

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne:

Bu çalışma jürimiz tarafından Mikrobiyoloji Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı	Prof.Dr.Şemsettin Ustaçelebi	(imza)
	Hacettepe Üniversitesi	

Tez Danışmanı	Prof.Dr.Burçin Şener	(imza)
	Hacettepe Üniversitesi	

Üye:	Prof. Dr.Tevfik Cengiz	(imza)
	Ankara Üniversitesi	

Üye:	Prof. Dr. Ruhi ALAÇAM	(imza)
	Hacettepe Üniversitesi	

Üye:	Prof. Dr. Dürdal Us	(imza)
	Hacettepe Üniversitesi	

ONAY:

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

(imza)

Prof. Dr. Hakan S. Orer
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yazar, bu çalışmanın gerçekleşmesine katkılarından dolayı, aşağıda adı geçen kişi ve kuruluşlara içtenlikle teşekkür eder.

Sayın Prof. Dr. Burçin Şener, tez danışmanım olarak çalışmaya yol gösterici katkılarda bulunmuş, çalışmada kullanılan izolatların temininde yardımcı olmuştur.

Sayın Prof. Dr. Şemsettin Ustaçelebi, tez çalışmam sırasında yol gösterici katkılarda bulunmuştur.

Sayın, Prof. Dr. Gülşen Haşçelik, tez çalışmam sırasında kullandığım izolatların temininde yardımcı olmuştur.

Sayın Prof. Dr. Deniz Gür, tez çalışmam sırasında yol gösterici katkılarda bulunmuş, çalışmada kullanılan pozitif kontrol izolatlarının temininde yardımcı olmuştur.

Sayın Doç. Dr. Özgen Köseoğlu Eser, tez çalışmam sırasında uygulanan moleküler yöntemler ile ilgili deneyimlerini benimle paylaşmıştır.

Sayın M. Sc. Pınar Yurdakul, tez çalışmam sırasında, uygulanan moleküler yöntemler ile ilgili deneyimlerini benimle paylaşmıştır.

Sayın Dr. Gül Bahar, tez çalışması sırasında kullanılan pozitif izolatların temininde yardımcı olmuştur.

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

ÇAKAR, A., Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri'nde ayrıştırılan *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında metallo-beta-laktamaz enziminin fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2005. *Pseudomonas aeruginosa* hastane enfeksiyonlarının en başta gelen nedenlerinden biridir. *P.aeruginosa*'nın pek çok antibiyotiğe dirençli olması tedavide ciddi bir sorun yaratmaktadır. Metallo-beta-laktamaz enzimleri karbapenemlerin de içinde bulunduğu monobaktamlar hariç tüm beta-laktam antibiyotiklere direnç gelişiminden sorumlu enzimlerdir. Metallo-beta-laktamaz enzimini kodlayan genler sınıf 1 integronlar içindeki gen kasetlerinde bulunmaktadır. Gen kasetleri bölgeye özgü rekombinasyon sistemiyle farklı integronlara taşınabilmekte, böylece direnç genlerinin bakteriler arası yayılımına neden olmaktadır. Bu çalışmanın amacı, çeşitli klinik örneklerden ayrıştırılan *P.aeruginosa* izolatlarında metallo-beta-laktamaz enzimini fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırmaktır. Bu amaçla, seftazidim ve/veya imipenem dirençli 110 *P.aeruginosa* izolatı çalışmaya alınmıştır. Çalışmaya alınan izolatların 66'sında (%60) çoklu ilaç direnci gözlenmiştir. Metallo-beta-laktamazın fenotipik tayininde beş fenotipik test uygulanmış, ayrıca imipenem hidrolizi deneyi gerçekleştirilmiştir. Fenotipik test sonuçlarını doğrulamak amacıyla iki primer seti kullanılarak PCR analizi yapılmıştır. PCR analiz sonuçlarına göre, çalışmaya alınan 110 izolatın 11'inde metallo-beta-laktamaz geni saptanmış, metallo-beta-laktamaz sıklığı %1.5 olarak belirlenmiştir. Fenotipik testlerin metallo-beta-laktamaz tayininde yeterli olmadığı görülmekle birlikte, PCR sonucu ile en uyumlu testin kombine disk sinerji testi olduğu gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *P.aeruginosa*, metallo-beta-laktamaz, integron, gen kaset

Destekleyen Kurumlar: H.Ü.B.A.B. 03.D02.101.012

ABSTRACT

ÇAKAR, A., Identification of metallo-beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in Hacettepe University Hospitals by phenotypic and genotypic methods, Hacettepe University Health Sciences Institute PhD Thesis in Microbiology, Ankara, 2005. *Pseudomonas aeruginosa* is a leading cause of nosocomial infections and is resistant to many antibiotics posing serious problems for therapeutic regimens. Metallo-beta-lactamases are the enzymes which cause resistance to all beta-lactam agents except monobactams. Metallo-beta-lactamase genes are carried in gene cassettes located in class1 integrons. Identification of metallo-beta-lactamase in clinical microbiology laboratories is very important. The aim of this study is to identify metallo-beta-lactamase enzyme in clinical *P.aeruginosa* isolates by phenotypic and genotypic methods. For this purpose, 110 *P.aeruginosa* isolates resistant to ceftazidime and/or imipenem were included in this study. Antibiotic susceptibility of the isolates and presence of metallo-beta-lactamase production were investigated by phenotypic and genotypic tests. From a total of 110 *P.aeruginosa* isolates, 66 (60%) were found multiple drug resistant. For identification of metallo-beta-lactamase, five phenotypic tests were performed. Also crude extract of isolates were tested for the presence of EDTA-inhibitable carbapenemase activity revealed the presence of imipenemase activity. In order to confirm the results of phenotypic tests, PCR analysis were performed. According to the PCR analysis 11 isolates were found metallo-beta-lactamase positive, and the prevalence of metallo-beta-lactamase was determined as 1.5%. Although phenotypic tests are not sufficient to detect metallo-beta-lactamase phenotypically, according to the PCR analysis, the most suitable test which can be used is combined disk diffusion test. The results of this study reveal that metallo-beta-lactamase are prevalent among *P.aeruginosa* isolates.

Keywords : *P.aeruginosa*, metallo-beta-lactamase, integron, gene cassette
 Supported by : H.Ü.B.A.B. 03.D02.101.012

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	vi
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
2.1.1 Morfoloji, Biyokimyasal ve Kültür Özellikleri	3
2.1.2 Epidemiyoloji	4
2.1.3 Virülans Faktörleri	5
2.1.3.1 Konak Faktörleri	5
2.1.3.2 Bakteriyel Faktörler	6
2.1.4 <i>P.aeruginosa</i> 'nın Neden Olduğu Enfeksiyon Hastalıkları	8
2.1.5 Laboratuvar Tanısı	9
2.1.6 <i>P.aeruginosa</i> Enfeksiyonlarının Tedavisi	9
2.2 <i>P.aeruginosa</i> 'da İlaç Direnci	10
2.2.1 Atım Pompaları	10
2.2.2 Dış Membran Geçirgenliği	12
2.2.3 Beta-laktamazlar	13
2.2.3.1 <i>P.aeruginosa</i> 'da Bulunan Beta-laktamazlar	15
2.2.4 Karbapenemleri Hidrolize Edebilen	16

	Beta-laktamazlar	
2.2.4.1	Serin Beta-laktamazlar	17
2.2.4.2	Metallo-beta-laktamazlar	18
2.2.4.2.1	Metallo-beta-laktamazların Sınıflandırılması	18
2.2.4.2.2	Kromozomal Kökenli Metallo-beta-laktamazlar	19
2.2.4.2.3	Metallo-beta-laktamazların Transferinde	19
	Kullanılan Genetik Sistemler	
2.2.4.2.4	Metallo-beta-laktamazların	21
	Biyokimyasal Özellikleri	
2.2.4.2.5	Transfer Edilebilen Metallo-beta-laktamazlar	23
2.2.4.2.5.1	IMP Benzeri Metallo-beta-laktamazlar	23
2.2.4.2.5.2	VIM Benzeri Metallo-beta-laktamazlar	27
2.2.4.2.5.3	SPM-1	30
2.2.4.2.5.4	GIM-1	31
2.2.4.2.6	Deneyisel Metallo-beta-laktamaz İnhibitörleri	31
2.2.4.2.7	Metallo-beta-laktamazların Tanısı	32
2.2.4.2.8	Tedavi	32
	GEREÇ VE YÖNTEM	34
3.1	<i>P.aeruginosa</i> izolatları	34
3.2	İzolatların Antibiyotik Duyarlılıklarının Saptanması	34
3.3	Metallo-beta-laktamazların Fenotipik Olarak Tanımlanması	37
3.3.1	Çift Disk Sinerji Testi	37
3.3.2	Kombine Disk Sinerji Testi	37
3.3.3	E-test	38
3.3.4	“Modifiye Hodge Testi”	38
3.3.5	Çinko İle Zenginleştirilmiş “Modifiye Hodge Test”	39
3.3.6	İmipenem Hidrolizi	39
3.4	Metallo-beta-laktamaz Enziminin PCR Analizi İle Saptanması	40

3.4.1	Kalıp DNA Hazırlanması	41
3.4.2	PCR İle Çoğaltma	41
3.4.3	Agaroz Jel Elektroforezi İle Bantların Okunması	42
3.5	PCR Pozitif İzolatların Genotipik Benzerliğinin Araştırılması	43
3.6	İstatistiksel Yöntemler	44
	BULGULAR	45
4.1	İzolatlar	45
4.2	<i>P.aeruginosa</i> İzolatlarına Ait Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları	46
4.3	Metallo-beta-laktamaz Tayininde Kullanılan Fenotipik Testler	49
4.3.1	Çift Disk Sinerji Testi Sonuçları	49
4.3.2	E-test Sonuçları	49
4.3.3	Kombine Disk Sinerji Testi Sonuçları	50
4.3.4	“Modifiye Hodge Test” Sonuçları	52
4.3.5	Çinko İle Zenginleştirilmiş “Modifiye Hodge Test” Sonuçları	52
4.3.6	İmipenemin Metallo-beta-laktamaz Tarafından Hidrolize Edilmesi	52
4.4	Metallo-beta-laktamaz Enziminin Genotipik Yöntemle Gösterilmesi	53
4.5	<i>bla_{VIM}</i> Geni Bulunduran İzolatların Genotipik Benzerliği	54
	TARTIŞMA	63
	SONUÇLAR	85
	KAYNAKLAR	87

SİMGELER VE KISALTMALAR

dNTP	Deoksinükleotit trifosfat
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
MBL	Metallo-beta-laktamaz
MHA	Mueller Hinton Agar
MHB	Mueller Hinton Buyyon
MİK	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MgCl ₂	Magnezyum klorür
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
PCR	Polymerase chain reaction (Polimeraz zincir tepkimesi)
Taq	Thermus aquaticus
TE	Tris, EDTA
Tris	Trihidroksietanolamin
UVP	Ultraviyole transillüminatör
AP-PCR	Arbitrarily primed polymerase chain reaction

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1 Metallo-beta-laktamaz genel yapısı	21
2.2 Metallo-beta-laktamaz hidroliz mekanizması	22
2.3 IMP benzeri enzimlerin filogenetik sınıflandırması	26
2.4 VIM benzeri enzimlerin filogenetik dağılımı	30
4.1 Çift disk sinerji testi	57
4.2 E-test	58
4.3 E-test (“ghost zone”)	58
4.4 Kombine disk sinerji testi	59
4.5 “Modifiye Hodge Test”	60
4.6 İzolatlara ait <i>bla_{VIM}</i> geninin 1. primer seti ile agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü	61
4.7 İzolatlara ait <i>bla_{VIM}</i> geninin 2. primer seti ile agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü	62

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1 <i>P.aeruginosa</i> 'da tanımlanmış ilaç pompaları ve hedef aldıkları antibiyotikler	11
2.2 Beta-laktamaz enzimlerinin sınıflandırması.	14
2.3 İlk bulunan IMP tipi metallo-beta-laktamazların ülkelere, bakteri türü ve bulunduğu integron sınıfına göre dağılımları	24
2.4 İlk bulunan VIM benzeri metallo-beta-laktamazların ülkelere, bakteri türü ve bulunduğu integron sınıfına göre dağılımları .	29
3.1 NCCLS tarafından <i>P.aeruginosa</i> için bildirilen breakpoint değerleri.	36
4.1 Çalışmaya alınan 110 <i>P.aeruginosa</i> izolatının disk difüzyon yöntemiyle imipenem ve seftazidim duyarlılıklarının hasta gruplarına göre dağılımı.	45
4.2 Çalışmaya alınan 110 <i>P.aeruginosa</i> izolatının ayrıştırıldığı örneklerin gönderildikleri bölümlere göre dağılımı.	46
4.3 Çalışmaya alınan 110 <i>P.aeruginosa</i> izolatının agar dilüsyon yöntemiyle siprofloksasin, seftazidim, meropenem, imipenem, tobramisin ve sefaperazon sulbaktam MİK ₅₀ ve MİK ₉₀ değerleri ile direnç yüzdelerinin hasta gruplarına göre dağılımı.	48
4.4 Çalışmaya alınan 110 <i>P.aeruginosa</i> izolatının disk difüzyon yöntemiyle aztreonam duyarlılıklarının hasta gruplarına göre dağılımı.	49
4.5 Çift disk sinerji testi ile fenotipik olarak metallo-beta-laktamaz pozitif ve negatif bulunan izolatların hasta gruplarına göre dağılımı.	49
4.6 E-test çalışılan 84 <i>P.aeruginosa</i> izolatının E-test ve kombine disk sinerji testi sonuçlarının değerlendirilmesi ve sonuçların hasta gruplarına göre dağılımı.	50
4.7 E-test uygulanan 84 izolatın çift disk sinerji testi ve kombine disk sinerji testi sonuçları .	51
4.8 Hidroliz deneyi ile metallo-beta-laktamaz açısından pozitif bulunan sekiz izolatın fenotipik ve genotipik özellikleri	55
4.9 İki primer seti kullanılarak yapılan PCR analizinde <i>bla_{VIM}</i> genleri	56

açısından pozitif bulunan 11 izolatın özellikleri.

GİRİŞ

Beta-laktam antibiyotiklere karşı gelişen dirençte en önemli mekanizma bu antimikrobiyal ajanların beta-laktamazlar tarafından hidrolize edilmesidir. Karbapenem grubu antibiyotikler diğer beta-laktam ajanlara göre daha geniş substrat profiline sahip olmaları, çoğu serin beta-laktamazlar tarafından hidroliz olmamaları nedeniyle tedavide tercih edilen ajanlardır. Ancak penisilin ve sefalosporinlerin yanı sıra karbapenemleri de hidroliz edebilen beta-laktamazlar bulunmaktadır. Karbapenemleri hidroliz edebilen en önemli enzimler sınıf B'de yer alan metallo-beta-laktamazlardır. *P.aeruginosa* ve *Acinetobacter spp* gibi nonfermenter bakterilerde saptanan metallo-beta-laktamazlar son yıllarda *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde de saptanmaya başlanmıştır. Aktif bölgelerinde çinko iyonu bulunan, beta-laktamaz inhibitörleriyle inaktive olmayan ve geniş substrat profiline sahip olan metallo-beta-laktamazları kodlayan genler kromozom veya plazmit üzerinde bulunan integronlar içindeki gen kasetlerinde bulunmaktadır. İntegronların plazmit veya transpozon aracılığıyla bakteriden bakteriye taşındığı saptanmıştır. Metallo-beta-laktamaz genlerini taşıyan gen kasetleri sınıf 1 integronda taşınmaktadır. Nonfermenter bakterilerde ve gram negatif basillerde en sık bulunan integronlar sınıf 1 integron olup metallo-beta-laktamaz genleri dışında aminoglikozit, sulfonamit, antiseptik ve dezenfektanlara direnci kodlayan gen kasetlerini de taşıyabilmektedir (1).

Japonya'da 1991 yılında bir *P.aeruginosa* izolatında metallo-beta-laktamaz saptanmış ve ilerleyen yıllarda önceleri Japonya başta olmak üzere Asya ülkelerinde daha sonra Avrupa ve Latin Amerika ülkelerinde metallo-beta-laktamaz üreten izolatlar rapor edilmeye başlanmıştır (2). Ülkemizde metallo-beta-laktamaz ilk kez bir *P.aeruginosa* izolatında saptanmış ve 2004 yılında rapor edilmiştir (3). IMP, VIM, SPM ve GIM olmak üzere dört grup metallo-beta-laktamaz enzimi bulunmaktadır. SPM dışında diğer enzimleri kodlayan genlerin integronda taşınıyor olması karbapenem direncinin yayılımını kolaylaştırmaktadır. Direnç yayılımını sınırlamak ve tedaviye yön vermek amacıyla metallo-beta-laktamazların rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında tespit edilmesi gerekmektedir. Ancak halen rutin

mikrobiyoloji laboratuvarlarında güvenilirliği onaylanmış ve standardize edilmiş bir test yoktur (4).

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri'nde 1998-2004 yılları arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen *P.aeruginosa* suşlarında metallo-beta-laktamaz varlığını araştırmak ve metallo-beta-laktamaz tayininde kullanılabilecek fenotipik testleri karşılaştırmak amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda çalışmaya alınan izolatlara metallo-beta-laktamaz tanımlamasında kullanılan fenotipik testler uygulanmış, sonuçlar moleküler test olan polimeraz zincir reaksiyonu ile doğrulanmıştır.

GENEL BİLGİLER

2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Klinik açıdan önem taşıyan aerob, gram-negatif basillerin %10 -%15'ni aerob, nonfermenter bakteriler oluşturmaktadır. Bu grup içerisinde yer alan *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) bitkilerde, hayvanlarda ve insanlarda enfeksiyonlara neden olabilen, önemli bir fırsatçı patojendir (5).

2.1.1 Morfoloji, Biyokimyasal ve Kültür Özellikleri

Gram-negatif, 1-3 µm boyunda, 0.5-1 µm eninde olan bu bakteri, *Pseudomonadaceae* ailesi içindeki en patojen türdür. Kültürlerde piyosyanin adı verilen çözünür fenazin pigmenti üretmesi en önemli özelliklerinden biridir. Piyosyanin dışında bakteri kırmızı pigmentten sorumlu piyorubin, siyah pigmentten sorumlu piyomelanin veya sarı-yeşil ya da yeşil-kahverengi renk veren piyoverdin pigmenti içerebilir. Piyosyanin ve piyoverdin pigmentlerinin bulunduğu bakteri izolatları kültür ortamında yeşil-mavi koloniler oluşturur (6).

Pek çok karbon kaynağını kullanabilmesi *P. aeruginosa*'ya kompleks besiyerlerinin yanı sıra basit besiyerlerinde de üreyebilme avantajı sağlar. Kültürlerde değişik koloni morfolojilerinde görülebilir. Bakterinin bazı türlerinin sentezlediği bir tür hücre dışı polisakkarit olan aljinat koloniye mukoid özellik vermektedir. Kronik obstrüktif pulmoner hastalığı olan hastalardan, üriner katatere bağlı kronik enfeksiyonlardan ve kistik fibrozisli hastalardan ayrıştırılan izolatlar sıklıkla mukoid koloni (M koloni) tipi oluşturmaktadır. Çevreden ve hastane enfeksiyonlarından ayrıştırılan izolatlar genellikle mukoid koloniler oluşturmazlar. Mukoid olmayan suşlar düşük miktarda alginat oluşturmaları nedeniyle R koloni veya β-hemolizli S koloni şeklinde gözlenmektedir. *P.aeruginosa* zorunlu aerob olmakla birlikte nitrat içeren ortamlarda nitratı son elektron alıcısı olarak kullanabildiği için anaerob koşullarda da üreyebilmektedir. Diğer bir özelliği olan 42°C'de üreyebilmesi ile *P.putida* ve *P. fluorescens*' den ayrılır. *P.aeruginosa*,

oksidaz pozitif özellikte olup karbonhidratları fermente edememekle birlikte glukoz, fruktoz, ksiloz gibi şekerlerden asit oluşturabilmektedir (7).

2.1.2 Epidemiyoloji

P.aeruginosa ilk kez 1960' lı yıllarda immün sistemi baskılanmış hastalarda, yanıklı hastalarda ve kistik fibrozisli hastalarda enfeksiyona yol açması nedeniyle önemli bir insan patojeni olarak kabul edilmiştir. Halen akciğer, kan ve üriner sistem kaynaklı nozokomiyal bakteriyel enfeksiyonların en önemli etkenlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Çoklu antibiyotik direncine sahip olabilmesi bu bakterinin önemini daha da arttırmaktadır (8).

Hastane dışında toprakta, suda ve bitkilerde bulunabilen *P.aeruginosa* sağlıklı insanlarda kolonize olabilmektedir. Distile suda çözünmüş karbondioksiti, sülfürü, demir ve divalan katyonları karbon ve gerekli besin kaynakları olarak kullanabilmesi, 45-50°C'de üreyebilmesi bakteriye çevre koşullarında canlılığını sürdürebilme ve çoğalabilme yeteneğini sağlamaktadır. Toplumdan kazanılan enfeksiyonlarda kaynak genellikle nemli ortamlardır. Deri enfeksiyonları, ülseratif keratit, eksternal otit, tırnak enfeksiyonları, endoftalmit ve endokardit toplumdan kazanılmış enfeksiyonlara örnek olarak verilebilir. *P.aeruginosa* kolonizasyonu, sağlıklı kişilerin boğazında, nazal mukozada ve deride %7, dışkıda ise %24 olarak saptanmaktadır (9,10).

P.aeruginosa hastane ortamında hastaların aksilla, kulak, perineum gibi nemli bölgelerinde, ayrıca lavabo, tuvalet, duş başı gibi cansız nemli ortamlarda üreyerek kaynak oluşturabilir. Ayrıca su ile temas eden solunum cihazları, temizleme solüsyonları gibi hastane ekipmanlarında da üreyebilmektedir. *P.aeruginosa* sağlıklı kişilerin florasında az miktarda da olsa bulunabildiği için bu kişiler yoğun bakım ünitelerine yattıkları zaman endojen *P.aeruginosa* ciddi enfeksiyonların kaynağını oluşturabilmektedir. *P.aeruginosa*'ya bağlı hastane enfeksiyonları genellikle mekanik ventilasyon yapılan olgularda, yanık olgularında, kemoterapi veya cerrahi girişimde bulunan hastalarda gelişmektedir (11,12). *P.aeruginosa*'ya bağlı gelişen hastane enfeksiyonlarının insidansında son 30 yılda değişim olmadığı tespit edilmiştir. Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans Sistemi bünyesinde 1992-1997 yılları arasında yapılan araştırmada, *P.aeruginosa* bakteriyemi olgularının

%3'ünden, pnömonilerin %21'inden (en sık izole edilen etken), üriner sistem enfeksiyonlarının %10'undan (en sık izole edilen 4. etken), göz, kulak, burun, boğaz enfeksiyonlarının %13'ünden (en sık izole edilen 3. etken) ve kardiovasküler enfeksiyonların %5'inden izole edilmektedir (13).

2.1.3 Virülans Faktörleri

P.aeruginosa pek çok virülans faktörüne sahiptir. Virülans faktörlerinin rolü ve önemi, doğal ve kazanılmış bağışık yanıt ve enfeksiyonun olduğu vücut bölgesi gibi bazı konak faktörleri tarafından etkilenir. Virülans faktörleri ile konak faktörleri arasındaki bu denge enfeksiyonun hafif veya ağır geçmesini belirleyen kriterdir.

2.1.3.1 Konak Faktörleri

Enfeksiyon hastalığı gelişiminde kişinin immün durumu büyük önem taşımaktadır. Bütünlüğü korunan deride enfeksiyon hastalığı meydana gelmezken, yara veya yanık bölgesine yerleşen bakteri bu bölgelerde çoğalarak kana geçebilir. Mukozal bariyer fonksiyonlarının kaybı *P.aeruginosa*'yı önemli bir patojen haline getirmektedir. Gözde korneal mukoza ve epitel yüzeyde meydana gelen fiziksel hasar bakteri için fırsat oluşturmaktadır. Benzer şekilde gastrointestinal sistem ve orofarenks normal florası ile mukus, enfeksiyonlara karşı koruyucu rol üstlenir. Doğal bağışıklık sisteminin bu önemli öğeleri kanser kemoterapisi, antibiyotik kullanımı, üst solunum yolunda endotrakeal tüp kullanımı gibi nedenler ile hasara uğrayabilir ve bu nedenle doğal bağışıklık sistemi görevini yerine getiremez. Mukozal yüzeylerde ve kanda bulunan kompleman ve kollektinler gibi çözünür faktörler opsonizasyonun meydana gelmesini sağlayarak fagositozun etkisini arttırmaktadır. Bu çözünür faktörlerdeki çeşitli nedenlerle ortaya çıkabilecek bozukluklar konağı bakteri karşısında zayıf duruma düşürür. Konak savunma mekanizmasında önemli etmenlerden olan IL-1, TNF- α , IL-4, IL-6, IL-9, IL-10, IL-18, TGF- β ve nitrik oksit gibi sitokin, kemokin ve oksijen radikalleri, bir taraftan enfeksiyonun üstesinden gelmeye çalışırken diğer taraftan patojenin yoğunluğuna bağlı olarak enflamasyona yol açar ve doku hasarına neden olabilirler. Doğal olarak bağışıklık sisteminde önemli bir yer tutan mediyatörlerin daha az ortaya çıkmasına

neden olan faktörler, enfeksiyonu kolaylaştırabildiği gibi daha az enflamasyona neden olarak enfeksiyonun kronikleşmesine yol açabilir (14).

2.1.3.2 Bakteriyel Faktörler

Adezinler: *P.aeruginosa*'da yüzeylere tutunmada rol alan pek çok adezin mevcuttur. Bakterinin uç kısımlarında bulunan pili, konak dokulara adezyondan sorumlu olduğu gibi abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşumunda rol alan faktörlerden biridir. Bakteride bulunabilen tek polar flajel hareket ve adezyondan sorumlu olup çevreden ve hastane enfeksiyonlarından izole edilen izolatlarda çoğunlukla bulunurken, kistik fibrozisli hastalardan ve kronik enfeksiyonu olan hastalardan izole edilen izolatların çoğunda bulunmamaktadır. Dış membran proteinlerinden OmpF bakterinin memeli hücrelerde bulunan heparin proteoglikanı bir reseptör olarak kullanmasını sağlar. Bu adezinlere ek olarak *P.aeruginosa*'nın hücrelere bağlanmada kullandığı diğer adezinler arasında lipopolisakkarit, PA-IL ve PA-IIL gibi lektin benzeri moleküller de sayılabilir (15,16,17) .

Proteazlar: LasA proteaz, elastaz, alkalın proteaz ve proteaz IV *P.aeruginosa*'da bulunabilen proteaz çeşitleridir. Genel olarak proteazlar, hücrelere sitotoksik etki gösterir ve doku yapılarının degradasyonuna yol açar (18).

Lipopolisakkarit: *P.aeruginosa* izolatlarında bulunan uzun “O” yan zincirleri komplemanın litik etkisini önlemektedir (19).

Demir alımı: Demir seviyesi *P.aeruginosa*'da Krebs siklusu ve oksidatif stres altında canlılığını sürdürebilmesi için gerekli genlerin regülasyonu gibi çeşitli fonksiyonların oluşmasında önem taşımaktadır. Ayrıca demir seviyesi virülansta rol oynayan genlerin regülasyonunda da önemli bir yere sahiptir. Bakteride piyoverdin ve piyoşelin pigmentlerinin kullanıldığı iki demir alım sistemi bulunmaktadır (20).

Toksinler: *P.aeruginosa* farklı fonksiyonlara sahip çeşitli toksinler üretebilmektedir. Ekzotoksin A majör hücrel toksin olup, protein sentezini inhibe ederek lokal ve sistemik patolojide rol alan bir toksindir. Ilımlı faj tarafından kontrol edilen sitotoksin nadir suşta görülmektedir (21). Fosfolipaz C, eritrosit hemolizi, fosfotidilkolin ve spingomyelin hidrolizine neden olurken, hemolitik olmayan fosfolipaz C fosfotidilkolin ve fosfotidilserin hidrolizine neden olmaktadır (22).

Diğer bir toksin olan rhamnolipid ise, eritrositlerin hemolizine neden olurken aynı zamanda hücre duvarını da parçalayabilme özelliğine sahiptir (23).

Tip III sekresyon sistemi: Ekzoenzim S, ekzoenzim T, ekzoenzim U ve ekzoenzim Y olmak üzere dört proteinden oluşan bu sistem ökaryotik hücrelere bakteriyel toksinlerin direk enjeksiyonunu sağlamaktadır. Bu sistem protein sentezi üzerine etki göstererek hücrenin iskelet sistemini bozmakta, akut enfeksiyon geçiren hastalarda mortalitenin artmasına neden olmaktadır (24).

Piyosiyanin: *P.aeruginosa*’nın ürettiği pigmentlerden biri olan piyosiyanin özellikle akciğerde epitel ve endotel hücre hasarından kısmen sorumludur. Piyosiyanin hidrojen peroksit ve süperoksit gibi oksijen radikalleri üreterek hücreye zarar verir. Ayrıca nazal silliaların fonksiyonunun bozulmasına neden olur. Piyosiyanin memeli hücresi tarafından oksijen radikallerini nötralize etmek için oluşturulan katalaz aktivitesini inhibe eder (25).

“Quorum-sensing”(QS): “Quorum-sensing” bakterinin çevresinde bulunan kendi türüne ait popülasyon yoğunluğunu saptamasına yarayan bir sistemdir. Bakteri popülasyonu belirli bir yoğunluğa ulaştığında özel sinyal molekülleri sayesinde bakterinin metabolizmasında birtakım değişikliklere neden olmakta ve bazı genlerin ekspresyonu meydana gelmektedir. *P.aeruginosa*’da şimdiye kadar tanımlanmış iki QS sistemi bulunmaktadır. Bu sistemler *P.aeruginosa*’da virülanstan sorumlu genlerin ekspresyonunda rol oynamaktadır. QS sistemi tarafından regüle edilen virülans faktörleri arasında elastaz, alkalen proteaz, hemolizin, rhamnolipid ve ekzotoksin A sayılabilir. Bu sistem aynı zamanda *P.aeruginosa*’nın patogeneğinde son derece önemli olan biyofilm oluşumunda da rol oynamaktadır (26).

Biyofilm oluşumu: *P.aeruginosa* özellikle kistik fibrozis hastalarının akciğerlerinde biyofilm oluşturma özelliğine sahiptir. Biyofilm oluşumu bakterinin katı yüzeye tutunmasıyla başlar. Bu aşamayı takiben bakteri bir taraftan hızla çoğalmaya, diğer taraftan ekzopolisakkaritten ibaret bir kılıf oluşturmaya başlar. Biyofilmi oluşturan bakteriler fenotipik ve metabolik olarak değişime uğradıkları için çevre koşullarına ve antibiyotiklere dirençli hale gelir (27).

2.1.4 *P.aeruginosa*'nın Neden Olduğu Enfeksiyon Hastalıkları

Endokardit: *P.aeruginosa* intravenöz ilaç kullananların doğal kalp kapaklarında ve protez kapaklarında enfektif endokardite neden olur.

Solunum sistemi enfeksiyonları: *P.aeruginosa* ile alt solunum yolu enfeksiyonları daha çok, konağın lokal solunum ve sistemik savunmasında hasar olduğunda görülür. *Pseudomonas* kaynaklı kronik akciğer enfeksiyonları, anormal solunum yolları sekresyonunun olduğu genetik bir hastalık olan kistik fibrozisli hastalarda sıklıkla ortaya çıkmaktadır.

Bakteriyemi: *P.aeruginosa* bakteriyemisi, hastanede kazanılan primer gram negatif bakteriyemiler içinde dördüncü sıklıktadır. Primer enfeksiyon bölgeleri solunum, gastrointestinal ve üriner yollar, deri ve yumuşak dokular, damar ve çevresi odaklardır.

Merkezi sinir sistemi enfeksiyonları: *P.aeruginosa* menenjit ve beyin abselerine yol açar. *P.aeruginosa* kanser hastalarında *Listeria monocytogenes*' den sonra ikinci sıklıkta menenjit etkeni, *Escherichia .coli*' den sonra ikinci sıklıkta beyin apsesi etkeni olarak bulunmuştur.

Kulak enfeksiyonları: *P.aeruginosa*, çok nadir olarak sağlıklı görünen bireylerin kulağında bulunabilir. Ancak zedelenme, enflamasyon veya basit olarak nemlilik yaratan ortamlarda dış kulak yoluna yerleşir. Ayrıca orta kulak enfeksiyonu veya dış kulak yolu enfeksiyonlarından sonra mastoidit gelişebilir. Bu hastaların çoğunda diabetes mellitus veya bağışıklık sistemini etkileyen başka bir hastalık bulunmaktadır.

Göz enfeksiyonları: *P.aeruginosa*, bakteriyel kornea ülseri, keratit ve endoftalmite sık neden olan etkenlerdendir.

Kemik ve eklem enfeksiyonları: Enfeksiyon doğrudan kemik ve eklemlerde başlar ya da kan yoluyla yayılım olur. Kan kaynaklı enfeksiyonlar ilaç bağımlılarında siktir. Cerrahi uygulamalar ve yumuşak doku enfeksiyonları sonucunda da sıklıkla *P.aeruginosa*'ya bağlı kemik ve eklem enfeksiyonları gelişir.

Üriner enfeksiyonlar: Genellikle hastanede kazanılır. Üriner kateterizasyon, cerrahi ve böbrek transplantasyonu ile ilişkilidir. Hastanede kazanılmış üriner sistem enfeksiyonlarının %11,7'sinden sorumlu olan *P.aeruginosa* , *E.coli* ve enterokoklardan sonra üçüncü sıklıkla izole edilen etkindir.

Gastrointestinal enfeksiyonlar: *P.aeruginosa* çocuklarda orta şiddette diyareye neden olurken bebeklerde daha ağır tablolara, öldürücü nekrotizan enterokolite neden olabilir.

Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları: *P.aeruginosa*'ya bağlı bakteriyemi sırasında tipik olarak **ektima gangrenosum** denilen deri lezyonları gelişebilir. Ayrıca bakteriyemi sırasında derialtı nodülleri, derin apseler, selülit, veziküler veya püstüler lezyonlar, büller görülebilir. Yatkınlık yaratan durumlar yanık, travma, dekubit ülserleri ve dermatitlerdir (28,14).

2.1.5 Laboratuvar Tanısı

P.aeruginosa izolasyonunda alınacak örnek, enfeksiyonun yerine göre değişmek üzere balgam, idrar, pü, beyin omurilik sıvısı, yanık sürüntüleri vb. olabilir. *P.aeruginosa*'yı kültürde üretmek amacıyla %5 koyun kanlı agar ve seçici bir besiyeri olan MacConkey agar kullanılmaktadır. Koloni morfolojisi, varsa pigment oluşumu ve üzüm benzeri kokusuyla çoğu zaman kolaylıkla tanımlanabilmektedir. Koloniler genellikle basık, R koloni formundadır. Ancak S koloni veya M koloni formunda koloni varyantları da oluşturabilmektedir. M koloni varyantları genellikle kistik fibrozisli hastaların balgam örneklerinde tanımlanmaktadır. Oksidaz pozitif olması, üç şekerli demirli besiyerinde fermentatif etki göstermemesi, 42°C'da üreyebilmesi ve Mueller-Hinton agarda çoğunlukla pigmentinin gözlenmesi tanı koydurucu özelliklerdir. Pigment oluşturmayan *P.aeruginosa* suşları da bulunabilmektedir. Bu suşların tanımlanması amacıyla glukoz oksidasyonu, asetamid hidrolizi ve nitratların nitrojen gazına redüksiyonu testleri yapılarak tanı konmaktadır. Rutin laboratuvarlarda uygulanan konvansiyonel biyokimyasal testlerin yanında tanımlamada kullanılabilen ticari otomatize sistemler de bulunmaktadır. Bu sistemler tanımlamayı ortalama %90 doğru yapmakta ve sonuçlar 4-48 saatte alınabilmektedir (29).

2.1.6 *P.aeruginosa* Enfeksiyonlarının Tedavisi

P.aeruginosa ile gelişen enfeksiyonlarda, bakterinin hızla direnç geliştirebilme olasılığı ve tedavide yeterince başarı sağlanamaması nedeniyle tedavinin tek bir antimikrobiyal ajan kullanılarak yapılması önerilmemektedir. En sık tercih edilen aminoglikozit ile penisilin grubundan bir ajanın kombine edilerek

kullanılmasıdır. *P.aeruginosa*' ya etkili olan diğer ajanlar arasında sefalosporinler, aztreonam, imipenem ve siprofloksasin sayılabilir. Sefalosporin grubu ajanlar içinde seftazidim, sefoperazon ve sefepim *P.aeruginosa*' ya en etkili olan türevlerdir. Ancak *P.aeruginosa*' nın duyarlılık paterninin coğrafik değişim göstermesi nedeniyle tedavi öncesi mutlaka duyarlılık testlerinin yapılması gerekmektedir (18,14).

2.2 *P.aeruginosa*' da İlaç Direnci

Son yıllarda yapılan çalışmaların sonuçlarına göre *Enterobacteriaceae* ailesi, *Acinetobacter* türleri ve *P. aeruginosa*' da saptanan kinolon direnci ve geniş spektrumlu beta-laktam ajanlara karşı gelişen direnç nedeniyle bu mikroorganizmalarla gelişen enfeksiyonların tedavisinde büyük zorluklar yaşanmaktadır. Latin Amerika ülkelerini kapsayan çok merkezli bir çalışmada, 5 yıllık süre içinde karbapenemlerin de içinde bulunduğu antipseudomonal ajanlara karşı direncin yıllara göre artış gösterdiği ve direnç oranının %40' a ulaştığı belirlenmiştir (30).

P.aeruginosa' da pek çok antibiyotiğe karşı intrinsik direnç bulunmaktadır. Bu intrinsik çoklu ilaç direncinin nedenleri arasında; ilaç atım pompaları, dış membran geçirgenliğinin düşük olması ve kromozomal indüklenebilir ya da dereprese AmpC beta-laktamaz enzimlerinin varlığı sayılabilir. *P. aeruginosa*'da beta-laktam ajanlara, özellikle karbapenemlere karşı dirençte rol alan en önemli kazanılmış direnç mekanizması ise metallo-beta-laktamazlardır(MBL) (31).

2.2.1 Atım Pompaları

Çoklu ilaç direncine neden olan mekanizmalardan biri ilaç atım pompalarıdır. *P.aeruginosa*' da 12 ilaç atım pompası olup, şu anda altı tanesi tanımlanmıştır. Tanımlanmış ilaç atım pompaları ve hedef aldıkları antibiyotikler Tablo 2.1'de verilmektedir.

Tablo 2.1 *P.aeruginosa*'da tanımlanmış ilaç atım pompaları ve hedef aldıkları antibiyotikler

Atımpompası	Hedef antibiyotik	Referans
MexAB-OprM	Beta-laktam, kinolon, kloramfenikol, tetrasiklin, trimetoprim-sulfametoksazol	41,42
MexCD-OprJ	Sefpirom, kinolon, kloramfenikol, tetrasiklin	36, 47
MexEF-OprN	İmipenem, kinolon, tetrasiklin	41, 48
MexXY	Aminoglikozit, tetrasiklin, makrolit	49, 50
MexJK	?	49, 50
MexGHIOpmD	?	49, 50

Üzerinde en fazla çalışılan ilaç atım pompası MexAB-OprM sistemidir. *mexAB-OprM* operonu üç pompa alt birimini kodlamaktadır. MexB intrinsik iç membran proteinidir. MexA iç membrana bağlı periplazmik bir lipoproteindir. OprM ise dış membranda bulunan bir lipoproteindir (32,33). MexB'nin görevi ilacı sitoplazmik membrandan dışarı atmaktır. MexA, MexB ile dış membranda bulunan OprM arasında köprü görevi görmektedir. MexA proteinini kodlayan genin üzerinde *mexR* gen bölgesi bulunmaktadır (34). MexR proteini 147 aminoasitten oluşmakta olup *mexAB-OprM* operonunun operatör bölgesine bağlanarak ilaç atım pompasının transkripsiyonunu engellemektedir (35,36). *mexR* geninin farklı bölgelerinde meydana gelebilecek tek bir nokta mutasyonu, MexR' nin pompa üzerindeki inhibitör etkisini ortadan kaldırmakta ve ilaç atım pompasının aktif olarak işlediği *nalB* mutantların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (37,38,39).Yapılan bir çalışmada tedavi öncesi duyarlı olan *P.aeruginosa* izolatlarından bir kısmının tedavi sonunda dirençli hale geldikleri belirlenmiş, direnç gelişen izolatların bir kısmında ilaç atım pompasının aktif hale geldiği saptanmıştır. Bu bulgu, tedavi sırasında mutantların seçildiğine işaret etmektedir (40). MexAB-OprM ilaç atım pompası, başta beta-laktam ajanlar olmak üzere kinolon, kloramfenikol, tetrasiklin ve trimetoprim-sulfametoksazol direncine de neden olmaktadır (41,42). MexAB-OprM sistemi aktif olan suşların, meropenemin de içinde bulunduğu pek çok antibiyotiğe dirençli oldukları halde imipeneme karşı direnç geliştirmedikleri tespit edilmiştir. Bu

farkın en önemli nedeni ilaç atım pompasının substrat profilinden kaynaklanmaktadır. Meropenemin ikinci pozisyonunda hidrofobik yan zincir bulunmakta olup, ilaç atım pompası için uygun bir substrattır. İmipenem ise ikinci pozisyonunda bulunan hidrofilik yan zinciri nedeniyle MexAB-OprM sisteminin substratı değildir (43,44,45).

P.aeruginosa' da tanımlanmış diğer ilaç atım pompalarından biri de MexCD-OprJ sistemidir. Bu sistemi negatif yönde regüle eden gende meydana gelen mutasyonla *nfxB* mutantlar oluşmaktadır (46). MexCD-OprJ sistemi özellikle sefpirom, kinolon, kloramfenikol ve tetrasikline direnç gelişiminden sorumludur (36,47). Diğer bir sistem olan MexEF-OprN sisteminin aktif hale gelmesi ile oluşan *nfxC* mutantları ise imipenem, kinolon ve tetrasiklinlere direnç gelişiminden sorumludur (41,48). MexXY ilaç atım sisteminin, bazı *P.aeruginosa* izolatlarında MexAB-OprM sistemiyle beraber bulunduğu saptanmıştır. Bu sistem aminoglikozit, tetrasiklin ve makrolit direncinden sorumlu tutulmaktadır. Bu sistemler dışında *P.aeruginosa*'da tanımlanmış olan diğer iki sistem MexJK ve MexGHI-OpmD sistemleridir (49,50).

2.2.2 Dış Membran Geçirgenliği

P.aeruginosa' da görülen çoklu ilaç direncinin diğer bir nedeni dış membran geçirgenliğinin azalmasıdır. Karbapenem direncinde, dış membranda bulunan OprD proteinini kodlayan gende meydana gelen mutasyon ile OprD proteinin eksprese olmaması, bu ajanların bakteri hücrelerine girişini kısıtlamaktadır (51). OprD proteininin yokluğu, karbapenem grubu antibiyotikler içinde özellikle imipenem direncinin gelişmesinde son derece önemli bir rol oynamaktadır. Örneğin, OprD proteini olmayan izolatlarda, imipenem minimum inhibitör konsantrasyon(MİK) değerinin meropeneme göre dört kat arttığı belirlenmiştir Karbapenemlere karşı dirençte OprD kaybı önemli olmakla birlikte tek başına dirençte rol almadığı belirlenmiştir. Karbapenemlere karşı gelişen dirençte beta-laktamaz enzimlerinin de son derece önemli bir rolü bulunmaktadır (52).

2.2.3 Beta-laktamazlar

Beta-laktamazlar plazmit veya kromozomal kökenli bakteriyel enzimler olup, beta-laktam antibiyotikte bulunan beta-laktam halkası üzerine etki göstererek kovalent açıl ester oluşturan ve esterin hidrolizi sonucu antibiyotiği inaktif hale getiren enzimlerdir. Bakteride beta-laktamaz sentezi konstitif veya indüklenabilir düzeyde olabilir. Gram-negatif bakterilerde periplazmik alanda bulunan enzim, gram-pozitif bakterilerde hücre dışına salgılanmaktadır. Ambler tarafından 1980 yılında beta-laktamazların moleküler sınıflandırması yapılmıştır. Bu sınıflandırma Bush tarafından geliştirilmiş ve önceki sınıflandırmada kullanılan substrat profilleri geliştirilerek beta-laktamaz enzimleri dört grupta toplanmıştır. Beta-laktamaz enzimlerinin sınıflandırması Tablo 2.2’de verilmektedir.

Bu sınıflandırmaya göre, fonksiyonel grup 1’de bulunan enzimler C moleküler sınıfına ait kromozomal enzimler olup tercih ettikleri substrat sefalosporinlerdir. Grup 2’de yer alan enzimler moleküler sınıf A’da yer almakta olup penisilin, sefalosporin, oksimin beta-laktam, kloksasilin, karbenisilin veya karbapenemleri hidrolize edebilme özelliklerine göre altı alt gruba ayrılmaktadır. Kloksasilini hidrolize eden enzimler grup 2d’de toplanmış olup moleküler sınıf D’ de yer almaktadır. Grup 2’ de bulunan diğer enzimlerse moleküler sınıf A’da yer almaktadır. Grup 2 enzimleri içinde stafilokokal penisilinazlar, geniş spektrumlu plazmit kökenli beta-laktamazlar, beta-laktamaz inhibitörlerine dirençli enzimler ve karbapenemazlar bulunmaktadır. Grup 3’ de bulunan enzimler moleküler sınıf B’ de yer almakta, penisilin, sefalosporin ve karbapenemleri hidroliz edebilen metallo-beta-laktamazları içermektedir. Grup 4’ de yer alan enzimlerin henüz moleküler sınıfı belli değildir. Bu grupta bulunan enzimler penisilinleri hidroliz edebilmekte ve klavulanik asitle zayıf inhibe olmaktadır. Moleküler sınıf A, C ve D’ de bulunan enzimlerin aktif bölgelerinde serin aminoasiti bulunurken moleküler sınıf B’de yer alan enzimlerin aktif bölgelerinde en az bir çinko iyonu bulunmaktadır (53).

Tablo 2.2 Beta-laktamazların sınıflandırılması

BJM Grup	Moleküler Sınıf	Substrat	İnhibisyon		Örnek Enzim
			CA	EDTA	
1	C	Sefalosporinler	-	-	Gr(-)bakterilerin AmpC enzimleri
2a	A	Penisilinler	+	-	Gr(+)bakterilerin penisilinazları
2b	A	Penisilinler, Sefalosporinler	+	-	TEM-1,TEM-2,SHV-1
2be	A	Penisilin, dar ve geniş spektrumlu sefalosporinler, monobaktamlar	+	-	TEM-3 ile TEM-26 SHV-2 ile SHV-6
2br	A	Penisilinler	+/-	-	TEM-30 ile TEM-36
2c	A	Penisilin, karbenisilin	+	-	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	D	Penisilin, kloksasilin	+/-	-	OXA-1 ila OXA-11, PSE-2
2e	A	Sefalosporinler	+	-	<i>P.vulgaris</i> 'in indüklenebilir sefalosporinazları
2f	A	Penisilinler, Sefalosporinler, Karbapenemler	+	-	NMC-A, Sme-1
3	B	Monobaktam dışındaki betalaktamlar	-	+	Kromozomal MBL, IMP, VIM, SPM-1, GIM-1
4	ND	Penisilinler	-	?	<i>P.cepacia</i> 'nın penisilinazı

Kaynak 141'den alınmıştır. ND: Tanımlanmamış, CA: Klavulanik asit BJM :Bush, Jacoby, Medeiros.

2.2.3.1 *P.aeruginosa*'da Bulunan Beta-laktamazlar

P.aeruginosa'da pek çok tipte beta-laktamaz enzimi bulunabilmektedir. Kromozomal kökenli moleküler sınıf C'de bulunan AmpC enzimleri konstitif olabileceği gibi indüklenebilir tipte de olabilir ve mutasyona bağlı oluşan dereprese mutantlarda devamlı yüksek düzeyde enzim sentezi gelişebilir. *P. aeruginosa*'da bulunabilen diğer önemli enzimler grup 2 içinde yer alan geniş spektrumlu beta-laktamazlardır. *P.aeruginosa*'da bulunabilen geniş spektrumlu beta-laktamazlar TEM, SHV, OXA, PER, VEB, GES ve IBC enzimleridir. Bu enzimler substrat profilleri açısından benzerlik taşısa da aminoasit dizilimleri açısından oldukça farklıdır (54). SHV ve TEM benzeri enzimler plazmit kökenli olup *P.aeruginosa*'da nadir saptanmaktadır. SHV-2a Fransa'da, SHV-5 ve SHV-12 Tayland'da tanımlanmıştır (55,56). *P.aeruginosa*'da bulunan SHV enzimleri sefpirom gibi yeni geliştirilen sefalosporinlere yüksek afinite göstermektedir (57). TEM-4, TEM-21, TEM-24 ve TEM-42 Fransa'da az sayıda izolatta tanımlanmıştır (58,59,60). TEM benzeri enzimler dar spektrumlu penisilinleri, geniş spektrumlu sefalosporinleri ve monobaktamları hidroliz edebilmektedir (61). Oksasilinleri hidroliz edebilen enzimler(OXA-2, OXA-10, OXA-18) *P.aeruginosa*'da saptanan diğer enzimlerdir. Metallo-beta-laktamazlarla birlikte sınıf 1 integronlar içinde bulunan OXA enzimleri direncin yayılmasını kolaylaştırmaktadır (62).

Kromozomal kökenli olan PER-1 enzimi ilk defa Fransa'da 1991 yılında bir Türk hastadan izole edilmiştir (63). TEM ve SHV benzeri enzimleriyle %18-20 aminoasit benzerliği gösteren PER-1 dar spektrumlu penisilinlere, dar ve geniş spektrumlu sefalosporinlere yüksek afinite göstermektedir (64). Ülkemizde 1999 yılında yapılan bir araştırmada *P.aeruginosa* izolatlarının %11'inde PER-1 enzimi saptanmıştır (65).

VEB benzeri enzimler, diğer geniş spektrumlu enzimlerden aminoasit dizilimi açısından oldukça farklıdır. Kromozomal kökenli olan VEB benzeri enzimler substrat profili açısından PER-1 enzimine benzemektedir. Bu enzimler daha çok Asya ülkeleri'nden rapor edilmektedir (66).

Diğer bir geniş spektrumlu beta-laktamaz olan GES-1 ilk defa Fransa’da saptanmıştır. Yunanistan’da izole edilen IBC-2 enzimine benzerlik gösteren GES-1 pek çok substrata zayıf afinite gösterirken, sınıf A beta-laktamazların aksine sefoksitine yüksek afinite göstermektedir (67). Son yıllarda saptanan GES-2 enzimi GES-1’den farklı olarak dış membran geçirgenliğinde azalma varsa imipenem direncine yol açmaktadır (68). IBC-2 enzimi Yunanistan’da saptanan seftazidim ve diğer oksiimino-sefalosporinlere dirençten sorumlu bir enzimdir. GES ve IBC enzimleri plazmit veya kromozomal kökenli olabilmektedir (67).

P.aeruginosa’da bulunabilen diğer önemli beta-laktamaz, penisilin, sefalosporin ve karbapenemleri hidrolize edebilen metallo-beta-laktamazlardır.

2.2.4 Karbapenemleri Hidrolize Edebilen Beta-laktamazlar

Karbapenem grubu antibiyotikler gram-pozitif ve gram-negatif mikroorganizmalara karşı aktivite gösteren geniş spektrumlu antimikrobiyal ajanlardır. Gram-negatif bakterilere penetrasyonlarının yüksek olması, çoğu beta-laktamaz enzimine karşı stabil olması ve penisilin bağlayan proteinlere (PBP) güçlü bağlanmaları bu ajanların yüksek aktivitelerinin nedenidir. Karbapenem grubu ajanlardan ilki 1976 yılında toprakta yaşayan bir mikroorganizma olan *Streptomyces cattleya*’da saptanmış ve bu bileşiğe “thienamycin” adı verilmiştir. Thienamycin türevleri üzerinde yapılan çalışmalar sonucu amino ve hidroksil grubunda yapılan modifikasyonlarla imipenem elde edilmiştir. Diğer beta-laktam ajanlarda olduğu gibi, imipenem peptidoglikan biyosentezi üzerine etki göstermektedir. İmipenem PBP1, PBP4, PBP5 ve PBP6’ya bağlanabilmekte ancak PBP2’ye diğerlerine göre çok daha güçlü bağlanabilmektedir. Yapılan metabolik çalışmalarda, imipenemin böbrekte bulunan dihidropeptidaz enzimi tarafından metabolize edildiği saptanmıştır. İmipenemin bu enzim tarafından hidrolizini engellemek için, dihidropeptidaz enziminin etkin inhibitörü olan silastatin ile birlikte kullanılması gerekmektedir. İmipenemde bulunan dihidropeptid kısmı penisilinlerde ve sefalosporinlerde bulunmamaktadır. İmipenem, in vitro koşullarda stafilokok, streptokok ve pnömokoklar gibi gram-pozitif mikroorganizmalara karşı oldukça, etkin ancak metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* ve koagülaz negatif stafilokoklara karşı etkin değildir. Enterokoklar arasında *Enterococcus faecalis* genellikle imipeneme

duyarlı, *E.faecium* ise genellikle dirençlidir. Gram-negatif bakteriler içinde imipenem, *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerine ve nonfermentatif bakterilere etkindir. Özellikle antipseudomonal penisilinlere, aminoglikozitlere ve üçüncü kuşak sefalosporinlere dirençli gram-negatif mikroorganizmalarla gelişen enfeksiyonların tedavisinde tercih edilen imipenem, meningokok, gonokok ve *Haemophilus influenzae* (beta-laktamaz üreten suşlar dahil)'ya karşı da mükemmel aktivite gösterir. *Acinetobacter spp.* ve *P.aeruginosa* üzerine etkin olan ajan, *Burkholderia cepacia* complex ve *Stenotrophomonas maltophilia*' ya karşı etkin değildir. İmipenem *Clostridium difficile* dışında klinik önem taşıyan çoğu anaerobik bakteri üzerine de etki gösterebilmektedir. İmipenem silastatinle beraber, diğer antibakteriyel ajanlara dirençli çoğu gram-pozitif, gram-negatif ve anaerobik bakterilerle gelişen toplum kaynaklı enfeksiyonların ve hastane enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır.

Karbapenem grubu ilaçlar içinde imipenemden sonra geliştirilen ve 1996 yılında "Food and Drug Administration" (FDA) tarafından onay alan ikinci ajan meropenemdir. Meropenemde karbapenem halkasına 1-β-metil grubu eklenmiştir. Meropenem gram-pozitif, gram-negatif ve anaerobik bakterilere karşı etkin olmasının yanında DHP-1 enziminden etkilenmemektedir. Meropenem gram-negatif bakterilere, imipenem ise gram-pozitif bakterilere karşı daha etkindir.

FDA tarafından 2001 yılında onay alan diğer karbapenem grubu ajan ertapenemdir. Henüz Türkiye' de kullanıma girmemiş olan ertapenemin komplike intra-abdominal enfeksiyonlar başta olmak üzere, toplum veya hastane kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde kullanılması önerilmektedir (69,70).

2.2.4.1 Serin Beta-laktamazlar

Karbapenem direncinde rol oynayan enzimler; grup 1'de yer alan AmpC enzimler, grup 2f'de yer alan enzimler ve grup 3'de yer alan metallo-beta-laktamazlardır. Grup 1'de yer alan ve dereprese mutantlarda devamlı ve yüksek düzeyde sentezlenen AmpC enzimler karbapenemler üzerinde etki gösterebilmektedir. Ancak bu inaktivasyon oldukça yavaştır ve dış membran geçirgenliğinin azalması ya da ilaç atım pompaları gibi ikinci bir direnç mekanizmasının olmadığı durumlarda, MİK değerlerinde fazla bir değişime yol

açmamaktadır (35). Karbapenem direncinde rol alan diğer beta-laktamazlar Bush sınıflamasında 2f de yer alan serin enzimlerdir. Bir *Serratia marcescens* izolatında 1982 yılında saptanan Sme-1 enzimi, 1984 yılında *Enterobacter cloacae*

izolatında saptanan IMI-1 enzimi ve 1990 yılında yine bir *E.cloacae* izolatında saptanan NMC-A enzimi dışında, bugüne kadar bu grupta yer alan ve karbapenem direncine neden olan başka bir enzim saptanmamıştır. Kromozomal kökenli ve indüklenebilir özelliğe sahip bu enzimler, metallo-beta-laktamazlardan farklı bazı özelliklere sahiptir. Bu enzimler imipeneme meropenemden daha fazla direnç gelişmesini sağlar, aztreonama dirençten sorumlu olduğu halde üçüncü kuşak sefalosporinleri hidrolize edemez ve klavulanik asitle inhibe olabilirler (71).

2.2.4.2. Metallo-beta-laktamazlar

Karbapenemlere karşı gelişen dirençte en önemli mekanizma metallo-beta-laktamazların varlığıdır.

2.2.4.2.1 Metallo-beta-laktamazların Sınıflandırması

Metallo-beta-laktamazlar, 1980 yılında Ambler tarafından yapılan sınıflandırmada serin beta-laktamazlar içinde yer almakta iken, 1989 yılında Bush tarafından yapılan sınıflandırmada fonksiyonel özellikleri göz önüne alınarak grup 3'e yerleştirilmişlerdir. Bu sınıflandırmadaki kriterler; metallo-beta-laktamaz enzimlerinin substrat profilleri (özellikle imipenem hidrolizi), EDTA' ya duyarlı olmaları ve serin beta-laktamaz inhibitörleri tarafından inhibe olmamalarıdır. Sınıflandırma 1995' te güncelleştirilmiş, 1997' de modifiye edilerek son halini almıştır. Metallo-beta-laktamazlar, imipenem ve diğer beta-laktam antibiyotikleri hidroliz etme özelliklerine göre alt gruplara ayrılmıştır (53). Grup 3a'da bulunan enzimler geniş spektrumlu aktiviteye sahiptir. Grup 3b'de bulunan enzimler özellikle karbapenemleri substrat olarak tercih etmektedir. Grup 3c'de bulunan enzimler ise diğer beta-laktam antibiyotiklere göre karbapenemler üzerine zayıf etki göstermektedirler. Ancak tüm bu enzimlerin ortak özellikleri EDTA ile inhibe olmalarıdır (53).

Metallo-beta-laktamazlar substrat profillerinin yanı sıra sekans benzerliklerine göre de alt gruplara ayrılmışlardır. Sınıf B1’de yer alan enzimler çinko iyonu ile birleşecekleri aktif bölgelerinde üç histidin ve bir sistin aminoasiti içeren enzimlerdir. Bu grupta IMP, VIM, GIM ve SPM-1 gibi transfer edilebilen enzimler bulunmaktadır. Sınıf B2’de bulunan enzimler, çinko iyonu ile birleşecekleri bölgelerinde birinci pozisyonda histidin yerine asparajin bulundurmaktadırlar. *Aeromonas* türlerinde ve *Serratia fonticola*’ da bulunan SFH-1 enzimi bu gruba dahildir. Sınıf B3’ de bulunan L1 enzimi ise diğerlerinden farklı olarak tetramer özelliğindedir (72).

2.2.4.2.2 Kromozomal Kökenli Metallo-beta-laktamazlar

Kromozomal kökenli metallo-beta-laktamazların en önemli özellikleri indüklenebilir özellikte olmalarıdır. Ancak bu enzimleri sentezleyen mikroorganizmalar fırsatçı patojenler olup, *Stenotrophomonas maltophilia* ve *Bacillus anthracis* dışında ciddi enfeksiyonlara yol açmamaktadır. Kromozomal kökenli metallo-beta-laktamaz sentezleyen bakteriler *Bacillus cereus* (BCII) (73), *Bacillus anthracis* (Bla2) (74), *Stenotrophomonas maltophilia* (L1) (75), *Aeromonas hydrophilia* (CphA) (76), *Chryseobacterium meningosepticum* (BlaB veya GOB-1) (77), *Chryseobacterium indologenes* (IND-1) (78), *Legionella gormanii* (FEZ-1) (79), *Caulobacter crescentus* (Mbl1B) (80), *Myroides* türleri (TUS-1, MUS-1) (81), *Janthinobacterium lividium* (THIN-B) (82), *Flavobacterium johnsoniae* (JOHN-1) (83) ve *Serratia fonticola* (SFH-1) (84) olarak sıralanabilir. Kromozomal kökenli bu enzimlerin diğer bir özellikleri genellikle serin beta-laktamazlarla bir arada bulunmalarıdır. Örneğin *Stenotrophomonas maltophilia* indüklenebilir L1 metallo-beta-laktamazı nedeniyle yüksek beta-laktam direncine sahip olmakla beraber aynı zamanda kromozomal sınıf A enzimi olan L2’yi de sentezlemektedir (85).

2.2.4.2.3 Metallo-beta-laktamazların Transferinde Kullanılan Genetik Sistemler

Kromozomal metallo-beta-laktamazların dışında hemen hemen tüm diğer metallo-beta-laktamazları kodlayan genler sınıf 1 integronlar içindeki gen kasetlerinde bulunmaktadır (86,87). Bunun yanı sıra bazı IMP metallo-beta-

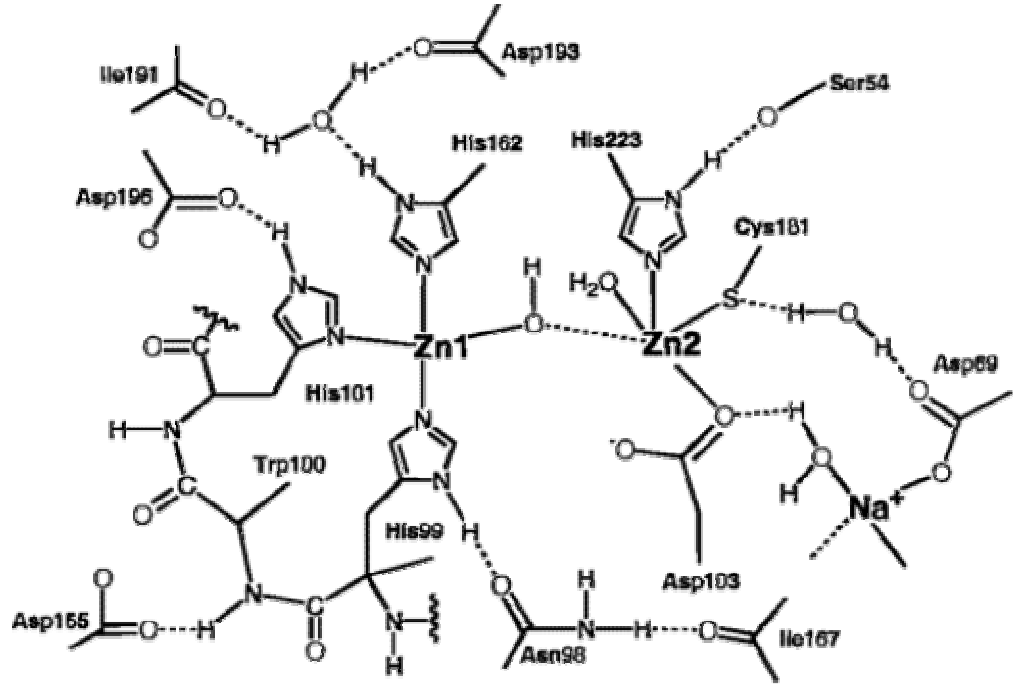
laktamazların sınıf 3 integronlarda da bulunabildiği gösterilmiştir (88,89). İntegronlar, biri integronda diğeri gen kasetinde bulunan iki DNA bölgesini bölgeye özgül rekombinasyonla transfer edebilen genetik yapılardır. İntegronlarda üç bölge bulunmaktadır: 5' korunmuş bölge, 3' korunmuş bölge ve değişken bölge. Bunlardan 5' korunmuş bölge, integras gen (*intI*), integras geninin yanında rekombinasyon bölgesi (*attI*) ve değişken bölgede bulunan gen kasetinin ekspresyonunu sağlayan promoter bölgesini kapsamaktadır. Diğer bölge olan 3' korunmuş bölgede ise antiseptiklere dirençten sorumlu *qac* geni ve sulfonamid direncinden sorumlu *sul* geni bulunmaktadır. İntegronun değişken bölgesinde bulunan gen kasetleri yaklaşık 1 kb büyüklüğünde küçük sirküler DNA' dan oluşmaktadır. Gen kaseti tek bir genin yanında 59-be adı verilen rekombinasyon bölgesini de içermektedir (90). Bir integronda birden fazla gen kaseti bulunabilmektedir. Çoğunlukla metallo-beta-laktamaz genlerini içeren gen kasetlerinin yanında aminoglikozitlere karşı dirençten sorumlu olan aminoglikozit asetiltransferaz enzimini kodlayan *aacA4* genini içeren gen kaseti de bulunmaktadır (91).

Aminoglikozit ve beta-laktam direnç genlerini taşıyan gen kasetleri bir integrondan diğerine rahatlıkla geçebilmektedir. Ancak bu gen kasetlerinin mikroorganizmalar arası transferinde plazmidler ya da transpozonlar gibi diğer genetik elemanlara ihtiyaç vardır (90). Metallo-beta-laktamaz genlerini taşıyan plazmidlerin 120-180 kb büyüklüğünde oldukları belirlenmiştir. Diğer bakterilere bu plazmidlerin transferinde, plazmidin büyüklüğü kadar metallo-beta-laktamaz genleri dışında içerdikleri diğer genlerin de önemli olduğu belirtilmekle birlikte bu konudaki bilgiler oldukça sınırlıdır (92). Metallo-beta-laktamaz genlerini taşıyan integronların başka mikroorganizmalara transferinde yer alan diğer genetik eleman transpozonlardır. İtalya' da 2003 yılında izole edilen bir *P.aeruginosa* suşunda IMP-13 enzimi ve bu enzimi kodlayan geni taşıyan integronun *Tn5051* tipi transpozon içinde yer aldığı saptanmıştır (93). Polonya' da izole edilen ve VIM-2 enzimi sentezleyen *P.aeruginosa* izolatında, enzimi kodlayan genin içinde bulunduğu integronun transpozonda taşındığı ve her iki transpozon arasında *tnpR* genlerinin aynı olduğu saptanmıştır. Bu bulgu, sınıf 1 integronların transpozonlar aracılığı ile yayıldığını desteklemektedir (93).

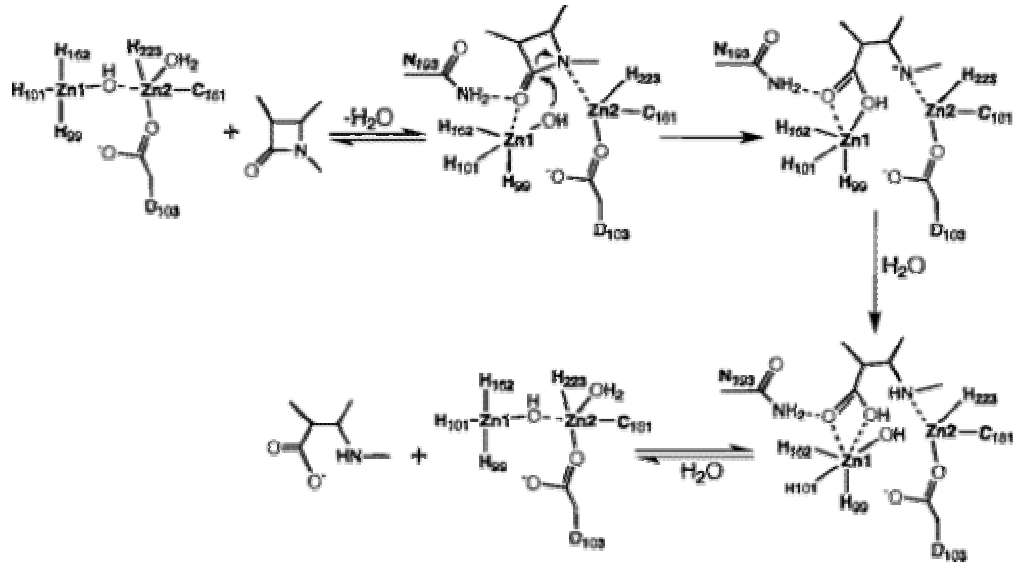
Metallo-beta-laktamazlar içinde integronda bulunmayan ve transpozonlarla ilişkisi olmayan enzimler de bulunmaktadır. SPM-1 enzimini kodlayan genin integron veya transpozonlar ile ilişkisi olmadığı saptanmıştır. SPM-1 enzimini kodlayan genin 180 kb büyüklüğünde bir plazmitte taşındığı belirlenmiştir. Bu plazmitin SPM-1 enzimini kodlayan gen dışında diğer antibiyotiklere direnç geni taşımadığı belirtilmektedir (94).

2.2.4.2.4 Metallo-beta-laktamazların Biyokimyasal Özellikleri

Metallo-beta-laktamazlar ve serin beta-laktamazlar, beta-laktam antibiyotiklerde beta-laktam halkasındaki amid bağı kırarak antibiyotiği etkisiz hale getirirler. Ancak her iki grup enzim aktivitelerini farklı yollardan gerçekleştirirler (95). Metallo-beta-laktamazların aktif bölgelerinde çinko iyonları bulunmaktadır. Çinko iyonları iki su molekülü ile reaksiyona girerek hidrolizin gerçekleşmesini sağlar. Sınıf B metallo-beta-laktamazlar dışında diğer metallo-beta-laktamazların çinko iyonu ile bağlanma bölgelerinde histidin-X-histidin-X-aspartik asitten oluşan çinko bağlama motifi bulunmaktadır. Tüm metallo-beta-laktamazlar aktif bölgelerinde çinko iyonlarına ihtiyaç duymaktadır. Sınıf B2 enzimleri bir çinko iyonuna ihtiyaç duyarken diğer metallo-beta-laktamazlar aktif bölgelerinde divalan çinko iyonuna bağlanırlar (53). Önerilen hidroliz mekanizmasına göre enzimin aktif bölgesi beta-laktam antibiyotikteki amid bağının polarizasyonunu sağlamakta ve çinkoya bağlı su moleküllerinin veya hidroksitlerin nükleofilik etkisini kolaylaştırmaktadır (96,97,98). Metallo-beta-laktamazların genel yapısı Şekil 2.1' de, hidroliz mekanizması ise Şekil 2.2'de gösterilmektedir.



Şekil 2.1. Metallo-beta-laktamazın genel yapısı. (Kaynak 99'dan alınmıştır.)



Şekil 2.2: Metallo-beta-laktamazın etki mekanizması.

Kaynak 99'dan alınmıştır.

Metallo-beta-laktamazlar serin beta-laktamazların aksine klavulanik asit ve sulbaktam gibi beta-laktamaz inhibitörleri ile inhibe olmamaktadır. Serin beta-laktamazlardan diğer bir farkı metallo-beta-laktamazların geniş substrat profilidir. Ancak hiçbir metallo-beta-laktamaz aztreonamı hidrolize edememektedir. Bu özellik aztreonamın metallo-beta-laktamaz inhibitörü olarak kullanılabileceği fikrini

gündeme getirmiştir. Ancak yapılan bir çalışmada VIM-2 sentezleyen *P. aeruginosa* ile hayvanlarda pnömoni oluşturulmuş ve aztreonamın etkinliği test edilmiştir. Aztreonamın yüksek dozlarda uygulandığında bile enfeksiyonu eradike edemediği saptanmıştır (100).

Metallo-beta-laktamazlar genel yapı ve aktif bölgelerinin özellikleri açısından birbirlerine çok benzemelerine rağmen beta-laktam ajanlara bağlanma ve hidroliz edebilme kabiliyetleri değişkenlik göstermektedir. Bu konuyla ilgili verilebilecek en güzel örnek VIM-1 ve VIM-2 arasındaki farktır. Bu iki enzim yapısal olarak hemen hemen aynıdır. VIM-2 pek çok beta-laktama yüksek afinite gösterirken benzilpenisilin, ampisilin, piperasilin, mezlosilin, tikarsilin, sefalotin, sefoksitin, sefotaksim, seftazidim, sefpirom, moksalaktam ve meropeneme zayıf bağlanma gücüne sahiptir. Ancak VIM-2, VIM-1'e göre imipeneme altı kat daha yüksek afiniteye sahiptir. VIM-1 ise VIM-2'ye göre piperasilin, azlosilin, tikarsilin, sefaloridin, sefalotin, sefuroksim, sefotaksim, seftazidim, sefpirom ve meropenemi daha güçlü hidrolize edebilmektedir. İki enzim arasındaki bu aktivite farkının enzimlerin aktif bölgelerindeki 224. pozisyonda histidin/tirozin değişimi ve 228. pozisyonda serin/arjinin değişimi şeklindeki aminoasit farkından kaynaklandığı belirtilmektedir (101).

2.2.4.2.5 Transfer Edilebilen Metallo-beta-laktamazlar

Transfer edilebilen MBL' lar IMP benzeri, VIM benzeri, SPM-1 ve GIM-1 olmak üzere dört grupta toplanmaktadır.

2.2.4.2.5.1 IMP benzeri Metallo-beta-laktamazlar

Metallo-beta-laktamaz enzimi ilk kez 1988 yılında Japonya' da bir *P.aeruginosa* izolatında tespit edilmiştir. Dirençten sorumlu MBL geninin konjugatif bir plazmitte taşındığı saptanmıştır (102). Bu saptamadan üç yıl sonra 1991 yılında, yine Japonya' da bir *S.marcescens* izolatından aynı MBL geni izole edilmiştir (103). 1991 yılından itibaren Japonya' nın farklı bölgelerinden *S.marcescens* ve *P.aeruginosa* izolatlarında MBL saptandığına dair raporlar yayınlanmaya başlanmıştır. Saptanan tüm enzimlerin aynı aminoasit dizisine sahip olduğu belirlenmiş ve diğer beta-laktam ajanlar yanında özellikle imipenemi hidrolize

edebilme yeteneğinden dolayı bu enzime IMP-1 adı verilmiştir. *S.marcescens* ve *P.aeruginosa* izolatlarından izole edilen IMP-1 enziminin 120 kb büyüklüğünde bir plazmitte, sınıf 3 integron içinde *aac(6')Ib* benzeri genle yan yana yerleşim gösterdiği belirlenmiştir (88,104). Daha sonra 13 ayrı ülkede yapılan çalışmalarda 18 farklı IMP benzeri enzim saptanmıştır. Saptanan enzimler, izole edildikleri bakteri türleri ve ülkeler Tablo 2.3’de verilmiştir.

Metallo-beta-laktamazların saptanmasının ardından Japonya’ da gram-negatif bakteriler arasında MBL varlığı araştırılmaya başlanmıştır. Taramalar sonucunda IMP-1 enzimine benzemekle beraber farklı MBL enzimleri saptanmıştır. Bu enzimlerden biri olan ve *Shigella flexneri* izolatından elde edilen IMP-3 enzimi, IMP-1’ den yalnızca iki aminoasit farklılık göstermektedir. IMP-3 enziminde 196. pozisyonda serin aminoasiti yerine glisin aminoasiti bulunmaktadır. Bu fark IMP-3 enziminin penisilinlere olan aktivitesinin düşük olmasına neden olmaktadır (105). IMP-1 enziminin diğer bir varyantı IMP-6 enzimidir. Benzer şekilde IMP-6 enzimi

Tablo 2.3 İlk bulunan IMP tipi MBL’ların ülkelere, bakteri türü ve bulunduğu integron sınıfına göre dağılımları.

	Bakteri	Ülke	İntegron
IMP-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Japonya	Sınıf 1, 3
		Kore	?
	<i>Pseudomonas putida</i>	Japonya	Sınıf 3
		Singapur	?
	<i>Serratia marcescens</i>	Japonya	Sınıf 1, 3
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Kore	?
		Japonya	Sınıf 1
		İngiltere?	?
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Singapur	?
		Japonya	Sınıf 1
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Japonya	Sınıf 1
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Japonya	Sınıf 1, 3
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Japonya	Sınıf 3
	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	Japonya	Sınıf 1
	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	Japonya	Sınıf 1
	<i>Atcaligenes faecalis</i>	Japonya	?
	<i>Citrobacter freundii</i>	Japonya	Sınıf 1
	<i>Enlerobacter aerogenes</i>	Japonya	Sınıf 1
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Japonya	?
	<i>Escherichia coli</i>	Japonya	Sınıf 1
	<i>Proteus vulgaris</i>	Japonya	Sınıf 1
	<i>Providencia rettgeri</i>	Japonya	Sınıf 1
	<i>Acinetobacter spp.</i>	İngiltere	?
IMP-2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	İtalya	Sınıf 1
		Japonya	Sınıf 1
	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Japonya	Sınıf 1
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Japonya	Sınıf 1

IMP-3	<i>Shigella flexneri</i>	Japonya	Sınıf 1
IMP-4	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Hong Kong	Sınıf 1
	<i>Citrobacter freundii</i>	Hong Kong	Sınıf 1
		Avustralya	Sınıf 1
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Çin	Sınıf 1
		Avusturalya	?
IMP-5	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Portekiz	Sınıf 1
IMP-6	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Brezilya	?
	<i>Serratia marcescens</i>	Japonya	Sınıf 1
IMP-7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kanada	Sınıf 1
		Malezya	Sınıf 1
IMP-8	<i>Enterobacter cloacae</i>	Tayvan	Sınıf 1
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Tayvan	Sınıf 1
IMP-9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Çin	Sınıf 1
IMP-10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Japonya	Sınıf 1
	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	Japonya	Sınıf 1
IMP-11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Japonya	?
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Japonya	?
IMP-12	<i>Pseudomonas putida</i>	İtalya	Sınıf 1
IMP-13	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	İtalya	Sınıf 1
IMP-16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Brezilya	Sınıf 1
IMP-18	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	A.B.D.	?

Kaynak 41' den kısaltılarak alınmıştır

De IMP-1'den iki aminoasit farklılık göstermektedir (106). IMP-1 varyantlarının sonuncusu olan IMP-10 1995-2001 yılları arasında MBL enzimi açısından taranan *P.aeruginosa* ve *Alcaligenes xylosoxidans* izolatlarında saptanmıştır. IMP-10 enzimini kodlayan genin bir *P.aeruginosa* izolatında plazmit kökenli, diğer bir *P.aeruginosa* izolatında ve bir *Alcaligenes* izolatında ise kromozomal kökenli olduğu tespit edilmiştir. IMP-10 enzimi IMP-1' den bir aminoasit farkı göstermekte olup, bu fark penisilin hidrolizini yavaşlatırken karbapenem hidroliz profilinde değişikliğe neden olmamaktadır (107).

İtalya'da 1997 yılında IMP-2 enziminin ve 1998 yılında Portekiz'de IMP-5 enziminin saptanması, MBL enzimlerinin sadece Japonya' ya özgü olmadığını gözler önüne sermiştir. IMP-2 enzimi IMP-1'den 36 aminoasit , IMP-5 IMP-1'den 17 aminoasit farkla ayrılmaktadır. Bunun yanı sıra her iki enzimi kodlayan gen yerleşim yönünden de IMP-1' den farklıdır. IMP-2 enzimini kodlayan genler integron içinde iki aminoglikozid direnç geni (*aacA4*, *aadA1*) ile beraber bulunmaktadır. IMP-5 enzimini kodlayan gen ise integronda tek başına bulunmaktadır (108,109).

İtalya' da 2000 yılında bir *P.putida* izolatında saptanan IMP-12 enziminin konjugatif olmayan 50 kb büyüklüğünde bir plazmitte taşındığı saptanmıştır. IMP-12 IMP-1' den 36 aminoasit farkla ayrılmakta ve penisilinlere karşı zayıf aktivite göstermektedir. İtalya' da bir *P.aeruginosa* izolatında saptanan diğer IMP varyantı

IMP-13'tür. Kromozomal yerleşim gösteren enzimin 19 aminoasit ile IMP-1' den ayrıldığı belirlenmiştir (93).

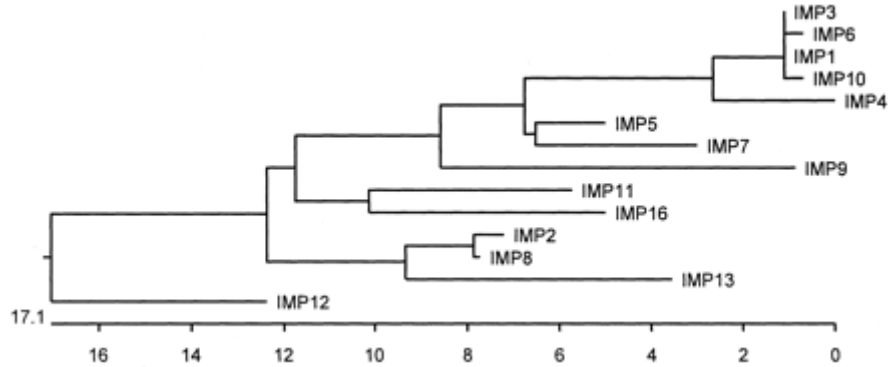
Güneydoğu Asya ile Avrupa ülkelerinde izole edilen IMP benzeri enzimlerin farklılık göstermesi, önceleri IMP alellerinin küresel yayılım göstermeyip lokal yayıldığı fikrini desteklemekteydi. Ancak 2002 yılında İngiltere' de *Acinetobacter junii* ve *Acinetobacter baumannii* izolatlarında IMP-1 enziminin saptanması MBL sorununun küresel olduğunu gözler önüne sermektedir (110,111).

Metallo-beta-laktamaz enzimlerinin Japonya'da saptanmasından sonra çeşitli ülkelerde dirençli izolatlar MBL yönünden araştırıldığında; 1994 yılında Çin'de bir *A. baumannii* izolatında IMP-4 enzimi (112), 1995' te Kanada' da bir *P.aeruginosa* izolatında IMP-7 enzimi (113), 1998'de Tayvan'da bir *Klebsiella pneumoniae* izolatında IMP-8 enzimi tanımlanmıştır (114). 1994-1998 yılları arasında Çin' de imipenem dirençli *Acinetobacter* izolatlarının %66'sında IMP-4 enzimi saptanmıştır. IMP-4 enziminin IMP-1'den 10 aminoasit ve IMP-2' den 37 aminoasit farklı olduğu ve aminoglikozid direnç genleriyle birlikte aynı integron içinde plazmid üzerinde yer aldığı belirlenmiştir. IMP-4 ise 1998-2000 yılları arasında *P.aeruginosa* ve *Citrobacter youngae* izolatlarında saptanmıştır (115). Son yayınlanan raporlarda ise IMP-4 enziminin Avustralya'da *E.coli*, *K. pneumoniae* ve *P.aeruginosa* izolatlarında tanımlandığı belirlenmiştir (116,117). İlk kez 1995'te Kanada'da saptanan IMP-7 ise 1999 yılında Malezya' da bir *P.aeruginosa* izolatında tanımlanmıştır (118). 1998 yılında Tayvan'da saptanan IMP-8 enziminin IMP-1'den ziyade IMP-2'ye benzediği belirlenmiş ve enzimin Japonya kökenli IMP-1 enzimiyle ilişkisi olmadığı düşünülmüştür (114).

Kore, MBL enzimlerine bağlı olarak karbapenem direncinin en çok görüldüğü ülkelerden biridir. Yapılan bir çalışmada karbapenem veya seftazidim dirençli izolatların %35'inde IMP benzeri enzimlerin olduğu belirlenmiştir (119). Kore'de imipenem direncinin 1996 yılında %6 iken 2001 yılında %19'a ulaştığı saptanmıştır (120).

Metallo-beta-laktamaz enzimine bağlı karbapenem direncinin problem oluşturduğu diğer bir ülke Brezilya'dır. Yapılan süveyans çalışmalarında, Brezilya'da IMP-1, IMP-16 (121), son olarak da 2004 yılında New Mexico'da yeni

bir IMP varyantı olan IMP-18'e bağlı karbapenem direnci rapor edilmiştir (122). IMP benzeri enzimlerin filogenetik sınıflandırması Şekil 2.3' de verilmektedir.



Şekil 2.3. IMP benzeri metallo-beta-laktamazların filogenetik sınıflandırması

Kaynak 123'den alınmıştır.

2.2.4.2.5.2 VIM Benzeri Metallo-beta-laktamazlar

Transfer olabilen MBL'ler içinde diğer önemli grup VIM benzeri enzimlerdir. VIM-1 enzimi ilk defa 1997 yılında İtalya' nın Verona kentinde bir *P.aeruginosa* izolatında saptanmıştır. Enzimin Verona kentinde saptanması ve imipeneme dirençli olması nedeniyle enzime VIM-1 adı verilmiştir.

VIM-1 enzimini içeren klinik izolatın piperasilin, seftazidim, imipenem ve aztreonamın da içinde bulunduğu pek çok beta-laktam ajana dirençli olduğu saptanmıştır. VIM-1 enziminin IMP benzeri enzimlerden oldukça farklı olduğu belirlenmiştir. Aminoasit dizilimi açısından VIM-1' e en yakın enzimin *Bacillus cereus*' ta bulunan BCII olduğu ve bu enzimle bile arasındaki homolojinin %39 olduğu belirtilmektedir (86). Diğer taraftan *bla_{IMP}* genleri gibi *bla_{VIM}* genlerinin de integronlar içindeki gen kasetlerinde bulunduğu ve genellikle aminoglikozid direnç genlerini taşıyan gen kasetleri ile aynı integron içinde yer aldıkları tespit edilmiştir. İlk defa VIM-1 enziminin saptandığı klinik izolatta enzimi kodlayan genlerin kromozomal yerleşimli olduğu belirtilmektedir (86). İtalya' da 2002 yılında yapılan bir çalışmada, VIM-1 enzimi üreten *P.putida* izolatlarının hastane enfeksiyonuna yol açtığı saptanmıştır (124). Bu bulgu, MBL'ın çevre kaynaklı olabileceği ya da *P.putida*'nın MBL için bir vektör olabileceği olasılığını gündeme getirmiştir (124).

VIM-1 enzimi sadece *P.aeruginosa* veya *P.putida*'ya özgül olmayıp, Yunanistan'da *E.coli* (125) ve *K.pneumoniae* izolatlarında da saptanmıştır (126).

VIM benzeri enzimlerden biri olan VIM-2 enzimi ilk kez 1996 yılında Fransa'da nütropenik bir hastanın kan kültüründen izole edilen *P.aeruginosa* izolatında saptanmıştır. Bu izolatın seftazidim, sefepim ve imipenemin de içinde bulunduğu pek çok beta-laktam ajana dirençli olduğu belirlenmiştir. VIM-2 enzimini kodlayan genlerin sınıf 1 integron içinde gen kasetinde taşındığı belirlenmiştir. VIM-1 ile VIM-2 enzimleri arasında aminoasitlerin dizilimi açısından %90 benzerlik bulunmaktadır (127).

VIM-2 üreten *P.aeruginosa* izolatları dünyanın pek çok ülkesinde tespit edilmiştir. Bu ülkeler arasında Japonya, Güney Kore, Portekiz, İspanya, Polonya, Hırvatistan, Şili, Venezüella, Arjantin, Belçika ve Amerika Birleşik Devletleri sayılabilir. Amerika Birleşik Devletleri'nde VIM-2 üreten *P.aeruginosa*'ya bağlı salgın yoğun bakım ünitesinde meydana gelmiş ve izolatın sadece aztreonama duyarlı olduğu belirlenmiştir. Diğer ülkelerde de VIM-2 üreten *P.aeruginosa*'nın neden olduğu sepsis veya pnömoni gibi ciddi enfeksiyonlar bildirilmiştir (92,128-133). Bunun yanı sıra VIM-2, *P.aeruginosa* dışında farklı bakteri türlerinde de saptanmıştır. Bu bakteriler arasında *C.freundii*, *S. marcescens* ve *E. cloacae* sayılabilir (133,134,135).

VIM benzeri enzimlerden bir diğeri olan VIM-3 enzimi, 2001 yılında Tayvan'da bir *P.aeruginosa* izolatında saptanmıştır. VIM-3 enziminin kromozomal kökenli olduğu ve iki aminoasit farkıyla VIM-2 enziminden ayrıldığı belirlenmiştir (136).

Yunanistan VIM benzeri enzimlerin en çok saptandığı ülkelerden biridir. VIM-4 enzimi 2001 yılında bir *P.aeruginosa* izolatında tespit edilmiş olup VIM-1 enziminden sadece bir aminoasit farkla ayrıldığı belirlenmiştir (137).

VIM benzeri enzimlerin saptandığı ülkelerden biri de Türkiye'dir. İlk defa bir *K.pneumoniae* izolatında, daha sonra bir *P.aeruginosa* izolatında tanımlanan VIM-5 enziminin VIM-1 enziminden beş aminoasit farkla ayrıldığı belirlenmiştir. VIM-5 üreten izolatları, diğer MBL pozitif izolatlardan ayıran en önemli fark aztreonama da dirençli olmalarıdır (3).

VIM-6 enzimi 2004 yılında Singapur’ da iki *P.putida* izolatında saptanmıştır. VIM-6 enzimi VIM-2 enziminden iki aminoasit, VIM-3 enziminden ise bir aminoasit farkla ayrılmaktadır. Bu enzimi üreten izolatların aztreonam dahil olmak üzere tüm antibiyotiklere dirençli olduğu belirlenmiştir (138).

Aminoasit dizilimi çözümlenmiş ve tanımlanmış son VIM benzeri enzim olan VIM-7, Amerika Birleşik Devletleri’nde karbapenemlere dirençli bir *P.aeruginosa* izolatında tespit edilmiştir. VIM-7, VIM-1 ile %77, VIM-2 ile %74 homoloji göstermektedir. Bu nedenle VIM benzeri enzimler içinde farklı bir alt grupta yer almaktadır. Enzimi kodlayan genlerin konjugatif plazmitte yer alan integronda taşındığı ve enzimi içeren izolatın polimiksin B dışında bütün antibiyotiklere dirençli olduğu saptanmıştır (139).

Bugüne kadar 16 ayrı ülkede 11 farklı VIM benzeri enzim saptanmıştır. Bu enzimlerin izole edildikleri bakteri türleri, ülke ve enzimi kodlayan genlerin integronda taşınıp taşınmadığına dair bilgiler Tablo 2.4’de verilmektedir.

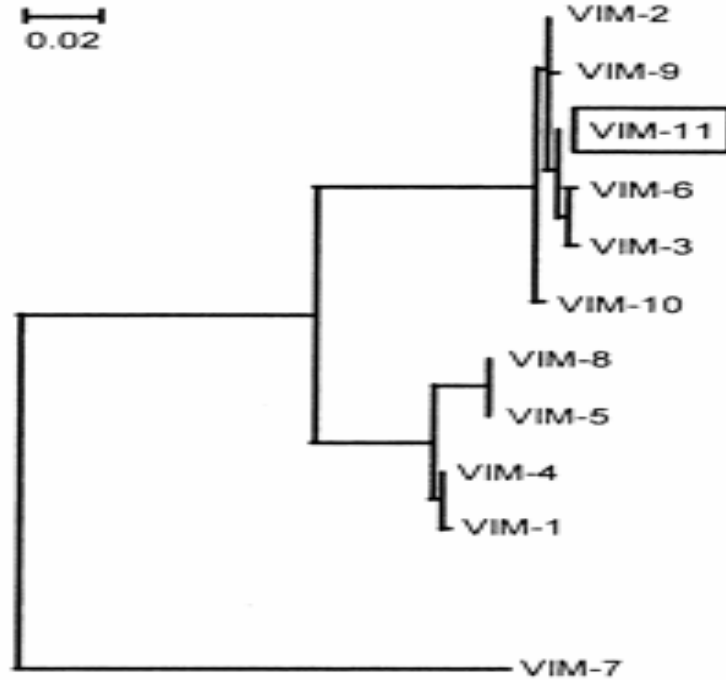
Tablo 2.4 İlk bulunan VIM tipi MBL’ların ülkelere, bakteri türü ve bulunduğu integron sınıfına göre dağılımları.

	Bakteri	Ülke	İntegron
VIM-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	İtalya	+
	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	İtalya	+
	<i>Pseudomonas putida</i>	İtalya	+
	<i>Escherichia coli</i>	Yunanistan	+
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Yunanistan	+
VIM-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Fransa	+
		Yunanistan	+
		İtalya	+
		Japonya	+
		Portekiz	+
		Hırvatistan	+
		Polonya	+
		Arjantin	+
		Kore	+
		Kore	+
		Kore	+
		Kore	?
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Şili	+
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Tayvan	?
	<i>Serratia marcescens</i>	Japonya	+
	<i>Pseudomonas putida</i>	Tayvan	?
VIM-3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Tayvan	?

VIM-4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Yunanistan	+
		İsveç	?
		Polonya	+
	<i>Enterobacter cloacae</i>	İtalya	?
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	İtalya	?
VIM-5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Türkiye	+
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Türkiye	+
VIM-6	<i>Pseudomonas putida</i>	Singapur	?
VIM-7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ABD	+
VIM-8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kolombiya	?
VIM-9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	İngiltere	?
VIM-10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	İngiltere	?
VIM-11a	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Arjantin	?
VIM-11b	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	İtalya	?

Kaynak 123' den kısaltılarak alınmıştır.

Bugün, VIM benzeri enzimler içinde henüz tamamen tanımlanmamış ve üzerinde çalışmaların devam ettiği enzimler de bulunmaktadır. Kolombiya' da *P.aeruginosa* izolatında tespit edilen VIM-8 (129), İngiltere' de saptanan VIM-9 ve VIM-10, Arjantin ve İtalya'da saptanan VIM-11 (140) henüz tanımlanmamış olan enzimlerdir. VIM benzeri enzimlerin filogenetik sınıflandırması Şekil 2.4'de verilmektedir.



Şekil 4 :VIM benzeri enzimlerin filogenetik dağılımı.

Kaynak 141' den alınmıştır.

2.2.4.2.5.3 SPM-1

Brezilya' da 1997 yılında bir *P.aeruginosa* izolatında tanımlanan SPM-1 enziminin, o güne kadar tanımlanan MBL'lerden tamamen farklı olduğu belirlenmiştir. Enzimi taşıyan izolatın kolistin dışında gram-negatif bakterilerle meydana gelen enfeksiyonların tedavisinde kullanılan tüm antimikrobiyal ajanlara dirençli olduğu saptanmıştır. SPM-1 enziminin sekans analizi yapıldığında, IMP-1 ile %35.5, CphA ile %32.2, BCII ile %30 ve CcrA ile %27 homoloji gösterdiği belirlenmiştir. SPM-1' i IMP ve VIM benzeri enzimlerden ayıran diğer özelliği transpozonlar veya integronlar içinde yer almamasıdır. SPM-1 enzimi penisilin grubu içinde yer alan ampicilin, piperasilin, karbenisilin, azlosilin ve sefalotini hızla hidroliz edebilmektedir. Ancak enzimin sefalosporinlere afinitesi penisilinlerden daha fazladır (142).

2.2.4.2.5.4 GIM-1

Almanya’ da 2002 yılında farklı hastalara ait *P.aeruginosa* izolatlarında tespit edilen GIM-1 (“German imipenemase”) enziminin, IMP ve VIM benzeri enzimlerden tamamen farklı olduğu belirlenmiştir. GIM-1 enziminin aminoasit dizisi en fazla IMP-6, IMP-1 ve IMP-4 (sırasıyla %43.5, %43.1 ve %43.1) enzimleriyle homoloji göstermektedir. GIM-1 VIM benzeri enzimlerle ortalama %31.2 ve SPM-1 ile %28 homoloji göstermektedir (143). Enzimin hidrolitik profili IMP-1’ e benzemekle birlikte IMP-1’ e göre daha zayıf aktiviteye sahiptir. SPM-1 enzimi dışında diğer MBL’ lar gibi GIM-1’ i kodlayan genler integron içinde taşınmaktadır. GIM-1 enzimini kodlayan genlerin bulunduğu integronda ayrıca iki aminoglikozid direnç geni ve OXA-2 enzimini kodlayan gen kaseti de bulunmaktadır (143).

2.2.4.2.6 Deneysel Metallo-beta-laktamaz İnhibitörleri

Beta-laktamaz üreten bakterilerle gelişen enfeksiyonların tedavisinde tedavi başarısını arttırmak amacıyla beta-laktam antibiyotikler beta-laktamaz inhibitörleri ile kombine edilerek kullanılmaktadır. MBL üreten bakteriler ile gelişen enfeksiyonların tedavisinde ise beta-laktam/beta-laktamaz inhibitör kombinasyonları etkili olamamaktadır. MBL’ların beta-laktamaz inhibitörleri karşısında stabil kalmasının pek çok nedeni bulunmaktadır. MBL’ların aktif bölgeleri küçük varyasyonlarla birbirinden farklılık göstermektedir. Bu nedenle tek bir inhibitör ajanın tüm enzimlere etkin olması oldukça zordur (109). Aşılması gereken diğer bir problem, MBL’ların aktif bölge yapılarının hücre fonksiyonlarında gerekli olan bazı memeli enzimlerine benzer olmasıdır. Örneğin insan glioksalaz II enzimi, MBL’ların çinko bağlama bölgelerine yapısal benzerlik göstermektedir. Tiyoesteraz özelliğine sahip olan enzim toksik 2-oksoaldehidlerin yıkımında rol almaktadır (109). Bu olumsuzluklara rağmen bugüne kadar MBL inhibitörü olarak bazı bileşikler geliştirilmiş ve çeşitli MBL’ lar üzerinde denenmiştir. Bu bileşikler arasında tiyoester türevleri, sülfonil hidrazon, süksinik asit türevleri, penisilinat sülfon, bifenil tetrazol, sefotetan, merkaptokarboksilat ve 1- β -metil-karbapenem sayılabilir. Her bir bileşik farklı MBL’lar üzerine denendiği için bileşiklerin aktivitelerini kıyaslamak oldukça zordur. *P.aeruginosa*’ da bulunan IMP-1 enzimine karşı 1- β -metil-karbapenem, penisilinat sülfon ve bazı tiyoester türevleri etkili

bulunmuş, ancak diğer bileşiklerin çalışılan hiçbir MBL üzerine etki göstermediği saptanmıştır (144).

2.2.4.2.7 Metallo-beta-laktamazların Tanısı

MBL' ların klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında tanımlanması amacıyla fenotipik testler kullanılmaktadır. Ancak bugüne kadar duyarlılığı ve özgüllüğü belirlenip standardize edilen bir test henüz bulunmamaktadır. Uygulanan fenotipik testlerin temeli MBL' ların EDTA ile inhibe olma özelliğine dayanmaktadır. Bu amaçla imipenem ve EDTA' nın ya da seftazidim ve 2-merkaptopropionik asitin kullanıldığı disk sinerji testleri, imipeneme duyarlı *E.coli*' nin MBL üreten bakteri ile birlikte bulunduğu inhibisyon zonunun azalmasıyla değerlendirilen Modifiye Hodge Testi, imipenem ve imipenem + EDTA varlığında MİK değerlerindeki azalmanın değerlendirildiği E-test ve mikrodilüsyon testi uygulanabilecek fenotipik testler arasında sayılabilir. Fenotipik testler içinde duyarlılığı en yüksek olan test ise, saflaştırılan enzimin imipenem veya meropenemi spektrofotometrik olarak hidrolize edebildiğini ve bu aktivitenin EDTA varlığında inhibe olduğunu göstermektir (4).

Metallo-beta-laktamaz tanısında genotipik yöntemler de kullanılabilir. Genotipik yöntemler fenotipik yöntemlere göre daha duyarlıdır. Belirli primerler kullanılarak bir izolatta MBL geni olup olmadığı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) uygulanarak belirlenebildiği gibi, her enzime özgül primerler kullanılarak enzim tipini saptamak da mümkündür. MBL' ların genotipik tayininde PCR dışında daha hassas bir yöntem olan DNA probe' ları da kullanılabilir. Moleküler yöntemlerin altın standardı olarak ise klonlama ve sekans analizi kabul edilmektedir (123).

2.2.4.2.8 Tedavi

Metallo-beta-laktamaz üreten bakterilerin büyük bir çoğunluğunu *P.aeruginosa* ve *Acinetobacter* türleri, daha az oranda da *Enterobacteriaceae* ailesi üyeleri oluşturmaktadır. Bu klinik izolatlarda beta-laktam direnç nedenleri arasında beta-laktamazlar, ilaç atım pompaları ve dış membran geçirgenliğinin azalması gibi mekanizmalar yer almaktadır. Çoklu ilaç direnci, klinik izolatta yukarıda sayılan direnç mekanizmalarından en az birinin bulunması halinde ortaya çıkmaktadır.

MBL'ların geniş direnç profiline sahip olması yanında, aminoglikozit gibi farklı antibiyotiklere direnç genleri ile beraber bulunabilmesi de önemli özelliklerinden biridir. MBL pozitif suşlar genel olarak beta-laktamlara, aminoglikozitlere ve florokinolonlara dirençli iken polimiksinlere duyarlıdır. Bugüne kadar MBL pozitif izolatlarla gelişen enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilecek stratejiler üzerine geniş çalışmalar yapılmamıştır. MBL inhibitörleri ile in vitro koşullarda denemeler yapılsa da, tedavide kullanılabilecek MBL inhibitörü henüz bulunmamaktadır. Tedavi alternatifi olarak, çoklu ilaç dirençli gram-negatif bakterilerle gelişen enfeksiyonlarda etkinliği gösterilmiş olan polimiksin B tercih edilmektedir (145). Son yapılan çalışmalarda, polimiksin B' nin fazla toksik olmadığı, tedavi başarısı için uygun bir aminoglikozit ile kombine edilerek kullanılabileceği belirtilmektedir (146).

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 *P.aeruginosa* izolatları

Çalışma kapsamına Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Patoloji Laboratuvarı'na 2002 ve 2003 yıllarında gönderilen çeşitli örneklerden ve Çocuk Göğüs Hastalıkları Bölümü'nden gönderilen balgam örneklerinden ayrıştırılan *P.aeruginosa* izolatları alındı. İzolatlar Sceptor (Becton Dickonson Diagnostic Instrument Systems, Sparks, Md.) ve standart mikrobiyolojik yöntemlerle daha önce tanımlanmıştı. Disk difüzyon yöntemiyle seftazidime ve/veya imipeneme dirençli suşlar çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya ayrıca daha önce metallo-beta-laktamaz varlığı gösterilmiş ve sekans analizi ile enzim tipi belirlenmiş 11 *P.aeruginosa* suşu alındı.

Disk difüzyon yöntemi: Çalışmaya alınan izolatlarda imipenem ve seftazidim direnci disk difüzyon yöntemiyle tekrar test edildi. Bu amaçla NCCLS önerileri doğrultusunda Mueller Hinton Agar (MHA) (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) kullanıldı. İzolatların taze kültürlerinden Mueller Hinton Buyyon'a (MHB) (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) 0.5 Mc Farland bulanıklık sağlanacak şekilde bakteri süspansiyonu yapıldı. Bakteri süspansiyonu steril bir eküvyon ile MHA yüzeyine homojen bir şekilde yayıldı. Besiyeri yüzeyinin kurumaması takiben seftazidim (30µg) ve imipenem (10µg) diskleri birbirinden en az 22 mm uzaklık olacak şekilde besiyeri üzerine yerleştirildi. Bir gece 35°C'de normal atmosferde inkübe edilen plakların seftazidim ve imipenem zon çapları ölçülerek, seftazidim için ≥ 18 mm ve imipenem için ≥ 16 mm ölçülen zon çapları dirençli kabul edildi (147). Disk difüzyon testiyle imipenem ve / veya seftazidim dirençli izolatlar çalışmaya dahil edildi. İzolatlar diğer testler yapılincaya kadar -20°C' de %10 gliserol içeren beyin kalp infüzyon buyyonda saklandı.

3.2 İzolatların Antibiyotik Duyarlılıklarının Saptanması

P.aeruginosa izolatlarının antibiyotik duyarlılığı NCCLS önerileri doğrultusunda agar dilüsyon yöntemiyle saptandı (147).

Besiyeri: Bu yöntemde MHA kullanıldı. Toz halindeki MHA'dan 38 gram 1000 ml distile suya eklenerek otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edildi. Besiyerine eş zamanlı olarak hazırlanmış antibiyotik solüsyonları eklenerek plaklara döküldü.

Antibiyotikler: Çalışmada altı antimikrobiyal ajan için agar dilüsyon yöntemi uygulandı. Çalışılan antimikrobiyal ajanlar, seftazidim (Glaxo Smith Kline, Worthing, İngiltere), imipenem (Merck Sharp and Dohme, A.B.D), meropenem

(Astra Zeneca Pharmaceuticals, İngiltere), siprofloksasin (Bayer, Almanya), tobramisin (Nobel, Almanya) ve sefaperazon sulbaktam (Pfizer, İsviçre) idi. Tüm çalışılan antimikrobiyal ajanların çözülmesi ve seyreltilmesi amacıyla distile su kullanılmıştır.

Her antibiyotikten NCCLS kriterlerine uygun olarak stok solüsyonları hazırlandı. Tüm antibiyotiklerin iki kat dilüsyonları yapıldı. Siprofloksasin için plaktaki en yüksek konsantrasyon 64 µg/ml ve en düşük konsantrasyon 0.125 µg/ml olacak şekilde on ayrı konsantrasyonda antibiyotik dilüsyonları hazırlandı. Tobramisin, imipenem, seftazidim ve meropenem için plaktaki en yüksek konsantrasyon 128 µg/ml ve en düşük konsantrasyon 1 µg/ml olacak şekilde sekiz ayrı konsantrasyonda antibiyotik dilüsyonları hazırlandı. Sefaperazon sulbaktam için plaktaki en yüksek konsantrasyon 256 µg/ml ve en düşük konsantrasyon 4 µg/ml olacak şekilde yedi ayrı konsantrasyonda antibiyotik dilüsyonları hazırlandı. Besiyeri dökülürken hazırlanan antibiyotik dilüsyonlarından 2 cc plağa döküldü, üzerine 18 cc besiyeri eklenerek plağın her tarafında homojen bir karışım sağlanacak şekilde karıştırıldı. Besiyerlerinin oda ısısında donmasını takiben +4°C'ye kaldırılarak ertesi gün kullanıldı.

Bakteri üremesi kontrol plağı olarak antibiyotik içermeyen MHA besiyeri kullanıldı.

İnokülümün Hazırlanması: *P. aeruginosa* izolatları stoktan açılarak kanlı agara pasajlandı. 18 saat 37°C'da inkübe edildi. Bu kültürlerden Mueller Hinton Buyyonda (MHB) 0.5 Mc Farland bulanıklık olacak şekilde süspansiyon yapıldı. Bu süspansiyonların standart olarak ortalama 10^8 cfu/ml bakteri içerdiği kabul edildi. Bakteri süspansiyonu MHB ile 1:100 oranında sulandırılarak 10^6 cfu/ml konsantrasyona getirildi.

Agar Plaklarının İnokülasyonu: Agar plakları inokülasyon öncesi etüvde 37°C'da bekletilerek ısıtıldı. Çalışma öncesi agar yüzeyinin kuru olmasına dikkat edildi. Önce kontrol plağına ekim yapıldı. Daha sonra en düşük antibiyotik konsantrasyonu içeren plaktan başlayarak her antibiyotik için hazırlanan farklı dilüsyondaki besiyerlerine "multipoint inoculator"(Wellrep 2, Denley Inc., İngiltere) kullanılarak 10 µl ekim yapıldı. 10^6 cfu/ml konsantrasyondan 10 µl ekildiği için her bakteri izolatından agar yüzeyine 10^4 cfu/ml inoküle edilmiş oldu.

Plakların İnkübasyonu: Ekilen plaklar bakteri damlaları kuruyuncaya kadar oda ısısında bekletildi. Kuruduktan sonra petri plakları çevrilerek 35°C’da 16-20 saat inkübe edildi.

Sonuçların yorumu: MİK değerleri bakteri üremesinin inhibe olduğu en düşük konsantrasyon olarak kabul edilmektedir. *P.aeruginosa* için NCCLS tarafından bildirilen “breakpoint” değerleri Tablo 3.1’de gösterilmektedir.

Tablo 3.1. NCCLS tarafından *P.aeruginosa* için bildirilen “breakpoint” değerleri

ANTİBİYOTİK	Duyarlı (µg/ml)	Orta dirençli (µg/ml)	Dirençli (µg/ml)
Seftazidim	≤ 8	16	≥ 32
Sefaperazon sulbaktam	≤ 16	32	≥ 64
İmipenem	≤ 4	8	≥ 16
Meropenem	≤ 4	8	≥ 16
Siprofloksasin	≤ 1	2	≥ 4
Tobramisin	≤ 4	8	≥ 16

Sonuçların kalite kontrolü: Agar dilüsyon yönteminde her çalışma sırasında kontrol suşu olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 kullanıldı.

Aztreonam duyarlılığı: Çalışılan *P.aeruginosa* izolatlarının aztreonama olan duyarlılıkları disk difüzyon yöntemiyle saptandı. Bu amaçla izolatların taze kültürlerinden MHB içinde 0.5 Mc Farland bulanıklık standardına uygun bakteri süspansiyonu hazırlanarak steril eküvyon yardımıyla MHA üzerine homojen ekimi yapıldı. Besiyerinin kurummasını takiben aztreonam diski (30µg) besiyeri üzerine yerleştirilerek plaklar 18 saat 35°C’da inkübe edildi. İnhibisyon zonu ≤ 15mm ise duyarlı, 16-21mm ise orta dirençli ve ≥ 22 mm ise dirençli kabul edildi.

3.3 Metallo-beta-laktamazın Fenotipik Olarak Tanımlanması

Bugüne kadar rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında metallo-beta-laktamaz tespiti için kullanılmak üzere geliştirilen testlerin bir çoğu, bu enzimlerin EDTA ya da 2-merkaptopropionik asit gibi metal şelatörler varlığında inhibe olma özelliğinden faydalanarak geliştirilmiştir.

3.3.1 Çift Disk Sinerji Testi

Çift disk sinerji testinin (ÇDST) temeli, EDTA varlığında imipeneme karşı oluşan inhibisyon zonunun genişlemesi mekanizmasına dayanmaktadır (148). Bu amaçla *P.aeruginosa* izolatlarının taze kültürlerinden MHB'na 0.5 Mc Farland bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlandı. Steril eküvyon yardımıyla bakteri süspansiyonundan MHA üzerine homojen ekim yapıldı. Besiyerinin kurummasını takiben imipenem diski (10µg) besiyeri yüzeyine yerleştirildi. İmipenem diskinin bir ucundan 10 mm uzağa boş bir kağıt disk yerleştirildi. Boş kağıt diskin üzerine 10µl EDTA (0.5M, pH 8) eklendi. Plaklar 35°C'da 18 saat inkübe edildi. İmipeneme karşı oluşan inhibisyon zon çapının EDTA'ya doğru genişlemesi metallo-beta-laktamaz varlığı açısından pozitif sonuç olarak değerlendirildi. Sonuçların kalite kontrolü, daha önce MBL ürettiği fenotipik ve genotipik yöntemlerle belirlenmiş ve enzim tipi tayin edilmiş *P.aeruginosa* izolatlarıyla yapıldı. Bu pozitif kontroller VIM-1, VIM-2, VIM-4, VIM-5, IMP-1, IMP-2 ve SPM-1 üreten *P.aeruginosa* izolatlarından oluşmaktadır. Negatif kontrol olarak MBL üretmediği bilinen *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşu kullanıldı.

3.3.2 Kombine Disk Sinerji Testi

Kombine disk sinerji testinin (KDST) mekanizması, EDTA varlığında ölçülen imipenem inhibisyon zon çapının elde edilen imipenem inhibisyon zon çapından >7mm daha fazla olması temeline dayanmaktadır (149). Bu amaçla *P.aeruginosa* izolatlarının taze kültürlerinden MHB'na 0.5 Mc Farland bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlanarak MHA'a steril eküvyon yardımıyla bakterinin homojen inokülasyonu yapıldı. Besiyeri yüzeyinin kurummasını takiben aralarında en az 22 mm olacak şekilde iki imipenem diski (10µg) besiyeri yüzeyine yerleştirilerek imipenem disklerinden bir tanesinin üzerine 10µl EDTA (0.5M, pH 8) eklendi. Plaklar 35°C'da 18 saat inkübe edildi. İmipenem + EDTA için ölçülen

inhibisyon zon çapı imipenem için ölçülen inhibisyon zon çapından 7 mm daha geniş ise test sonucu pozitif olarak değerlendirildi. Testin kalite kontrolü, daha önceki testlerde kullanılan metallo-beta-laktamaz pozitif ve metallo-beta-laktamaz negatif izolatlarla yapıldı.

3.3.3 E-test

Çalışmamızda kullandığımız E-test (AB Biodisk, Solna, İsveç) ticari olarak bulunan ve metallo-beta-laktamaz enziminin fenotipik tayininde kullanılmak üzere geliştirilmiş bir testtir. E-test şeritinin bir tarafında giderek azalan konsantrasyonda imipenem (256 µg/ml-4 µg/ml), diğer tarafında ise imipenemle birlikte EDTA bulunmaktadır (64 µg/ml-1 µg/ml). İmipenem + EDTA kısmında imipenem konsantrasyonu giderek azalırken EDTA konsantrasyonu (4 µg/ml) sabittir. İmipenem+EDTA MİK değeri ile imipenem MİK değeri arasında en az sekiz kat azalma saptanırsa, test metallo-beta-laktamaz enzimi açısından pozitif kabul edilmektedir. Testin pozitif olmasının diğer bir kriteri, E-test şeritinin imipenem veya EDTA içermeyen orta bölümünde “ghost zone” (hayalet bölge) olarak adlandırılan görüntünün izlenmesidir (150). Çalışmaya alınan *P.aeruginosa* izolatlarına uygulanan E-test yönteminde, bakteri izolatlarının taze kültürlerinden MHB’na 0.5 Mc Farland bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlanarak steril bir eküvyonla MHA üzerine bakterinin homojen inokülasyonu yapıldı. Besiyeri yüzeyinin kurumasının ardından E-test şeridi besiyeri üzerine yerleştirildi ve plaklar 35°C’da 18 saat inkübe edildi. Testin kalite kontrolü, diğer testlerde kullanılan metallo-beta-laktamaz pozitif ve metallo-beta-laktamaz negatif suşlar ile yapıldı.

3.3.4 “Modifiye Hodge Test”

“Modifiye Hodge Test” (MHT), diğer testlerin aksine metallo-beta-laktamaz enziminin EDTA varlığında inhibe olması prensibine dayanmamaktadır. MHT, imipeneme duyarlı bir bakteri izolatının, metallo-beta-laktamaz üreten bir bakteri ile birlikte bulunduğu imipenem varlığında üreyebilmesi temeline dayanmaktadır (151). Bu testte imipeneme duyarlı bakteri suşu olarak *E.coli* ATCC 35218

kullanıldı. MHT uygulanmadan önce kullanılacak olan *E.coli* suşunun imipeneme duyarlı olduğu disk difüzyon yöntemiyle doğrulandı.

E.coli suşunun kanlı agardaki taze kültüründen MHB'na 0.5 Mc Farland bulanıklığında süspansiyonu yapılarak, bakteri süspansiyonunun MHB' da 1:10 sulandırımı yapıldı ve steril eküvyon yardımıyla MHA üzerine homojen inokülasyonu sağlandı. Besiyeri yüzeyinin kurumasını takiben besiyerinin merkezine imipenem diski (10µg) yerleştirildi. Test edilecek *P.aeruginosa* izolatının kanlı agardaki taze kültüründen steril eküvyon yardımıyla bakteri kolonileri toplandı ve imipenem diskinin bir ucundan başlayarak besiyeri kenarına doğru yoğun bakteri ekimi yapıldı. Bu şekilde her plakta biri pozitif kontrol olmak üzere toplam dört izolat çalışılmış oldu. İnokülasyonu takiben plaklar 35°C'da 18 saat inkübe edildi. *E.coli* suşuna bağlı oluşan inhibisyon zonunun *P.aeruginosa* üremesinin bulunduğu bölgede azalması ve bu bölgede *E.coli* üremesinin görülmesi pozitif test sonucu olarak kabul edildi.

3.3.5 Çinko ile Zenginleştirilmiş Modifiye Hodge Testi

Metallo-beta-laktamaz enziminin çinko varlığında aktivitesinin arttığı bilinmektedir. Bu özellikten yararlanarak MHT'nin duyarlılığının çinko varlığında artıp artmadığını test etmek amacıyla, MHT uygulandıktan sonra plaklar inkübe edilmeden önce imipenem diski üzerine 10µl 50mM çinko sülfat ($ZnSO_4$) eklendi (152). Sonuçlar MHT sonuçlarıyla karşılaştırıldı.

3.3.6 İmipenem Hidrolizi

Bugüne kadarki gelişmelerin ışığında, metallo-beta-laktamaz tespitinde kullanılan fenotipik testler içinde duyarlılığı en yüksek test olarak imipenem hidrolizi kabul edilmektedir. İmipenem hidrolizi testi, bakteri izolatından elde edilen enzimin imipenemi hidrolize etmesi ve bu aktivitenin EDTA varlığında inhibe olması temeline dayanmaktadır (153).

Enzim eldesi: Çalışılan *P.aeruginosa* izolatlarından beta-laktamaz enziminin elde edilmesi amacıyla izolatların kanlı agardaki taze kültürlerinden 1-2 koloni alınarak 10 ml MHB'na inoküle edildi. Sıvı kültürler 35°C'da bir gece inkübe edildi. Ertesi gün 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek MHB'da üreyen bakteriler

çöktürüldü. Üst sıvı atılarak bakteri çökeltisi üzerine 1.5 ml 100µM PBS (“phosphate Buffer Solution”) eklendi. Tüpler vorteksenerek mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Bakterilerin parçalanması ve beta-laktamaz enziminin açığa çıkması amacıyla sonikasyon işlemi uygulandı. Mikrosantrifüj tüpünde bulunan her izolat beş defa 50V’da 20 saniye sonikasyon cihazında (Consort, Belçika) sonike edildi. Sonikasyon aşamaları arasında mikrosantrifüj tüpleri buz içinde bekletildi.

Sonikasyon aşamasını takiben mikrosantrifüj tüpleri 4500 rpm’de 6°C’ da 30 dakika santrifüj edildi. Hidroliz deneyinde kullanılmak üzere üst sıvı alındı.

Sonikasyonun kalite kontrolü: Sonikasyon işleminden sonra beta-laktamaz enziminin elde edilip edilmediğini saptamak amacıyla toplanan üst sıvılardan 20’şer µl alınarak nitrosefin disklerine (Becton Dickinson, A.B.D) damlatıldı. Nitrosefin diskinin pembe-kırmızı renge dönüşmesi üst sıvıda beta-laktamaz bulunduğunun göstergesi olarak kabul edildi.

Hidroliz deneyi: Elde edilen enzimin imipenemi hidrolize edip etmediği spektrofotometrik yöntemle çalışıldı. İlk spektrofotometre küvetine 2 ml imipenem (150µM) ve 100µl PBS eklenerek 299 nm’de absorbans değeri okundu. Hidroliz deneyi için küvetlere 2 ml imipenem (150µM) ve 100µl üst sıvıdan konarak 299 nm’de ilk absorbans değeri saptandı. Her 30 saniyede bir kez olmak üzere toplam 5-10 dakika absorbans değeri okunarak varsa absorbanstaki azalma kaydedildi. Her çalışmada, daha önce metallo-beta-laktamaz pozitif bulunmuş en az bir izolat, pozitif kontrol olarak çalışmaya dahil edildi (153).

Metallo-beta-laktamaz varlığının doğrulanması: Hidroliz deneyinde saptanan metallo-beta-laktamaz enziminin varlığını doğrulamak amacıyla EDTA ile inhibisyon testi yapıldı. Bu amaçla 200µl üst sıvı spektrofotometre küvetine alınarak üzerine 40µl 50mM EDTA eklendi ve oda ısısında 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda üzerine 2 ml imipenem (150µM) eklenerek spektrofotometrede 299 nm’de absorbans değeri saptandı. Her 30 saniyede bir toplam 5-10 dakika absorbans değeri okundu. Absorbans değerinde her hangi bir değişiklik gözlenmemiş ise imipenemin hidrolizine neden olan enzimin metallo-beta-laktamaz enzimi olduğu sonucuna varıldı.

3.4. Metallo-beta-laktamaz Enziminin PCR Analizi İle Saptanması

Çalışmaya alınan 110 *P.aeruginosa* izolatı PCR analizi ile *bla_{VIM}* ve *bla_{IMP}* genleri açısından incelenmiştir.

3.4.1 Kalıp DNA'nın Hazırlanması

İzolatlar bir gece 37°C'da Mueller Hinton buyyonda inkübe edildi. Bakteri süspansiyonları 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek bakteriler çöktürüldü. Çökelti üzerine 1 ml TE (Tris-EDTA) tamponu eklenip vortekslenerek homojenize edildikten sonra tekrar 10000 rpm'de santrifüj edildi ve dipteki çökelti üzerine 1 ml TE tamponu kondu. Bu yıkama işlemi beş kez tekrarlandı. Daha sonra çökelti üzerine 100 µl TE tamponu eklenerek, karışım 30 dakika su banyosunda kaynatıldı. 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj sonrası üst sıvıda kalan DNA steril bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.

Kalıp DNA'nın hazırlanması sırasında kullanılan TE tamponunun içeriği şu şekildedir:

TE tamponu (pH 8.0):

2M TrisHCl 0.5 ml

0.5M EDTA 0.2 ml

Steril distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

0.5M EDTA (etilendiaminotetraasetikasit) stok çözeltisi (pH 8.0):

EDTA (Sigma) 18.61g

Steril distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

2M Tris (trihidroksiaminometan) HCl stok çözeltisi (pH 8.0):

Tris Baz (Sigma) 10.6g

Tris HCl (Sigma) 17.7g

Steril distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

3.4.2 PCR ile Çoğaltma

PCR ile çoğaltmada *bla_{IMP}* geni için bir, *bla_{VIM}* geni için iki farklı primer seti kullanılmıştır.

bla_{IMP} geni için primer seti; *bla_{IMP}* F (5'-ATG AGC AAG TTA TCT TAG TAT TC-3') ve *bla_{IMP}* R (5'-GCT GCA ACG GAC TTG TTA G-3') primerleri kapsamakta ve 765bp ürün elde edilmesini sağlamaktadır (154).

bla_{VIM} geni için birinci primer seti; *bla_{VIM}* F (5'-AGT GGT GAG TAT CCG ACA G-3') ve *bla_{VIM}* R (5'-ATG AAA GTG CGT GGA GAC-3') primerlerini kapsamakta ve 261bp ürün elde edilmesini sağlamaktadır (155).

bla_{VIM} geni için ikinci primer seti ise, *bla_{VIM}* F (5'-TTA TGG AGC AGC AAC GAT GT-3') ve *bla_{VIM}* R (5'-CGA ATG CGC AGC ACC AGG-3') primerlerini kapsamakta ve 621bp ürün elde edilmesini sağlamaktadır (154).

PCR toplam 25µl hacimde gerçekleşmiştir.

Tepkime karışım içeriği:

Steril distile su

1x PCR tamponu (Metis Bio. Ltd., Türkiye)

0.2 mM dNTP karışımı (Metis Bio. Ltd., Türkiye)

2.5 mM MgCl₂ (Metis Bio. Ltd., Türkiye)

0.250 U Taq polimeraz (Metis Bio. Ltd., Türkiye)

10 pmol *bla_{VIM}* /*bla_{IMP}* F primer, 10 pmol *bla_{VIM}*/*bla_{IMP}* R primer (TIB Molbiol , Berlin, Almanya)

2.5 µl kalıp DNA

Otomatik “thermocycler”a (MJ Research Inc, A.B.D) konulan tüpler 94°C’da 5 dakika denatürasyon sonrası, her döngü,

94°C’da 25 saniye denatürasyon

57°C’da 40 saniye primer birleşmesi

72°C’da 50 saniye polimerizasyon olmak üzere 30 döngü uygulanmıştır.

Son olarak 72°C’da 6 dakika polimerizasyon süresi eklenmiştir (155).

3.4.3 Agaroz Jel Elektrophorezi ile Bantların Okunması

bla_{VIM} ve *bla_{IMP}* genlerine ait PCR ürünlerinin analizi agaroz jel elektrophorez ile gerçekleştirildi. Bunun için %1.7 agaroz içeren jel hazırlandı. “Thermocycler”dan çıkarılan her bir tepkime tüpünden 15 µl alınarak 6 µl yükleme tamponu ile

karıştırıldı ve agaroz jeldeki kuyucuklara kondu. Elektroforez işlemi 103 V'da 80 dakika süre ile gerçekleştirildi. Jel daha sonra 30 dakika 0.5g/ml etidyum bromür içerisinde boyandı ve distile su ile yıkandı. Jeldeki amplifikasyon ürünleri ultraviyole transillüminatör (UVP) ile görüntülendi. Her bir jel için ϕ x174HaeIII moleküler ağırlık standardı, örneklerin bant büyüklüklerinin gerçek boyutunu ölçmek için kullanıldı.

3.5 PCR Pozitif İzolatların Genotipik Benzerliğinin Araştırılması

PCR ile metallo-beta-laktamaz gen varlığı saptanan erişkin hastalara ait dokuz izolatanın genotipik benzerliklerini değerlendirmek amacıyla AP-PCR yöntemi uygulandı (156). Bu yöntemde M13 primeri (5'-gAgggTggCggTTCT) kullanıldı.

PCR toplam 25 μ l hacimde gerçekleştirildi.

Tepkime karışımı içeriği:

Steril distile su

1x PCR tamponu (Metis Bio. Ltd., Türkiye)

0.2 mM dNTP karışımı (Metis Bio. Ltd., Türkiye)

2.5 mM MgCl₂ (Metis Bio. Ltd., Türkiye)

0.250 U Taq polimeraz (Metis Bio. Ltd., Türkiye)

30 pmol M13 primeri (TIB Molbiol, Berlin, Almanya)

2 μ l kalıp DNA

Elde edilen PCR karışımı “thermocycler” cihazına konarak aşağıdaki program uygulandı.

1. 94 °C'de 4 dakika
2. 30 °C'de 1 dakika
3. 72 °C'de 1 dakika (1, 2 ve 3 nolu aşamalar arka arkaya iki döngü)
4. 94 °C'de 30 saniye
5. 55 °C'de 30 saniye
6. 72 °C'de 1 dakika (4, 5 ve 6 no'lu aşamalar arka arkaya 44 döngü)
7. 72 °C'de 4 dakika

Agaroz jel elektroforezi ile bantların okunması: Elde edilen PCR ürünleri %1.5 agaroz jelde 110 V'da 100 dakika yürütüldü ve 30 dakika etidyum bromür ile boyandı. Jeldeki amplifikasyon ürünleri ultraviyole transillüminatör ile görüntülendi.

İki veya daha fazla sayıda farklı bant görülen izolatların genotipik olarak farklı oldukları kabul edildi.

3.6 İstatistiksel Değerlendirme

Bu çalışmada elde edilen sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesi, bağımsız gruplarda iki yüzde arasındaki farkın önemlilik testi kullanılarak yapıldı.

BULGULAR

4.1 İzolatlar

Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na 2002 ve 2003 yılları arasında gönderilen çeşitli klinik örneklerden toplam 1603 adet *P.aeruginosa* ayrıştırılmıştır. Bu izolatların 664'ü farklı hastalara aittir. Farklı hastalara ait 664 *P.aeruginosa* izolatından seftazidim ve/veya imipenem dirençli 75 tanesi ve Çocuk Göğüs Hastalıkları Bölümü'nden gönderilen balgam örneklerinden ayrıştırılan 35 adet seftazidim ve/veya imipenem dirençli *P.aeruginosa* izolatı olmak üzere toplam 110 izolat çalışmaya alınmıştır. Çalışmaya alınan 110 *P.aeruginosa* izolatının disk difüzyon yöntemiyle 45'i (%40.9) imipenem ve seftazidime dirençli, 27'si (%24.5) imipeneme dirençli, seftazidime duyarlı ve 38'i (%34.6) imipeneme duyarlı seftazidime dirençlidir. Çalışmaya alınan *P.aeruginosa* izolatlarının disk difüzyon yöntemi ile imipenem ve seftazidim duyarlılıklarının hasta gruplarına göre dağılımı Tablo 4.1'de verilmektedir.

Tablo 4.1. Çalışmaya alınan 110 *P.aeruginosa* izolatının disk difüzyon yöntemiyle imipenem ve seftazidim duyarlılıklarının hasta gruplarına göre dağılımı.

	ÇOCUK		ERİŞKİN		TOPLAM	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
IMP-D CAZ-D	22	20.0	23	20.91	45	40.91
IMP-D CAZ-H	12	10.91	15	13.64	27	24.55
IMP-H CAZ-D	1	0.90	37	33.64	38	34.54
TOPLAM	35	31.81	75	68.19	110	100.00

IMP: İmipenem; CAZ: Seftazidim; D: Dirençli; H: Duyarlı

Çalışmaya alınan 110 *P.aeruginosa* izolatı balgam (38, %34.50), pü (21, %19.09), kan (17, %15.45), bronkoalveoler lavaj (13, %11.81), idrar (8, %7.27), katater (4, %3.63), derin trakeal aspirat (4, %3.63), safra (3, %2.72), torasentez

mayi (1, %0.90) ve böbrek taşı (1, %0.90) olmak üzere pek çok klinik örnekten ayrıştırılmıştır.

Çalışmaya alınan 110 *P.aeruginosa* izolatından 35'i (%31.80) Çocuk Göğüs Hastalıklarından, 75'i (%68.19) Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hastanesi'nin farklı bölümlerinden gönderilen örneklerden ayrıştırılmıştır. İzolatların ayrıştırıldığı örneklerin gönderilen bölümlere göre dağılımı Tablo 4.2'de verilmektedir.

Tablo 4.2. Çalışmaya alınan *P.aeruginosa* izolatlarının ayrıştırıldığı örneklerin gönderildikleri bölümlere göre dağılımı.

Örneklerin Gönderildiği Bölüm	Sayı	%
Çocuk Göğüs Hastalıkları	35	31.80
Yoğun Bakım	28	25.45
Dahiliye	15	13.63
Yanık	15	13.63
Cerrahi Birimler	13	11.81
Büyük Acil Plk.	4	3.63
Toplam	110	100.00

4.2. *P.aeruginosa* İzolatlarına Ait Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları

Çalışmaya alınan 110 *P.aeruginosa* izolatına ait antibiyotik duyarlılık testleri, NCCLS önerilerine uygun olarak agar dilüsyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Siprofloksasin, seftazidim, meropenem, imipenem, tobramisin ve sefoperazon sulbaktam olmak üzere toplam altı antibiyotiğin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri saptanmıştır. Çalışmaya dahil edilen 110 klinik *P.aeruginosa* izolatının her bir antibiyotik için MİK aralığı, MİK₅₀, MİK₉₀ değerleri ile direnç yüzdelerinin hasta gruplarına göre dağılımları Tablo 4.3'de verilmektedir. Bağımsız gruplarda iki yüzde arasındaki farkın önemlilik testinde, çocuk ve erişkin hasta grubunda bulunan siprofloksasin, seftazidim, tobramisin ve sefoperazon-sulbaktam direnç yüzdeleri arasındaki

farkın anlamlı olmadığı ($p>0.05$), meropenem ve imipenem direnç yüzdeleri arasındaki farkın ise anlamlı olduğu ($p<0.05$) saptanmıştır.

Çalışmaya pozitif kontrol suşu olarak daha önce metallo-beta-laktamaz ürettiği saptanan ve DNA sekans analizi ile ürettiği enzim tipi belirlenen toplam 11 *P.aeruginosa* izolatı (3 VIM-2(+), 2 VIM-1(+), 2 VIM-4(+), 1 SPM-1(+), 1 VIM-5(+), 1 IMP-1(+) ve 1 IMP-2(+)) alınmıştır. Pozitif kontrol suşların agar dilüsyon yöntemiyle çalışılan altı antibiyotik için MİK değerleri saptandığında, bir adet VIM-2(+) *P.aeruginosa* izolatı siprofloksasine duyarlı bulunurken, diğer 10 pozitif kontrol suşunun çalışılan altı antibiyotiğe de yüksek düzeyde dirençli oldukları (imipenem, meropenem, tobramisin, seftazidim MİK değeri ≥ 128 $\mu\text{g/ml}$, siprofloksasin MİK değeri 64 $\mu\text{g/ml}$, sefaperazon-sulbaktam MİK değeri $\geq 256\mu\text{g/ml}$) belirlenmiştir.

Florokinolon (siprofloksasin) ve aminoglikozit (tobramisin) direncine sahip olup beta-laktam grubu antibiyotiklerden (seftazidim, meropenem, imipenem, sefaperazon-sulbaktam) en az birine dirençli olan izolat, çoklu ilaç dirençli olarak kabul edilmiştir. Buna göre çalışmaya alınan 110 *P.aeruginosa* izolatının 66'sı (%60) çoklu ilaç direncine sahiptir.

Çalışmaya alınan 110 *P.aeruginosa* izolatının aztreonam duyarlılıklarına disk difüzyon yöntemiyle bakılmıştır. NCCLS kriterlerine göre inhibisyon zon çapı ≤ 15 mm dirençli, 16-21 mm orta dirençli ve ≥ 22 mm duyarlı olarak kabul edilmiştir. Bu kriterlere göre izolatların 63'ü (%57.3) aztreonama dirençli, 27'si (%24.5) orta dirençli ve 20'si (%18.2) duyarlı bulunmuştur. Çalışılan *P.aeruginosa* izolatlarının disk difüzyon yöntemiyle aztreonam duyarlılıklarının hasta gruplarına göre dağılımı Tablo 4.4'de verilmektedir.

Çalışma sırasında pozitif kontrol suşu olarak kullanılan *P.aeruginosa* izolatlarının disk difüzyon yöntemi ile aztreonam duyarlılıklarına bakıldığında; 11 pozitif kontrol suşunun altısı aztreonama dirençli, beşi ise orta dirençli bulunmuştur.

Tablo 4.3. Çalışmaya alınan 110 *P.aeruginosa* izolatının agar dilüsyon yöntemiyle siprofloksasin, seftazidim, meropenem, imipenem, tobramisin ve sefaperazon-sulbaktam MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri ile direnç yüzdelerinin hasta gruplarına göre dağılımı.

	MİK ARALIĞI µg/ml.	ÇOCUK			ERİŞKİN			TOPLAM		
		MİK ₅₀ µg/ml.	MİK ₉₀ µg/ml.	DİRENÇ %	MİK ₅₀ µg/ml.	MİK ₉₀ µg/ml.	DİRENÇ %	MİK ₅₀ µg/ml.	MİK ₉₀ µg/ml.	DİRENÇ %
Seftazidim	1 - >128	16	>128	65.71	64	>128	80.00	64	>128	75.45
Sefaperazon Sulbaktam	8 - >256	64	128	71.42	64	256	90.66	64	256	84.55
İmipenem	1 - >128	64	>128	94.28	16	64	72.00	16	>128	79.10
Meropenem	1 - >128	32	128	91.42	16	128	73.33	16	128	79.10
Siprofloksasin	0.125 - 128	2	8	51.42	4	128	69.33	4	64	63.64
Tobramisin	1 - >128	8	64	77.14	32	128	81.33	16	128	80.00

Tablo 4.4 Çalışmaya alınan 110 *P.aeruginosa* izolatının disk difüzyon yöntemiyle aztreonam duyarlılıklarının hasta gruplarına göre dağılımı.

	Dirençli ≤15mm	Orta Dirençli 16-21mm	Duyarlı ≥22mm	Toplam
Çocuk	21(%19.1)	5(%4.5)	9(%8.2)	35(%31.8)
Erişkin	42(%18.2)	22(%20.0)	11(%10.0)	75(%68.2)
Toplam	63(%57.3)	27(%24.5)	20(%18.2)	110(%100.0)

4.3. Metallo-beta-laktamaz Tayininde Kullanılan Fenotipik Testler

4.3.1 Çift Disk Sinerji Testi

Çift disk sinerji testi ile 110 *P. aeruginosa* izolatının 22'sinde (%20.0) metallo-beta-laktamaz fenotipik olarak pozitif bulunmuştur. Çift disk sinerji testi ile pozitif ve negatif bulunan izolatların hasta gruplarına göre dağılımları Tablo 4.5'de verilmektedir. Çift disk sinerji testi pozitif olan bir izolat Şekil 4.1'de gösterilmektedir. Çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan 11 metallo-beta-laktamaz pozitif *P.aeruginosa* suşundan VIM-1, VIM-4, VIM-5 ve IMP-1 pozitif suşlar çift disk sinerji testi ile pozitif sonuç verirken VIM-2, IMP-2 ve SPM-1 pozitif suşlar metallo-beta-laktamaz açısından şüpheli sonuç vermiştir.

Tablo 4.5. Çift disk sinerji testi (ÇDST) ile fenotipik olarak metallo-beta-laktamaz pozitif ve negatif bulunan izolatların hasta gruplarına dağılımı.

		ÇOCUK		ERİŞKİN		TOPLAM	
		SAYI	%	SAYI	%	SAYI	%
ÇDST	POZİTİF	6	5.45	16	14.54	22	20.00
	NEGATİF	29	26.36	59	53.65	88	80.00
	TOPLAM	35	31.81	75	68.19	110	100.00

4.3.2 E-test

Çalışmaya alınan izolatlarda metallo-beta-laktamazın fenotipik tayini amacıyla kullanılan testlerden biri de E-testtir. İmipenem dirençli suşlar seçilerek yapılan E-test toplam 84 izolata uygulanmıştır. E-test uygulanan 84 izolatın 25'inin (%29.8) fenotipik

olarak metallo-beta-laktamaz ürettiği, 59'unun (%70.2) ise fenotipik olarak metallo-beta-laktamaz üretmediği saptanmıştır. E-test ile fenotipik olarak metallo-beta-laktamaz ürettiği saptanan iki izolat Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'de gösterilmektedir. Çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan 11 metallo-beta-laktamaz pozitif suşun hepsi E-test ile pozitif sonuç vermiştir.

4.3.3 Kombine disk sinerji testi (KDST)

Çalışmaya alınan izolatlarda fenotipik olarak metallo-beta-laktamaz üretiminin gösterilmesi amacıyla uygulanan üçüncü fenotipik test kombine disk sinerji testidir. Kombine disk sinerji testinin uygulandığı 110 *P.aeruginosa* izolatının 32'sinde (%29.1) fenotipik olarak metallo-beta-laktamaz üretildiği, 78'inde (%70.9) ise üretilmediği saptanmıştır. Kombine disk sinerji testi ile fenotipik olarak metallo-beta-laktamaz ürettiği saptanan bir izolat Şekil 4.4'de gösterilmektedir. Çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan 11 metallo-beta-laktamaz pozitif suşun hepsi kombine disk sinerji testi ile pozitif sonuç vermiştir.

E-test çalışılan 84 izolatta kombine disk sinerji testinin sonuçları Tablo 4.6'da verilmektedir.

Tablo 4.6. E-test çalışılan 84 *P.aeruginosa* izolatının E-test ve kombine disk sinerji test sonuçlarının değerlendirilmesi ve sonuçların hasta gruplarına göre dağılımı

		ÇOCUK		ERİŞKİN		TOPLAM	
		SAYI	%	SAYI	%	SAYI	%
E-test(+)	KDST(+)	7	8.33	12	14.28	19	22.61
	KDST(-)	2	2.38	4	4.76	6	7.14
E-test(-)	KDST(+)	0	0	13	15.47	13	15.47
	KDST(-)	21	25	25	29.76	46	54.76
Toplam		30	35.71	54	64.29	84	100.00

E-test yapılan 84 izolatın çift disk sinerji testi ve kombine disk sinerji testi sonuçları Tablo 4.7’de verilmektedir.

Tablo 4.7. E-test uygulanan 84 izolatın çift disk sinerji testi ve kombine disk sinerji testi sonuçları

		ÇDST			
		POZİTİF		NEGATİF	
		SAYI	%	SAYI	%
E-test(+)	KDST(+)	10	11.90	9	10.71
	KDST(-)	1	1.19	5	5.95
E-test(-)	KDST(+)	6	7.14	7	8.33
	KDST(-)	5	5.95	41	48.80

Çift disk sinerji testi, E-test, kombine disk sinerji testi sonuçlarının uyumu:

Uygulanan iki test arasında sonuçların uyum oranı her iki testle pozitif ve her iki testle negatif bulunan izolat sayısının toplam çalışılan izolat sayısına bölünmesiyle saptanmıştır. Buna göre;

Çift disk sinerji testi ile kombine disk sinerji testinin uyumu:

Pozitif izolat sayısı : 16

Negatif izolat sayısı : 70

UYUM: $[(16+70)/110] \times 100 = \%78.2$

Çift disk sinerji testi ile E-test uyumu:

Pozitif izolat sayısı : 11

Negatif izolat sayısı : 48

UYUM: $[(11+48)/84] \times 100 = \%70.2$

E-test ile kombine disk sinerji testi uyumu:

Pozitif izolat sayısı : 19

Negatif izolat sayısı : 46

UYUM: $[(19+46)/84] \times 100 = \%77.3$

Çift disk sinerji testi, E-test, kombine disk sinerji testi uyumu:

Pozitif izolat sayısı : 10

Negatif izolat sayısı : 41

UYUM: $[(10+41)/84] \times 100 = \%60.7$

4.3.4 “Modifiye Hodge Test” (MHT)

Çalışmaya alınan 110 *P.aeruginosa* izolatında metallo-beta-laktamazın fenotipik tayininde kullanılan diğer bir test MHT’dir. MHT ile izolatların altısında (%5.45) metallo-beta-laktamaz pozitif, 104’ünde (%94.5) ise fenotipik olarak negatif bulunmuştur. MHT ile pozitif bulunan altı izolatın biri disk sinerji testi ile, dördü E-test ile ve üçü kombine disk sinerji testi ile pozitif bulunmuştur. MHT ile fenotipik olarak metallo-beta-laktamaz pozitif bulunan bir izolat Şekil 4.5’de gösterilmektedir. Çalışmada kullanılan 11 metallo-beta-laktamaz pozitif suştan, VIM-4, VIM-5, SPM-1, VIM-2 pozitif suşlar MHT ile pozitif sonuç verirken, VIM-1, IMP-1 ve IMP-2 pozitif suşlar negatif sonuç vermiştir.

4.2.5 Çinko sülfat ile Zenginleştirilmiş Modifiye Hodge Testi (MHT-ZnSO₄)

Metallo-beta-laktamaz enziminin aktif bölgesinde çinko iyonunun bulunması özelliğinden yola çıkılarak uygulanan çinko sülfat ile zenginleştirilmiş “Modifiye Hodge Testi”nde çalışılan 110 *P.aeruginosa* izolatının MHT ile pozitif bulunan altı izolat dışında sekiz izolat daha fenotipik olarak metallo-beta-laktamaz pozitif bulunmuştur. Pozitif bulunan izolatların biri disk sinerji testiyle, altısı E-test ile, yedisi ise kombine disk sinerji testi ile pozitif bulunmuştur. MHT ile negatif bulunan IMP-1 pozitif kontrol suşu MHT-ZnSO₄ ile pozitif, VIM-1 pozitif ve IMP-2 pozitif suşlar ise negatif bulunmuştur.

4.3.6 İmipenemin Metallo-beta-laktamaz Tarafından Hidrolize Edilmesi

Çalışmaya alınan 110 klinik *P.aeruginosa* izolatında metallo-beta-laktamaz enzim varlığı hidroliz deneyi ile de çalışılmıştır. Çalışmada pozitif kontrol olarak daha önce metallo-beta-laktamaz ürettiği saptanan ve sekans analizi ile enzim tipi belirlenen 11 *P.aeruginosa*’dan elde edilen enzimlerin imipenemi hidrolize ederken absorbans değerlerindeki düşüşe bakılmıştır. Buna göre; iki VIM-1 pozitif suşta ve bir IMP-1 pozitif suşta absorbans değeri 7 λA°, VIM-4 pozitif suşlardan birinde 33 λA° ve diğer suşlarda (SPM-1, VIM-5, IMP-2, VIM-2 ve VIM-4) 11-19 λA° azaldığı saptanmıştır. Çalışılan

110 *P.aeruginosa* izolatının 8'inin imipenemi hidrolize edebildiği ve EDTA varlığında hidrolizin inhibe olduğu gösterilmiştir. Hidroliz pozitif sekiz izolatta absorban değerlerinde ki düşüş şu şekildedir; Suş no 2: 20 λA° , suş no 3: 29 λA° , suş no 5: 15 λA° , suş no 26: 30 λA° , suş no 30: 20 λA° , suş no 34: 32 λA° , suş no 71: 14 λA° , suş no 73: 8 λA° .

Hidroliz deneyi ile metallo-beta-laktamaz açısından pozitif bulunan sekiz izolatın özellikleri Tablo 4.8'de verilmektedir.

4.4. Metallo-beta-laktamaz Enziminin Genotipik Yöntemle Gösterilmesi

Çalışmaya alınan 110 *P.aeruginosa* izolatı, *bla_{VIM}* geninin korunmuş bölgesine özgül iki farklı primer seti kullanılarak PCR metodu ile incelenmiştir. Toplam 11(% 10) izolat *bla_{VIM}* geni açısından pozitif bulunmuştur. PCR ile pozitif bulunan 11 izolata ait özellikler Tablo 4.9'da verilmektedir. Kullanılan iki farklı primer seti ile pozitif bulunan izolatlara ait bant paternleri Şekil 4.6 ve 4.7'de verilmektedir.

Çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan VIM pozitif izolatlardan 1. primer seti ile VIM-1, VIM-2 ve VIM-5 pozitif suşlar, 2. primer seti ile ise VIM-1 ve VIM-2 pozitif suşlar tanımlanabilmiştir. Her iki primer seti ile VIM-4 pozitif suşlar tanımlanamamıştır.

Kullanılan iki farklı primer seti ile yapılan PCR analizinde, 261 bp ürün veren 1. primer seti ile tüm PCR pozitif izolatlar tanımlanırken 621 bp ürün veren 2.primer seti ile sadece dört izolat (suş no 5, suş no 30, suş no 34, suş no 117) tanımlanabilmiştir.

bla_{IMP} genlerine özgü primer seti ile yapılan PCR analizinde, çalışmada kullanılan IMP-1 ve IMP-2 pozitif suşlar saptanamadığı için çalışmaya alınan 110 izolat *bla_{IMP}* geni açısından değerlendirilememiştir.

Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda 2002 ve 2003 yıllarında 664 farklı hastadan ayrıştırılan seftazidim ve/veya imipenem dirençli *P.aeruginosa* izolatlarının 9'unda (%1.5) metallo-beta-laktamaz geni saptanmıştır.

4.5 *bla_{VIM}* Geni Bulunduran İzolatların Genotipik Benzerliği

PCR analizi sonucunda *bla_{VIM}* geni açısından pozitif bulunan erişkin hastalara ait dokuz izolatın genotipik benzerliği AP-PCR yöntemiyle araştırılmıştır. AP-PCR'a göre yedi farklı genotip saptanmıştır. Suş no 19, 20 ve 24 benzer genotipte bulunurken, diğer PCR pozitif izolatların farklı genotipte oldukları saptanmıştır. Benzer genotipe sahip üç izolattan ikisi Yanık Ünitesi'nden, diğeri ise Cerrahi Bilimler'den gönderilen püy örneklerinden ayrıştırılmıştır. Suş no 19 ve 20, 2003 yılının Nisan ayına, suş no 24 ise 2003 yılının Mart ayına ait örneklerden izole edilmiştir.

Tablo 4.8. Hidroliz deneyi ile metallo-beta-laktamaz açısından pozitif bulunan sekiz izolatın fenotipik ve genotipik test sonuçları

SUŞ NO.	BÖLÜM	TARİH	PCR	İMP (MİK)	CAZ (MİK)	ATM	ÇDST	E-test	KDST	MHT	MHT-Zn
2	Yoğun B.	08.2003	N	32 µg/ml	64µg/ml	I	N	N	N	N	P
3	Yanık	08.2003	N	8µg/ml	>128µg/ml	D	N	N	N	N	P
5	Yoğun B.	07.2003	P	32µg/ml	64µg/ml	D	N	N	N	P	P
26	Yanık	02.2003	N	16µg/ml	64µg/ml	D	P	P	P	N	N
30	Yanık	01.2003	P	16µg/ml	8µg/ml	D	N	N	P	N	N
34	Yanık	01.2003	P	32µg/ml	4µg/ml	D	N	P	P	P	P
71	Yoğun B.	01.2002	N	16µg/ml	128µg/ml	I	N	P	N	P	P
73	Yoğun B.	01.2002	P	16µg/ml	128µg/ml	D	P	P	P	N	P

İMP:İmipenem; CAZ:Seftazidim; ATM:Aztreonam; ÇDST: Çift disk sinerji testi; KDST:Kombine disk sinerji testi; MHT:Modifiye Hodge Test;
MHT-Zn:Çinko sülfat ile zenginleştirilmiş Modifiye Hodge Test
I: Orta dirençli; D: Dirençli; P: Pozitif; N: Negatif

Tablo 4.9. İki primer seti kullanılarak yapılan PCR analizinde *blaVIM* genleri açısından pozitif bulunan 11 izolatın özellikleri

SUŞ NO.	ÖRNEK	BÖLÜM	TARİH	İMP µg/ml	CAZ µg/ml	ATM	ÇDST	KDST	E-test	MHT	MHT-Zn	HİDROLİZ
5	BAL	YB	07.2003	32	64	D	N	N	N	P	P	P
19	Püy	Yanık	04.2003	128	>128	D	N	P	P	N	P	N
20	Püy	Cerrahi	04.2003	8	>128	D	P	P	N	N	N	N
24	Püy	Yanık	03.2003	8	128	D	N	P	P	N	N	N
29	BAL	Dahiliye	02.2003	16	128	D	P	P	P	N	N	N
30	Püy	Yanık	01.2003	16	8	D	N	P	N	N	N	P
34	Kan	Yanık	01.2003	32	4	D	N	P	P	P	P	P
48	Kan	Dahiliye	07.2002	1	32	I	N	N	ND	N	N	N
73	Kan	YB	01.2002	16	>128	D	P	P	P	N	P	P
116	Balgam	Çocuk	12.1998	32	>128	D	N	N	N	N	N	N
117	Balgam	Çocuk	04.2000	1	>128	D	N	N	ND	N	N	N

CAZ:Seftazidim; IMP: İmipenem; ATM: Aztreonam; ÇDST: Çift disk sinerji testi; KDST: Kombine disk sinerji testi; MHT: “Modifiye Hodge Test” MHT-Zn: Çinkosülfat ile zenginleştirilmiş “Modifiye Hodge Test”; D: Dirençli; I: Orta dirençli; P: pozitif; N: Negatif; ND: belirlenmemiş.

Şekil 4.1 Çift Disk Sinerji Testi

Şekil 4.2 E-test

Şekil 4.3 E-test ile “ghost zone” görünümü

Şekil 4.4 Kombine Disk Sinerji Testi

Şekil 4.5 “Modifiye Hodge Test”

K: pozitif kontrol; P1:negatif kontrol; P2, P3: klinik izolat

Şekil 4.6 PCR analizi ile blaVIM genleri (1. primer seti-261 bp)
M: Marker, Sıra 9: pozitif kontrol; sıra 8, negatif kontrol; sıra 1-7: klinik izolat

Şekil 4.7 PCR analizi ile blaVIM genleri (2. primer seti-621 bp)
M: Marker, Sıra 1: pozitif kontrol; sıra 2, negatif kontrol; sıra 3-4: klinik izolat

TARTIŞMA

Pseudomonas cinsi bakteriler toprakta ve suda yaşayan gram-negatif, nonfermentatif, aerop basillerdir. *Pseudomonas* cinsi içinde en sıklıkla izole edilen insan patojeni *Pseudomonas aeruginosa*'dır. *P.aeruginosa* daha çok hastane enfeksiyonu olmak üzere, immün yetmezliği olanlarda, malign veya metabolik hastalığı bulunanlarda, uzun süre kemoterapi ve radyoterapi alanlarda, yaşlılarda, ağır yanıklı kişilerde en önemli enfeksiyon etkenlerinden biridir. Bu tip olgularda *P.aeruginosa*, lokalize yaradan pnömoni ve menenjitte kadar uzanan geniş bir hastalık tablosuna sahiptir. *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının sıklığı özellikle hastane ortamında daha yüksektir. Hastane koşullarında bakteriler hem daha kolay barınma olanağı bulmakta hem de direnç kazanma şansı artmaktadır. *P.aeruginosa* suşlarının etken olduğu enfeksiyonlarda en önemli sorun, antibiyotiklere direncin çabuk gelişmesi ve yüksek oranda olmasıdır. Çoklu ilaç direncine sahip *P.aeruginosa* suşları ile gelişen enfeksiyonların tedavisi, klinikte karşılaşılan en önemli sorunlardan bir tanesidir (5). Çalışmamızda klinik örneklerden tanımlanan 110 *P.aeruginosa* izolatının 66'sı (%60) çoklu ilaç direncine sahiptir. Çoklu ilaç direncine sahip olduğu belirlenen 66 *P.aeruginosa* izolatının florokinolon grubunda yer alan siprofloksasine, aminoglikozit grubunda yer alan tobramisine ve beta-laktam grubunda yer alan ajanlardan (seftazidim, meropenem, imipenem ve sefaperazon-sulbaktam) en az birine dirençli olduğu belirlenmiştir.

P.aeruginosa'da çoklu ilaç direncine birden fazla mekanizma neden olmaktadır. Topoizomeraz II ve IV'de meydana gelen mutasyonlar florokinolon direncine neden olmakta, kromozomal AmpC beta-laktamaz üreten suşlarda enzimin dereprese olması penisilin, sefalosporin ve karbapenem grubu antibiyotiklere direnç gelişimini sağlamaktadır. *P.aeruginosa*'da bulunan çeşitli ilaç atım pompaları ile de pek çok antibiyotik grubuna karşı direnç gelişmektedir. Örneğin, MexAB-OprM pompası florokinolon, penisilinler, sefalosporinler ve karbapenem grubu içinde yer alan meropeneme karşı direnç gelişiminden sorumludur. MexCD-OprJ ve MexEF-OprN pompaları florokinolonlara, MexXY-OprM ise aminoglikozitlere dirence yol açan mekanizmalar içinde yer almaktadır. *P.aeruginosa*'da dış membran geçirgenliğinin bozulması ise sadece imipenem direncine neden olmaktadır (157).

Ancak yapılan çalışmalarda MexEF-OprN atım pompasının regülatörü olan *mexT* geninde meydana gelen mutasyonun MexEF-OprN ekspresyonunu artırırken dış membran geçirgenliğinden sorumlu OprD ekspresyonunu azalttığı saptanmıştır. Bu durum izolatın florokinolonların yanı sıra imipeneme karşı da direnç geliştirmesini sağlamaktadır (158, 159).

P.aeruginosa'da ilaç direncine neden olan diğer bir mekanizma, antibiyotikleri inaktive edebilen enzimlerin bulunmasıdır. Aminoglikozit inaktivasyonuna sahip olan aminoglikozit asetiltransferaz ve adeniltransferaz, özellikle seftazidim direncine neden olan PER-1, sefalosporin, monobaktam ve penisilin direncine yol açan OXA tipi geniş spektrumlu beta-laktamazlar bu enzimler içinde sayılabilir (160).

P.aeruginosa'ya bağlı gelişen enfeksiyonların tedavisinde çeşitli antimikrobiyal ajanlar kullanılabilir. *P.aeruginosa*'ya bağlı sepsis vakalarında, seftazidim, sefepim, meropenem veya imipenem tek başına kullanılabileceği gibi, piperasilin-tazobaktam ile amikasin kombinasyonu veya karbapenem grubu bir antibiyotik ile aminoglikozit grubundan bir antibiyotiğin kombine edilerek kullanılabileceği bildirilmektedir. *P.aeruginosa* ile gelişen pnömoni tedavisinde aminoglikozitlerin tek başına yeterli olmadıkları görüldüğünden beta-laktam antibiyotik ile kombine edilmesi tavsiye edilmektedir (5). *P.aeruginosa*'nın neden olduğu idrar yolu enfeksiyonlarının tedavisinde ise tek başına kullanılacak bir antimikrobiyal ajanın yeterli olduğu gözlenmiştir. Alternatifler arasında, seftazidim, imipenem, aztreonam sayılabilir. Oral olarak kullanılabilen siprofloksasin tercih edilen antimikrobiyal ajanlardan biridir (7). Buna karşın yanık hastalarında *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde tek başına kullanılan antimikrobiyal ajanın yeterli olmadığı, mutlaka kombine tedavi uygulanması gerektiği bildirilmektedir (5). *P.aeruginosa*'da bulunabilen çoklu ilaç direnci, tedavide başarısızlığa yol açabilmektedir. Tedavide kullanılan antimikrobiyal ajanlara duyarlı olan izolat tedavi sırasında dirençli hale gelebilmektedir. Tedavi sırasında ilaç atım pompası regülatör geninde meydana gelebilen tek bir mutasyon, beraberinde dış membran geçirgenliğinin azalmasına da neden olabilmekte ve izolat pek çok antimikrobiyal ajana dirençli hale gelmektedir (159). *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisindeki alternatiflerden biri de, bir karbapenem veya geniş

spektrumlu bir beta-laktam ile aminoglikozit grubundan bir antibiyotiğin kombine edilmesidir. Ancak izolat bu ajanlara duyarlı olsa bile tedavi sırasında direnç gelişme olasılığı mevcuttur. Karbapenem grubu ajanlar dahil olmak üzere monobaktamlar dışında tüm beta-laktam antibiyotiklere ve beta-laktamaz inhibitörlerine direnç gelişiminden sorumlu metallo-beta-laktamaz genleri, genellikle aminoglikozit direnç genleri ile birlikte aynı integron içerisinde yer almaktadır. Bu genlerin ekspresyonları, integronun 5' bölgesinde bulunan promotor bölgesinin aktif olup olmamasına bağlıdır. Promotor bölgesinin aktif olmadığı durumda izolat karbapenemlere duyarlı gözükmemektedir. Ancak tedavi sırasında geniş spektrumlu bir beta-laktam olan seftazidim veya karbapenem grubundan imipenem ya da meropenem gibi bir ajana maruz kalmak, promotor bölgesinde mutasyona neden olabilmekte ve metallo-beta-laktamaz direnç genleri ile birlikte aynı integronda bulunan aminoglikozit direnç genlerinin de ekspresyonuna yol açmaktadır.

P.aeruginosa'da bulunan ilaç direnciyle ilgili literatürde pek çok yayına rastlamak mümkündür. Amerika Birleşik Devletleri'nde 1995-1996 yıllarını kapsayan elli merkezin katıldığı çalışmada kan örneklerinden ayrıştırılan 204 adet *P.aeruginosa* izolatının %7'sinin imipeneme, %15'nin seftazidime, %12'sinin siprofloksasine ve %8'inin tobramisine dirençli olduğu bildirilmiştir (161). A.B.D'nden on merkez, Meksika'dan üç merkez ve Brezilya'dan bir merkezin katıldığı bir diğer çalışmada *P.aeruginosa* izolatlarında, imipenem direnci %25, meropenem direnci %23, seftazidim direnci %21, siprofloksasin direnci %25 ve tobramisin direnci %19 olarak saptanmıştır (162). İtalya'da 2001 yılında hastane enfeksiyonu etkeni olan *P. aeruginosa* izolatlarının %14'ü imipenem ve meropeneme, %22'si siprofloksasine ve %20'si seftazidime dirençli bulunmuştur (163). Yunanistan'da 2003 yılında yapılan bir çalışmada *P.aeruginosa* izolatlarında anti-pseudomonal ajanlara direnç oranları verilirken karbapenem direncine dikkat çekilmiştir. Yunanistan'da 1996-1998 yılları arasında karbapenem direnci %19 iken (155), 2003 yılında yayınlanan raporda karbapenem direncinin %35'e yükseldiği belirtilmektedir (164). Benzer şekilde Polonya' da yapılan bir çalışmada 1992'de *P.aeruginosa* izolatlarında karbapenem direnci %1.8 iken 2001 yılında bu oran %19.3'e yükselmiştir (165). Kore'de 1995'de *P.aeruginosa* izolatlarında karbapenem direncinin %3, 1997'de %16 (166), 2001'de ise % 21'e yükseldiği

saptanmıştır (167). Latin Amerika’da 1997-2001 yılları arasında hospitalize hastalardan ayrıştırılan *P.aeruginosa* izolatlarında karbapenem direncinin % 17’den % 35.6’ya yükseldiği rapor edilmiştir (168). Bu çalışmalar haricinde dünyanın çeşitli ülkelerinden yıllar içerisinde karbapenem direncindeki artışa dair pek çok rapor yayınlanmıştır (148,152,169,170-176).

P.aeruginosa’da ilaç direnci ile ilgili ülkemizde de yapılan pek çok çalışmaya rastlamak mümkündür. Cevahir ve arkadaşlarının 1998-2000 yılları arasında çeşitli klinik örneklerden ayrıştırılan *P.aeruginosa* izolatlarında amikasin direncini %54.2, seftazidim direncini %64.7, siprofloksasin direncini %37.1, imipenem direncini %37.3 ve meropenem direncini % 43.8 olarak saptamışlardır (177). Akçay ve arkadaşlarının 2003 yılında Haydarpaşa Numune Hastanesi’nde hastane enfeksiyonlarından tanımlanan *P.aeruginosa* izolatlarının %19’unun imipeneme ve %32’sinin meropeneme dirençli olduğunu saptamışlardır (178). Erdemoğlu ve arkadaşlarının GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi’nde yoğun bakım ünitesinde yatan hastaların kan kültürlerinden ayrıştırılan *P.aeruginosa* izolatlarının %40’ının karbapenem, %50’sinin seftazidim ve %66’sının aztreonam direncine sahip olduğunu rapor etmişlerdir (179). Biçmen ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada hospitalize hastalardan ayrıştırılan *P.aeruginosa* izolatlarında %30 karbapenem, %50 seftazidim, %60 aztreonam ve %30 siprofloksasin direnci olduğunu belirtmektedir. Bu çalışmalar dışında ülkemizde yapılan daha pek çok çalışma, *P.aeruginosa*’da bulunan ilaç direncine dikkat çekmektedir (180-187).

Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı’nda 2002 ve 2003 yıllarında 664 farklı hastaya ait toplam 1603 *P.aeruginosa* izolatının 388’inin (%24.2) imipeneme, 606’sının (%37.8) meropeneme, 348’inin (%21.7) seftazidime, 666’sının (%41.5) siprofloksasine, 783’ünün (%48.8) tobramisine ve 591’inin (%36.8) aztreonama dirençli olduğu belirlenmiştir (Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hastanesi yıllık kaydı).

Yukarıda sözü edilen çalışmalarda, araştırmacıların da değindiği gibi *P.aeruginosa* izolatlarında geçmiş yıllara göre hızla artan karbapenem direnci dikkat çekicidir. Karbapenem grubu antibiyotiklere karşı gelişen dirençten bir çok mekanizma sorumlu olabilmektedir. Bakterinin ilaç atım pompası ile meropeneme, dış membran geçirgenliğinin azalması ile imipeneme, bazı OXA tipi geniş

spektrumlu beta-laktamazlar ve yüksek düzeyde kromozomal AmpC enzimi sentezleyen dereprese mutantların varlığı nedeniyle de hem imipeneme hem de meropeneme direnç kazanabildiği bilinmektedir. Ancak son yıllarda üzerinde en çok durulan karbapenem direnç mekanizması, bu antibiyotikleri ve monobaktamlar dışında tüm diğer beta-laktamları hidroliz etme yeteneğine sahip metallo-beta-laktamazların varlığıdır. Ambler sınıflamasına göre moleküler sınıf B'de, Bush, Jacoby ve Medeiros sınıflamasına göre fonksiyonel sınıf 3'te yer alan bu enzimlerin en önemli özelliklerinden bazıları aktif bölgelerinde divalan çinko iyonu bulundurmaları, aztreonama duyarlı olmaları, EDTA veya 2-merkaptopropionik asit gibi metal şelatörlerle inhibe olurken, sülbaktam, tazobaktam ve klavulanik asit gibi beta-laktamaz inhibitörleriyle inhibe olmamalarıdır. Şimdiye kadar IMP, VIM, SPM-1 ve GIM-1 olmak üzere dört farklı grup altında toplanan metallo-beta-laktamazlardan en fazla IMP ve VIM tipi enzimler saptanmaktadır. IMP tipi enzimler *P.aeruginosa*'nın yanı sıra enterik bakterilerde de bulunmakta iken, VIM benzeri enzimler *P.aeruginosa* ve diğer non-fermenter bakterilerde bulunmaktadır (163).

Metallo-beta-laktamaz enziminden sorumlu gen, integron içerisinde yer alan gen kasetlerinde bulunmaktadır. İntegronlar, kendi başlarına hareket kabiliyeti olmayan, içinde bir veya birden fazla gen kaseti taşıyabilen genetik elemanlardır (188,189,190). Bir bakteride birden fazla integron bulunabileceği için, integronda taşınan gen kasetlerinin ekspresyonu ve seviyesi, bakterideki integron sayısına ve integronun 5' bölgesinde bulunan promotor bölgesinin aktif olup olmamasına bağlıdır (191). Metallo-beta-laktamaz genlerini taşıyan integronlarda, sıklıkla aminoglikozit direncine neden olan enzimleri kodlayan gen kasetleri de bulunmaktadır. Bu durumda bakteri beta-laktam antibiyotiklerin yanında aminoglikozitlere de direnç geliştirebilmektedir (192,193).

İntegronlar, hareket kabiliyetleri olmamasına karşın konjugatif plazmitler veya transpozonlar içinde yer aldıklarında bakteriden bakteriye kolayca geçebilmektedir. Diğer taraftan, integron içinde yer alan gen kasetleri bir integrondan diğerine geçebilmekte, böylece direncin yayılımı sağlanabilmektedir. Bir integronda en son kazanılan gen kaseti, integronun 5' bölgesine en yakın bölgede yer almaktadır. Bugüne kadar yapısı analiz edilen metallo-beta-laktamaz gen kasetlerini taşıyan integronlarda, metallo-beta-laktamaz gen kasetlerinin çoğunlukla integronun başında

yer aldığı diğer bir deyişle son kazanılan gen kaseti oldukları rapor edilmiştir (192,194).

Metallo-beta-laktamaz üreten bakterilerde direnç yayılımı, klonal veya horizontal olabilmektedir. Japonya’da 2002 yılında 60 merkezden izole edilen metallo-beta-laktamaz üreten *P.aeruginosa* izolatlarının aynı genotipte oldukları belirtilmiştir (171). Benzer şekilde Kore (167), Yunanistan (174), Çin (195), Tayvan (196) ve İtalya’dan (197) yayınlanan bazı raporlarda metallo-beta-laktamaz üreten *P.aeruginosa* izolatlarının aynı genotipte oldukları, bu nedenle de direncin klonal yayılıma bağlı olduğu vurgulanmaktadır.

Metallo-beta-laktamaz geninin başka bakterilere geçişinde diğer bir yol horizontal yayılım, diğer bir deyişle gen transferidir. Japonya’da onüç merkezde saptanan metallo-beta-laktamaz pozitif *P.aeruginosa* izolatlarının 11 ayrı genotipte oldukları belirlenmiştir (198). Kore’de yapılan bir çalışmada VIM-2 üreten bir *P.aeruginosa* izolatında bulunan integron yapısının, VIM-2 üreten bir *Acinetobacter* suşundaki integron yapısıyla aynı olduğu saptanmıştır (199). Tüm bu çalışmalar metallo-beta-laktamaz geninin bakteriler arasında horizontal yolla da geçebildiğine işaret etmektedir.

Metallo-beta-laktamazların prevalansı konusunda çok yeterli bilgiye sahip olunmasa da, metallo-beta-laktamaz genlerinin non-fermenter gram-negatif basiller arasında hızla yayıldığı bilinmektedir. Metallo-beta-laktamaz gen varlığının önemi, hem karbapenemler dahil olmak üzere pek çok antibiyotiğe direnç gelişimine neden olması, hem de direnç genlerinin horizontal yayılım ile diğer bakterilere kolaylıkla geçebilmesidir (163). Metallo-beta-laktamaz direnç genlerinin kaynağı ve/veya rezervuarı olarak hayvan yemlerinde kullanılan antibiyotikler sorumlu tutulmaktadır. Bir domuzdan elde edilen *P.aeruginosa* izolatında, insan izolatu ile aynı integron yapısının bulunması bu olasılığı desteklemektedir (194).

Metallo-beta-laktamaz enziminin en önemli özelliği karbapenem grubu antibiyotiklere karşı dirence yol açmasıdır. Bazı çalışmalarda, karbapenem direncinin düşük olduğu izolatlarda ilaç atım pompalarının faal olduğu ve dış membran geçirgenliğinin düşük olduğu vurgulanırken, yüksek karbapenem direncine (MİK $\geq 32\mu\text{g/ml}$) metallo-beta-laktamazların neden olabileceği belirtilmektedir (154,155,174,195,200). Farklı bir görüşe göre ise, yüksek karbapenem direncinden

tek başına metallo-beta-laktamaz sorumlu değildir. Yapılan bir çalışmada metallo-beta-laktamaz taşıyan ancak OprD proteininde mutasyon olmayan suşların seftazidime yüksek dirençli, imipeneme ise orta dirençli oldukları belirlenmiştir. Aynı enzimi taşıyan ve OprD mutasyonu olan suşlarda ise seftazidimin yanı sıra imipeneme de yüksek direnç görülmektedir (201). Yapılan diğer bir çalışmada karbapenem grubu antibiyotiklere karşı yüksek direnç gelişiminde metallo-beta-laktamazların tek başına yeterli olmadıkları, ilaç atım pompası ve/veya dış membran geçirgenliği gibi ikinci bir mekanizmanın bulunması gerektiği, bu nedenle de metallo-beta-laktamaz varlığını saptamayı hedefleyen çalışmalarda imipenem duyarlı izolatların gözardı edilmemesi gerektiği vurgulanmaktadır (158).

Metallo-beta-laktamaz üreten izolatların klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında erken tanısı hem dirençli izolatın yayılmasını önlemek, hem de klinisyeni tedavi konusunda bilgilendirebilmek için son derece önemlidir. Yapılan pek çok araştırma sonucunda metallo-beta-laktamaz üreten izolatların bazı özellikleri ortaya çıkarılmıştır. Metallo-beta-laktamaz üreten izolatlarda genel olarak seftazidim MİK değeri ≥ 128 $\mu\text{g/ml}$ (199,202) olmakla birlikte, duyarlılık testleri her zaman metallo-beta-laktamaz varlığı için bir gösterge değildir. Metallo-beta-laktamaz pozitif izolatlarda imipenem direnci değişkenlik gösterebilmektedir (149,193,199). Yayınlanan bir raporda, imipenem MİK değeri 8-32 $\mu\text{g/ml}$ ve seftazidime yüksek dirençli izolatların metallo-beta-laktamaz açısından taranması önerilmektedir (169). SENTRY Antimikrobiyal Sürveyans Programı'nda imipenem ve meropenem MİK değeri ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$ ve seftazidim MİK değeri ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$ olan tüm izolatlar, metallo-beta-laktamaz da dahil olmak üzere diğer antimikrobiyal direnç genleri açısından rutin olarak taranmaktadır (200).

Bugüne kadar çeşitli merkezlerde gram-negatif bakterilerde ve non-fermentatif bakterilerde metallo-beta-laktamaz varlığını araştıran pek çok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalara alınan izolatların seçiminde farklılıklar bulunmaktadır. Bazı yayınlarda seftazidim MİK değeri ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$ olan izolatlar (148,202), bazılarında imipenem ve/veya meropenem MİK değeri ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ olan izolatlar (164, 167), bazılarında ise seftazidim ve sefaperazon-sülbaktam MİK değeri sırasıyla ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$ ve ≥ 128 $\mu\text{g/ml}$ olan izolatlar çalışmaya alınmıştır (176, 203). Diğer pek çok çalışmada ise disk difüzyon yöntemiyle imipenem ve/veya seftazidime

dirençli izolatlar çalışmaya dahil edilmiştir (158, 196, 199). Bizim çalışmamızda da en çok önerilen kriter dikkate alınarak, disk difüzyon yöntemiyle imipenem ve/veya seftazidim dirençli olarak saptanan izolatlar çalışmaya alınmıştır.

Bugüne kadar dünyanın çeşitli ülkelerinde yapılan araştırmalarda metallo-beta-laktamaz enziminin tespitine yönelik çeşitli fenotipik testler uygulanmıştır. Halen metallo-beta-laktamaz tanısında standart bir test olmaması, araştırmacıları duyarlılığı ve özgüllüğü en yüksek testi bulma çabasına yöneltmiştir. Yapılan çalışmaların büyük bir çoğunluğunda bir veya iki fenotipik test uygulanmış, sonuçlar hidroliz deneyi ve PCR analizi ile doğrulanmıştır. Bizim çalışmamızda olduğu gibi iki fenotipik testten daha fazlasını uygulayan çalışma sayısı oldukça azdır (149, 199).

Bugüne kadar yapılan çalışmaların bazılarında, fenotipik testlerin metallo-beta-laktamaz tayinindeki duyarlılık ve özgüllükleri belirlenmiştir. Bu çalışmalarda, çalışılan izolatlarda var olabilecek tüm metallo-beta-laktamaz enzimlerinin saptandığı düşünülmektedir. Bizim çalışmamızda ise, kanımızca çalışılan izolatlarda varolabilecek tüm enzim tipleri saptanamadığı için fenotipik testlerin duyarlılık ve özgüllüklerinin verilmesi uygun görülmemiştir. Bunun yerine fenotipik test sonuçları, hidroliz deneyi ve PCR analizi sonucunda pozitif bulunan izolatlar baz alınarak tartışılacaktır.

Metallo-beta-laktamaz enziminin tayininde uygulanan fenotipik testlerin büyük bir çoğunluğu, enzimin metal şelatör tarafından inhibisyonu temeline dayanmaktadır. Metal şelatör, enzimin aktif bölgesindeki çinko iyonuna bağlanarak aktif bölgeden çinko iyonunun ayrılmasına yol açmaktadır (204, 205). Bu prensibe dayanan fenotipik testlerden bir tanesi çift disk sinerji testidir. Çift disk sinerji testinde substrat olarak seftazidim veya imipenem, inhibitör madde olarak ise 2-merkaptopropiyonik asit (2-MPA) veya EDTA kullanılmaktadır. Literatürde çift disk sinerji testinde seftazidim ve 2-MPA'nın kullanıldığı pek çok çalışmaya rastlamak mümkündür. Japonya'da 2003 yılında yapılan bir çalışmada seftazidim ve sefaperazon sülbaktama dirençli gram-negatif izolatlara çift disk sinerji testi uygulanmış, fenotipik olarak pozitif olduğu saptanan izolatların hepsinin PCR analizi ile IMP-1 ürettikleri saptanmıştır (176). Arakawa ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada IMP-1 inhibitörleri olarak bakır klorür, demir klorür, EDTA, merkaptasetik asit, 2-MPA ve merkaptoetanol karşılaştırılmış, IMP-1 pozitif

izolatların tanımlanmasında 2-MPA'nın en iyi sonucu verdiği, EDTA'nın ise bazı izolatlardaki enzimi tespit edemediği belirtilmiştir (148). Japonya'da 2004 yılında seftazidime yüksek dirençli *P.aeruginosa* izolatlarına seftazidim ve 2-MPA kullanılarak yapılan çift disk sinerji testi sonucunda pozitif bulunan izolatların hepsinin PCR analizi ile IMP-1 veya IMP-2 ürettikleri belirlenmiştir. Seftazidim ve 2-MPA ile yapılan disk sinerji testi sonuçlarının PCR ile %100 uyumlu bulunmasına rağmen, araştırmacılar substrat olarak seftazidim yerine imipenemin kullanılmasını önermektedir. Zira test edilen izolatta geniş spektrumlu beta-laktamaz veya kromozomal AmpC beta-laktamaz enzimi varsa seftazidimin yanlış pozitif sonuç verebildiği, imipenemin ise bu enzimlerden etkilenmediği belirtilmektedir (198). Seftazidim ve 2-MPA ile yapılan çift disk sinerji testlerinde gözlenen diğer bir özellik, bu testin özellikle IMP-1 pozitif izolatları tanımlayabilmesidir. IMP-1 üreten izolatların seftazidime yüksek direnç gösterdikleri, imipenem direncinin ise değişkenlik gösterdiği belirtilmektedir (148). Bu nedenle Japonya gibi IMP benzeri enzimlerin saptandığı ülkelerde, çift disk sinerji testinde seftazidim ve 2-MPA kullanılmaktadır. VIM benzeri enzim üreten izolatların fenotipik olarak tayin edilmesinde ise imipenem ve EDTA'nın duyarlılığının yüksek olduğu vurgulanmaktadır. Yapılan bir çalışmada VIM benzeri enzim ürettiği bilinen *P.aeruginosa* izolatlarında seftazidim ile 2-MPA ve imipenem ile EDTA kullanılarak yapılan çift disk sinerji testinde fenotipik olarak VIM benzeri enzim üreten izolatların tanımlanmasında seftazidim ile 2-MPA duyarlılığının %45.7, özgüllüğünün %100 olduğu, buna karşılık imipenem ile EDTA duyarlılığının %82.9 ve özgüllüğünün %98.9 olduğu belirlenmiştir (199). Lee ve arkadaşlarının yaptıkları başka bir çalışmada ise, VIM benzeri enzim ürettiği daha önce saptanmış olan *P.aeruginosa* izolatlarında imipenem ve EDTA kullanılarak yapılan çift disk sinerji testinin %100 özgüllük ve duyarlılığa sahip olduğu rapor edilmiştir (151). Tayvan'da 2001 yılında 209 *P.aeruginosa* izolatının imipenem ve EDTA kullanılarak yapılan çift disk sinerji testinde, fenotipik metallo-beta-laktamaz taramasında pozitif çıkan 21 izolatın PCR analizi ile de pozitif bulunduğu belirtilmektedir. PCR pozitif 21 izolatın 16'sı VIM-2, 5'i ise IMP-1 enzimi üretmektedir. Bu sonuçlara göre imipenem ve EDTA'nın kullanıldığı çift disk sinerji testinin, VIM benzeri enzimler kadar IMP benzeri enzimleri de tanımlayabildikleri

vurgulanmaktadır (196). Her ne kadar ülkemizde bulunan metallo-beta-laktamaz enzim tipi veya tipleri belirlenmemiş olsa da, VIM benzeri enzimlerin başta Yunanistan, İtalya ve Fransa olmak üzere Avrupa ülkelerinde sık rastlanılan enzim türü olması nedeniyle, çalışmamızda olası VIM benzeri enzim üreten izolatları fenotipik olarak saptamak amacıyla çift disk sinerji testinde imipenem ve EDTA'nın kullanılması tercih edilmiştir. Çalışılan toplam 110 imipenem ve/veya seftazidim dirençli *P.aeruginosa* izolatının 22'si (%20) çift disk sinerji testi ile pozitif, 88'i(%80) negatif sonuç vermiştir. Hidroliz deneyinde pozitif bulunan sekiz izolatın çift disk sinerji testi sonuçlarına bakıldığında iki izolatın pozitif sonuç verdiği saptanmıştır. İki farklı primer seti ile yapılan PCR analizinde *bla_{VIM}* geni pozitif bulunan 11 izolattan sadece üçünde çift disk sinerji testi pozitif saptanmıştır. Çift disk sinerji testinin değerlendirilmesindeki kriter, imipenem inhibisyon zonunun EDTA'ya doğru genişlediğinin gözlenmesidir. Bu durum subjektif değerlendirmelere neden olabilmektedir. Diğer taraftan çift disk sinerji testinde, test edilecek izolatın imipenem direnci de oldukça önemlidir. İmipenem dirençli izolatlarda, imipenem diskinden EDTA diskine doğru genişleyen inhibisyon zonu rahatlıkla gözlenebilirken, imipeneme orta dirençli veya duyarlı izolatlarda imipenem diski etrafında var olan inhibisyon zonu testin değerlendirilmesini zorlaştırmakta ya da imkansız kılmaktadır. Bu gibi durumlarda yanlış negatif sonuçlar elde etmek mümkündür. Çalışmamızda hidroliz deneyi ile pozitif bulunan 3 numaralı suş ve PCR analizi ile pozitif bulunan 20 ve 24 numaralı suşların imipenem MİK değeri 8µg/ml'dir. Bu suşlardan biri çift disk sinerji testi ile pozitif diğer ikisi ise negatif bulunmuştur. Bu bulgu testin değerlendirilmesindeki subjektif yaklaşıma bir örnek teşkil edebileceği gibi, aynı zamanda imipeneme orta dirençli suşlarda yanlış negatif sonuçlar alınabileceğine de bir örnektir.

Çift disk sinerji testinde yanlış pozitif sonuç elde edilmesinin en önemli nedeni, metal şelatör olarak kullanılan EDTA ve 2-MPA'in tek başına da özgül olmayan geniş inhibisyon zonu oluşturabilmesidir. EDTA ve 2-MPA'in bu özelliği testin yanlış değerlendirilmesine yol açabilmektedir. Yapılan bir çalışmada EDTA diski üzerine eklenen sodyum merkaptasetik asitin, istenmeyen geniş ve özgül olmayan inhibisyon zonunun oluşmasını engellediği gösterilmiştir (152).

Metallo-beta-laktamazların fenotipik tayininde sıklıkla kullanılan diğer bir test ise E-testtir. Ticari olarak bulunabilen E-test aynı zamanda kolay uygulanma özelliğine de sahiptir. Fenotipik testlerin bir çoğunda olduğu gibi E-testin temeli, metallo-beta-laktamazın EDTA varlığında inhibe olmasına dayanmaktadır. E-test şeridinin üzerinde, bir tarafta imipenem diğer tarafta ise imipenem ile birlikte EDTA bulunmaktadır. İmipenem MİK değerinin EDTA varlığında sekiz kat düşmesi fenotipik olarak metallo-beta-laktamaz varlığına işaret etmektedir. MİK değerlerindeki düşüş esas alındığı için, çift disk sinerji testinde karşılaşılan subjektif yaklaşımlar E-test ile ortadan kalkmaktadır. Çift disk sinerji testine göre daha objektif değerlendirilebilen E-testin en büyük dezavantajı, imipenem orta dirençli ve duyarlı izolatlarda metallo-beta-laktamaz tayinine uygun olmamasıdır. E-test şeridinde imipenem kısmında ilaç konsantrasyonu 4-256 µg/ml arasında, imipenem ve EDTA kısmında ise 1-64 µg/ml arasında değişmektedir. Bu nedenle imipenem duyarlı suşlara E-test uygulanamazken, imipeneme orta dirençli suşlarda (MİK değeri 8 µg/ml) sonuçların yanlış değerlendirilmesine neden olabilmektedir. Walsh ve arkadaşlarının 2002 yılında yaptıkları bir çalışmada, daha önce metallo-beta-laktamaz ürettiği saptanmış ve imipenem MİK değeri ≥ 4 µg/ml olan izolatların büyük bir çoğunluğunun E-test ile pozitif sonuç verdiği rapor edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, E-testin metallo-beta-laktamazın fenotipik tayinindeki duyarlılığı %94 ve özgüllüğü %95 olarak belirlenmiştir (150). Ancak yapılan diğer pek çok çalışma, E-testi metallo-beta-laktamaz tayininde başarılı bulmamaktadır. Yan ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptıkları bir çalışmada, metallo-beta-laktamaz ürettiği bilinen gram-negatif basiller ve nonfermenter bakterilerde E-testin metallo-beta-laktamazın fenotipik tayinindeki duyarlılığı %36.7 olarak belirlenmiştir (149). İtalya'da aynı yıl yapılan diğer bir çalışmada imipenem dirençli *P.aeruginosa* izolatlarında metallo-beta-laktamazın fenotipik tayininde kullanılan E-test ile yanlış pozitif sonuçlar alındığı belirtilmektedir (163). Walsh ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptıkları diğer bir çalışmada, E-test ile pozitif bulunan 31 *P.aeruginosa* izolatının 25'i PCR analizi ile metallo-beta-laktamaz açısından doğrulanabilmiştir (154). Latin Amerika ülkelerini kapsayan bir çalışmada ise, E-test ile pozitif bulunan 54 *P.aeruginosa* izolatının PCR analizi ile sadece 25'inde metallo-beta-laktamaz geninin olduğu saptanmıştır (200).

E-test yanlış pozitif sonuçlar verebildiği gibi, yanlış negatif sonuçlar da verebilmektedir. Örneğin, 2003 yılında Yunanistan'da bir hastanede *P.aeruginosa*'ya bağlı salgında imipenem MİK değeri ≥ 8 µg/ml olan 53 izolat E-test ile taranmış ve 44'ü E-test pozitif bulunmuştur. Ancak daha sonra yapılan PCR analizi ile E-testin metallo-beta-laktamaz üreten üç izolatu tanımlayamadığı belirlenmiştir.

Çalışmamızda, metallo-beta-laktamazın fenotipik tayininde imipeneme orta dirençli ve dirençli izolatlarla E-test uygulanmıştır. E-test uygulanan 84 izolatın 25'i (%29.8) E-test ile pozitif, 59'u (%70.2) ise negatif bulunmuştur. Hidroliz deneyi ile pozitif bulunan sekiz izolatın dördü E-test ile pozitif bulunurken, *bla_{VIM}* genlerinin korunmuş bölgelerine özgü iki farklı primer seti ile yapılan PCR analizinde VIM benzeri enzim ürettiğini saptadığımız ve E-test uygulanmış olan dokuz izolattan beşinin E-test ile pozitif , dördünün ise negatif sonuç verdiği belirlenmiştir. Çalışmamızda PCR analizi ile pozitif bulunan 48 ve 117 no'lu suşların imipenem MİK değeri 1 µg/ml olduğu için bu suşlara E-test uygulanmamıştır. PCR analizi pozitif olan 20 ve 24 no'lu suşların birinde E-test pozitif diğerinde ise negatif bulunmuştur. Bu sonuç imipeneme orta dirençli izolatlarda E-testin yanıltıcı sonuçlar doğurabileceğine bir örnek teşkil etmektedir.

Elde edilen yanlış pozitif sonuçların en önemli nedeni, çift disk sinerji testinde de gözlenen EDTA'nın özgül olmayan inhibisyon etkisinden kaynaklanabilir. Yapılan bir çalışmada, 1-10-o-fenantirolin adlı bir maddenin EDTA'ya göre metallo-beta-laktamazları daha iyi inhibe ettiği ve özgül olmayan inhibisyon zonlarına neden olmadığı belirtilmektedir. Bundan sonra amaçlanan hedeflerden bir tanesi EDTA yerine bu madde kullanılarak metallo-beta-laktamazın fenotipik tayinindeki değerinin değerlendirilmesi olabilir (205).

Ülkemizde metallo-beta-laktamaz tayinine dair literatürde üç çalışmaya rastlanmıştır. Bahar ve arkadaşları 2004 yılında yayınladıkları raporda, SSK Dışkapı Eğitim Hastanesi'nde yatmakta olan bir hastadan tanımladıkları *K.pneumoniae* izolatının genotipik yöntemlerle VIM-5 tipi metallo-beta-laktamaz ürettiğini rapor etmişlerdir (3). Bayraktar ve arkadaşlarının 2004 yılında yayımlanan raporunda, Kasım 2002 ve Kasım 2003 tarihleri arasında Şişli Etfal Hastanesi yoğun bakım ünitesinde yatan hastalarda tanımlanan karbapenem dirençli *P.aeruginosa* izolatlarına E-test uygulandığı ve toplam 27 suştan 17'sinin (%66.6) E-test ile

fenotipik olarak metallo-beta-laktamaz ürettiği belirtilmektedir (206). Diğer yayın Toraman ve arkadaşları tarafından 2004 yılında yayınlanan bir olgu raporudur. Bu raporda Fırat Üniversitesi Araştırma Hastanesi'nde yatmakta olan diyabetli bir hastanın ayağından izole edilen *K.pneumoniae* suşunda metallo-beta-laktamaz varlığı E-test ile gösterilmiştir (207). Her iki çalışmada da metallo-beta-laktamaz varlığı sadece E-test ile gösterilmiş olup diğer fenotipik testler kullanılmamış, PCR analizi ile sonuç doğrulanmamıştır. Literatürdeki yayınlar göz önüne alındığında, E-testin tek başına metallo-beta-laktamaz tayininde yetersiz kalabileceği bilindiğinden, sadece E-test yapılarak metallo-beta-laktamaz varlığını ya da yokluğunu söylemek uygun değildir.

Metallo-beta-laktamazın fenotipik tayininde uyguladığımız diğer bir test kombine disk sinerji testidir. Disk difüzyon testi ile, imipenem ve ikinci imipenem diski üzerine eklenen 750 µg EDTA içeren disklerin inhibisyon zon çapları arasındaki farkın 7 mm'nin üzerinde olması, metallo-beta-laktamaz açısından pozitif kabul edilmektedir. Lee ve arkadaşları 2003 yılında yayınlanan raporlarında, disk difüzyon yöntemiyle imipenem ve/veya seftazidim dirençli *P.aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* izolatlarına kombine disk sinerji testi uygulamış ve sonuçları PCR analizi ile doğrulamışlardır. Bu araştırmacılar, kombine disk sinerji testinin VIM benzeri enzim üreten izolatların fenotipik tanısındaki duyarlılığının %93.9 olduğunu belirtirken, IMP benzeri enzim üreten izolatların fenotipik tanısında başarısız olduğunu bildirmişlerdir (199). Yan ve arkadaşlarının 2004 yılında yayınladıkları raporda ise, kombine disk sinerji testinin *P.aeruginosa* izolatlarında metallo-beta-laktamazın fenotipik tanısındaki duyarlılığının %87, özgülüğünün ise %96.7 olduğunu bildirmişlerdir. Metallo-beta-laktamaz üreten izolatlarda imipenem MİK değeri ≤ 4 µg/ml ise kombine disk difüzyon testinin uygulanamayacağı vurgulanmaktadır. Diğer taraftan metallo-beta-laktamaz üreten ve imipenem MİK değeri ≥ 4 µg/ml olan izolatların hepsi kombine disk sinerji testi ile tanımlanabilmiştir (149).

Çalışmamızda 110 *P.aeruginosa* izolatının uygulanan kombine disk sinerji testi ile 32'si (%29.1) pozitif, 78'i (%70.9) ise negatif bulunmuştur. Hidroliz deneyi pozitif olan 8 izolatın 4'ü, PCR analizi ile *bla_{VIM}* pozitif 11 izolatın 7'si kombine disk sinerji testi ile de pozitif bulunmuştur. PCR analizi ile *bla_{VIM}* geni pozitif bulunan

ancak hiçbir fenotipik testle pozitif sonuç vermeyen üç izolatta, metallo-beta-laktamaz enziminin eksprese olmadığı düşünülmektedir. Bu üç izolat gözardı edildiğinde kombine disk sinerji testi sekiz PCR pozitif izolatın yedisinde pozitif sonuç vermiştir. Elde edilen bu sonuç, çalışmamızda uygulanan fenotipik testler içinde kombine disk sinerji testinin PCR analizi sonucu ile en çok uyum gösteren test olduğunu vurgulamaktadır.

Metallo-beta-laktamazın fenotipik yöntemlerle tayininde enzimin EDTA ile inhibisyonu temeline dayanan fenotipik testler arasında sonuç uyumuna bakıldığında; çift disk sinerji testi ile kombine disk sinerji test uyumu %78.2, çift disk sinerji testi ile E-test uyumu %70.2, E-test ile kombine disk sinerji test uyumu %77.3 olarak saptanmıştır. Çift disk sinerji testi, E-test ve kombine disk sinerji testinin uyumu ise %60.7 olarak bulunmuştur. Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre, kombine disk sinerji testinin E-test ile arasındaki uyum yüzdesi yüksektir ve PCR analizi sonuçları ile en fazla uyum gösteren testtir. Bu nedenlerden dolayı, yayınlanan çoğu raporda metallo-beta-laktamazın fenotipik tayininde E-test kullanılmışsa da, kombine disk sinerji testi, E-testin uygulanmadığı laboratuvarlarda metallo-beta-laktamazın fenotipik tayininde kullanılabilecek alternatif bir test olarak gözükmektedir.

Metallo-beta-laktamazın fenotipik tayininde uygulanabilecek diğer bir test ise “Modifiye Hodge Testi”(MHT) dir. Bu testin prensibi, imipeneme duyarlı olan bir *E.coli* izolatının metallo-beta-laktamaz üreten bir bakterinin varlığında, enzim tarafından imipenemin hidrolize olması nedeniyle üreme kabiliyetini tekrar kazanmasına dayanmaktadır. MHT’ nin metallo-beta-laktamazı fenotipik olarak tayin edebilmedeki değeri yapılan bazı çalışmalarla araştırılmıştır. Lee ve arkadaşları 1995-1999 yılları arasında imipeneme dirençli *P.aeruginosa* ve *Acinetobacter spp.* izolatlarına MHT’ni uygulamışlar ve PCR analizi sonucu testin duyarlılığını %100, özgüllüğünü ise %88 olarak bulmuşlardır (151). Lee ise 2003 yılında yayınlanan raporunda MHT’nin metallo-beta-laktamaz üreten izolatların hepsini tanımlayamadığını, yanlış negatif sonuçlar alınabildiğini belirtmektedir (199). Aynı yıl yayınlanan bir başka raporda bu çalışmanın bulguları desteklenmiş, MHT duyarlılığını yükseltmek amacıyla, çinko sülfat ile zenginleştirilmiş MHT (MHT-ZnSO₄) uygulanmış ve yanlış negatif sonuçların bu şekilde önüne geçilebildiği belirtilmiştir (152).

Çalışmamızda MHT ve MHT-ZnSO₄ testlerinin metallo-beta-laktamazın fenotipik tayinindeki yeri araştırılmıştır. Çalışmaya alınan 110 *P.aeruginosa* izolatından 6'sı (%5.45) MHT ile, 14'ü (%12.72) ise MHT-ZnSO₄ ile pozitif bulunmuştur. PCR analizi sonucu *bla_{VIM}* geni açısından pozitif bulunan 11 izolatın iki tanesi MHT ile, dört tanesi ise MHT-ZnSO₄ ile pozitif bulunmuştur. Çalışmamız sırasında gerek MHT gerekse MHT-ZnSO₄'ün değerlendirilmesinde pozitif ve negatif izolatların her zaman doğru biçimde değerlendirilemeyecekleri belirlenmiştir. Zira çalışmamızda kullandığımız metallo-beta-laktamaz üreten pozitif kontrol suşlarından bazıları her iki testle de negatif sonuç vermiştir. Bu nedenle PCR pozitif 11 izolatın dokuzunda MHT ile çıkan yanlış negatif sonuçların sebebi MHT'nin bazı pozitif izolatlarda doğru sonuç vermemesine bağlı olabilir. MHT'ne çinko sülfat eklenmesi ile şüpheli suşlarda sonucun daha net değerlendirilebileceği düşünülmüştür. Test edilen izolatta eğer metallo-beta-laktamaz varsa çinko iyonu enzimin aktif bölgesine bağlanacak ve enzimin işlevini arttıracaktır. Çalışmamızda MHT ile pozitif bulunan altı izolatın dışında MHT-ZnSO₄ ile sekiz izolat daha pozitif bulunmuştur.

Pek çok fenotipik testin temeli metallo-beta-laktamaz enziminin EDTA gibi bir metal şelatörle inhibe olmasına dayanmaktadır. MHT ise bu prensibe uymayan bir testtir. Bu testte imipeneme duyarlı olan bir *E.coli* suşunun metallo-beta-laktamaz üreten bir bakteri varlığında, enzimin imipenemi hidrolize etmesi ve bu nedenle imipenem etkisinin ortadan kalkması sebebiyle üremeye devam etmesi temeline dayanmaktadır. Ancak bilindiği gibi metallo-beta-laktamazlar dışında bazı enzimler de imipenem hidrolizine neden olmaktadır. Eğer izolatta OXA-23 ile OXA-28 enzimlerinden biri varsa ya da izolat dereprese bir mutantsa, sürekli yüksek düzeyde sentezlenen kromozomal AmpC enzimleri imipenemin hidrolizine yol açabilmektedir. Bu nedenlerden dolayı kanımızca MHT, metallo-beta-laktamazın fenotipik tayininde kullanılabilecek güvenilir bir test olmayabilir. Besiyerine EDTA eklenerek geliştirilecek yeni bir yöntem bu testi metallo-beta-laktamaz tayinine daha özgül bir yöntem haline getirebilir.

Metallo-beta-laktamazların tayininde bugünkü bilgilerimiz ışığında fenotipik testler içinde en güvenilir test olarak imipenem ve meropenem hidroliz deneyi, genotipik testler içinde ise PCR analizi ve takiben yapılacak olan sekans analizi

kabul edilmektedir. Literatürde hidroliz deneyi ile PCR analizinin uyumlu sonuç verdiğine dair pek çok yayına rastlamak mümkündür (154, 200, 163, 170, 203). Ancak sözü edilen çalışmaların hepsinde hidroliz deneyi, yapılan bir veya iki fenotipik testle pozitif bulunan izolatlara uygulanmış, fenotipik testlerle negatif bulunan izolatlara uygulanmamıştır. Bizim çalışmamızda ise fenotipik test pozitifliğine bakılmaksızın tüm izolatlara hidroliz deneyi yapılmış, sekiz izolat hidroliz pozitif bulunmuştur. Hidroliz pozitif bulunan izolatlarda EDTA'nın hidrolizi inhibe ettiği gösterilerek metallo-beta-laktamaz varlığı teyit edilmiştir. Hidroliz pozitif bulunan sekiz izolatın ikisi çift disk sinerji testi ile, dördü E-test ile, dördü kombine disk sinerji testi ile, üçü MHT ve altısı ise MHT-ZnSO₄ ile pozitif bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda PCR analizi sadece hidroliz pozitif izolatlara uygulanmıştır. Bizim çalışmamızda ise PCR analizi fenotipik test sonuçlarından ve hidroliz deneyi sonuçlarından bağımsız olarak tüm izolatlara uygulanmıştır. PCR analizi ile bulunan pozitif 11 izolatın dördü hidroliz deneyi ile de pozitif sonuç vermiştir. Hidroliz deneyi negatif olup, fenotipik testlerin ve PCR analizinin pozitif olduğu izolatlarda EDTA inhibisyonuna dayanan fenotipik testlerin pozitifliğinin metallo-beta-laktamaz aktivitesinden mi yoksa EDTA'nın kendi inhibisyon yeteneğinden mi kaynaklandığı belli değildir. Zira hidroliz negatif, PCR pozitif ve EDTA inhibisyonu temeline dayanan herhangi bir fenotipik test pozitif dört izolatta MHT ve MHT-ZnSO₄ negatif (sadece bir izolatta MHT-ZnSO₄ pozitif) bulunmuştur. Diğer bir neden ise hidroliz deneyinin manipülasyonu sırasında bakteri sonikasyonunun iyi yapılamamış olmasından, dolayısı ile enzimin tam olarak açığa çıkamamasından kaynaklanabilir. Literatür incelendiğinde hidroliz deneyi sırasında absorbans değerindeki ne kadarlık düşüşün hidroliz deneyi açısından pozitif kabul edileceğine dair bir ifadeye rastlanmamıştır. Çalışmamızda kullandığımız ve gerek MİK değerlerinin yüksek olduğu gerekse diğer fenotipik testler ile pozitif saptadığımız bazı kontrol suşlarının hidroliz deneyinde absorbans değerindeki düşüş miktarı oldukça azdır. Bu nedenle buna benzer alınan sonuçlar hidroliz açısından negatif kabul edilebilmektedir. Hidroliz deneyi pozitif, PCR analizi negatif olan dört izolatta dikkati çeken diğer bir nokta hidroliz deneyi pozitifliği ile MHT-ZnSO₄ test pozitifliğinin paralellik göstermesidir. Hidroliz deneyi pozitif olan dört izolattan üçü MHT-ZnSO₄ ile de pozitif sonuç vermiştir. Her iki deneyde de enzim aktivitesini

arttırmak için eklenen çinkonun bu sonuçta rolü olduğu düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada MHT-ZnSO₄ hariç tüm fenotipik testlerle negatif bulunan izolatlarda metallo-beta-laktamaz dışında farklı bir karbapenemazın hidrolizden sorumlu olabileceği ileri sürülmektedir. Çalışmamızda 2 ve 3 nolu suşlarda MHT-ZnSO₄ dışında tüm fenotipik testler negatif bulunmuştur. Ancak bu iki izolatın hidroliz deneyi pozitif olup, hidrolizin EDTA ile inhibe olduğu gösterilmiştir. Metallo-beta-laktamazlar dışında diğer karbapenemazların EDTA ile inhibe olmadıkları bilindiği için her ne kadar PCR ile pozitif sonuç alınmamış olsa da bu iki izolatta metallo-beta-laktamaz varlığı üzerinde durulmaktadır. Diğer taraftan hidroliz pozitif izolatlara bakıldığı zaman tamamının yanık ve yoğun bakım gibi dirençli bakterilerin sık olarak izole edildiği bölümlerden geldiği görülmektedir. Bu nedenle başka primerler kullanılarak yapılabilecek genotipik testlerle metallo-beta-laktamaz varlığının gösterilmesi ihtimal dahilindedir.

Metallo-beta-laktamaz varlığının tespitinde PCR analizi güvenilir bir genotipik yöntemdir. PCR analizinde *bla_{VIM}* veya *bla_{IMP}* genlerinin korunmuş bölgelerine özgü farklı primer setleri kullanılabilirdiği gibi enzime özgül primer seti de kullanılabilir. Enzim tiplendirmesinde ise PCR sonucu elde edilen amplikonun sekans analizinin yapılması gerekmektedir. Zira VIM benzeri ya da IMP benzeri enzimler birbirlerinden genellikle bir veya iki amino asit farkla ayrılmaktadır. Kore, İtalya, Japonya, Fransa ve Yunanistan gibi ülkelerde hangi tip metallo-beta-laktamazın görüldüğü bilindiği için bu ülkelerde yapılan çalışmalarda o ülkede en fazla görülen enzim tipine özgül primerler kullanılmaktadır. Bizim ülkemizde ise metallo-beta-laktamaz varlığı ile ilgili tek bir rapor bulunmakta, ve elde edilen enzimin VIM-5 tipinde olduğu rapor edilmektedir (3). Bugün Avrupa’da IMP benzeri enzimlerin çok nadir, VIM benzeri enzimlerin ise oldukça yaygın olarak bulunduğu bilinmektedir. Çalışmamızda *bla_{VIM}* genlerinin korunmuş bölgelerine özgül iki primer seti ile PCR analizi gerçekleştirilmiştir. PCR analizinde kullanılan 1. primer seti 261 bp ürün, 2. primer seti ise 621 bp ürün vermektedir. Çalışmamızda fenotipik test veya hidroliz deneyi pozitifliğine bakılmaksızın çalışmaya dahil edilen 110 *P.aeruginosa* izolatına PCR analizi yapılmış ve 11 izolat *bla_{VIM}* genleri açısından pozitif bulunmuştur. Pozitif bulunan izolatların hepsi 1. primer seti ile saptanabilirken, 2. primer seti ile sadece dört izolatta bulunan *bla_{VIM}* geni

saptanabilmiştir. Benzer şekilde hidroliz pozitif olan dört izolat kullanılan iki primer setiyle pozitif sonuç vermemiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda, *bla_{VIM}* genlerinin korunmuş bölgelerine ait farklı primer setlerinin aynı duyarlılığa sahip olmadıkları düşünülmektedir. Zira, Pasteran ve arkadaşlarının 2005 yılında Arjantin’den yayınladıkları kısa raporda, *bla_{VIM}* genlerinin korunmuş bölgelerine özgü dört ayrı primer seti kullanıldığı belirtilmiştir (141). Kullanılan bu dört farklı primer seti ile elde edilen PCR sonuçları verilmemiş olmasına karşın araştırmacıların mümkün olduğu kadar fazla ve farklı primer kullanarak varolan metallo-beta-laktamaz genini gözden kaçırmak istemedikleri düşünülebilir. Bizim çalışmamızda da 2. primer seti ile saptanamayan dört izolat, bu primer setinin 1. primer setine göre daha az duyarlılığa sahip olduğunu düşündürmektedir. Çalışmada kullanılan her iki primer seti VIM-1, VIM-2, ve VIM-3 enzimlerinin korunmuş bölgeleri esas alınarak hazırlanmıştır. Ancak VIM benzeri enzimlerin birbiriyle filogenetik benzerlikleri nedeniyle diğer VIM benzeri enzimleri de tanımlayabileceği düşünülmektedir. Çalışmada kullandığımız VIM pozitif *P.aeruginosa* izolatlarından, 1. primer seti ile VIM-1, VIM-2 ve VIM-5 üreten pozitif kontroller saptanabilirken, 2. primer seti sadece VIM-1 ve VIM-2 üreten pozitif kontrolleri saptayabilmiştir. VIM-1 ile VIM-4 arasında bir amino asit farklılık bulunmasına rağmen her iki primer seti ile de VIM-4 saptanamamıştır. Bu nedenle fenotipik test ya da hidroliz deneyi ile pozitif bulunan ancak PCR ile *bla_{VIM}* geni saptanamayan izolatlarda metallo-beta-laktamaz geninin olmadığını söylemek uygun olmayabilir. Diğer bir olasılık ise, PCR ile tanımlanamamış ancak fenotipik test ve/veya hidroliz deneyi pozitif olan izolatlarda VIM benzeri enzimlerin dışında başka tip bir metallo-beta-laktamaz enziminin bulunabileceğidir. Gibb ve arkadaşları 2002 yılında yayınladıkları bir raporda, kullandıkları *bla_{VIM}* ve *bla_{IMP}* primer setleri ile bir *P.aeruginosa* izolatında metallo-beta-laktamaz genini saptayamadıklarını, ancak genomik DNA’yı bir plazmitte klonladıktan sonra yapılan sekans analizi ile *bla_{IMP}* genini saptayabildiklerini belirtmişlerdir (169). Bundan sonraki hedeflerden biri de şimdiye kadar tanımlanmış metallo-beta-laktamaz enzimlerinin mümkün olduğunca çoğuna özgü primer setleri kullanılarak PCR analizinin tekrarlanması olabilir. Son yıllarda kabul gören diğer bir yaklaşım ise izolatlarda sınıf 1 integronlara özgü primerler kullanarak integronu

belirlemek ve sekans analizi ile integronda bulunan gen kaseti veya gen kasetlerinin içeriğini açığa çıkarmaktır (154).

Çalışmamızda bulunan 11 PCR pozitif izolat incelendiğinde 48., 116. ve 117. numaralı izolatların hidroliz deneyi dahil olmak üzere hiçbir fenotipik testinin pozitif olmadığı görülmektedir. Bu üç izolatta metallo-beta-laktamaz geninin eksprese edilmediği düşünülmektedir. Metallo-beta-laktamaz geninin eksprese edilmediği izolatlarda karbapenem MİK değerlerinin düşük olabileceği bildirilmektedir (198). Çalışmamızda metallo-beta-laktamaz geninin kriptik olduğunu düşündüğümüz 48 ve 117 numaralı suşlarda karbapenem MİK değerleri 1 µg/ml'dir. Diğer yayınlanan raporda ise imipenem ve meropenem MİK değerleri 8-32 µg/ml olduğunda ilaç atım pompalarının ve dış membran geçirgenliğinin dirençten sorumlu olabileceği veya metallo-beta-laktamazın ekspresyonunun düşük olabileceğinden söz edilmektedir (174). Çalışmamızda 116 numaralı izolatta meropenem ve imipenem MİK değeri sırasıyla 16 µg/ml ve 32 µg/ml olarak bulunmuştur. PCR pozitif bulunan diğer sekiz izolatta imipenem MİK değerleri 8-128 µg/ml arasında değişmektedir. İmipenem MİK değerlerindeki bu değişkenlik çeşitli çalışmalarda metallo-beta-laktamaz enzimi bulundurduğu saptanan izolatlardaki imipenem direncindeki değişkenlikle uyumludur (196, 166, 208, 176, 171). İmipenem direncindeki değişkenliğin en önemli nedeni olarak metallo-beta-laktamazın ekspresyon düzeyi ve metallo-beta-laktamaz dışında ikinci bir direnç mekanizmasının rol oynadığı belirtilmektedir (195).

Metallo-beta-laktamaz gen kasetlerinin sınıf 1 integronda çoğunlukla aminoglikozit direncinden sorumlu gen kasetleri ile birlikte bulunduğu bilinmektedir (192,194). Çalışmamızda metallo-beta-laktamaz geninin eksprese edilmediğini düşündüğümüz üç izolatın aminoglikozit sınıfında yer alan tobramisin MİK değeri 1µg/ml iken diğer sekiz PCR pozitif izolatta tobramisin MİK değerlerinin 16 ila ≥ 128 µg/ml arasında değiştiği saptanmıştır.

Bugüne kadar metallo-beta-laktamaz üreten izolatlarda gözlenen ortak özelliklerden biri de bu izolatlarda seftazidim MİK değerlerinin oldukça yüksek olmasıdır (193). Çalışmamızda PCR pozitif bulunan 11 izolatın sekizinde yüksek seftazidim direnci gözlenmiştir.

Metallo-beta-laktamazların diğerk bir ortak özelliğı aztreonamı hidrolize edememeleridir. Ancak bugüne kadar metallo-beta-laktamaz pozitif izolatların çoğunlukla aztreonama da dirençli oldukları rapor edilmiştir (192,193,195). Benzer şekilde çalışmamızda PCR pozitif izolatların 10'u aztreonama dirençli, biri orta dirençli bulunmuştur.

Çalışmamızda PCR pozitif izolatların ayrıştırıldığı örnekler çeşitlilik (dört püy, üç kan, iki balgam, iki bronkoalveolar lavaj) göstermektedir. Bugüne kadar yapılan çeşitli çalışmalarda metallo-beta-laktamazın en fazla idrar örneklerinden ayrıştırılan *P.aeruginosa* izolatlarında tanımlandığı rapor edilmiştir (163,167,171,196,202). Bizim çalışmamızda ise idrar örneklerinden ayrıştırılan *P.aeruginosa* izolatlarında metallo-beta-laktamaz saptanmamıştır.

Kanada'da 2001 yılında bir hastanede ayrıştırılan *P.aeruginosa* izolatlarında metallo-beta-laktamaz sıklığı %5.2 olarak bulunmuştur (169). Kore'de 2000-2001 yılları arasında imipeneme dirençli *P.aeruginosa* izolatlarında metallo-beta-laktamaz sıklığı %11.4 olarak saptanmıştır (167). SENTRY Antimikrobiyal Sürveyans Programının 2005 yılında yayınlanan raporuna göre, imipenem dirençli *P.aeruginosa* izolatlarında metallo-beta-laktamaz sıklığı, İtalya'da %39.1, Japonya'da %26.8 ve Latin Amerika ülkelerinde %19.7 olarak belirlenmiştir (173). Çalışmamızda 2002 ve 2003 yıllarında Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda 664 farklı hastadan ayrıştırılan *P.aeruginosa* izolatlarının 9'unda (%1.5) metallo-beta-laktamaz geni olduğu saptanmıştır. Çalışmamızın sonucunda bulunan metallo-beta-laktamaz oranı düşük görünmektedir. Ancak halen tespit edemediğimizi düşündüğümüz farklı metallo-beta-laktamaz enzimlerinin bulunma olasılığı nedeniyle, *P.aeruginosa* izolatlarında metallo-beta-laktamaz sıklığının daha yüksek olduğu kanısındayız.

PCR analizi ile *bla_{VIM}* geni açısından pozitif bulunan erişkin hastalara ait dokuz örneğın genotipik benzerliğı AP-PCR yöntemiyle araştırılmıştır. AP-PCR sonuçlarına göre yedi farklı genotip bulunmuştur. Tek başına AP-PCR sonuçları ile izolatların moleküler epidemiyolojisi hakkında kesin bir yargıya varılamasa da üç izolatın genotipik olarak benzer olduğu görülmüştür. Bunlardan 19 ve 24 no'lu suşlar, 2003 yılının Nisan ayında Yanık Ünitesi'nde yatmakta olan iki hastanın püy örneklerinden, 20 no'lu suş ise aynı yılın Mart ayında Cerrahi Bilimler'de yatmakta

olan bir hastanın püy örneğinden ayrıştırılmıştır. Bu üç hastanın aynı suş ile enfekte olduğu düşünülmektedir. Bu bulgular metallo-beta-laktamaz pozitif *P.aeruginosa* izolatlarının hastane ortamında yayılabileceğine işaret etmekte olup, nozokomiyal enfeksiyonlara neden olan çoklu antibiyotik direnci taşıyan izolatların yayılmasını önlemenin oldukça önem taşıdığını vurgulamaktadır. Bu izolatların yayılmasındaki en önemli neden, kullanılan tıbbi aletlerin yeterli hijyene sahip olmaması olabileceği gibi, hastane personeli tarafından dirençli izolatların yayılması da söz konusu olabilmektedir. Özellikle yoğun bakım ünitesi, yanık ünitesi veya cerrahi bölümlerde bu tür izolatların bulunup bulunmadığını belirlemek ve yayılımın önlenmesi için gerekli önlemleri almak son derece önem taşımaktadır.

Metallo-beta-laktamaz enzimlerinin başta nonfermenter bakteriler olmak üzere diğer gram-negatif basiller arasında da hızla yayıldığı bilinmektedir. Dirençten sorumlu genin sınıf 1 integronda gen kasetleri içinde bulunması yayılımı kolaylaştırıcı bir özelliktir. Gerek dirençli izolatların yayılımının önlenmesi, gerekse klinikte tedaviye yön verilmesi açısından metallo-beta-laktamaz enzimi içeren izolatların mikrobiyoloji laboratuvarlarında hızlı, kolay ve güvenilir şekilde tanımlanmaları gerekmektedir. Halen metallo-beta-laktamazların tanısında güvenilirliği kabul edilmiş standardize bir testin olmaması, metallo-beta-laktamaz içeren pek çok izolatın gözden kaçmasına neden olmaktadır. Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarları'nda imipenem direnci ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$ olan *P.aeruginosa* izolatlarının metallo-beta-laktamaz varlığı açısından değerlendirilmesi gerektiği düşünülmektedir. E-testin tüm metallo-beta-laktamaz üreten izolatları tanımlayamadığı bilinse de testin duyarlılığını arttırmak için, substrat olarak imipenem, meropenem ve seftazidim gibi birden fazla substrat ile EDTA, 2-MPA gibi metallo-beta-laktamaz inhibitörlerinin denenmesi tavsiye edilmektedir. Fenotipik test ile pozitif bulunan izolatların moleküler tekniklerle mutlaka doğrulanması gerektiği belirtilmektedir. Bu amaçla PCR analizi, hibridizasyon tekniği veya sınıf 1 integronun genetik elemanlarının çoğaltılması ve sekans analizinin yapılması izlenecek yollardır (123). Çalışmamızda metallo-beta-laktamazın fenotipik tayininde uyguladığımız fenotipik testler içinde PCR analizi ile en uyumlu sonuç veren fenotipik testin kombine disk sinerji testi olduğu gözlenmiştir. Kombine disk sinerji testinin E-test ile olan uyumu, metallo-beta-laktamaz varlığını tespit etmede kombine disk sinerji testinin E-test için bir

alternatif oluşturabileceğini düşündürmektedir. Bundan sonraki en önemli hedef bu enzimleri tanımlayabilecek duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek testlerin geliştirilmesi için araştırmaların devam etmesi olmalıdır.

Çoğu metallo-beta-laktamaz üreten izolatlarda, beta-laktam direnci yanında aminoglikozitlere ve florokinolonlara direnç de göze çarpmaktadır. Bu izolatlarda metallo-beta-laktamaz enziminin yanı sıra sefalosporinaz, aktif ilaç atım pompaları veya dış membran geçirgenliğinin düşük olması gibi ikinci bir direnç mekanizması da bulunabilmektedir. Metallo-beta-laktamaz üreten izolatlarla meydana gelen enfeksiyonların tedavisinde izlenecek yol henüz kesinlik kazanmamış olmakla birlikte, bu izolatların polimiksin B'ye duyarlı oldukları gözlenmektedir (100). Polimiksin B'nin yanı sıra rifampinin de tedavide alternatif olabileceği düşünülmektedir (123). Bunun yanı sıra in vitro kullanılan metallo-beta-laktamaz enzimi inhibitörlerinden hiç biri bugün tedavide kullanılmaya uygun değildir (209).

Yakın zamanda metallo-beta-laktamaz üreten izolatlarla gelişen enfeksiyonların tedavisinin oldukça sınırlı olabileceği olasılığı nedeniyle, bu enzimi üreten izolatların özellikle hastane ortamında yayılmasını önlemek çok önemlidir. Bu amaçla metallo-beta-laktamaz enziminin erken tanısı büyük önem kazanmaktadır. Ayrıca özellikle yoğun bakım ünitelerine ve onkoloji servisine kabul edilen hastaların metallo-beta-laktamaz üreten bir izolatla kolonize olup olmadığının belirlenmesi metallo-beta-laktamaza bağlı direncin yayılımının engellenmesinde alınacak önlemlerin başında gelmektedir (210).

SONUÇLAR

1. *P.aeruginosa*'da bulunan çoklu ilaç direnci tedavinin başarısız olabilmesine neden olabilmektedir. Çalışmaya alınan seftazidim ve/veya imipenem dirençli *P.aeruginosa* izolatlarının %60'ı çoklu ilaç direncine sahiptir.
2. Çalışmaya 2002-2003 yıllarında Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hastanesi Klinik Patoloji Laboratuvarına gelen 664 hastaya ait 75 imipenem ve/veya seftazidim dirençli *P.aeruginosa* izolatı ile Çocuk Göğüs Hastalıkları bölümünden gönderilen balgam örneklerinden soyutlanan 35 imipenem ve/veya seftazidim dirençli *P.aeruginosa* suşları alınmıştır. Altı antibiyotik için yapılan agar dilüsyon metodu ile çocuk ve erişkin hasta grupları arasında seftazidim, sefaperazon-sülbaktam, siprofloksasin ve tobramisin direnç yüzdeleri arasında fark anlamlı bulunmamıştır. Ancak çocuk hastalardan soyutlanan izolatlarda meropenem ve imipenem direnç yüzdeleri erişkin hasta izolatlarına göre daha yüksek bulunmuştur.
3. Metallo-beta-laktamaz üreten izolatların hastane ortamında yayılmasını engellemek ve tedaviye yön vermek amacıyla bu izolatların klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında hızlı, kolay ve güvenilir testler ile tanımlanabilmesi gerekmektedir. Ancak bugün halen güvenilir, standart bir test mevcut değildir. Çalışmamızda uygulanan beş fenotipik test içinde PCR sonuçları ile uyumu açısından en güvenilir test kombine disk sinerji testidir. Kombine disk sinerji testinin E-test ile yüksek uyum göstermesi, bu testin E-test'in kullanılamayacağı laboratuvarlarda metallo-beta-laktamaz tayininde alternatif olabileceğini düşündürmektedir.
4. Metallo-beta-laktamazların genotipik tayininde kullanılan iki primer seti ile 11 izolat pozitif bulunmuş olup metallo-beta-laktamaz sıklığı erişkin hastalardan 2002 ve 2003 yıllarında soyutlanan *P.aeruginosa* izolatlarında

%1.5 olarak saptanmıştır. Ancak kullanılan primer setleri ile tüm metallo-beta-laktamaz üreten izolatların tespit edilemediği düşünülmektedir. İmipenem ve/veya seftazidim dirençli 110 izolatta ise metallo-beta-laktamaz sıklığı %10 olarak belirlenmiştir.

5. PCR analizi ile saptanan üç izolatın tüm fenotipik testleri negatif bulunmuş, antibiyotiklere yüksek dirençli olmadıkları belirlenmiştir. Bu üç izolatta metallo-beta-laktamaz geninin kriptik olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle antibiyotik duyarlılık test sonuçlarının metallo-beta-laktamaz varlığı açısından her zaman fikir veremeyebileceği düşünülmektedir.
6. PCR analizi sonucunda erişkin hastalara ait dokuz izolatta metallo-beta-laktamaz geni saptanmıştır. Bu izolatların üçünün genotipik olarak benzer olduğu belirlenmiştir. Hastane ortamında dirençli izolatların yayılmasını önlemek oldukça önemlidir. Bu nedenle bundan sonraki hedef metallo-beta-laktamazları güvenilir, hızlı ve kolay tanımlayabilecek testlerin geliştirilmesi için çalışmaların devam etmesi olmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Bush, K. New β -lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial chemotherapy. Clin. Infect. Dis., 32, 1085-1089, 2001.
2. Lagatolla, C., Tonin, E.A., Monti-Bragardin, C., Dolzani, L., Gombac, F., Bearzi, C., Edalucci, E., Gionechetti, F., Rossolini G.M. Endemic carbapenem- resistant *Pseudomonas aeruginosa* with acquired metallo-beta-lactamase determinants in European hospital. Emerg. Infect. Dis., 10, 535-538, 2004.
3. Bahar, G., Mazzariol, R., Koncan, R., Mert, A., Fontana, R., Rossolini, G.M., Cornaglia, G. Detection of VIM-5 metallo-beta-lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey. J. Antimicrob. Chemother., 54, 282-283, 2004.
4. Yan, J.J., Wu, J.J., Tsai, T.S., Chuang, C.L. Comparison of the double-disk, combined-disk, and Etest methods for detecting metallo-beta-lactamases in gram-negative bacilli. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 49, 5-11, 2004.
5. Murray, P., Rosenthal, K., Kobayashi, G.S., Pfaller, M.A. *Pseudomonas* and related microorganism, "Medical Microbiology" (Ed. P.R Murray, K. Rosenthal, G.S. Kobayashi, M.A. Pfaller)'de 3. baskı, Mosby, St. Louis-Missouri, s. 258-265, 1998.
6. Bilgehan, H. Non-fermentatif gram olumsuz bakteriler, "Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları" (H. Bilgehan)'da , Barış Yayınları, İzmir, s. 139-157, 1992.
7. Baron, E.J., Peterson, L.R., Finegold, S.M. Nonfermentative gram-negative bacilli and coccobacilli, "Diagnostic Microbiology" (Ed. E.J. Baron, L.R. Peterson, S.M. Finegold)'de 9.baskı, Mosby, St. Louis-Missouri, s. 386-406, 1994.
8. Wilmoth, D., Walters, P.E., Tomlin, R. Caring for adults for cystic fibrosis. Crit. Care Nurse, 21, 34-44, 2001.

9. Berthelot, P., Grattard, F., Mahul, P. Prospective study of nosocomial colonization and infection due to *Pseudomonas aeruginosa* in mechanically ventilated patients. *Intensive Care Med.*, 27, 503-512, 2001.
10. Morrison, A.J., Wenzel, R.P. Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Infect. Dis.*, 6, 627-640, 1984.
11. Cardenosa, J.A., Sole-Violan, J., Bordes Benitez, A. Role of different routes of tracheal colonization in the development of pneumonia in patients receiving mechanical ventilation. *Chest*, 116, 462-470, 1999.
12. Ewig, S., Torres, A., El-Ebiary, M. Bacterial colonization patterns in mechanically ventilated patients with traumatic and medical head injury. Incidence, risk factors and association with ventilator-associated pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 159, 188-198, 1999.
13. Richards, M.J., Edwards, J.R., Culver, D.H. Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States, National Nosocomial Infections Surveillance System. *Crit. Care Med.*, 27, 887-892, 1999.
14. Pier, G. Ramphal, R. *Pseudomonas aeruginosa*, "Principles and Practice of Infectious Diseases" (Ed. G. Mandel, J.E. Bennett, R. Dolin)'de, Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia, s. 2587-2615, 2005.
15. Zar, H., Saiman, L., Quittel, L. Binding of *Pseudomonas aeruginosa* to respiratory epithelial cells from patients with various mutations in the cystic fibrosis transmembrane regulator. *J. Pediatr.*, 126, 230-233, 1995.
16. Pier, G.B., Grout, M., Zaidi, T.S. Role of mutant CFTR in hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections. *Science*, 271, 64-67, 1996.
17. Plotkowski, M.C., Costa, A.O., Morandi, V. Role of heparan sulphate proteoglycans as potential receptors for non-piliated

- Pseudomonas aeruginosa* adherence to non-polarised airway epithelial cells. J. Med. Microbiol., 50, 183-190, 2001.
18. Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., Winn W.C. The nonfermentative gram-negative bacilli, "Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology" (Ed. E.W. Koneman, S.D. Allen, W.M. Janda, P.C. Schreckenberger, W.C. Winn)'de 5.baskı, Lippincott, Philadelphia-New York, s. 253-321, 1997.
 19. Pier, G.B., Ames, P. Mediation of the killing of rough, mucoid isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis by the alternative pathway of complement. J. Infect. Dis., 150, 223-228, 1984.
 20. Poole, K., McKay, G.A. Iron acquisition and its control in *Pseudomonas aeruginosa*: Many roads lead to Rome. Front. Biosci., 8, 661-686, 2003.
 21. Holder, I.A., Neely, A.N., Frank, D.W. PerV immunization enhances survival of burned *Pseudomonas aeruginosa*-infected mice. Infect Immun, 69, 5908-5909, 2001.
 22. Terada, L.S., Johansen, K.A., Nowbar, S. *Pseudomonas aeruginosa* hemolytic phospholipase C suppresses neutrophil respiratory burst activity. Infect Immun, 67, 2371-2376, 1999.
 23. Wieland, C.V., Siegmund, B., Senaldi, G. Pulmonary inflammation induced by *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide, phospholipase C, and endotoxin: Role of interferon regulating factor 1. Infect Immun, 70, 1352-1358, 2002.
 24. Frithz-Lindsten, E., Holmstrom, A., Jacobson, L. Functional conservation of the effector protein translocators of *Pseudomonas aeruginosa*. Mol. Microbiol., 29, 1155-1165, 1998.
 25. Britigan, B.E., Roeder, T.L., Rasmussen, G.T. Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* secretory products pyocyanin and pyochelin generates hydroxyl radical and causes synergistic damage to endothelial cells-Implications for *Pseudomonas*-associated tissue

- injury. J. Clin. Invest., 90, 2187-2196, 1992.
26. Albus, A.M., Pesci, E.C., Runyen-Janecky, L.J. Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol., 179, 3928-3935, 1997.
 27. Donlan, R.M., Costerton, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin. Microbiol. Rev., 15, 167-193, 2002.
 28. Erdem, B. Pseudomonaslar, “Temel ve Klinik Mikrobiyoloji”(Ed. G.Mutlu, T. İmir, A.T. Cengiz, Ş. Ustaçelebi, E. Tümbay, Ö. Mete)’de 1.baskı, Güneş Kitabevi-Ankara, s. 551-559, 1999.
 29. Kiska D., Gilligan P.H. Pseudomonas, “Manual of Clinical Microbiology” (Ed. P.R. Murray, E. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, R.H. Tenover)’de 7. baskı, Washington, s.517-526, 1999.
 30. Andrade, S.S., Jones, R.N, Gales, A.C., Sader H.S. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin America medical centres: 5 year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program(1997-2001). J. Antimicrob. Chemother., 52, 140-147, 2003.
 31. Pai, H., Kim, J., Lee, J.H., Choe K.W., Gotoh N. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Antimicrob. Agents Chemother., 45, 480-484, 2001.
 32. Poole, K., Tetro, K., Zhao, Q., Neshat, S., Heinrichs, D.E., Bianco, N. Expression of the multidrug resistance operon *mexA-mexB-oprM* in *Pseudomonas aeruginosa*: *mexR* encodes a regulator of operon expression. Antimicrob. Agents Chemother., 40, 2021-2028, 1996.
 33. Saito, K., Eda, S., Maseda, H., Nakae, T. Molecular mechanism of Mex-R mediated regulation of MexAB-OprM efflux pump expression in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol. Letters, 195, 23-28, 2001.
 34. Lim, D., Poole, K., Strynadka, N.C.J. Crystal structure of the MexR repressor of the *mexRAB-oprM* multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Biol. Chem., 277, 29253-29259, 2002.

35. Masuda, N., Gotoh, N., Ishii, C., Sakagawa, E., Satoshi, O., Nishino, T. Interplay between chromosomal β -lactamase and the MexAB-OprM efflux system in intrinsic resistance to β -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43, 400-402, 1999.
36. Gotoh, N., Tsujimoto, H., Tsuda, M., Okamoto, K., Nomura, A., Wada, T., Nakahashi, M., Nishino, T. Characterization of the MexC-MexD-OprJ multidrug efflux system in *mexA-mexB-oprM* mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42, 1938-1943, 1998.
37. Saito, K., Yoneyama, H., Nakae, T. *nalB*-type mutations causing the overexpression of the MexAB-OprM efflux pump are located in the *mexR* gene of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosome. *FEMS Microbiol. Letters*, 179, 67-72, 1999.
38. Evans, K., Poole, K. The MexA-MexB-OprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa* is growth-phase regulated. *FEMS Microbiol. Letters*, 173, 35-39, 1999.
39. Sanchez, P., Rojo, F., Martinez, J.L. Transcriptional regulation of *mexR*, the repressor of *Pseudomonas aeruginosa mexAB-oprM* multidrug efflux pump. *FEMS Microbiol. Letters*, 207, 63-68, 2002.
40. Zih-Zarifi, I., Llanes, C., Köhler, T., Pechere, J., Plesiat, P. In vivo emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexA-MexB-OprM. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43, 287-291, 1999.
41. Pumbwe, L., Piddock, L.J.V. Two efflux systems expressed simultaneously in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44, 2861-2864, 2000.
42. Beinlich, K.L., Chuanchuen, R., Schweizer, H.P. Contribution of multidrug efflux pumps to multiple antibiotic resistance in veterinary clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Letters*, 198, 129-134, 2001.
43. Köhler, T., Hamzehpour, M., Epp, S., Pechere, J. Carbapenem

- activities against *Pseudomonas aeruginosa*: Respective contributions of OprD and efflux systems. Antimicrob. Agents Chemother., 43, 424-427, 1999.
44. Srikumar, R., Paul, C.J., Poole, K. Influence of mutations in *mexR* repressor gene on expression of the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol., 182, 1410-1414, 2000.
 45. Narita, S., Eda, S., Yoshihara, E., Nakae, T. Linkage of the efflux-pump expression level with substrate extrusion rate in MexAB-OprM efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 308, 922-926, 2003.
 46. Higgins, P.G., Fluit, A.C., Milatovic, D., Verhoef, J., Schmitz, F.J. Mutations in GyrA, ParC, MexR and NfxB in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Inter. J. Antimicrob. Agents, 21, 409-413, 2003.
 47. Hocquet, D., Beryrand, X., Köhler, T., Talon, D., Plesiat, P. Genetic and phenotypic variations of a resistant *Pseudomonas aeruginosa* epidemic clone. Antimicrob. Agents Chemother., 47, 1887-1894, 2003.
 48. Schweizer, H. Intrinsic resistance to inhibitors of fatty acid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is due to efflux: Application of a novel technique for generation of unmarked chromosomal mutations for the study of efflux systems. Antimicrob. Agents Chemother., 42, 394-398, 1998.
 49. Llanes, C., Hocquet, D., Vogne, C., Benali-Baitich, D., Neuwirth, C., Plesiat, P. Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously. Antimicrob. Agents Chemother., 48, 1797-1802, 2004.
 50. Evans, K., Adewoye, L., Poole, K. MexR repressor of the *mexAB-oprM* multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of MexR binding sites in the *mexA-mexR* intergenic

- region. J. Bacteriol., 183, 807-812, 2001.
51. Wolter, D., Hanson, N.D., Lister, P.D. Insertional inactivation of *oprD* in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* leading to carbapenem resistance. FEMS Microbiol. Letters, 236, 137-143, 2004.
 52. Livermore, D. Interplay of impermeability and chromosomal β -lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother., 36, 2046-2048, 1992.
 53. Rasmussen, B.A., Bush, K. Carbapenem-hydrolyzing β -lactamases. Antimicrob. Agents Chemother., 41, 223-232, 1997.
 54. Weldhagen, G.F., Poirel, L., Nordmann, P. Ambler Class A extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel developments and clinical impact. Antimicrob. Agents Chemother., 47, 2385-2392, 2003.
 55. Chanowong, A., M'Zali, F.H., Heritage, J., Lulitanond, A. ve Hawkey, P.M. SHV-12, SHV-5, SHV-2a and VEB-1 extended spectrum β lactamases in gram-negative bacteria isolated in a university hospital in Thailand. J. Antimicrob. Chemother., 48, 839-852, 2001
 56. Naas, T., Philippon, P., Poirel, L., Ronco, E., Nordmann, P. An SHV-derived extended-spectrum β lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother., 43, 1281-1284, 1999.
 57. Podbielski, A., Schönling, B., Melzer, B., Warnatz, K., Leusch, H.G. Molecular characterization of a new plasmid-encoded SHV-like β lactamase(SHV-2 variant) conferring high level cefotaxime resistance upon *Klebsiella pneumoniae*. J. Gen. Microbiol., 137; 569-578, 1991.
 58. Bert, F., Branger, C., Lambert-Zechowsky, N. Identification of PSE and OXA β -lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. J. Antimicrob. Chemother., 50, 11-18, 2002.

59. Dubois, V., Arpin, C., Noury, P. ve Quentin, C. Clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* carrying a *bla*_{TEM-21} gene located on a chromosomal interrupted TnA type transposon. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46, 3624-3626, 2002.
60. Marchandin, H., Jean-Pierre, H., De Champ, C., Sirot, D., Darbas, H., Perigault, P.F., Carriere, C. Production of TEM-24 plasmid-mediated extended-spectrum β lactamase by clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44, 213-216, 2000.
61. Medeiros, A.A. Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactam antibiotics. *Clin. Infect. Dis.*, 24, 19-45, 1997.
62. Philippon, L.N., Naas, A., Bouthors, T., Barakett, V., Nordmann, P. OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 41, 2188-2195, 1997.
63. Nordmann, P., Ronco, E., Naas, T., Duport, C., Michel-Briand, Y., Labia, R. Characterization of a novel extended-spectrum- β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 37, 962-969, 1993.
64. Bouthors, A.T., Dagoneau, N., Blanchard, S., Naas, T., Nordmann, P., Jarlier, V., Sougagoff, W. Role of residues 104, 164, 166, 238, 240 in the substrate profile of PER-1 β -lactamase hydrolysing third-generation cephalosporins. *Biochem. J.*, 330, 1443-1449, 1998.
65. Vahaboğlu, H., Coşkun, O., Tansel, R., Öztürk, R., Şahin, N., Köksal, İ., Kocazeybek, Z., Tatman-Ötkun, M., Leblebicioğlu, H., Özinel, M.A., Akalın, H., Kocagöz, S., Korten V. Clinical importance of extended-spectrum- β -lactamase (PER-1-type) producing *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas* strains. *J. Med. Microbiol.*, 50, 642-645, 2001.
66. Poirel, L., Naas, T., Guibert, M., Chaibi, E.B., Labia, R.,

- Nordmann, P. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43, 573-581, 1999.
67. Mavroidi, A., Tsakris, A., Tzelepi, E., Miriagou, V., Sofianou, D. Tzouvelekis, L.S. An integron-associated β -lactamase (IBC-2) from *Pseudomonas aeruginosa* is a variant of the extended-spectrum β -lactamase IBC-1. *J. Antimicrob. Chemother.*, 48, 627-630, 2001.
 68. Poirel, L., Weldhagen, G.F., Naas, T., Champs, C., Dove, M.G. Nordmann, P. GES-2, a class A β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45, 2598-2603, 2001.
 69. Brink, A.J., Feldman, C., Grolman, D.C., Muckart, D., Pretorius, J., Richards, G. Appropriate use of the carbapenems. *S. Afr. Med. J.*, 94, 857-861, 2004.
 70. Edwards, S.J., Emmas, C.E., Campbell, H.E. Systematic review comparing meropenem with imipenem plus cilastatin in the treatment of severe infections. *Curr. Med. Res. Opin.*, 21, 785-794, 2005.
 71. Frere, J.M. β -lactamases and bacterial resistance to antibiotics. *Mol. Microbiol.*, 16, 385-395, 1995.
 72. Quiroga, A.M., Franceschini, N., Rossolini, G.M., Gutking, G., Bonfiglio, G., Franchino, L., Amicosante, G. Interaction of cefotetan and the metallo-beta-lactamases produced in *Aeromonas* spp and in vitro activity. *Chemother.*, 46, 177-183, 2000.
 73. Lim, H.M., Pene, J.J., Shaw, R.W. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Bacillus cereus* 5/B/6 β -lactamase II structural gene. *J. Bacteriol.*, 170, 2873-2878, 1988.
 74. Chen, Y.W., Succi, J., Tenover, F.C., Koehler, T.M. β -lactamase gene of the penicillin-susceptible *Bacillus anthracis* Sterne strain. *J. Bacteriol.*, 185, 223-230, 2003.
 75. Walsh, T.R., Hall, L., Assinder, S.J. Nichols, W.W., Cartwright,

- S.J., MacGowan, A.P., Bennett, P.N. Sequence analysis of the L1 metallo-beta-lactamase from *Xanthomonas maltophilia*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1218, 199-201, 1994.
76. Massidda, O., Rossolini, G.M., Sata, G. The *Aeromonas hydrophila* *cphA* gene: molecular heterogeneity among class B metallo-beta-lactamases. *J. Bacteriol.*, 173, 4611-4617, 1991.
 77. Rossolini, G.M., Franceschini, N., Lauretti, L., Caravelli, B., Riccio, M.L., Galenli, M., Frere, J.M., Amicosante, G. Cloning of a *Chryseobacterium* (*Flavobacterium*) *meningosepticum* chromosomal gene (*blaA*_{CME}) encoding an extended-spectrum class A β -lactamase related to the *Bacteroides* cephalosporinases and the VEB-1 and PER β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43, 2193-2199, 1999.
 78. Bellais, S., Poirel, L., Leotard, S., Naas, T., Nordmann, P. Genetic diversity of carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamases from *Chryseobacterium* (*Flavobacterium*) *indologenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44, 3028-3034, 2000.
 79. Boschi, L., Mercuri, P.S., Riccio, M.L., Amicosante, G., Galenli, M., Frere, J.M., Rossolini, G.M. The *Legionella* (*Fluoribacter*) *gormanii* metallo-beta-lactamase: a new member of the highly divergent lineage of molecular-subclass B3 β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44, 1538-1543, 2000.
 80. Simm, A.M., Higgins, C.S., Pullan, S.T., Avison, M.B., Niumsup, P., Erdozain, O., Bennett, P.M., Walsh, T.R. A novel metallo-beta-lactamase, Mbl1b, produced by the environmental bacterium *Caulobacter crescentus*. *FEBS Lett.*, 509, 350-354, 2001.
 81. Mammeri, H., Bellais, S., Nordmann, P. Chromosome-encoded β -lactamases TUS-1 and MUS-1 from *Myroides odoratus* and *Myroides odoratimimus*, new members of the lineage of molecular subclass B1 metalloenzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 3561-3567, 2002.
 82. Rossolini, G.M., Condemi, M.A., Pantanella, F., Docquier, J.D.,

- Amicosante, G., Thaller, M.C. Metallo-beta-lactamase producers in environmental microbiota: new molecular class B enzyme in *Janthinobacterium lividum*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45, 837-844, 2001.
83. Naas, T., Bellais, S., Nordmann, P. Molecular and biochemical characterization of a carbapenem-hydrolysing β -lactamase from *Flavobacterium johnsoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 51, 267-273, 2003.
 84. Saavedra, M.J., Peixe, L., Sousa, J.C., Henriques, I., Alves, A., Correia, A. Sfh-1, a subclass B2 metallo-beta-lactamase from a *Serratia fonticola* environmental isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47, 2330-2333, 2003.
 85. Walsh, T.R., MacGowen, A.P., Bennett, P.M. Sequence analysis and enzyme kinetics of the L2 serine β -lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41, 1460-1464, 1997.
 86. Lauretti, L., Riccio, M.L., Mazzariol, A., Cornaglia, G., Amicosante, G., Fontana, R., Rossolini, G.M. Cloning and characterization of *bla*_{VIM}, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43, 1584-1590, 1999.
 87. Poirel, L., Lambert, T., Türkoğlu, S., Ronco, E., Gaillard, J., Nordmann, P. Characterization of class 1 integrons from *Pseudomonas aeruginosa* that contain the *bla*_{VIM-2} carbapenem-hydrolysing β -lactamase gene and of two novel aminoglycoside resistance gene cassettes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45, 546-552, 2001.
 88. Arakawa, Y., Murakami, M., Suzuki, K., Ito, H., Wacharotayankun, R., Ohsuka, S., Kato, N., Ohta, M. A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene *bla*_{IMP}. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39, 1612-1615, 1995.
 89. Collis, C.M., Kim, M.J., Stokes, H.W., Hall, R.M. Integron encoded

- Int1 integrases preferentially recognise the adjacent cognate *attI* site in recombination with a 59-be site. *Mol. Microbiol.*, 46, 1415-1427, 2002.
90. Bennett, P.M. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.*, 43, 1-4, 1999.
 91. Walsh, T.R., Toleman, M.A., Hryniewicz, W., Bennett, P.M., Jones, R.N. Evolution of an integron carrying *bla*_{VIM-2} in Eastern Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J. Antimicrob. Chemother.*, 52, 116-119, 2003.
 92. Aoki, S., Hirakata, Y., Kondoh, A., Gotoh, N., Yanagihara, K., Miyazaki, Y., Tomono, K., Yamada, Y., Kohno, S., Kamihira, S. Virulence of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother.*, 48, 1876-1878, 2004.
 93. Toleman, M.A., Biedenbach, D., Bennett, D., Jones, R.N., Walsh, T.R. Genetic characterization of a novel metallo-beta-lactamase gene, *bla*_{IMP-13}, harboured by a novel Tn5051-type transposon disseminated carbapenemase genes in Europe: report from the SENTRY worldwide antimicrobial surveillance programme. *J. Antimicrob. Chemother.*, 52, 583-590, 2003.
 94. Partridge, S.R., Hall, R.M. The IS1111 family members IS4321 and IS5075 have subterminal inverted repeats and target the terminal inverted repeats of Tn21 family transposons. *J. Bacteriol.*, 185, 6371-6384, 2003.
 95. Toleman, M.A., Simm, A.M., Murphy, T.A., Gales, A.C., Biedenbach, D.J., Jones, R.N., Walsh, T.R. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J. Antimicrob. Chemother.*, 50, 673-679, 2002.
 96. McManus-Munoz, S., Crowder, M.W. Kinetic mechanism of metallo-beta-lactamase L1 from *Stenotrophomonas maltophilia*.

- Biochemistry, 38, 1547-1553, 1999.
97. Spencer, J., Clarke, A.R., Walsh, T.R. Novel mechanism of hydrolysis of therapeutic β -lactams by *Stenotrophomonas maltophilia* L1 metallo-beta-lactamase. J. Biol. Chem., 276, 33638-33644, 2001.
 98. Wang, Z., Fast, W., Benkovic, S.J. Direct observation of an enzyme-bound intermediate in the catalytic cycle of the metallo-beta-lactamase from *Bacteroides fragilis*. J. Am. Chem. Soc., 120, 10788-10789, 1998.
 99. Wang, Z., Fast, W., Benkovic, S.J. On the mechanism of the metallo-beta-lactamase from *Bacteroides fragilis*. Biochem., 38, 1013-1023, 1999.
 100. Bellais, S., Mimos, O., Leotard, S., Jacolat, A., Petitjean, O., Nordmann, P. Efficacy of β -lactams for treating experimentally induced pneumonia due to a carbapenem-hydrolysing metallo-beta-lactamase-producing strain of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother., 46, 2032-2034, 2002.
 101. Docquier, J.D., Lamotte-Brasseur, J., Galenli, M., Amicosante, G., Frere, J.M., Bush, K., Rossolini, G.M. On functional and structural heterogeneity of VIM-type metallo-beta-lactamases. J. Antimicrob. Chemother., 51, 257-266, 2003.
 102. Watanabe, M., Iyobe, S., Inoue, M., Mitsuhashi, S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother., 35, 147-151, 1991.
 103. Osano, E., Arakawa, Y., Wacharotayankun, R., Ohta, M., Horii, T., Ito, H., Yoshimura, F., Kato, N. Molecular characterization of an enterobacterial metallo-beta-lactamase found in clinical isolate of *Serratia marcescens* that show imipenem resistance. Antimicrob. Agents Chemother., 38, 71-78, 1994.
 104. Senda, K., Arakawa, Y., Nakashima, K., Ito, H., Ichiyama, S., Shimokata, K., Kato, N., Ohta, M. Multifocal outbreaks of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to

- broad-spectrum β lactams, including carbapenems. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40, 349-353, 1996.
105. Iyobe, S., Kusadokora, H., Ozaki, J., Matsumura, N., Minami, S., Haruta, S., Sawai, T., O'Hara, K. Aminoacid substitutions in a variant of IMP-1 metallo-beta-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44, 2023-2027, 2000.
 106. Yano, H., Kuga, A., Okamoto, R., Kitasato, H., Kobayashi, T., Inoue, M. Plasmid-encoded metallo-beta-lactamase (IMP-6) conferring resistance to carbapenems, especially meropenem. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45, 1343-1348, 2001.
 107. Iyobe, S., Kusadokoro, H., Takahashi, A., Yomoda, S., Okubo, T., Nakamura, A., O'Hara, K. Detection of a variant metallo-beta-lactamase, IMP-10, from two unrelated strains of *Pseudomonas aeruginosa* and an *Alkaligenes xylosoxidans* strain. *Antimicrob Agents Chemother.*, 46, 2014-2016, 2002.
 108. Cornaglia, G., Riccio, M.L., Mazzariol, A., Lauretti, L., Fontana, R., Rossolini, G.M. Appearance of IMP-1 metallo-beta-lactamase in Europe., *Lancet*, 353, 899-900, 1999.
 109. Daiyasu, H., Osaka, K., Ishino, Y., Toh, H. Expansion of the zinc metallo-hydrolase family of the beta-lactamase fold. *FEBS Lett.*, 503, 1-6, 2001.
 110. Towner, K.J., Gee, T., Boswell, T. An unwanted import to the UK: a carbapenem resistant clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* producing metallo-beta-lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.*, 50, 1092-1093, 2002.
 111. Tysall, L., Stockdale, M.W., Chadwick, P.R., Palepou, M.F., Towner, K.J., Livermore, D.M., Woodford, N. IMP-1 carbapenemase detected in an *Acinetobacter baumannii* clinical isolate from the UK. *J. Antimicrob. Chemother.*, 49, 217-218, 2002.
 112. Chu, Y.W., Afzal-Shah, M., Houang, E.T., Palepou, M.I., Lyon, D.J., Woodford, N., Livermore, D.M. IMP-4, a novel metallo-beta-lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. collected in Hong

- Kong between 1994 and 1998. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45, 710-714, 2001.
113. Gibb, A.P., Tribuddharat, C., Moore, R.A., Louie, T.J., Krulicki, W., Livermore, D.M., Palepou, M.F., Woodford, N. Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new *bla*_{IMP} allele, *bla*_{IMP-7}. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46, 255-258, 2002.
 114. Yan, J.J., Ko, W.C., Tsai, S.H., Wu, H.M., Wu, J.J. Outbreak of infection with multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying *bla*_{IMP-8} in a university medical center in Taiwan. *J. Clin. Microbiol.*, 39, 4433-4439, 2001.
 115. Hawkey, P.M., Xiong, J., Ye, H., Li, H., M'Zali, F.H. Occurrence of a new metallo-beta-lactamase IMP-4 carried on a conjugative plasmid in *Citrobacter youngae* from the People's Republic of China. *FEMS Microbiol. Lett.*, 194, 53-57, 2001.
 116. Peleg, A.Y., Franklin, C., Bell, J., Spelman, D.W. Emergence of IMP-4 metallo-beta-lactamase in a clinical isolate in Australia. *J. Antimicrob. Chemother.*, 54, 699-700, 2004.
 117. Poirel, L., Pham, J.N., Cabanne, L., Gatus, B.J., Bell, S.M., Nordmann, P. Carbapenem-hydrolysing metallo-beta-lactamases from *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolated in Australia. *Pathology*, 36, 366-367, 2004.
 118. Ho, S.E., Subramaniam, G., Palasubramaniam, S., Navaratnam, P. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Malaysia producing IMP-7 beta-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46, 3286-3287, 2002.
 119. Oh, E.J., Lee, S., Park, Y.J., Park J.J., Park, K., Kim, S.I., Kang, M.W., Kim, B.K. Prevalence of metallo-beta-lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean university hospital and comparison of screening methods for detecting metallo-beta-lactamase. *J. Microbiol. Methods.*, 54, 411-418, 2003.

120. Lee, K., Lee, W.G., UH, Y., Ha, G.Y., Cho, J., Chong, Y. VIM- and IMP-type metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas* spp and *Acinetobacter* spp in Korean hospitals. *Emerg. Infect. Dis.*, 9, 868-871, 2003.
121. Mendes, R.E., Toleman, M.A., Ribeiro, J., Sader, H.S., Jones, R.N., Walsh, T.R. Genetic characterization of a novel metallo-beta-lactamase gene, *bla*_{IMP-16} : a highly divergent *bla*_{IMP} with a unique genetic context. Reports from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother.*, 48, 4654-4661, 2004.
122. Hanson, N.D., Hossain, A., Buck, L.L., Moland, E.S., Thomson, K.S. Program and abstracts of the 44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents Chemotherapy, Washington, D.C., abst. C1-291, 2004.
123. Walsh, T.R., Toleman, M.A., Poirel, L., Nordmann, P. Metallo-beta-lactamases: the quite before storm? *Clin. Microbiol. Rev.*, 18, 306-325, 2005.
124. Lombardi, G., Luzzaro, F., Docquier, J.D., Riccio, M.L., Perili, M., Coli, A., Amicosante, G., Rossolini, G.M., Toniolo, A. Nosocomial infections caused by multidrug-resistant isolates of *Pseudomonas putida* producing VIM-1 metallo-beta-lactamase. *J. Clin. Microbiol.*, 40, 4051-4055, 2002.
125. Scoulica, E.V., Neonakis, I.K., Gikas, A.I., Tselentis, Y.J. Spread of *bla*_{VIM-1} producing *E.coli* in a university hospital in Greece. Genetic analysis of the integron carrying the *bla*_{VIM-1} metallo-beta-lactamase. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 48, 167-172, 2004.
126. Giakkoupi, P., Xanthaki, A., Kanelopoulou, M., Vlahaki, A., Miriagou, V., Kontou, S., Papafraggas, E., Malamou-Lada, H., Tzouvelekis, L.S., Legakis, N.J., Vatopoulos, A.C. VIM-1 metallo-beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greek hospitals. *J. Clin. Microbiol.*, 41, 3893-3896, 2003.
127. Poirel, L., Collet, L., Nordmann, P. Carbapenem-hydrolysing

- metallo-beta-lactamase from a nosocomial isolate of *Pseudomonas aeruginosa* in France. *Emerg Infect. Dis.*, 6, 84-85, 2000.
128. Cardoso, O., Leitao, R., Figueiredo, A., Sousa, J.C., Duarte, A., Peixe, L.V. Metallo-beta-lactamase VIM-2 in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Portugal. *Microb. Drug Resist.*, 8, 93-97, 2002.
 129. Mendes, R.E., Castanheira, E.M., Garcia, P., Guzman, M., Toleman, M.A., Walsh, T.R., Jones, R.N. First isolation of *bla*_{VIM-2} in Latin America: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48, 1433-1434, 2004.
 130. Prats, G.E., Miro, E., Mirelis, B., Poirel, L., Bellais, S., Nordmann, P. First isolation of a carbapenem-hydrolysing beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46, 932-933, 2002.
 131. Sardelic, S., Pallecchi, L., Punda-Polic, V., Rossolini, G.M. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*-carrying VIM-2 metallo-beta-lactamase determinants, Croatia. *Emerg. Infect. Dis.*, 9, 1022-1023, 2003.
 132. Yatsuyagani, J., Saito, S., Harata, S., Suzuki, N., Ito, Y., Amano, K., Enomoto, K. Class 1 integron containing metallo-beta-lactamase gene *bla*_{VIM-2} in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48, 626-628, 2004.
 133. Yum, J.H., Yong, D., Lee, K., Kim, H.S., Chong, Y. A new integron carrying VIM-2 metallo-beta-lactamase gene cassette in a *Serratia marcescens* isolate. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 42, 217-219, 2002.
 134. Jeong, S.H., Lee, K., Chong, Y., Yum, J.H., Lee, S.H., Choi, H.J., Kim, J.M., Park, K.H., Han, B.H., Lee, S.W., Jeong, T.S. Characterization of a new integron containing VIM-2, a metallo-beta-lactamase gene cassette, in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 51, 397-400, 2003.

135. Yan, J.J., Ko, W.C., Tsai, S.H., Wu, H.M., Wu, J.J. Metallo-beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* isolates in a university hospital in Taiwan: prevalence of IMP-8 in *Enterobacter cloacae* and first identification of VIM-2 in *Citrobacter freundii*. J. Antimicrob. Chemother., 50, 503-511, 2002.
136. Yan, J.J., Hsueh, P.R., Ko, W.C., Luh, K.T., Tsai, S.H., Wu, H.M., Wu, J.J. Metallo-beta-lactamase 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, 2001.
137. Pournaras, S., Tsakris, A., Maniati, M., Tzouveleakis, L.S., Maniatis, A.N. Novel variant (*bla*_{VIM-4}) of the metallo-beta-lactamase gene *bla*_{VIM-1} in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother., 46, 4026-4028, 2002.
138. Koh, T.H., Wang, G.C.Y., Sng, L.H. IMP-1 and a novel metallo-beta-lactamase, VIM-6, in a fluorescent pseudomonads isolated in Singapore. Antimicrob. Agents Chemother., 48, 1939-1940, 2004.
139. Toleman, M.A., Rolston, K., Jones, R.N., Walsh, T.R. *bla*_{VIM-7}, evolutionary distinct metallo-beta-lactamase gene in *Pseudomonas aeruginosa* isolate from United States. Antimicrob. Agents Chemother., 48, 329-332, 2004.
140. Pagniez, G., Radice, M., Amoroso, A., Famiglietti, A., Gutkind, G. Abstr. 44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, abstr. C1-293, Washington, D.C.
141. Pasteran, F., Faccone, D., Petroni, A., Rapoport, M., Galas, M. Novel variant (*bla*_{VIM-11}) of the metallo-beta-lactamase *bla*_{VIM} family in a GES-1 extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Argentina. Antimicrob. Agents Chemother., 49, 474-475, 2005.
142. Murphy, T.A., Simm, A.M., Toleman, M.A., Jones, R.N., Walsh, T.R. Biochemical characterization of the acquired metallo-beta-lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother., 47, 582-587, 2003.

143. Castanheira, M., Toleman, M.A., Jones, R.N., Schmidt, F.J., Walsh, T.R. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, *bla_{GIM-1}*, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48, 4654-4661, 2004.
144. Payne, D.J., Hueso-Rodriguez, J.A., Boyd, H., Concha, N.O., Janson, C.A., Gilpin, M., Bateson, J.H., Cheever, C ve ark. Identification of a series of tricyclic natural products as potent broad spectrum inhibitors of metallo-beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46, 1880-1886, 2002.
145. Karabinis, A., Paramythiotou, E., Mylona-Petropoulou, D., Kalogeromitros, A., Katserelis, N., Kontopidou, F., Poularas, I., Malamou-Lada, H. Colistin for *Klebsiella pneumoniae*-associated sepsis. *Clin. Infect. Dis.*, 38, E7-E9, 2004.
146. Markou, N., Apostolakos, H., Koumoudiou, C., Athanasion, M., Koutsoukou, A., Alamanos, I., Gregorakos, L. Intravenous colistin in the treatment of sepsis from multi-resistant gram-negative bacilli in critically ill patients. *Crit. Care*, 7, R78-R83, 2003
147. National Committee for Clinical Laboratory Standards. M100-S13. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Thirteenth Informational Supplement. NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards Documents. 2003. Wayne, Pennsylvania, USA
148. Arakawa, Y., Shibata, N., Shibayama, K., Kurokawa, H., Yagi, T., Fujiwara, H., Goto, M. Convinient test for metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J. Clin Microbiol.*, 38, 40-43, 2000.
149. Yan, J., Wu, J., Tsai, S., Chuang, C. Comparison of the double disk, combined disk and Etest methods for detecting metallo-beta-lactamases in gram-negative bacilli. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, 49, 5-11, 2004.

150. Walsh, T., Bolmström, A., Qwarmström, A., Gales, A. Evaluation of a new Etest for detecting metallo-beta-lactamases in routine clinical testing. *J. Clin. Microbiol.*, 40, 2755-2759, 2002.
151. Lee, K., Chong, Y., Shin, H.B., Kim, Y.A., Yong, D. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 7, 88-102, 2001.
152. Lee, K., Lim, Y.S., Yong, D., Yum, J.H., Chong, Y. Evaluation of the Hodge Test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-beta-lactamase producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J. Clin. Microbiol.*, 41, 4623-4629, 2003.
153. Lauretti, L., Riccio, M., Mazzariol, A., Cornaglia, G., Amicosante, G., Fontana, R., Rossolini, G. Cloning and characterization of *bla_{VIM}*, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43, 1584-1590, 1999.
154. Toleman, M., Biedenbach, D., Bennett, D., Jones, R., Walsh, T. Italian metallo-beta-lactamases: a national problem? Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. *J. Antimicrob. Chemother.*, 55, 61-70, 2005.
155. Tsakris, A., Pournaras, S., Woodford, N., Palepou, M., Babini, G., Douboyas, J., Livermore, D. Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 1290-1292, 2000.
156. Mammeri, H., Laurans, G., Eveillard, M., Castelain, S. Coresistance of SHV-4 and TEM-24 producing *Enterobacter aerogenes* strains before a large outbreak of TEM-24 producing strains in a French hospital. *J. Clin. Microbiol.*, 39, 2184-2190, 2001.
157. Livermore, D. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare? *Clin. Infect. Dis.*, 34, 634-640, 2002.

158. Cornaglia, G., Mazzariol, A., Lauretti, L., Rossolini, G., Fontana, R. Hospital outbreak of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1, a novel transferable metallo-beta-lactamase. Clin. Infect. Dis., 31, 1119-1125, 2000
159. Ochs, M., McCusker, P., Bains, M., Hancock, R. Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids. Antimicrob. Agents Chemother., 43, 1085-1090, 1999.
160. Bal, Ç. Beta-laktamazlar: Güncel durum. Flora, 8, 111-123, 2003.
161. Jones, R., Pfaller, M., Marshall, S., Hollis, R., Wilke, W. Antimicrobial activity of 12 broad spectrum agents tested against 270 nosocomial blood stream infection isolates caused by non-enteric gram-negative bacilli: Occurrence of resistance, molecular epidemiology, and screening for metallo-enzymes. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 29, 187-192, 1997.
162. Pfaller, M., Jones, R. MYSTIC (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection) results from the Americas: resistance implications in the treatment of serious infections. J. Antimicrob. Chemother., 46, 25-37, 2000.
163. Luzzaro F., Endimiani, A., Docquier, J., Mugnaioli, C., Bonsignori, M., Amicosante, G., Rossolini, G., Toniolo, A. Prevalence and characterization of metallo-beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 48, 131-135, 2004.
164. Pournaras, S., Maniati, M., Petinaki, E., Tzouvelekis, L.S., Tsakris, A., Legakis, N., Maniatis, A. Hospital outbreak of multiple clones of *Pseudomonas aeruginosa* carrying the unrelated metallo-beta-lactamase gene variants *blaVIM-2* and *blaVIM-4*. J. Antimicrob. Chemother., 51, 1409-1414, 2003.

165. Patzer, J., Toleman, M., Deshpande, M., Kaminska, W., Dzierzanowska, D., Bennett, P., Jones, R., Walsh, T. *Pseudomonas aeruginosa* strains harbouring an unusual *blaVIM-4* gene cassette isolated from hospitalized children in Poland (1998-2001). J. Antimicrob. Chemother., 53, 451-456, 2004.
166. Lee, K., Lim, J., Yum, J., Yong, D., Chong, Y., Kim, J., Livermore, D. *blaVIM-2* cassette-containing novel integrons in metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* isolates disseminated in a Korean Hospital. Antimicrob. Agents Chemother., 46, 1053-1058, 2002.
167. Lee, K., Lee, W., Uh, Y., Ha, G., Cho, J., Chong, Y. VIM and IMP type metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas* species and *Acinetobacter* species in Korean hospitals. Emerg. Infect. Dis., 9, 868-871, 2003.
168. Mendes, R., Toleman, M., Ribeiro, J., Sader, H., Jones, R., Walsh, T. Integron carrying a novel metallo-beta-lactamase gene, *blaIMP-16* and a fused form of aminoglycoside resistant gene *aac(6')-30/aac(6')-Ib'*: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Antimicrob. Agents Chemother., 48, 4693-4702, 2004.
169. Gibb, A., Tribudharat, C., Moore, R., Louie, T., Krulicki, W., Livermore, D., Palepou, M., Woodford, N. Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new *blaIMP* allele, *blaIMP-7*. Antimicrob. Agents Chemother., 46, 255-258, 2002.
170. Giakkaoupi, P., Petrikos, G., Tzouveleakis, L.S., Tsonas, S., Legakis, N., Vatopoulos, A.C. 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, 2003.

171. Kimura, S., Alba, J., Shiroto, K., Sano, R., Niki, Y., Maesaki, S., Akizawa, K., Kaku, M., Watanuki, Y., Ishii, Y., Yamaguchi, K. Clonal diversity of metallo-beta-lactamase-possessing *Pseudomonas aeruginosa* in geographically diverse region of Japan. J. Clin. Microbiol., 43, 458-461, 2005.
172. Lagatolla, C., Tonin, E., Monti-Bragadin, C., Dolzani, L., Gombac, F., Bearzi, C., Edalucci, E. Endemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with acquired metallo-beta-lactamase determinants in European Hospital. Emerg. Infect. Dis., 10, 535-539, 2004.
173. Jones, R., Biedenbach, D., Sader, H., Fritsche, T., Toleman, M., Walsh, T. Emerging epidemic of metallo-beta-lactamase-mediated resistances. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 51, 77-84, 2005.
174. Tsakris, A., Pournaras, S., Woodford, N. Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. J. Clin. Microbiol., 38, 1290-1292, 2000.
175. Senda, K., Arakawa, Y., Nakashima, K., Ito, H., Ichiyama, S., Shimokata, K., Koto, N., Ohta, M. Multifocal outbreaks of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum beta-lactams, including carbapenems. Antimicrob. Agents Chemother., 40, 349-353, 1996.
176. Yamasaki, K., Komatsu, M., Yamashita, T., Shimakawa, K., Ura, T., Nishio, H., Satoh, K. Production of CTX-M-3 extended-spectrum beta-lactamase and IMP-1 metallo-beta-lactamase by five gram-negative bacilli: survey of clinical isolates from seven laboratories collected in 1998 and 2000, in Kinki region of Japan. J. Antimicrob. Chemother., 51, 631-638, 2003.
177. Cevahir, N., Kaleli, İ., Demir, M., Öztürk, S., Mete, E. Çeşitli klinik örneklerden soyutlanan *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direncinin değerlendirilmesi. ANKEM Derg. 17, 16-19, 2003.

178. Akçay, S., Topkaya, A., Oğuzoğlu, N., Küçükercan, M., Ertem, S., Göktaş, P. Hastane infeksiyonu etkeni *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında imipenem ve meropenem duyarlılığı. *İnfeksiyon Dergisi*, 17, 465-469, 2003.
179. Erdemoğlu, A., Ardıç, N., Özyurt, M. Kan kültürlerinden üretilen *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında antibiyotik direnci. *ANKEM Derg.*, 17, 397-399, 2003.
180. Bozkurt, H., Güdücüoğlu, H., Aygöl, K., Baykal, S., Berktaş, M. Klinik örneklerden üretilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antimikrobiyallere karşı gelişen direnç oranları. *ANKEM Derg.*, 19, 51, 2005.
181. Çetin, S., Kaya, S., Cicioğlu, B., Demirci, M., Arıkan, S., Pakbaş, İ. Ocak 2004-Ocak 2005 tarihleri arasında kan kültürlerinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* izolatlarının antibiyotik direnç durumları. *ANKEM Derg.*, 19 (Ek 1), 52, 2005.
182. Bozkurt, H., Güdücüoğlu, H., Yaman, G., İzci, H., Berktaş, M. Yoğun bakım ünitesinde yatan hastalardan üretilen patojen mikroorganizmalar ve antimikrobiyallere duyarlılıkları. *ANKEM Derg.*, 19 (Ek 1), 46, 2005.
183. Geyik, M., Hoşoğlu, S., Ayaz, C., Çelen, M. Geriatrik hastane infeksiyonlarından izole edilen bakteriler ve antibiyotik duyarlılıkları. *ANKEM Derg.*, 19 (Ek 1), 42, 2005.
184. Pullukçu, H., Taşbakan, M., Aydemir, Ş., Sipahi, O., Turhan, A., Özinel, M., Ulusoy, S. İdrar kültürlerinden izole edilen bakterilerin çeşitli antibiyotiklere duyarlılıklarının değerlendirilmesi. *ANKEM Derg.*, 19 (Ek 1), 47, 2005.
185. Gültekin, B., Eyigör, M., Aydın, N. Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas* kökenlerinin antibiyotik direnci. *ANKEM Derg.*, 18, 1-4, 2004.

186. Gülay, Z. Gram negatif çomaklarda antibiyotik direnci: 2003-2004 Türkiye haritası. ANKEM Derg., 19 (Ek 2), 66-77, 2005.
187. Korkut, Ç., Salman, T., Gürler, N., Gün, F., Karataş, M., Çelik, A. İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Kliniği'nde mikrobiyolojik kültür sonuçları ve antibiyogramların değerlendirilmesi. ANKEM Derg., 19 (E00k1), 42, 2005.
188. Hawkey, P., Xiong, J., Ye, H., Li, H., M'Zali, F. Occurrence of a new metallo-beta-lactamase IMP-4 carried on a conjugative plasmid in *Citrobacter youngae* from the People's Republic of China. FEMS Microbiol Let., 194, 53-57, 2001.
189. Partridge, S., Brown, H., Hall, R. Characterization and movement of the Class 1 integron known as Tn2521 and Tn1405. Antimicrob. Agents Chemother., 46, 1288-1294, 2002.
190. Laraki, N., Galenli, M., Thamm, I., Riccio, M., Amicosante, G., Frere, J., Rossolini, G. Structure of In31, a *bla_{IMP}* containing *Pseudomonas aeruginosa* integron phyletically related to In5, which carries an unusual array of gene cassettes. Antimicrob. Agents Chemother., 43, 890-901, 1999.
191. Collis, C., Kim, M., Partridge, S. Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines. J. Bacteriol., 141, 3017-3026, 2002.
192. Toleman, M., Biedenbach, D., Bennett, D., Jones, R., Walsh, T. Genetic characterization of a novel metallo-beta-lactamase gene, *bla_{IMP-13}*, harboured by a novel Tn-5051 type transposon disseminating carbapenemase genes in Europe: report from the SENTRY worldwide antimicrobial surveillance programme. J. Antimicrob. Chemother., 52, 583-590, 2003.
193. Senda, K., Arakawa, Y., Ichiyama, S., Nakashima, K., Ito, H., Shimokoto, K., Kato, N., Ohta, M. PCR detection of metallo-beta-lactamase gene (*bla_{IMP}*) in gram-negative rods resistant to broad spectrum beta-lactams. J. Clin. Microbiol., 34, 2909-2913, 1996.

194. Quinteira, S., Sousa, J., Peixe, L. Characterization of In100, a new integron carrying a metallo-beta-lactamase and a carbenicillinase, from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother., 49, 451-453, 2005.
195. Wang, C., Mi, Z. IMP-1 metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in a university hospital in the People's Republic of China. J. Antimicrob. Chemother., 42, 1159-1160, 2004.
196. Yan, J., Hsueh, P., Ko, W., Luh, K., Tsai, S., Wu, H., Wu, J. 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, 2001.
197. Lombardi, G., Luzzaro, F., Docquier, J., Riccio, M., Perili, M., Coli, A., Amicosante, G., Rossolini, G., Toniolo, A. Nosocomial infections caused by multidrug-resistant isolates of *Pseudomonas putida* producing VIM-1 metallo-beta-lactamase. J. Clin. Microbiol., 40, 4051-4055, 2002.
198. Nishio, H., Komatsu, M., Shibata, N., Shimakawa, K., Sueyoshi, N., Ura, T., Satoh, K., Toyokawa, M., Nakamura, T., Wada, Y., Orita, T., Kofuku, T., Yamasaki, K., Sakamoto, M. Metallo-beta-lactamase producing gram-negative bacilli: Laboratory-based surveillance in cooperation with 13 clinical laboratories in the Kinki region of Japan. J. Clin. Microbiol., 42, 5256-5263, 2004.
199. Oh, E., Lee, S., Park, Y., Park, J., Park, K., Kim, S., Kang, M., Kim, B. Prevalence of metallo-beta-lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean university hospital and comparison of screening methods for detecting metallo-beta-lactamase. J. Microbiol. Methods, 54, 411-418, 2003.
200. Sader, H., Castanheira, M., Mendes, R., Toleman, M., Walsh, T., Jones, R. Dissemination and diversity of metallo-beta-lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Inter. J. Antimicrob. Agents, 25, 57-61,

2005.

201. Matsumura, N., Minami, S., Watanabe, Y., Iyobe, S., Mitsuhashi, S. Role of permeability in the activities of beta-lactams against gram-negative bacteria which produce a group 3 beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43, 2084-2086, 1999.
202. Hirakata, Y., Izumikawa, K., Yamaguchi, T., Takemura, H., Tanaka, H., Yoshida, R., Matsuda, J., Nakano, M., Tomono, K., Maesaki, S. Rapid detection and evaluation of clinical characteristics of emerging multiple-drug-resistant gram-negative rods carrying the metallo-beta-lactamase gene *bla_{IMP}*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42, 2006-2011, 1998.
203. Shibata, N., Doi, Y., Yamane, K., Yagi, T., Kurokawa, H., Shibayama, K., Kato, H., Kai, K., Arakawa, Y. PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrase carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J. Clin. Microbiol.*, 41, 5407-5413, 2003.
204. Siemann, S., Brewer, D., Clarke, A., Dmitrienko, I., Lajoie, G., Viswanatha, T. IMP-1 metallo-beta-lactamase: effect of chelators and assessment of metal requirement by electrospray mass spectrometry. *Biochimica. Biophysica. Acta.*, 1571, 190-200, 2002.
205. Franceschini, N., Caravelli, B., Docoquer, J., Galenli, M., Frere, M., Amicosante, G., Rossolini, G. Purification and biochemical characterization of the VIM-1 metallo-beta-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44, 3003-3007, 2000.
206. Bayraktar, B., Yıldız, D., Bulut, E. Yoğun bakım ünitesinden izole edilen karbapeneme dirençli *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında metallo-beta-laktamaz üretiminin araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.*, 34, 248-252, 2004.

207. Toroman, Z., Yakupoğulları, Y., Kizirgil, A. Metallo-beta-laktamaz üreten bir *Klebsiella pneumoniae* suşunun infekte ettiği diyabetik ayak yarası. *İnfeksiyon Dergisi*, 18, 525-528, 2004.
208. Poirel, L., Collet, L., Nordmann, P. Carbapenem-hydrolysing metallo-beta-lactamase from a nosocomial isolate of *Pseudomonas aeruginosa* in France. *Emerg. Infect. Dis.*, 6, 84-85, 2000.
209. Pellegrino, F., Teixeira, L., Carvalho, M., Nouer, S., Oliveria, M., Sampaio, J., Freitas, A., Ferreira, A., Amorim, E., Riley, L., Moreira, B. Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 40, 2420-2424, 2002.
210. Urban, C., Maurer, S., Rahal, J. Considerations in control and treatment of nosocomial infections due to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Infect. Dis.*, 36, 1268-1274, 2003.