

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
HASTANESİNDE İZOLE EDİLEN GRAM NEGATİF
NONFERMENTER BAKTERİLERDE METALLO BETA-
LAKTAMAZ ENZİM AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Tülay TETİK

MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Emel SESLİ ÇETİN

ISPARTA-2008

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
HASTANESİNDE İZOLE EDİLEN GRAM NEGATİF
NONFERMENTER BAKTERİLERDE METALLO BETA-
LAKTAMAZ ENZİM AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Tülay TETİK

MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Emel SESLİ ÇETİN

Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Fonu Tarafından
1670-TU-08 olu proje numarası ile desteklenmektedir.

ISPARTA-2008

ÖNSÖZ

Uzmanlık öğrenimim süresince yardımlarını ve bilgilerini esirgemeyen Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı başkanı değerli hocam Doç. Dr. Buket CİCİOĞLU ARIDOĞAN'a, eğitimimin her aşamasında sıcak ilgisini, anlayışını, desteğini ve bilgilerini benden esirgemeyen, tez çalışmalarımın büyük bir titizlikle yürütülmesini sağlayan değerli danışman hocam Yrd.Doç.Dr. Emel SESLİ ÇETİN'e teşekkürlerimi sunarım.

Öğrenimim süresince bilgi ve deneyimleri ile desteklerini gördüğüm değerli hocalarım Doç. Dr. Mustafa DEMİRCİ'ye, Doç. Dr. Selçuk KAYA'ya, Doç. Dr. Ali Kudret ADILOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarım Dr. Ayşe Gül ÖZSEVEN, Dr. Ayşe AYNALI, Dr. Mehmet Salih ARIKAN, Dr. Osman KILINÇ, Dr. Hayati GÜNEŞ, Dr. İlker PAKBAŞ, Dr. Nurettin GÖNÜLATEŞ, Dr. Tekin TAŞ, laboratuvar sorumlumuz Hakan DOĞANGÖNÜL ve Bediha OĞUZ'a, parazitolojideki neşesiyle hepimizin çalışma isteğini artıran Cengiz KAYAER'e ve diğer teknisyen arkadaşlarıma eğitimim süresince verdikleri destek için teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca her zaman yanımda olan anneme, babama ve kızkardeşime destekleri için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLO ve RESİM LİSTESİ	iv
KISALTMALAR	v
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Gram Negatif Non Fermenter Bakteriler	3
2.1.a. Acinetobacter baumannii.....	3
2.1.b. Pseudomonas aeruginosa	5
2.2. Antibakteriyel Direnç Mekanizmaları.....	6
2.2.1. Beta-Laktam Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları	6
2.2.2. Beta-Laktamazlar	8
2.2.2.a. Grup 1 (Amp C) beta-laktamazlar:.....	9
2.2.2.b. Grup 2 beta-laktamazlar:.....	10
2.2.2.c. Grup 3 beta laktamazlar	12
2.2.3. Karbapenemler	15
2.3. Karbapenamazlar.....	16
2.3.1. Metallo-Beta-Laktamazlar	17
2.3.1.a. Metallo Beta Laktamazların Biyokimyası.....	18
2.3.1.b. Kromozomal Olarak Kodlanmış MBL'lar	19
2.3.1.c. MBL'ların Aktarılmasında Kullanılan Genetik Aracılar	20
2.3.1.d. Aktarılabılır MBL'lar.....	21
2.3.2. Deneysel Metallo Beta Laktamaz Enzim İnhibitörleri.....	25
2.3.3. MBL'ların Tespiti	26
2.3.4. MBL Enzim Aktivitesi Gösteren Bakterilerle Oluşan İnfeksiyonların Tedavisi	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1. MBL Tesbitinde Kullanılan Fenotipik Yöntemler	31
3.1.a. Kombine Disk Testi.....	31
3.1.b. Çift Disk Sinerji Testi	31
3.1.c. Modifiye Hodge Testi	31

3.1.d. MBL E Test.....	32
4. BULGULAR	33
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	37
6. ÖZET.....	44
7. SUMMARY	45
8. KAYNAKLAR	46

TABLO ve RESİM LİSTESİ

Tablo 1 Beta-laktamaz grupları ve genel özellikleri (1).	14
Tablo 2. MBL üreten izolatların olası tedavi seçenekleri. Kaynak 113 den Türkçeye çevrilmiştir	28
Tablo 3. Disk difüzyon sınır değerleri.	30
Tablo 4. <i>A. baumannii</i> ve <i>P. aeruginosa</i> 'nın bazı antibiyotiklere direnç durumları (n/%).....	33
Tablo 5. MBL Fenotipik tesbit yöntemleri sonucunda bakterilerdeki MBL pozitifliği (%).....	34
Tablo 6. <i>A. baumannii</i> için en az üç fenotipik yöntemle saptan MBL pozitifliği.....	34
Tablo 7. <i>P. aeruginosa</i> izolatlarında en az üç farklı fenotipik yöntemle saptanan MBL pozitifliği	35

RESİM LİSTESİ

Resim 1. E Test sonuç-pozitif	35
Resim 2. E Test sonuç-negatif	35
Resim 3. Kombine disk testi sonuç-pozitif.	36
Resim 4. Kombine disk testi sonuç-negatif	36
Resim 5. Çift disk sinerji testi sonuç- Pozitif (üst), Negatif(alt).....	36
Resim 6. Modifiye Hodge testi sonuç-pozitif	36

KISALTMALAR

NFGNB	: Non Fermenter Gram Negatif Bakteriler
GSBL	: Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz
MBL	: Metallo Beta-Laktamaz
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetikası
PBP	: Penislin Bağlayan Protein
KNS	: Koagülaz negatif stafilokoklar
OMP	: Outer Membrane Protein
GN	: Gram Negatif
VIM	: Verona İmipenemaz
SPM	: Sao Paulo Metallo Beta Laktamaz
GPM	: German imipenemase
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ATCC	: American Type Culture Collection
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
MIK	: Minimal İnhibitör Konsantrasyon
IPM	: İmipenem

1. GİRİŞ

Non Fermenter Gram Negatif Bakteriler (NFGNB), genellikle doğada saprofit olarak bulunan, immün sistemi baskılanmış ve hastanede yatan hastalarda ciddi infeksiyonlara neden olan bakterilerdir. İnsanda hastalık etkeni olarak en sık izole edilen nonfermenter basiller ise *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii*'dir. Bu bakterilerle oluşan infeksiyonlarda kullanılan antibiyotiklere karşı oluşan direncin artması nedeniyle tedavide güçlüklerle karşılaşmaktadır.

Karbapenemler, geniş antibakteriyel spektrumları, bakteriyel membranlardan hızla geçebilmeleri, AmpC ve genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) enzimlerine dayanıklı olmaları gibi özellikleri nedeniyle özellikle çoklu ilaç direnci olan Gram negatif bakteri infeksiyonlarında ilk tercih olarak kullanılan antibiyotik grubudur. Ancak, özellikle ampirik tedavide yaygın kullanılmaları direnç oranlarının artmasıyla sonuçlanmıştır. Gram negatif patojenlerde metallo beta-laktamaz (MBL) enzimine bağlı olarak ortaya çıkan ve giderek arttığı gözlenen karbapenem direnci tüm dünyada klinik ve epidemiyolojik açıdan önem taşımaktadır. MBL'leri kodlayan genler kromozom veya plazmid aracılı olabilir ve sınıf I integronlar üzerinde yer alır. Bu nedenle Gram negatif bakteriler arasında hızla yayılarak önemli bir tehdit oluştururlar. MBL'ler, Bush sınıflamasında fonksiyonel grup 3 veya Ambler sınıflamasında sınıf B'de yer alan ve diğer beta-laktamazlardan farklı olarak aktif bölgelerinde Zn^{+2} iyonu bulunan enzimlerdir. Dolayısıyla bu enzimler klavulanat, tazobaktam, sulbaktam gibi klasik beta-laktamaz inhibitörlerinden etkilenmezken EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) gibi bir metal şelatörü ile inaktive olurlar. Bu enzimlerin en önemli özelliği monobaktamlar dışında tüm beta-laktamları ve karbapenemleri hidroliz edebilmeleridir.

MBL üreten bakterilerin erken ve doğru olarak tespit edilmesi bu bakterilerin kontrolsüz yayılımlarının sınırlandırılmasına yardımcı olacaktır. Bu sorunun farkındalığı hastanelerde mikrobiyologların bu suşlarla meydana gelebilecek olası salgınları erken fark etmelerini sağlaması yanında dolayısı ile klinisyenlerin antimikrobiyal seçimlerinde ve infeksiyon kontrolünde uygun yaklaşımlara yönelmelerini sağlayacaktır.

Bu çalışmanın amacı hastanemizin çeşitli servislerinde yatmakta olan hastalardan laboratuvarımıza gönderilen çeşitli materyallerden izole edilen imipeneme dirençli *A. baumannii* ve *P.aeruginosa* türlerinde MBL enzim aktivitesini bilinen çeşitli fenotipik yöntemlerle tesbit ederek hastanemizdeki izolatlarda MBL pozitifliğinin prevalansını saptamaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gram Negatif Non Fermenter Bakteriler

Non Fermenter Gram Negatif Bakteriler (NFGNB) son yıllarda immün sistemi baskılanmış ve özellikle ilaç tedavisi alan hastalarda artan oranlarda görülen fırsatçı patojenler olarak infeksiyonlara neden oldukları bilinmektedir. Bu bakteriler çevresel olarak toprakta, suda, hastane ortamı florasında, kısaca doğada yaygın olarak; insanlarda ise derinin bakteriyel florasında, solunum yolu florası ve oral florada bulunabilmektedir (1). NFGN Bakteriler birçok intrinsik veya kazanılmış ilaç direnci taşımaya eğilimli olmaları yanı sıra dirençli suşlarla meydana gelmiş olan infeksiyonlarda seçenек olarak kabul edilen yeni antimikrobiyal bileşiklere karşı da bakteriyel direncin hızla artmakta olduğunu bildiren raporlar kaygıya neden olmaktadır (2).

NFGNB'den özellikle dört türü, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* ve *Burkholderia cepacia* hastanede yatan hastalarda önemli hastane infeksiyonlarına neden olmaktadır (2).

Bu infeksiyonlar arasında septisemi, solunum ve genitoüriner sistem infeksiyonları, intrakraniyel infeksiyonlar, endokardit, gastrointestinal sistem enfeksiyonları, cerrahi alan infeksiyonu gibi birçok nozokomiyal infeksiyon tabloları yer almaktadır. Hastanede yatan hastalarda fırsatçı olmalarına rağmen, toplumdan kazanılmış infeksiyonlara da neden oldukları bildirilmektedir (3).

2.1.a. Acinetobacter Baumannii

A. baumannii, yaklaşık 1–1.5µm X1.5-2.5 µm boyutlarında Gram negatif kok, ilk izolasyonda ve bir günlük taze kültürlerinde kokobasil formunda olup, subkültürlerinde veya penisilinli ortamda ürediklerinde basil şeklinde görülür. Oksidaz testi negatiftir. Mac Conkey besiyerinde genellikle ürer. Doğada yaygın olarak görülmekte ve insan deri florasında da bulunabildiğinden klinik örneklerden sıklıkla izole edilmektedir. *Acinetobacter* türleri özellikle vücudun nemli bölgeleri başta olmak üzere normal deri florasında yer alabilmektedirler. Normal sağlıklı bireylerin yaklaşık % 25'inin derilerinde *Acinetobacter* türlerini taşıdıkları gösterilmiştir (4).

Hastanede izlenen hastalarda taşıyıcılık oranı daha yüksektir. Bunun nedeni çapraz kontaminasyon ve hastane ortamının kaynak oluşturmalarıdır. Yapılan çeşitli çalışmalarda özellikle salgın dönemlerinde hastanede yatan hastalarda boğaz taşıyıcılığı % 7–18 olarak bulunmuş ve trakeostomi sürüntülerinde ise % 45 oranında saptanmıştır (5).

Virulans potansiyelleri düşük olduğundan bağışıklık sistemi normal olanlarda infeksiyon oluşturma olasılığı oldukça düşüktür. Asidik pH'da ve düşük ısıda üreyebilme özellikleri yanında bilinen sitotoksin üretimi yoktur. Hücre duvarında bulunan lipopolisakkaritin endotoksijenik özelliği çok az bilinmektedir. *Acinetobacter* sepsisinin semptomlarından in vivo endotoksin üretimi sorumludur. Bakterinin insan vücudunda üreyebilmesi için gerekli olan demiri sağlayabilme özelliği de önemli virulans faktörlerindedir. Bazı *Acinetobacter* türlerinin dış membran reseptör proteinleri gibi sideroforları ürettikleri gösterilmiştir (6).

Acinetobacter türlerinin spesifik antibiyotiklere karşı duyarlılıkları önemli ölçüde farklılıklar gösterir ve birçok ajana karşı direnç giderek artmaktadır. Ürütücü şekilde, imipenem, seftazidim, amikasin ve tüm diğer rutin test edilen antibiyotiklere dirençli *Acinetobacter* suşlarına bağlı salgınlar bildirilmiştir. Bu gibi durumlar için uygun tedavi yaklaşımı halen belirsizdir. Dirençli *Acinetobacter* türlerinin tedavisinde karbapenem grubu, sulbaktam ve minosiklin ve kolistin en etkin antibiyotikler olarak bildirilmekte, özellikle ciddi *Acinetobacter* infeksiyonlarında ise kombine tedaviler önerilmektedir. Bunlar arasında en sık kullanılan kombinasyon imipenem+amikasindir. Seftazidim + aminoglikozid veya florokinolon kombinasyonlarının kullanılabilceği, imipenem+siprofloksasin kombinasyonunun hem in vivo, hem de in vitro aktivitesinin olduğu gösterilmiştir. Tedavi sırasında etkenin imipeneme direnç durumuna göre rifampisin+kolistin kombinasyonlarının da in vitro olarak etkin olduğu bulunmuştur (6, 7, 8).

Antibiyotik duyarlılık profillerinde olabilecek bu değişkenlikler nedeniyle *Acinetobacter*'lerin etken olduğu infeksiyonların tedavisi etken olarak izole edilen suşların duyarlılık testleriyle yönlendirilmelidir (9).

2.1.b. *Pseudomonas Aeruginosa*

Gram-negatif, sporsuz, düz veya hafif kıvrık, 1.5-3 µm boyunda, 0.5-0.8 µm genişliğinde olan bu bakteri, Pseudomonadaceae ailesi içindeki en patojen türdür. Kirpikli ve hareketli, zorunlu aéropturlar. Çoğu izolatlar kanlı agarda beta hemolitikdir ve tipik yeşil metalik parlaklık oluşturur. Rutin kullanılan besiyerlerinde optimal 30-37°C'de ve hafif alkali ortamda kolayca ürerler. Kültürlerde piyosiyanın adı verilen çözüner fenazın pigmenti üretmesi en önemli özelliklerinden biridir. Piyosiyanın dışında bakteri kırmızı pigmentten sorumlu piyorubin, siyah pigmentten sorumlu piyomelanin veya sarı-yeşil ya da yeşil-kahverengi renk veren piyoverdin pigmenti içerebilir. Piyosiyanın ve piyoverdin pigmentlerinin bulunduğu bakteri izolatları kültür ortamında yeşil-mavi koloniler oluşturur. *Pseudomonas aeruginosa* karbonhidratları fermente etmez. Glikoz, ksiloz gibi şekerlere oksidatif etki gösterirken, maltozu etkilemez. Oksidaz reaksiyonları pozitifdir. *P. aeruginosa*'nın epitel hücrelerine tutunmayı sağlayan piluslar ve tutunucu hücre yüzeyi yapıları olmak üzere iki protein adezini vardır. İki çeşit hemolizin yapar; biri ısıya duyarlı, fosfolipaz C olarak adlandırılan bir protein ve diğeri ısıya dayanıklı bir glikolipittir. Lipit A endotoksini organizmanın biyolojik etkisini düzenler. Ekzotoksin A ise hücre dışı bir enzim olup, elongasyon faktör 2'yi (EF2) inaktive ederek protein sentezini inhibe eder (10).

P. aeruginosa sağlıklı insanlarda nadiren hastalığa neden olan, sık rastlanan bir insan saprofitidir. Konak savunmasının bozulmasına neden olan yanık, kanser kemoterapisi, uzun süreli geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, üriner veya damar içi kateter, endotrakeal entübasyon gibi savunma mekanizmalarının bozulduğu durumlar ayrıca nötropeni, hipogammaglobulinemi, kompleman eksikliği gibi bağışıklık sisteminin baskılandığı durumlar enfeksiyona zemin hazırlar (10). *P. aeruginosa* enfeksiyonu kolonizasyon, invazyon ve sistemik yayılım olmak üzere üç aşamada gelişir. Cilt ve mukoza yüzeylerine kolonize olan bakterilerin yayılımında virülans faktörleri, konağın immun direnci ve fiziksel savunma mekanizmaları önemli yer tutar. İnfeksiyon, kolonizasyon aşamasında kalabilir ya da sistemik enfeksiyona ilerleyebilir (11, 12).

2.2. Antibakteriyel Direnç Mekanizmaları

Günümüzde antibiyotiklerin düzensiz kullanımının artması, yoğun bakım ünitelerinde yatan ve immun sistemi bozulmuş hasta sayısının artması, gıda endüstrisinde antibiyotik kullanımı gibi nedenlerle mikroorganizmalardaki antibiyotik direnci giderek artmaktadır. Antibiyotiklerin uygunsuz ve gelişigüzel kullanımı ile gerek toplum kökenli gerekse de hastane kökenli infeksiyonların tedavisinde önemli sorunlar yaşanmaktadır. Direnç sorununun daha yoğun olarak yaşandığı yerler antibiyotik kullanımının daha yoğun olması nedeni ile hastanelerdir. Ülkemizde hastanelerde en sık direnç sorunu yaşanan mikroorganizmalar; *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Koagulaz negatif stafilokoklar (KNS)*, *Enterobacter spp*, *Enterokoklar*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter spp* dir (13, 14).

Antibiyotik direnci; bir bakterinin antimikrobiyal ajanın üremeyi engelleyici veya öldürücü etkisinden korunabilme kapasitesidir. Bakterilerin antibiyotiklere direnci çeşitli nedenlerden kaynaklanabilir.

1. İntrinsik Direnç (Doğal Direnç): Bir bakterinin genetik özelliği nedeniyle bazı antibiyotiklere olan doğal direncini tanımlar.

2. Kazanılmış Direnç: Bakterinin genetik özelliklerindeki değişimlere bağlı olarak; ya kromozom, transpozon veya plazmid DNA'sındaki mutasyonlarla ya da direnç geni taşıyan DNA dizilerinin başka bakterilerden transformasyon, transdüksiyon veya konjugasyon yoluyla alınması sonucu ortaya çıkan dirençtir.

3. Çevre ve Koşullara Bağlı Direnç: Antibiyotiklerin invitro ve invivo etkinliklerinin farklılık göstermesine neden olan dirençtir. Dokudaki pH değişiklikleri, antibiyotiğin infeksiyon bölgesine ulaşamaması ve oksijen basıncı değişiklikleri gibi nedenlerle invitro testlerde etkili olarak değerlendirilen antibiyotik invivo koşullarda etki göstermeyebilir (15, 16).

2.2.1. Beta-Laktam Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları

Bakteri hücre duvarındaki temel yapı peptidoglikan (murein, mukopeptid) adı verilen, kovalent bağlarla bağlı, bakteriyi ağ şeklinde kavrayan, sağlam, bakterinin yapısını ve bütünlüğünü sağlayan büyük bir polimerdir. Beta-laktam antibiyotikler

ise transpeptidaz ve karboksipeptidazları inhibe edip, bakterilerin hücre duvarında yer alan peptidoglikan tabakasının sentezini bozarak etki ederler. Hücre duvar yapısı bozulan bakteride ozmotik direnç kaybı ve ölüm meydana gelmektedir (17, 18).

Beta-laktam antibiyotiklerin etki gösterebilmeleri için penisilin bağlayan proteinlere (PBP) etkin konsantrasyonda bağlanması gereklidir. Bakteriler, bu basamakların her birinde bir engel oluşturarak direnç geliştirebilirler. Bakterilerde beta-laktam antibiyotiklere karşı oluşan direnç 3 yolla gelişebilmektedir:

1. İlacın hedef bölgesindeki değişiklikler: Beta-laktam antibiyotiklerin hedef bölgesi olan PBP'lerdeki değişiklikler; kromozomal mutasyonlar sonucu PBP'nin beta-laktam antibiyotiğe afinitesinin azalması, PBP sayısında azalma olması veya beta-laktam antibiyotiklere düşük afinite gösteren yeni PBP'lerin sentezlenmesi sonucu oluşabilmektedir (19, 20, 21). Gram pozitif bakterilerde daha fazla görülmektedir.

2. Dış membran geçirgenliğinin bozulması: Gram negatif bakterilerde beta-laktam antibiyotikler, dış membrandaki 'outer mebrane protein'(OMP) adı verilen porlar yolu ile hücre içine girmektedir. Beta-laktam antibiyotikler dış membrandan porin F ve porin C adı verilen başlıca 2 kanal aracılığı ile geçerler. İmipenem dış membrandan ayrıca D2 proteini adı verilen özel bir porini kullanarak da geçer. Dolayısıyla bir GN bakteri porin F ve porin C proteinlerini mutasyona uğratarak tüm beta-laktamlara direnç geliştirebilirken, imipeneme duyarlı kalır. Öte yandan, özellikle *P.aeruginosa* ve *Enterobacter* suşlarında dış membrandan D2 proteinin kaybolması bakteriyi imipeneme dirençli hale getirebilir (21, 22).

3. Beta-laktamaz enzimleri ile ilacın inaktive edilmesi: Beta-laktamazlar penisilinler, sefalosporinler ve benzeri beta-laktam antibiyotikleri hidolize ederek bu antibiyotikleri etkisiz hale getirip direnç gelişimine neden olan enzimlerdir. Bu enzimler beta-laktam halkasındaki karbonil grubu ile bir ester köprüsü kurup siklik amid bağını parçalayarak bir açıl-enzim türevi oluştururlar. Daha sonra enzim açıl molekülünden ayrılarak rejenere olur. Bakteride beta-laktamaz enzimi indüklenebilir veya yapısal olabilir. Gram pozitif bakterilerde enzim genellikle indüklenebilir iken, Gram negatif bakterilerde beta-laktamazların bir kısmı indüklenebilir, bir kısmı da yapısal özelliktedir.

Beta-laktamaz genleri bakteri plazmidi, kromozomu, transpozon veya integron gibi taşınabilir genetik elemanlar üzerinde bulunabilir (22). Yapısal olarak PBP'lere benzerler. Beta-laktamazlar; hem Gram-pozitif hem de Gram negatif aerob ve anaerob bakteriler tarafından sentezlenir. Gram-pozitif bakteriler arasında beta-laktamaz üreten en önemli patojen stafilokoklardır. Anaeroblardan *Clostridium* ve *Fusobacterium*'ların beta-laktamazları esas olarak penisilini parçalarken *Bacteriodes*'ler tarafından üretilen beta-laktamazlar ise sıklıkla sefalosporinlere etki eder. Gram negatif bakterilerde beta-laktam direncindeki en önemli mekanizma beta laktamaz üretimidir. Gram negatif bakterilerde beta-laktamazlar, dış membran ile sitoplazmik membran arasındaki periplazmik aralıkta bulunurken, Gram-pozitif bakterilerde doğrudan hücre dışına salınmaktadır. Bu nedenle Gram negatif bakteri türlerinde betalaktamazlara bağlı dirençte sıklıkla antibiyotik geçirgenliği ile ilgili mekanizmalar da rol oynamaktadır (23).

2.2.2. Beta-Laktamazlar

Penisilinazın 1940 lı yıllarda Abraham ve Chain tarafından bulunmasından sonra günümüze kadar yaklaşık 400 civarında beta-laktamaz enzimi tanımlanmış ve beta-laktamazların sayı ve çeşitlerindeki artış bu enzimlerin gruplandırılmasını zorunlu kılmıştır. 1973 yılında Richmand ve Sykes tarafından beta-laktamazlar sınıflandırılmış bu sınıflandırma 1976 yılında ise Sykes ve Matthew tarafından genişletilmiştir (24, 25, 26).

Beta-laktamazların sınıflandırılmasında en çok Bush-Jacoby-Medeiros ve Ambler sınıflandırmaları kullanılmaktadır. 1980 yılında Beta laktamazlar Ambler tarafından moleküler yapılarına göre 4 sınıfa ayrılmışlardır

Sınıf A: Aktif bölgelerinde serin aminoasit taşıyan, penisilinleri hidroliz eden beta-laktamazlardır.

Sınıf B: Aktivite gösterebilmeleri için çinkoya bağlı tiyol grupları gerektiren metallobetalaktamazlardır.

Sınıf C: Kromozomal AmpC geni tarafından kodlanması nedeniyle AmpC enzimler olarak da adlandırılan öncelikle sefalosporinazlardan oluşan enzimlerdir.

Sınıf D: Oksasilini hidroliz eden serin beta-laktamazlardır.

1995 yılında Bush ve arkadaşları substrat özgüllüğü ve beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlılığının temel alındığı biyokimyasal özelliklerine göre fenotipik sınıflandırma ile tüm enzimleri 4 gruba ayırmışlardır. Bu en yeni sınıflandırma şeması ve bu grupların genel özellikleri tablo'da görülmektedir (27).

Bu sınıflandırma klinik mikrobiyoloji laboratuvarında antibiyogram değerlendirmede üstünlük sağlarken, tek bir nokta mutasyonu ile substrat özgüllüğünün değişebilmesi ise dezavantajdır. Beta-laktamazların nükleotid dizilenmesini esas alan Ambler sınıflaması ise mutasyonlardan etkilenmemektedir (25, 26, 28).

2.2.2.a. Grup 1 (Amp C) beta-laktamazlar

Çoğunluğunu kromozomal enzimlerin oluşturmasına rağmen kromozomal Amp C beta-laktamaz genlerinin plazmidlere transferi ile oluşan plazmid kontrolünde olan beta-laktamazlar da bu grupta yer almaktadır. Moleküler sınıflamada sınıf C'de yer alırlar (29). Bu gruptaki enzimler 1., 2., 3. kuşak sefalosporinleri, penisilinleri ve monobaktamları hidrolize edebilirler. Bu enzimlerin aşırı üretimi dış membran porin değişiklikleri gibi bir diğer mekanizma ile birleştiğinde karbapenem direncine yol açabilmekle birlikte karbapenemler üzerine etkileri azdır. Bu enzimler aktif bölgelerinin yapısal özellikleri nedeniyle klavulanik asit ve sulfonların beta-laktam halkalarına bağlanmazlar. Bu nedenle de beta-laktamaz inhibitörleri olan klavulonik asit ve sulbaktama dirençlidirler (30, 31, 32).

Grup I beta-laktamazlar indüklenebilir özelliktedir. Normalde bakteriler tarafından bu enzimler bir baskılayıcı mekanizma ile düşük düzeyde sentezlenirken ortama bir beta-laktam antibiyotik eklendiğinde enzim sentezinde artış olabilmektedir. Farklı beta-laktam antibiyotikler grup 1 beta-laktamaz sentezini değişik oranlarda artırabilirler ama beta-laktam antibiyotik ortadan kalktığında bakteriler düşük orandaki bazal enzim sentezine devam ederler. Bu nedenle kalıcı direnç söz konusu olmaz. Bu tip beta-laktamazları üreten bakterilerde temel sorun, bu enzimleri doğal olarak fazla miktarda sentezleyen dereprese mutantların indüksiyona gerek olmaksızın yüksek oranda beta-laktamaz üretmesidir. Dereprese mutantlar, indüklenebilir beta-laktamaz sentezleyen bakteri topluluklarında zayıf indükleyiciler ile tedavi sırasında ortaya çıkabilen labil beta-laktamazlardır.

İndüklenebilir kromozomal beta-laktamaz taşıyan bu Gram negatif bakterilerde normalde 10^5 – 10^7 arasında bir sıklıkla dereprese mutantlar bulunur. Kullanılan antibiyotik, infeksiyon yeri, bakteri sayısı ve antibiyotiğin dağılımı dereprese mutantların ortaya çıkmasında etkilidir. Bu mutantlarda beta-laktamaz enzimlerinin sentezi sürekli ve yüksek düzeyde olmaktadır. Bu infeksiyonların tedavisi sırasında kullanılan antibiyotik duyarlı bakterilere etki ederken antibiyotik etkisine dirençli doğal mutantların ortamda çoğalmasını sağlayarak dirençli hastane infeksiyonlarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Karbapenemler hem indükleyici kromozomal hemde dereprese mutantlara etkilidir. Bu nedenle dereprese mutantların seleksiyonuna neden olmazlar (17, 33, 34, 35).

1989 yılında kromozom kontrolündeki Amp C enzimlerinin plazmid kontrolündeki türleri ortaya çıkmaya başlamıştır. Plazmid kökenli aktarılabılır Amp C tipi beta-laktamazlar, kromozomal Amp C beta-laktamaz genlerinin plazmidlere transfer olması ile ortaya çıkmıştır. Plazmid kökenli Amp C tipi enzimler indüklenebilir olmamaları nedeniyle diğerlerinden ayrılırlar. Günümüzde plazmid kökenli Amp C tipi enzimlerin sayısı 20'yi aşmıştır. FOX, LAT, MIR, MOX, BİL, CMY örnek olarak verilebilir (33).

2.2.2.b. Grup 2 beta-laktamazlar:

Tümü moleküller sınıf olarak A ve D'de yer almaktadır. Plazmidlerce taşınmaları nedeniyle klinik açıdan önem taşımaktadırlar. Substrat profilindeki farklılık nedeniyle birkaç alt gruba ayrılmaktadır.

Grup 2a: Bu grupta penisilini hidrolize eden, klavulanik asitle inhibe olan enzimler bulunmaktadır. Gram pozitif bakterilerde bulunan penisilinazların birçoğu bu grup içerisinde yer almaktadır. Bu gruptaki enzimler penisilini sefalosporinlerden daha hızlı hidrolize etmektedir (27, 31, 33).

Grup 2b: Bu grup içinde yer alan enzimler klavulanik asit ile inhibe olan penisilin ve sefalosporinleri içermektedir. Hem penisilin hem sefalosporinleri hidrolize eden, klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlı beta-laktamazlar içerirler. Yaygın olarak bulunan ve plazmid kontrolünde olan “geniş spektrumlu” TEM–1, TEM–2 ve SHV–1 enzimleri bu grupta yer almaktadır(36, 37).

Grup 2be: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazları (GSBL) içeren gruptur. Oksimino beta-laktamlar ve monobaktamlar gibi antibiyotiklerin yaygın kullanımı sonucunda TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 gibi ana enzimlerden 1-4 aminoasit değişikliği ile geniş spektrumlu beta-laktamları da etkileyen, oksimino-aminotiazolil sefalosporinleri hidrolize eden yeni beta-laktamazlar ortaya çıkmıştır. Karbapenemler ve sefamisinler bunlara dayanıklıdır (36). GSBL'lar sefoksitin, sefotetan klavulanik asit, tazobaktam ve daha az oranda sulbaktam gibi beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlıdırlar. Özellikle *Klebsiella* ve *E.coli* suşlarında yaygındır. Bu grupta yer alan enzimlerden biri de PER-1 enzimi ilk kez Türkiyede saptanmıştır (38, 39).

Grup 2br: TEM ve SHV enzimlerinin beta-laktam inhibitörlerine dirençli mutantları bulunmaktadır. Klavulanik asitten etkilenmeyen, GSBL'lar bu grupta yer almıştır. İnhibitörlere dirençli enzimlerin çoğu TEM türevidir için inhibitörlere rezistan TEM (IRT) olarak adlandırılır TEM-30 dan TEM-36'ya kadar olan TEM enzimleri ve TRC-1 enzimi bu gruptadır (27).

Grup 2c: Bu grup içinde karbenisilini hidroliz eden, klavulanik asit gibi beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlı enzimler yer almaktadır. PSE-1, PSE-3, PSE-4 beta-laktamazları, *Moraxella catarrhalis*'in BRO-1 ve 2 enzimleri, *Aeromonas hydrophila*'nın kromozomal AER-1, *V.cholerae*'nin SAR-1 enzimi de bu gruptadır (27).

Grup 2d: Oksasilini hızlı hidrolize eden beta-laktamazlardan OXA grubu enzimler bu grup içinde yer almaktadır. Bunlardan OXA-11 enzimi, Türkiye'de izole edilen bir suşta saptanmıştır. Klavulanik asit ve sulbaktama dirençlidirler.

OXA tipi enzimlerden iki grubu önem taşımaktadır.

1) Plazmid veya integron kökenli, seftazidim veya sefotaksim, sefepim, aztreonamı inaktive edebilen OXA tipi genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlardır.

2) Özellikle *A. baumannii* izolatlarında görülen moleküler sınıflandırmada sınıf D'de bulunan karbapenemleri hidrolize eden karbapenamazlardır. Modifiye Hodge testi ile karbapenamaz aktiviteleri gösterilebilir. Karbapenamaz aktivitesi bulunan metallo enzimlerden klavulanik asit ve tazobaktama kısmen duyarlı, buna karşın EDTA ile inhibe olmamaları ile metallo beta-laktamaz enzimlerinden ayrılabilirler. Grup 2'nin diğer alt gruplarında bulunan tüm enzimler, moleküler sınıf A'da yer alırken, sadece bu alt grup moleküler sınıf D'de yer alır (41, 42).

Grup 2e:Grup 1'deki enzimlerden farklı olarak klavulanik asitle inhibe olan sefalosporinazları içermektedir. *Stenotrophomonas maltophilia*'nın kromozomal L-2 enzimi, *Bacteroides fragilis* ve *Proteus vulgaris*'in kromozomal enzimleri bu gruptadır, *B.uniformis* ve *B.vulgatus*'un kromozomal CblA ve CfxA, *E.coli*'den izole edilen FEC-1 ile *Yersinia enterocolitica*'dan izole edilen Blal enzimleri bu grupta yer almaktadır (27).

Grup 2f: Karbapenem antibiyotiklere etkili, ama metallo enzim olmayan serin beta laktamazları bu grup içindedir. 1982 yılında *Serratia marcescens*'in Sme-1 enzimi, 1984 yılında *Enterobacter cloacae*'nin indüklenebilen IMI-1 enzimi, 1990 yılında yine bir *Enterobacter cloacae* izolatında saptanan kromozomal NMC-A enzimi bu grupta yer almaktadır. Klavulanik asit ile inhibe olmaktadır. Aztreonama dirençten sorumlu olduğu halde üçüncü kuşak sefalosporinleri hidrolize edemezler (27, 43).

2.2.2.c. Grup 3 beta laktamazlar

Moleküler sınıf B'de yer alan metallo-beta-laktamaz (MBL) enzimlerinden oluşur. Aktif bölgelerinde serin yerine bir Zn^{+2} iyonu bulunan enzimlerdir. Klavulanik asit, tazobaktam, sulbaktam gibi beta laktamaz inhibitörleri de bu enzimlere etki etmezler, ama EDTA gibi bir metal şelatörü ile inhibe olurlar. Bu gruptaki enzimler hem kromozomal hem de plazmid kökenlidirler. Monobaktamlar dışında karbapenemler dahil tüm beta laktamları hidroliz edebilirler. Aktiviteleri için Zn^{+2} (çinko) iyonlarına gereksinimleri vardır. Bu beta-laktamazlar a, b, c olmak üzere 3 alt gruba ayrılırlar.

Grup 3a: Bu enzimler penisilinleri, karbapenem ve sefalosporinlerden daha etkili olarak hidrolize edebilirler. Maksimum aktivite göstermeleri için ortamda Zn^{+2} (çinko) iyonunun bulunması gereklidir. Bu grup içerisinde CerA, PCM-1, IMP 1-8, *Stenotrophomonas maltophilia*'nin Ll enzimleri yanısıra, *P. aeruginosa*'da saptanan VIM 1-3 enzimleri de yer almaktadır.

Grup 3b: Bu grup enzimler penisilin ve sefalosporinlere zayıf hidrolitik etki gösterir. Özellikle karbapenemleri substrat olarak tercih ederler. Büyük ölçüde *Aeromonas* cinsinden türeyip *A.hydrophilia*'da bulunur ve bazen gerçek karbapenemaz olarak adlandırılır, çünkü grup 3a enzimlerinin aksine penisilin ve

sefalosporin üzerinde hiç hidrolitik etkileri yoktur. Bu nedenle varlıkları nitrosefin hidrolizine dayanan testlerle gösterilemez.

Grup 3c: Bu grubun özelliği diğer beta laktam antibiyotiklere göre karbapenemler üzerine zayıf etki göstermeleridir. Güçlü sefalosporinaz aktiviteye sahiptir. Bu enzim geniş spektrumlu sefalosporinler ve sefamisinler de dahil sefalosporinleri çok yüksek oranda hidroliz etmesiyle diğer alt gruplardan ayrılmaktadır. *Legionella gormanni* metallo-beta-laktamaz enzimi bu gruptadır (44, 45).

Grup 4: Molekül sınıfı henüz belirlenmemiş, yapıları saptanamamış kavulanik asitle inhibe olmayan penisilinazlar bu grubu oluşturur. Biri dışında hepsi kromozomaldır. *A.faecalis*, *B.fragilis*, *C.jejuni*'den izole edilen enzimler, *Clostridium butyricum*'un indüklenebilen enzimi, *E.coli*'nin plazmid kontrolündeki SAR-2 beta-laktamazı ve *Pseudomonas cepacia*'daki beta-laktamazlar da bu gruba dahildir. Bir bakteride birden çok beta-laktamaz tipi aynı anda görülebilir ve bu çok sık olan bir durumdur. Böylece kromozomal ve plazmid kökenli beta-laktamazlar bazen iç içe geçerler. Grup 1'deki kromozomal beta-laktamazlar, Grup 2'deki ESBL enzimler ve Grup 3'deki beta-laktamazlar hastane infeksiyonlarında sorun olarak en sık karşımıza çıkan enzimlerdir.

Tablo 1 Beta-laktamaz grupları ve genel özellikleri (1).

Beta-laktamaz grubu	Alt grup	Moleküler sınıf (Ambler)	Substrat	Özellik
1		C	Sefalosporinler	Çoğunlukla Gram-negatif bakterilerdeki kromozomal enzimler (ancak plazmidde de kodlanabilir) Klavulanik asitle inhibe olmaz.
2		A, D		Birçoğu klavulanik asitle inhibe olur
	2a	A	Penisilinler	Stafilokok ve enterokoklardaki penisilinazlar
	2b	A	Penisilinler Sefalosporinler	Çoğunlukla Gram-negatif bakterilerdeki geniş spektrumlu betalaktamazlar (TEM-1, TEM-SHV-1)
	2be	A	Penisilinler, dar ve geniş spektrumlu Sefalosporinler	Oksiiminosefalosporin ve monobaktamlara direnç oluşturan genişlemiş spektrumlu betalaktamazlar (GSBL)
	2br	A	Penisilinler	İnhibitörlere dirençli TEM (IRT) Betalaktamazlar
	2c	A	Penisilinler	Karbenisilini hidroliz eden Enzimler
	2d	D	Penisilin, oksasilin	Oksasilini hidroliz eden Klavulanik asit ile az inhibe olurlar.
	2e	A	Sefalosporinler	Klavulanik asit ile inhibe olan Sefalosporinazlar
	2f	A	Penisilin, Sefalosporin, karbapenemler	Karbapenemleri hidroliz eden, aktif bölgede serin içeren ve klavulanik asit ile inhibe olan enzimler
3	3a, 3b, 3c	B	Karbapenemler dahil bir çok beta-laktam	Metallo-beta-laktamazlar.
4		?	Penisilinler	Diğer gruplara girmeyen dizileri belirlenmemiş

2.2.3. Karbapenemler

Karbapenemler ilk olarak 1976 yılında *Streptomyces cattleya* tarafından üretilen ve “thienamycin adı verilen bileşiğin üzerinde amino ve hidroksil gruplarında değişiklikler yapılarak elde edilmiştir. İlk bulunan ajan imipenemdir. Sefalosporinlerdeki bir çift bağ içeren 5 üyeli halka yapısında bir metilenin yerine bir sülfürün geçmesiyle diğer beta-laktam ajanlardan ayrılır. Beta laktam antibiyotikler gibi peptidoglikan biyosentezi üzerine etki göstermektedir. İmipenem, PBP1, PBP2, PBP4, PBP5 ve PBP6 ya bağlanabilmekte bunlardan PBP2 ye diğerlerinden daha güçlü bağlanmaktadır. İmipenem, böbrekte bulunan dihidropeptidaz enzimi tarafından yıkılmakta; bunu engellemek için klinikte dihidropeptidaz enzim inhibitörü olan silastatinle birlikte kullanılmaktadır. Mikobakteriler, hücre duvarından yoksun organizmalar, nadir nonfermentatifler ve *Aeromonas* dışında Gram pozitif, Gram negatif ve anaerob mikroorganizmalarla oluşan hastane infeksiyonları ve toplumdan kazanılmış infeksiyonlardaki bakteriyel patojenlere etkilidir.

1996 yılından sonra ise karbapenem grubunun ikinci üyesi olan meropenem kullanıma girmiştir. Meropenem, karbapenem halkasına 1-β-metil grubu eklenerek elde edilmiştir. Meropenem, dihidropeptidaz enziminden etkilenmez. Gram pozitif, Gram negatif ve anaerob bakterilere karşı etkindir.

2001 yılında ise “Food and Drug Administration” (FDA) tarafından ertapenem isimli karbapenem grubu üçüncü antibiyotiğe onay verilmiştir. Geniş etki spektrumları ve dirençli bakterilerle oluşan ciddi infeksiyonlarda tercih edilmeleri nedeniyle karbapenem grubu antibiyotikler önemli antibakteriyel ajanlar içerisinde (46).

Karbapenemlere Direnç Mekanizmaları

Karbapenemlere karşı bilinen 3 etki mekanizması ile direnç gelişebilmektedir:

1. İlacın hücre içinde etkin konsantrasyona ulaşamaması:

a. Porin değişimleri: Bu, özellikle *P.aeruginosa* suşlarındaki temel direnç mekanizmasıdır. *P.aeruginosa* suşlarında karbapenemler için özel bir porin olan OprD'nin kaybı bu grup antibiyotiklere direnç gelişmesine neden olmaktadır. OprD

kaybı özellikle imipenem tedavisi sırasında gelişmektedir (47).

b. Aktif pompa sistemlerinin indüklenmesi

2. Karbapenemleri hidroliz eden enzimlerin varlığı (karbapenemazlar)

En geniş spektrumlu antibakteriyel etkinliğe sahip beta laktam sınıfı olan karbapenemlerden birini, en azından imipenem veya meropenemden birini, belirgin olarak hidrolize eden beta-laktamazlar olarak tanımlanabilir. Bu enzimlerin çoğu yalnız karbapenemlere değil, diğer beta-laktam ajanlara da etkilidirler (46,47).

2.3. Karbapenamazlar

a. Ekstrinsik (kazanılmış) karbapenamazlar:

Ambler moleküler sınıflamasına göre A, B veya D moleküler sınıflarına ait olabilirler. Bunlar, imipenem, meropenem, penisilinler, geniş spektrumlu sefalosporinler ve aztreonama direnç gelişmesine neden olan ve tazobaktam başta olmak üzere beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlı olan enzimlerdir. *Acinetobacter spp.*, *P.aeruginosa* ve Enterobacteriaceae'da bulunur. Sınıf D tipleri sadece *Acinetobacter spp.*'de, sınıf A tipleri ise birkaç Enterobacteriaceae izolatında bulunurlar.

b. İntrinsik (kromozomal) karbapenamazlar:

Moleküler sınıf B'de yer alan bu enzimler aktif bölgelerinde çinko iyonları bulduklarından beta-laktamazlar içinde kendine ait özgün özelliğe sahiptir. Katalitik aktivite çinko iyonuna bağlıdır ve EDTA ile birleştiğinde kaybolur. Diğer moleküler sınıflara (A, C ve D) ait beta-laktamazlar çinko içermezler, serin bazlı mekanizmaları vardır ve birkaç istisna dışında önemli kromozomal karbapenamaz etkinlikleri yoktur. Bu grupta, *B.cereus II*, *B.fragilis*'in CcrA, *B.cepacia*'nın PCM-1, *S.maltophilia*'nın L1, *C.indologenes*'in IND-1-4, *C.meningosepticum*'un BlaB enzimleri sayılabilir. Bunların tümü Bush sınıflandırmasında grup 3'te yer alan metallo beta laktamazlardır.

3. Hedef PBP değişimleri:

Tek başına nadir görülür, ancak diğer mekanizmalar ile birlikte.

2.3.1. Metallo-Beta-Laktamazlar

Metallo-beta-laktamazlar, 1980 yılında Ambler tarafından sınıf B, serin beta laktamazlar içinde sınıflandırılmış, daha sonra 1989 yılında Bush fonksiyonel özelliklerine göre bu enzimleri ayrı bir grup olan fonksiyonel grup 3 içerisinde sınıflandırmıştır. Bu sınıflama 1995 yılında güncellenmiş ve 1997 yılında modifiye edilmiştir (27, 47).

Metallo-beta-laktamazlar, diğer beta-laktamazlardan farklı olarak aktif bölgelerinde **çinko** iyonu bulunan enzimlerdir. Serin beta laktamaz inhibitörlerinden (klavulanat, tazobaktam ve sulbaktam gibi) etkilenmezler ama EDTA gibi bir metal şelatörü ile inaktive olurlar. Bu enzimlerin en önemli özelliği monobaktamlar dışında tüm beta-laktamları ve karbapenemleri hidroliz edebilmeleridir. 1960 yılında ilk olarak metallo beta laktamaz enzimi *Bacillus cereus*'ta tanımlandı, daha sonra 1980 li yılların başında *Stenotrophomonas maltophilia*'da gösterildi. Daha sonra imipenemi hidrolize eden metallo beta laktamaz enzimi *Bacillus fragilis* ve *Aeromonas hydrophilia* da tanımlandı.

1991 yılında Japonya'da *Serratia marcescens* ve *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında plazmid kökenli bir metallo beta laktamaz enzimi (IMP-1) bulununcaya kadar sadece bu grupta kromozomal enzimlerin varlığı biliniyordu. Aktarılabılır metallo beta laktamaz enziminin bulunmasıyla karbapenemlere direnç gelişimi ile ilgili endişeler artmıştır. Metallo beta laktamazları kodlayan genler genelde klas 1 (bazen klas3) integronlarca taşınıp, sonra transpozonların içine yerleştirilip yüksek derecede aktarılabılır bir genetik araç elde edilir. Ayrıca integron içindeki başka gen kasetleri, aminoglikozid direncine neden olarak bu antibiyotiklerin alternatif tedavide kullanımını engeller. Bütün metallo beta laktamazlar imipenemi hidrolize ederler; ancak bu özellikleri oldukça değişkendir ve hidroliz etme hızı bakterinin karbapenemlere direncinin seviyesi ile korele olmayabilir. Buna göre bu enzimler imipenem ve diğer beta laktamları hidrolize etme temeline göre alt gruplara ayrılmıştır (alt grup 3a, 3b, 3c, bakınız) (47, 48).

Metallo-beta-laktamazlar moleküler düzeyde sınıflanması ve standardize edilmesi oldukça zor hemen hemen imkansız gibi görünen, ayrı bir grup enzimlerdir. Substrat profillerinin yanı sıra sekans özellikleri ve diğer yapısal özellikleri baz

alınarak alt gruplara ayrılması yönünde çeşitli denemeler yapılmıştır. Bu enzimler üç alt sınıfta gruplandırılmıştır. Sınıf B1 çinko iyonu ile birleşecekleri aktif bölgelerinde üç histidin bir sistin aminoasidi içeren enzimlerden oluşur. Bu grup içerisinde transfer edilebilen IPM, VIM, GIM ve SPM-1 enzimleri bulunur. Sınıf B2 de bulunan enzimlerde ise birinci pozisyonda histidin yerine asparajin bulunur. Bu gruba örnek olarak SFH-1 enzimi verilebilir. Sınıf B3’de ise tetramer yapısındaki L1 enzimi bulunur (49).

2.3.1.a. Metallo Beta Laktamazların Biyokimyası

Hem metallo beta laktamazlar hem de serin-beta laktamazlar, beta laktam halkasındaki amid bağı kırarak antibiyotik direncine neden olurlar, ama iki grup enzimin etki mekanizması tamamen farklıdır.

Metallo beta laktamazların kristal yapısının bilinmesi katalitik etkileri konusunda önemli katkılarda bulunmuştur. Farklı metallo beta laktamaz enzimleri %25’ten daha az ortak amino asit yapılarına sahip olsa da, hepsinin ortak özelliği $\alpha\beta\alpha$ katlantısının bulunması ve aktif bölge yapılarının süperimpoze olmasıdır (50).

Metallo beta laktamazların çoğu esnek bir halka yapısına sahiptir ve bu yapının beta laktam substratların bağlanması ve hidrolizini başlattığı düşünülmektedir. Beta laktamazlardan farklı olarak, birçok beta laktam metallo beta laktamazlara substrat olabilir ve bu özellikleri çok geniş spektrumlu aktivitelerinin olmasını sağlayabilir. Klavulanik asit ve sulbaktam gibi zayıf substrat kabul edilen serin inhibitörlerinden de etkilenmez. İlginç olarak, metallo beta laktamazların hiçbirisi aztreonamı iyi şekilde hidrolize etmez ve aztreonamın bu özelliği nedeniyle terapötik metallo beta laktamaz inhibitörü olabileceği ileri sürülmüştür.

Bir enzimin substrata olan ilgisi K_m , enzimin substrata bağlanma gücü k_{cat} ile ifade edilirken k_{cat}/K_m enzimin katalitik verimliliğinin ölçüsüdür. Enzimler katlantı ve aktif bölge yapısında ortak özellikleri paylaşırsa da, beta laktamları bağlama ve hidrolize etme özellikleri değişken olabilir. Bunun en önemli örneği yapısal olarak birbirine çok benzeyen VIM-1 ve VIM-2 arasındaki farktır. Örneğin, VIM2 birçok beta laktama VIM-1’den daha sıkı bağlanmaya yatkındır ve benzil penisilin, ampisilin, piperacilin, mezlosilin, tikarsilin, sefalotin, sefoksitin, sefotaksim,

seftazidim, sefpirom, moksalaktam ve meropenem için kayda değer derecede düşük Km düzeyine sahiptir. İmipenem için ise VIM-1 ve VIM-2'nin Km değerleri sırasıyla 1,5µM ve 10µM' dir. Yapısal olarak benzer olan enzimlerin farklı kinetik değerler göstermesi araştırmacıları beta laktam substratlarına bağlanma ve hidrolize etmede metallo beta laktamazların katalitik mekanizmasını araştırmaya yöneltmiştir. Örneğin, Docquier ve arkadaşları, bu önemli kinetik farklılıkların aktif bölge ya da yakınındaki 224'üncü pozisyondaki histidin/tyrozin ve 228'inci pozisyondaki serine/arjinin amino asit (substitution)'lerinden kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir(51).

2.3.1.b. Kromozomal Olarak Kodlanmış MBL'lar

Kromozomal olarak kodlanmış MBL enzimlerinin önemli özellikleri indüklenebilir özellikte olmalarıdır. Genelde doğada bulunan bazı bakteriler, aynı zamanda MBL enzimi de taşımaktadırlar. Bu enzimleri taşıyan çoğu bakteriler genellikle beta laktamlar antibiyotiklere dirençlidir ya da direnç kazanabilir. Bu bakterilerin çoğu fırsatçı patojenler olup *S. maltophilia* ve *B. anthracis* dışında nadiren ciddi infeksiyonlara neden olurlar. Kromozomal olarak MBL kodlayan bakteriler arasında; *Bacillus cereus* (BC2) (52), *Bacillus anthracis* (53), *Stenotrophomonas Maltophilia* (L1) (54), *Aeromonas hydrophilia* (CphA) (55), *Chryseobacterium meningosepticum* (BlaB yada GOB-1) (56), *Chryseobacterium indologenes* (IND-1) (57), *Legionella gormannii* (FEZ-1) (58), *Caulobacter crescentus* (MblI B) (59), *Myroides spp* (TUS-1, MUS-1) (60), *Janthinobacterium lividium* (THIN-B) (61), *Flavobacterium johnsoniae* (JOHN-1) (62) ve *Serratia fonticola* (SFH-1) (63) olarak sayılabilir. Kromozomal kökenli bu enzimler genellikle serin beta-laktamaz enzimleri ile bir arada bulunurlar. Örneğin; *A. hydrophilia* ve *Aeromonas veronii biovar sobia*, 3 beta laktamaz enzimini üretirler; bunlar penisilinaz, sefalosporinaz ve bir MBL enzimidir. Ya da beta laktam antibiyotik tedavisi sırasında *S. maltophilia* da ki indüklenebilir L1 metallo beta laktamaz enzimi ile birlikte klas A kromozomal enzim L2 de sentezlenmektedir. Bu derepresyon olayı genellikle in vivo beta laktam tedavisi altında iken 10^5 ile 10^7 'de 1 sıklıkta oluşabilir (64).

Bacteroides spp. ile ilgili genellikle kromozomal olarak tanımlanan bir grup MBL geni aslında aktarılabılır özelliktedir. Diğer anaerobik bakterilerle karşılaştırıldığında *B. fragilis* potansiyel olarak CfiA ya da bazen CcrA isimli MBL üretebilmesi nedeniyle, beta laktamlara dirençlidir. CfiA MBL geni ilk olarak 1990 yılında genetik olarak tanımlanmış, kataliz etme mekanizması ve yapı-fonksiyon özellikleri bakımından en yoğun çalışılanlardan birisi olmuştur. Çalışmalar birçok ülkede, *B. fragilis*'in yaklaşık % 2–4 suşunda sessiz cfiA geni bulunduğunu göstermiştir (65, 66).

2.3.1.c. MBL'ların Aktarılmasında Kullanılan Genetik Araçlar

Geniş spektrumlu sefalosporinlerin veya karbapenemlerin kullanımının artmasıyla metallo-beta-laktamaz enzimi taşıyan genlerin yayıldığı düşünülmektedir (67, 68). Kromozomal olarak kodlanan metallo-beta-laktamazlar dışındaki diğer metallo-beta-laktamaz enzimlerini kodlayan genler klas 1 integronlar içindeki gen kasetlerinde bulunurlar (69, 70).

IPM enzimlerinin klas 3 integronlar içindedeyer aldığı gösterilmiştir (71).

İntegronlar; biri integronda biri gen kasetinde 2 DNA bölgesi arasında, bölgeye özel rekombinasyon olaylarında gen kasetlerini elde etme yeteneğine sahiptirler. İntegronlar, 5' korunmuş bölgesi, 3' korunmuş bölgesi ve değişken bölgeden oluşur. 5' bölgesinde integrase genini (intl), bitişik rekombinasyon bölgesini (attI) ve değişken bölgede elde edilen gen kasetinin ekspresyonunu başlatan bir promotör (tetikleyici) içerir. 3' korunmuş bölgesinde ise sulfonamidlere ve antiseptiklere direnç gelişimine neden olan sul ve qac geni bulunmaktadır. Gen kasetleri, yaklaşık 1 kb boyutunda, tek bir gen ve 59 baz element adı verilen rekombinasyon bölgesini içeren, küçük dairesel, DNA parçalarından oluşmaktadır (72). Genellikle MBL enzimini kodlayan gen kasetleri yanında aminoglikozid grubu antibiyotikleri kodlayan aacA4 geni de bulunmaktadır. Böylece beta laktam antibiyotiklere ve kanamisin, neomisin, amikasin ve streptomisin gibi aminoglikozid grubu antibiyotiklerin hepsine de direnç gelişimi gözlenmektedir (73). Aminoglikozid ve beta laktam direnç genlerini taşıyan gen kasetleri bir integrondan diğerine serbestçe dolaşabilir, bir organizmadan diğerine kendi başlarına hareket edemezler ve plasmidler ve transpozonlar gibi başka genetik elemanların yardımına ihtiyaç duyarlar (72).

Metallo beta laktamaz enzim genlerini taşıyan integronların bakteriler arası yayılımından sorumlu olan genetik eleman transpozonlardır. 2003 yılında İtalya’da *P.aeruginosa* izolatında blaIMP–13 MBL enzimi ve bu enzimi kodlayan geni taşıyan Tn5051-tip transpozona gömülü integron rapor edildi. Polonya’da izole edilen *P.aeruginosa*’da aynı noktada blaIMP–13 ve blaVIM-2 enzim genlerini taşıyan integronun transpozonda taşındığı ve her iki taraftaki transpozonların tnpR genlerinin aynı olduğu saptanmıştır. Bu bulgular klas 1 integronların yayılımından transpozonların sorumlu olduğunu düşündürmüştür. Bununla birlikte bütün MBL genlerinin integronlar ya da transpozonlarla ilişkili olmadığına dair raporlar da vardır(74).

2.3.1.d. Aktarılabılır MBL’lar

IMP tipi Metallo Beta Laktamazlar

1988 yılında ilk olarak Japonya’da *P.aeruginosa* suşunda GN 17203’ün bulunmasıyla konjugatif bir plazmidle taşınan metallo beta laktamaz geni tanımlanmıştır (75). Bu izolatın imipenem MIC değeri 50 µg/ml olarak tesbit edilmiş ve genişletilmiş spektrumlu sefalosporinlere de (örneğin seftazidim MIC >400 µg/ml) dirençli olduğu bildirilmiştir. Üç yıl sonra 1991 yılında Japonya Okazaki’deki Aichi Hastanesinde üriner sistem infeksiyonundan izole edilen *Serratia marcescens* Tn9106 suşunda birebir aynı gen bulunmuştur (76). Daha sonra Japonya’nın çeşitli bölgelerinden aynı geni taşıyan farklı izolatlar bildirilmiştir. Saptanan tüm enzimlerin aynı aminoasit yapısına sahip olduğu belirlenmiş ve beta laktam ajanlarla birlikte imipenemi hidrolize etme özelliğinden dolayı bu enzime IMP-1 adı verilmiştir. Bu IMP–1 enzimi klas 3 integron üzerinde ve 120 kb büyüklüğünde bir plazmidde bulunur (71).

Shigella flexneri, *S.marcescens*, *P.aeruginosa* ve *Alcaligenes spp* izolatlarında metallo beta laktamaz enzimi varlığı araştırılırken Japonya’da IMP-1’in 3 minör varyantı, IMP–3, IMP–6 ve IMP–10 tanımlanmıştır. Genetik ve kinetik çalışmalarda 169’uncu pozisyondaki serin yerine glisin geçmesinin penisiline karşı aktivitede bir azalmaya yol açtığı belirlendi. IMP-6’da izlenen bu aynı amino asit değişikliği; sadece penisilin G ve piperaciline karşı düşük aktivite göstermemiş, aynı zamanda, IMP-1’in aksine; imipenemle kıyaslandığında daha yüksek seviyede meropenem hidrolizi göstermiştir (77).

Taşınabilir metallo beta laktamaz genlerinin yalnızca Japonya'nın problemi olmadığı; 1997'de İtalya'da blaIMP-2'nin ve 1998'de Portekiz'de blaIMP-5'in bulunması ile görülmüştür (78, 79). Daha sonraki çalışmalarda tüm dünyada metallo beta laktamaz enzimi taşıyan bakterilere rastlanmakla birlikte, Japonya'daki ilk tesbit edilen taşınabilir metallo beta laktamaz enzim geninin diğer ülkelere Japonya'dan yayıldığını kanıtlayacak çok az veri elde edilmiştir. Avrupa'daki IMP'ler ve Güneydoğu Asya'dakiler arasında farklar olması IMP allellerinin Japonya'dan dünyaya yayıldığı görüşünü desteklememiştir. Daha çok bu allellerin lokal belirdiği görüşü ileri sürülebilir.

VIM-tip Metallo Beta Laktamazlar

Kazanılan MBL'ların ikinci dominant grubu VIM-tipi enzimlerdir. VIM-1 ilk olarak 1997 yılında Verona İtalya'da bir *P.aeruginosa* izolatında tanımlanmıştır. Bu izolatın İmipenem için MIC değeri $>128\mu\text{g/ml}$ iken piperasilin, seftazidim, imipenem ve aztreonam gibi beta laktam ilaçlara da dirençliydi. VIM-1 (Veronese imipenemaz) diğer metallo enzimlerle yapısal benzerlikler gösteriyordu. BlaIMP genlerinde bulunduğu gibi, blaVIM-1 geni de klas 1 integronlara gen kaseti olarak bütünleşmiştir. Bu integron blaVIM-1 gen kasetine ek olarak, klas 1 integronlarda tipik olan integrase geni ve aminoglikozidlere direnci kodlayan aacA4 gen kasetini taşır (80). Ek olarak, VIM-1 İtalya'da nozokomiyal infeksiyon kaynağı olup, *P. putida* izolatlarında da tespit edilmesi çevresel izolatların MBL'ların kaynağı ya da en azından vektörleri olduğu görüşünü desteklemiştir (81). VIM-1 ayrıca Yunanistan'da *E. coli* ve birkaç *K. pneumoniae* izolatında tespit edilmiştir (82). BlaVIM-2 ilk olarak güney Fransa'da 1996 yılında nötropenik bir hastanın kan kültüründe *P. aeruginosa* izolatında identifiye edildi (83). Bu izolat, seftazidim, sefepim ve imipenem gibi birçok betalaktama dirençliydi, ama aztreonama duyarlıydı. VIM-2 (% 90 amino asit aynı) VIM-1'e çok benziyordu ve bir gen kaseti tarafından kodlanmıştı, blaVIM-2 pozitif klas1 integronlarda tespit edilen tek direnç geni bu izolattaydı (84). Daha sonra, Marsilya Fransa'da 1995-1999 yılları arasında 10 ayrı VIM-2 pozitif *P. aeruginosa* izolatı identifiye edilmiştir. Bu izolatlar aynı genotipik paterne sahipti, ama blaVIM-2 geni taşıyan klas 1 integronlar büyüklük ve yapı bakımından değişiklik gösteriyordu (85).

VIM-2 üreten *P.aeruginosa* ayrıca, Japonya, Güney Kore, Portekiz, İspanya, Polonya, Hırvatistan, Şili, Venezuela, Arjantin, Belçika ve yakın zamanda Amerika Birleşik Devletlerinde rapor edilmiştir (86, 87, 88, 89, 90, 91, 92).

Yakın zamanda, Tayvan'da *P. aeruginosa* izolatlarında VIM-2 ve VIM serisinin yeni ortaya çıkan varyantı VIM-3 identifiye edildi. VIM-3'ün amino asit yapısı VIM-2'den 2 amino asit oynamayla değişir. blaVIM-3 geninin kromozom üzerindeki yeri fark edilmesine rağmen kesin genetik yapısı hala bilinmemektedir. Yunanistan Larissa'dan bir *P. aeruginosa* izolatında VIM-4 rapor edilmiştir VIM-4, VIM-2 ve VIM-3 te olduğu gibi, VIM-1'den sadece bir amino asit değişikliğiyle (Ser175Arg) ayrılır. İlginç olarak, Yunanistan'dan transfer edilen İsveç'teki bir hastada karbapenem dirençli VIM-4 *P. aeruginosa* izolatu identifiye edildi.

VIM-1'den 5 amino asit değişikliği ile ayrılan VIM-5 ise, ilk olarak Türkiye-Ankara'da *K. Pneumoniae* ve *P. aeruginosa* izolatlarında izole edilmiştir (95). BlaVIM-5'in identifiye edildiği *P. aeruginosa* izolatu aztreonem dahil bütün beta laktamlara dirençliydi (93, 94).

Singapur'dan iki *P. putida* izolatında β -laktamaz VIM-6 identifiye edildi. Bu izolatlar β -laktamlara yüksek derecede dirençliydi, imipenem ve meropenem MIC değerleri $>32\mu\text{g/ml}$, seftazidim için $>256\mu\text{g/ml}$ ve aztreonam için $128\mu\text{g/ml}$ bulundu. VIM-6 ise VIM-2'den iki amino asit değişikliği (59. pozisyonda glutamin/arjinin ve 165. pozisyonda asparajin/serin) ve VIM-3'den sadece bir amino asit değişikliği ile ayrılıyordu. Tam olarak aydınlatılan en yeni VIM-tipi β -laktamaz olan VIM-7, Houston Teksas'tan bir karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatında tanımlanmıştır. VIM-1 ile %77 ve VIM-2 ile %74 benzerliği olup, VIM-tipi β -laktamazlar arasında yeni bir üçüncü subgrup oluşturur. blaVIM-7 integron kökenli gibi gözükmetedir. Aztreonam dahil bütün β -laktamlara ve polimiksin B hariç diğer antibiyotiklere dirençli olan klinik bir izolattan identifiye edilmiştir.

Raporlar VIM-tipi β -laktamazların farklı coğrafi alanlardan identifiye edildiğini işaret etse de, bu gibi enzimlerin belirli bölgelerde yayılımını değerlendirmek üzere bazı çalışmalar yapılmıştır. VIM-1 ve VIM-2 birkaç değişik Enterobakter türlerinden identifiye edilmiş olsa da, bu enzimlerin bilinen en önemli rezervuarı *P. aeruginosa*'dır.

Yeni blaVIM genlerinin ilki Kolombiya'da *P.aeruginosa*'dan izole edilen blaVIM-8 Güney Amerika'da sayıları hızla artan blaVIM genlerine bir yenisini eklemiş oldu. Son olarak, İngiltere'den blaVIM-9 ve blaVIM-10 Arjantin ve İtalya'dan blaVIM-11 bildirilmiştir (97).

SPM-1 Metallo Beta Laktamaz

1997 yılında Brezilya Sao Paulo'da bir *P.aeruginosa* klinik izolatu, SENTRY araştırma programı parçası olarak tanımlanmış ve blaSPM-1 (Sao Paulo MBL) olarak adlandırılan yeni bir gen taşıdığı gösterilmiştir (98). İzolatu, kolistin dışında standart bütün Gram negatif bakterilere etkili antibiyotiklere dirençli olduğu gösterilmiştir. SPM-1, beta laktamlardan penisilin, ampisilin, piperasilin, karbenisilin, azlosilin ve sefalotini hızlı hidrolize etme yeteneğine sahipken enzimin sefalosporinlere afinitesi daha fazladır. SPM-1'in dizilimi diğer MBL'larla karşılaştırıldığında, en fazla benzerlik IMP-1 (%35.5), ile bulunmakla birlikte IMP ve VIM benzeri enzimler gibi transpozon yada integronlar içinde yer almamaktadır (98, 99) Ayrıca, IMP-1 ve VIM-1 gibi kompetitif inhibitör olarak davranan klavulanik asit ya da aztreonamı hidrolize etmez (100).

GIM-1 Metallo Beta Laktamaz

2002 yılında Almanya Dusseldorf'da farklı tıp merkezlerinden farklı hastalardan beş *P.aeruginosa* izolatu elde edildi ve GIM-1 diye adlandırılan yeni bir klas B beta laktamaz içerdiği gösterildi.(German imipenemase).

IPM ve VIM benzeri enzimlerden tamamen farklı olduğu belirlenmiştir. Bu isolatlar sadece polimiksin B ye duyarlıydı. Pulsed-field jel elektroforez analizi ile beş *P.aeruginosa* izolatu ayırt edilemiyordu. GIM-1 enziminin amino asit dizilimi IMP-6 (% 43.5), IMP-1(%43.1) ve IMP-4 (%43.1) ile benzerlik göstermektedir. GIM-1 VIM enzimleri ile VIM-7 (% 31,2), VIM-1, VIM-4 ve VIM-5 (% 28,8) ve SPM-1 (% 28.0) ile de benzerlik göstermektedir.

MBL'lerin çoğunda olduğu gibi (SPM-1 enzimi dışında) bla GIM-1, 45 kb'lık küçük bir plazmidde taşınan klas 1 integronda bulunur. Bu integron içerisinde ayrıca iki aminoglikozid direnç genleri (aaaA4 veaadA1) ve bir beta laktamaz geni (blaOXA-2) gibi üç tane daha direnç gen kaseti de bulunmaktadır (47, 101)

2.3.2. Deneysel Metallo Beta Laktamaz Enzim İnhibitörleri

Bilinen bütün serin beta laktamaz inhibitör ve inaktivatörleri metallobeta laktamaz enzimlerine karşı etkisizdirler. Bütün metallo beta laktamazların inaktivatörü olarak EDTA, 10-phenanthroline ve dipikolinik asit rapor edilmiştir. Metallo beta laktamaz enzimi üreten bakteriler ile oluşan infeksiyonların tedavisinde beta laktam/beta laktamaz inhibitör kombinasyonlarının kullanılması tedavide etkili olmamaktadır. Metallo beta laktamaz enzimlerinin yapılarındaki aktif bölgelerin farklılığından dolayı bütün MBL enzimlerine etkili olabilecek tek bir inhibitörün bulunması oldukça güçtür. B-laktamaz inhibitörü olan klavulonik asit düşük toksisiteye sahip ve memeli hücreleri ile etkileşmezken MBL enzim inhibitörleri ile ilgili diğer önemli sorunda MBL lerin aktif bölge yapılarının memelilerdeki hücresel fonksiyonlarda yaşamsal önemi olan enzimlerle benzer özellikte olmasıdır. Örneğin 2 oxoaldehidlerin katabolizması için gerekli ve bir tiyoesteraz olan gliosalaz-2 MBL enzimleri ile benzer protein katlantılarına sahiptir ve çinko bağlanma bölgeleri ile yapısal benzerlik göstermektedir (102, 103).

MBL inhibitörü olarak çok çeşitli, yapısal olarak farklı bileşikler incelenmiş bunlarla ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır; bunlar Tiyoester türevleri, triflorometil alkoller, ketonlar, tiyoller, sülfonil hidrozonlar, trisiklik doğal ürünler, süksinik asit türevleri, bifenil tetrazoller, sisteinilpeptidler, merkaptokarboksilatlar, 1- β -metilkarbapenem, sefotetan, tiyoksi- sefalosporinler ve penisilin türevleri sayılabilir (104, 105, 106)

Çalışmalarda bu bileşikler farklı MBL enzimlerine karşı denendiği için bileşiklerin birbirleri ile karşılaştırılması oldukça zordur. *P. aeruginosada* bulunan IPM-1 enzimine karşı 1- β -metilkarbapenem, bazı tiyoester türevleri ve penisinat sülfon gibi bileşikler etkili bulunmuş ama çalışılan diğer bileşiklerin MBL ler üzerine etkili olmadığı bulunmuştur (107).

Yeni geliştirilen bileşikler beta laktam yapısı çevresinde sentez edilmektedir ve bu bileşikler farmokokinetik açıdan daha umut verici olabilirler. Tedavi edici olarak, klinikte kullanılabilen β -laktamlar (örneğin aztreonam), kompetatif inhibisyona bağlı potansiyel bir MBL inhibitörü olduğu için ayrıca önerilebilir (108, 109).

2.3.3. MBL'ların Tespiti

Bakterilerde MBL enzim genlerinin tesbit edilmesi GSBL'nin erken tesbiti kadar önemlidir. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında MBL enzimi taşıyan bakterilerin tanımlanmasında çeşitli fenotipik yöntemler kullanılmaktadır. Ama bugüne kadar *Enterobacteriaceae* ailesinin üyeleri, *P.aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii*'nin MBL direnç geni taşıdığını tesbit eden standart fenotipik yöntem ve test kriteri ortaya konulamamıştır. Örneğin; *Enterobacteriaceae*'ların çoğu ve bazı *Acinetobacter spp* türleri MBL enzimi taşıdığı halde 1–2 µg/ml imipenem MIC değerleri ile duyarlı görünecektir. Bu nedenle MBL tespitinde tarama plağı uygulamasında bakteri türü dikkate alınmalıdır. Örneğin *Pseudomonaslar* *Enterobacteriaceae* 'lardan daha yüksek karbapenem MIC değerlerine sahiptir. ESBL üretmediği bilinen *Enterobacteriaceae* 'larda MBL tesbiti için tarama plağı EDTA'lı veya EDTA'sız seftazidim içermelidir. MBL enzimleri aktif bölgelerinde serin yerine bir Zn⁺² iyonu bulunan enzimlerdir ve metal şelatörü olan EDTA ile inhibe olurlar. Uygulanan fenotipik yöntemlerinde temeli EDTA'nın MBL enzimini inhibe etme özelliğine dayanmaktadır (107, 110).

Kombine disk testi: plak içerisine yerleştirilen 2 imipenem diskinde bir tanesine EDTA eklendikten sonra ki inhibisyon zon çapı fakına göre değerlendirilmenin yapıldığı testtir. EDTA solusyonunun eklendiği imipenem/EDTA diskinin inhibisyon zonu tek başına imipenem diski zon çapından ≥ 7 mm büyük ise MBL pozitif bakteri izolatu kabul edilmektedir.

Çift disk sinerji testi: amaç imipenem inhibisyon zonunun EDTA varlığında genişleyip genişlemediğini tesbit ederek MBL pozitif bakteri izolatlarını tanımlamaktır. İmipenem diski ve merkezinden 10mm uzağına daha önce hazırlanan boş disk yerleştirilerek yapılan testtir. Boş disk üzerine EDTA eklendikten sonra imipenem diski inhibisyon zonunun EDTA eklenmiş boş diske doğru genişlemesi sinerjistik inhibisyon zonu olarak değerlendirildi.

MBL E Test yöntemi: ise test stribinin bir tarafında imipenem diğer tarafında ise imipenem ve EDTA bulunmaktadır. İmipenem MİK değerinin EDTA'nın olduğu taraftaki diğer taraftaki MİK değerinden 8 kat yüksek ve üzerinde bir değer olması MBL pozitifliği olarak değerlendirilir.

Modifiye Hodge testi: temeli imipeneme duyarlı bir bakterinin metallo beta laktamaz üreten bir bakteri ile bir arada bulunduğu imipenem varlığında da üreyebilmesi esasına dayanmaktadır. Bu test penisilinaz üreten *N.gonorrhoeae* tesbitinde kullanılan Hodge testinin metallo beta laktamaz üretimini göstermek için *S.aereus* (ATCC 25923) yerine *E.coli* (ATCC 25922), penisilin diski yerinede imipenem diski kullanılması ile modifiye edilmiştir (110,111).

MBL'ların identifikasyonunda kromojenik substrat nitrosefinli karşıt boyama jeli yardımıyla enzimin izoelektrik noktası tespit edilmiştir. Bu yöntem birbirinden anlamlı şekilde farklı olan MBL'ların izoelektrik noktaları hakkında yararlı bilgiler sağlamasına rağmen MBL enziminin identifikasyonunda önerilmemektedir (112).

Moleküler olmayan yöntemlerden en önemlisi “altın standart” olarak tanımlanan duyarlılığı en yüksek olan test ise bakteriden saflaştırılarak elde edilen enzimin özel spektrofotometrik cihazlar kullanılarak imipenem ve meropenem hidrolizini göstermektir. Bu enzim aktivitesi EDTA varlığında inhibe olmaktadır. MBL ların tesbit edilmesinde genotipik yöntemlerde kullanılabilir. Genotipik yöntemlerin fenotipik yöntemlere göre duyarlılığı daha yüksektir. Bakterinin MBL geni taşıyıp taşımadığını PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemi ile enzimi ve tipini saptamak olasıdır. DNA probing kullanılarak da MBL tesbit edilebilir. Moleküler yöntemlerin altın standardı ise sekans analizi ve klonlama yöntemleridir.

2.3.4. MBL Enzim Aktivitesi Gösteren Bakterilerle Oluşan İnfeksiyonların Tedavisi

MBL'lar ile ilgili en önemli sorun eşsiz geniş spektrumlu direnç profilleridir. Optimal tedavi protokolünü belirlemek için MBL enzimi pozitif izolatlarla olan insan infeksiyonlarıyla ilgili hiçbir geniş çalışma yapılmamıştır. Yani bu infeksiyonları tedavi etmek için uygun tedavi hala bilinmemektedir. Yakın gelecekte yeni antibakteriyel ajanlar bulunmazsa MBL enzim üreten izolatların yayılımı ölümcül sonuçlara yol açacak gibi gözükmektedir. Tablo 2'de çeşitli vaka raporları ve çalışmaların değerlendirilmesi ile MBL aktivitesi gösteren izolatlarla meydana gelen infeksiyonların tedavisinde seçeneğe olabilecek antibiyotikler gösterilmiştir.

Tablo 2. MBL üreten izolatların olası tedavi seçenekleri (113).

Antimikrobiyal ajanlar	Yorum
Karbapenemler	Önerilen tek rapordan başka klinik veriler yoktur Yakınozamanda yayınlanan tek bir hayvan deneyi raporu vardır. Karbapenemlerin kullanımları ile ilgili veriler: karbapenem tedavisi sonucunda karbapenem dirençli mutantların ortaya çıkması. Bu MBL üreten izolatlarda çeşitli karbapenemlerin öldürücü sonuçlarının olabileceğine ilişkin invitro veriler olmasına rağmen bütün karbapenemlere uygulanabilir.
Aztreonam	İnvitro veriler destekleyecektir ama bunlarla ilgili klinik veriler sınırlıdır. Hayvan modelleri ile ilgili çelişkili sonuçlar rapor edilmiştir. MBL üreten izolatlarda aztreonamın diğer direnç mekanizmalarından da etkilenebileceği söz edilmiştir. Kombinasyon tedavisinde kullanılabilir. Bu konuda çalışmalara ihtiyaç vardır.
Piperasilin/tazobaktam	Bazı P. aeruginosa izolatlarında kullanımın invitro veriler destekleyecektir ama bununla ilgili klinik veriler yoktur.
Florokinolonlar ve Aminoglikozidler	Bunların kullanımını suşların duyarlılığı ile ilgili klinik veriler destekleyecektir. Kombinasyon tedavilerinde kullanılabilir. Bu konuda çalışmalara ihtiyaç vardır.
Kolitsin	Tedavide seçilebilecek tek ilaçtır. Direnç rapor edilmemiştir ve bu ilaçla ilgili laboratuvar çalışması yapılmalıdır
Kolitsin+Rifampisin	Bu kombinasyon invitro verilerle desteklenmektedir.
Tetrasiklin ve Glisiklinler	Bunların kullanımını suşların duyarlılığı ile ilgili klinik verilerle desteklenebilir. Tigesiklinle ilgili invitro çalışmalarda MBL üreten Enterobakter ve Acinetobacter türlerinde etkili olabileceği ileri sürülmüştür.
Fosfomisin	Bunların kullanımını suşların duyarlılığı ile ilgili klinik verilerle desteklenebilir. Diğer bileşiklerle birlikte kullanılabilir.

Hastaları klinik servislere, özellikle yoğun bakım ünitelerine ve onkoloji ünitelerine kabul ederken MBL üreten bakterilerle kolonizasyonu tespit etmek önlem alınması açısından yararlı olacaktır. Erken tespit çoklu ilaç direncine sahip bu izolatların yayılımını önleyebilir ve birinci ve ikinci derece tedavileri sağlayabilir. Bir hastanede MBL pozitif bir izolatın identifiye edilmesi sadece terapötik bir problem değil aynı zamanda infeksiyon kontrol komitesini de ciddi şekilde ilgilendiren bir durumdur. Mikrobiyoloji laboratuvarı infeksiyon kontrol komitesini acilen bilgilendirmeli, hasta yüksek risk grubunda kabul edilmeli ve uygun izolasyon ölçütleri uygulanmalıdır. Eğer gerekliyse, hastanın tıbbi formları, hasta ile temasa geçen klinisyenleri ve diğer tıbbi bakım çalışanlarını bilgilendirecek şekilde infeksiyonun yüksek risk grubundan olduğunu belirtir şekilde düzenlenmelidir(114).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada kullanılan bakteriler: Çalışmaya Ocak 2007 ile Aralık 2007 tarihleri arasında Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına çeşitli kliniklerden gönderilen örneklerden izole edilen 330 *A. baumannii* (141) ve *P. aeruginosa* (189) suşu dahil edildi. Kliniklerden gelen örnekler konvansiyonel biyokimyasal testler (IMVIC) ve BBL Crystal identifikasyon sistemi (Becton, Dickinson and Company, USA.) kullanılarak tiplendirildi.

Mikrobiyoloji laboratuvarına kliniklerden gönderilen örneklerden en yüksek oranda, 330 suşun yaklaşık % 30'u (98) yoğun bakım servisinde gönderilen örneklerden elde edildi. Bunu sırasıyla nöroloji yoğun bakım servisi %12(39), iç hastalıkları % 7 (25), göğüs hastalıkları % 6 (20), plastik cerrahi % 3 (11), ortopedi % 3 (11), genel cerrahi % 3 (10) ve diğer kliniklerden de yaklaşık olarak % 35 (116) oranında izole edilen örnekler izledi.

Laboratuara gönderilen örneklerin dağılımı ise en yüksek oranda kan kültürü örneği % 29 (96) sonra sırasıyla yara yeri örnekleri % 19 (65), idrar % 18 (61), trakeal aspirat % 16 (52), balgam % 14 (45) ve diğer örneklerde yaklaşık % 4 (16) oranında tesbit edildi.

Antibiyotik diskleri: Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile yapılan duyarlılık testleri için ticari olarak elde edilen imipenem (10µg) (BD) diskleri kullanıldı. Çift disk sinerji testinde ise Whatman kağıdından hazırlanan boş diskler kullanıldı.

Mueler-Hinton agar besiyeri: Hazırlanışı: Mueller-Hinton agar besiyeri (Oxoid) kullanıldı. 38 g'ı 1000 ml'lik distile su içerisinde çözüldü. 1 atmosfer basınç altında 121 °C de 15 dakika otoklavlandı. Uygun ısıda soğutulmuş 90 mm çaplı petri kutularına 4 mm kalınlığında döküldü. Plaklar kullanılıncaya kadar + 4 °C'de buzdolabında saklandı. Bu hazırlanan besiyeri disk difüzyon duyarlılık testlerinde, MBL fenotipik test yöntemleri olan İPM/EDTA kombine disk testi, Modifiye Hodge testi, çift disk sinerji testi ve MBL E test yöntemleri için kullanıldı.

EDTA (Etilendiamintetraasetikasit) Hazırlanışı: Ticari olarak HiMedia'dan hazır elde edilen EDTA tozu ile 0,5 M EDTA solüsyonu hazırlandı. Bunun için 18,61 g disodium EDTA.H₂O tozu 100 ml'lik steril distile suda çözülerek pH 8.0'e ayarlandı. pH ayarlanırken NaOH kullanıldı. Metallo beta laktamaz inhibitörü olarak İPM/EDTA kombine disk testi, Modifiye Hodge testi, ve Çift disk sinerji testlerinde kullanıldı.

MBL E Test Stripleri: Ticari olarak hazır elde edilen, bir tarafında 4–256 µg/ml imipenem, diğer tarafında ise sabit konsantrasyonda EDTA ile birlikte 1–64 µg/ml imipenem içeren E test MBL şeritleri (AB BIODISK, Sweden) kullanıldı.

Antibiyotik Duyarlılık Testleri: Antibiyotik duyarlılık testleri CLSI kriterlerine göre Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile yapıp değerlendirildi. 18–20 saatlik taze kültür pasajlarından saf olarak elde edilen bakteri kolonileri deneylerde kullanıldı. Bu kolonilerden elde edilen bakterilerden Mueller Hinton buyyonunda 0.5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlanarak steril eküvyon ile önceden hazırlanan Mueller-Hinton agar plaklarına yayıldı. En çok 30 dakika içerisinde diskler yerleştirildi ve 35°C- 37°C lik etüvde 18–20 saat inkübe edildi. Antibiyogramlar 18-20 saatlik inkübasyondan sonra zon çapları CLSI (Ocak 2007) standartlarına göre ölçülerek dirençlilik, orta derecede duyarlılık ve duyarlılık durumları kaydedildi. *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* için imipenem (10µg) (BD) disk difüzyon sınır değerleri tablo 3'ye göre değerlendirildi.

Tablo 3. Disk difüzyon sınır değerleri.

	Disk içeriği	Zon çapı (mm)		
		Dirençli	Orta duyarlı	Duyarlı
<i>A. baumannii</i>	10 µg	≤ 13	14–15	≥ 16
<i>P. aeruginosa</i>	10 µg	≤ 13	14–15	≥ 16

Kontrol suşu olarak imipeneme duyarlı *Escherichia coli* “American Type Culture Collection” (ATCC) ATCC 25922 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 kullanıldı. *A. baumannii* ve *P. Aeruginosa* bakterilerinin antibiyotik duyarlılık testleri ve MBL enzimini tesbit etmek için kullanılan fenotipik testler aşağıda belirtilen gereçler ve yöntemler kullanılarak yapılmıştır.

3.1. MBL Tesbitinde Kullanılan Fenotipik Yöntemler

3.1.a. Kombine Disk Testi

Taze kültür pasajlarından saf olarak elde edilen bakterilerin 0,5 Mc Farland bulanıklığında süspansiyonu steril eküvyon ile önceden hazırlanan Mueller-Hinton agar plaklarına yayıldı. Plak içerisine 2 tane imipenem (10µg) diski yerleştirildi. Diskler arası uzaklık 22 mm olacak şekilde ayarlandı. İmipenem disklerinden bir tanesinin üzerine daha önceden hazırlanmış olduğumuz 0,5 M'lık EDTA solüsyonundan 10 µl pipetle eklendi. Plak 35°C– 37°C lik etüvde 18–20 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda inhibisyon zon çapları ölçüldü. EDTA solüsyonunun eklendiği imipenem/EDTA diskinin inhibisyon zonu tek başına imipenem diski zon çapından ≥ 7 mm büyük ise MBL pozitif bakteri izolatu olarak kaydedildi (110, 115).

3.1.b. Çift Disk Sinerji Testi

Çift disk sinerji testinde amaç imipenem inhibisyon zonunun EDTA varlığında genişleyip genişlemediğini tesbit ederek MBL pozitif bakteri izolatlarını tanımlamaktır. Bunun için taze kültür pasajlarından saf olarak elde edilen bakterilerin 0,5 Mc Farland bulanıklığında süspansiyonu steril eküvyon ile önceden hazırlanan Mueller-Hinton agar plaklarına yayıldı. Plak üzerine imipenem (10µg) diski yerleştirildi. İmipenem diskinin merkezinden 10mm uzağına daha önce hazırlanan boş disk yerleştirildi. Boş disk üzerine 0,5 M EDTA solüsyonundan 10µl eklendi. Test sonuçları plaklar 35°C- 37°C lik etüvde 18–20 saat inkübe edildikten sonra değerlendirmeye alındı. İnkübasyon sonrasında imipenem diski inhibisyon zonunun EDTA eklenmiş boş diske doğru genişlemesi sinerjistik inhibisyon zonu olarak değerlendirildi. Bu genişlemenin görüldüğü bakteri izolatları MBL üreten pozitif suş olarak kaydedildi (110, 116).

3.1.c. Modifiye Hodge Testi

Modifiye Hodge testinde imipeneme duyarlı olan *E.coli* ATCC 25922 standart suşu taze pasajlarından elde edilen 0,5 Mc Farland bulanıklığında hazırlanan süspansiyonlar Mueller Hinton agar plaklarına yayıldı. Plağın ortasına imipenem (10µg) diski yerleştirildi. Diskin kenarından plağın dört tarafına merkezden perifer

doğru döz çizgi Şeklinde test edilecek olan bakteriler ekildi. Plaklar etüvde inkübe edildi. 18–20 saat inkübe edildikten sonra değerlendirildi. Test sonuçları imipeneme duyarlı olan *E.coli* ATCC 25922 suşunun duyarlılık zon çapının çizgi ekimi yapılan bakteri taraflarında yonca yaprağı Şeklinde bozulması ve bu bölgede *E.coli* üremesi metallo beta laktamaz üretimi yönünde pozitif test sonucu olarak değerlendirildi.

3.1.d. MBL E Test

Test edilecek bakteri isolatlarının 0,5 Mc Farland bulanıklığında süspansiyonu steril eküvyon ile önceden hazırlanan Mueller-Hinton agar plaklarına yayıldı. MBL E Test stripleri plak üzerine yerleştirildi. Etüvde 18–20 saatlik inkübasyondan sonra değerlendirildi. İmipenem-EDTA MİK değer ve imipenem MİK değer not edildi. IPM/IPM-EDTAMİK değerleri oranlandığında 8 ve üzerinde bir değer elde edilmesi MBL üreten bakteri isolatı olarak değerlendirildi (110).

4. BULGULAR

Ocak 2007 ile Aralık 2007 tarihleri arasında Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına çeşitli kliniklerden gönderilen örneklerden izole edilen 330 *A. baumannii* (141) ve *P. aeruginosa* (189) suşundan çalışmaya disk difüzyonla imipeneme dirençli ve/veya orta derecede duyarlı olarak değerlendirilen toplam 113 bakteri alındı. Bunlardan 61 tanesi *A. baumannii* ve 52 tanesi ise *P. aeruginosa* idi.

Bu isolatlar aynı zamanda florokinolon grubunda yer alan siprofloksasiline, aminoglikozit grubunda yer alan tobramisine ve beta-laktam grubunda yer alan antibiyotiklerden (meropenem, imipenem, ceftazidim, sefoperazon/sulbaktam) en az bir tanesine daha dirençli idi. *A. baumannii* ve *P. aeruginosa*'nın bazı antibiyotiklere direnç durumu tablo 4'de yer almaktadır.

Tablo 4. *A. baumannii* ve *P. aeruginosa*'nın bazı antibiyotiklere direnç oranları (n/%)

	CAZ	CRO	FEP	IPM	CİP	AK	SCF	TZP	ATM
<i>A.baumannii</i> n=61	52(85)	53 (86)	52(85)	61(100)	52(85)	42(69)	37(60)	49(80)	54(88)
<i>P.aeruginosa</i> n=52	45(86)	45(86)	42(80)	52(100)	46(88)	30(58)	35(67)	41(79)	46(88)

CAZ: Sefotazidim, CRO: seftriakson, FEP: sefepim, CİP: siprofloksasin, AK: amikasin, SCF: sefoperazon/sulbaktam, TZP: piperasilin/tazobaktam, ATM: aztreonam

Mikrobiyoloji laboratuvarına kliniklerden gönderilen örneklerin dağılımı da kliniklere göre farklılık göstermekteydi. Yoğun bakım servisinden en yüksek oranda, kan kültürü ve trakeal aspirat örnekleri gönderilirken, cerrahi servislerinden yara yeri örnekleri, iç hastalıkları servisinden ise kan kültürü ve idrar örnekleri çoğunlukta idi. Bu örneklerden izole edilen bakterilerin MBL enzimi üretimini araştırmak için fenotipik tesbit yöntemlerinden kombine disk testi, çift disk sinerji testi, modifiye hodge testi ve MBL E test yöntemleri uygulandı. Sonuçlar tablo 5'de görülmektedir.

Tablo 5. MBL Fenotipik tesbit yöntemleri sonucunda bakterilerdeki MBL pozitifliği (%)

Fenotipik yöntem	<i>A. baumannii</i> (n=61)	<i>P. aeruginosa</i> (n=52)
	MBL (+) n (%)	MBL(+) n (%)
Kombine disk testi	46 (%75)	32 (%62)
Çift disk sinerji testi	51 (%84)	38 (%73)
Modifiye Hodge testi	45 (%74)	30 (%58)
MBL E Test	49 (%80)	21 (%40)

Bizim çalışmamızda *A. baumannii* izolatlarında tespit edilen en yüksek MBL pozitifliği oranı (% 84) çift disk sinerji testi ile elde edilirken *P. aeruginosa* suşlarında da ise en yüksek MBL pozitifliği oranı (% 62) çift disk sinerji testi ile elde edilmiştir. *A. baumannii* izolatlarında MBL pozitifliği en yüksek oranda yoğun bakım ve nöroloji yoğun bakım kliniklerinden gelen kan kültürü ve trakeal aspirat örneklerinde tespit edilirken; *P. aeruginosa* suşlarında ise MBL pozitifliği en yüksek oranda çift disk sinerji testi ile nöroloji yoğun bakım ve cerrahi (ortopedi, plastik ve genel cerrahi) kliniklerinden gelen trakeal aspirat ve yara yeri örneklerinde tespit edilmiştir.

A. baumannii izolatlarında dört farklı fenotipik yöntemle MBL pozitifliği gösteren suş sayısı toplam 32, en az üç farklı fenotipik yöntemle tesbit edilen MBL pozitifliğinin sayısı ise 14 olarak tesbit edildi. Çalışmamız sonucunda en az üç veya üzerinde fenotipik yöntemle MBL pozitifliği bulunan toplam 46 izolatın klinik ve örneklere göre dağılımı tablo 6'de gösterilmiştir.

Tablo 6. *A. baumannii* için en az üç fenotipik yöntemle tesbit edilen MBL pozitifliğinin servislere göre dağılımı

Servis	Kan	T. asp	İdrar	Yara	Balgam	Diğer
Y. bakım	17	10	1			1
N. Y.Bakım	3	4				
Cerrahi S.	1	1	1	2	1	
Göğüs H					2	1
Diğer S.						1

T.asp: Trakeal aspirat, Y.bakım: Yoğun bakım, N.Y.Bakım: Nöroloji yoğun bakım, Cerrahi S:Cerrahi servisler (ortopedi, plastik, genel cerrahi ve beyin

cerrahisi), Diğer S:Diğer servisler

P. aeruginosa izolatlarında ise toplam çalışılan suş sayısının yüksek olmasına rağmen dört fenotipik yöntemle 11, en az üç farklı yöntemle 17 suшта olmak üzere toplam 28 suшта üç veya üzerinde yöntemle tesbit edilen MBL pozitifliği saptandı. MBL pozitifliğinin klinik ve örnekler göre dağılımı tablo7’de gösterilmiştir.

Tablo 7. *P. aeruginosa* izolatlarında en az üç farklı fenotipik yöntemle saptana MBL pozitifliği

Servis	Kan	T. asp	İdrar	Yara	Balgam	Diğer
Y. bakım	6	4				1
N. Y.Bakım	2	3				
Cerrahi S.	1		1	4		
Göğüs H					3	1
Diğer S.			1			1

T.asp: Trakeal aspirat, Y.bakım: Yoğun bakım, N.Y.Bakım: Nöroloji yoğun bakım, Cerrahi S:Cerrahi servisler (ortopedi, plastik, genel cerrahi ve beyin cerrahisi), Diğer S:Diğer servisler



Resim 1. E Test sonuç-pozitif



Resim 2. E Test sonuç-negatif



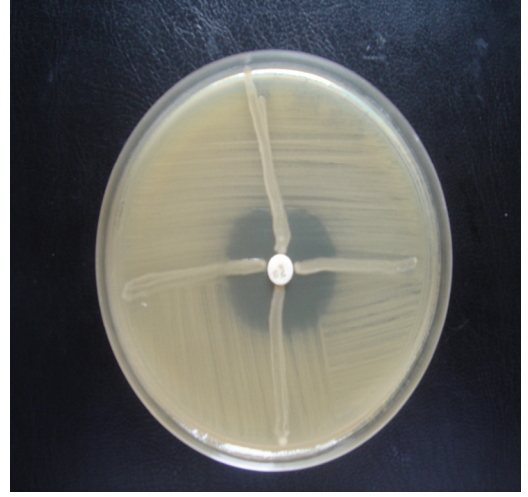
Resim 3. Kombine disk testi sonuç-pozitif.



Resim 4. Kombine disk testi sonuç-negatif



Resim 5. Çift disk sinerji testi sonuç- Pozitif (üst), Negatif(alt)



Resim 6. Modifiye Hodge testi sonuç-pozitif

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Son yıllarda artan oranlarda gözlenen antibakteriyel direnç nedeniyle bakterilerin neden olduğu infeksiyonların tedavisinde güçlüklerle karşılaşmaktadır. Beta laktam grubu antibiyotiklerin en geniş spektrumlu olan karbapenemlere bile direnç gelişmektedir. Karbapenemler; antibakteriyel spektrumlarının genişliği, amfilik özellikleri nedeniyle bakteriyel membranlardan hızla geçebilmeleri, AmpC ve GSBL enzimlerine dayanıklı olmaları gibi özellikleri nedeniyle özellikle çoklu dirençli GN bakteri infeksiyonlarında ilk sırada kullanılan antibiyotik grubudur. Ancak, karbapenemlerin özellikle ampirik tedavide yaygın olarak kullanılması, bu antibiyotiklere karşı direnç oranlarının artmasıyla sonlanmıştır. GNNF bakteriler son yıllarda immun sistemi baskılanmış ve ilaç tedavisi alan hasta gruplarında artan oranlarda görülen önemli fırsatçı patojenler olarak ortaya çıkmaktadır. Özellikle yaşamı tehdit eden çoklu ilaç direnci gösteren GN bakterilerin yol açtığı ciddi infeksiyonlarda karbapenem grubu antibiyotikler son seçenek durumunda olduğu için karbapenem direncinin ayrı bir önemi vardır. Hastane salgınları açısından önemli bakteri türlerinde buldukları için tanımlanmaları infeksiyon kontrolü açısından önemlidir. Hastane ortamında bakterilerin barınma ve direnç kazanma olasılıkları artmaktadır. Bakterilerdeki direnç oranları ülkeden ülkeye, bir ülkede bölgeden bölgeye hatta bölgede bulunan hastaneler arasında farklılıklar göstermekle birlikte bu oranların her merkez için zamanla artması kaygı verici bir gelişmedir. İnfeksiyonların tedavisinde ortaya çıkan bu problemler infeksiyonun erken kontrolü ve tedavisi açısından önemli iken kaygıya neden olan diğer bir konuda yeni antimikrobiyal bileşiklere karşı bakteriler tarafından geliştirilen yeni direnç mekanizmalarıdır.

Dünyadaki imipenem direnç oranlarına baktığımızda *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* türü bakterilerde giderek artan miktarlarda antibiyotik direnci görülmektedir. *Pseudomonas* için % 6 ile % 70 arasında değişen oranlarda imipenem direnci görülürken bu oran *Acinetobacter* 'lerde % 13 ile % 58 arasında değişmektedir (2).

Ülkemizde de *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* türü bakterilerde imipenem direnci coğrafik bölgelere göre farklılık göstermekte ve *Pseudomonas* 'larda yaklaşık

% 4 ile % 85, *Acinetobacter* 'lerde ise % 8 ile % 70 arasında değişmektedir (117, 118, 119, 120, 121, 122, 123).

Çalışmamızda ise bu oran *Pseudomonas* 'larda % 27,5, *Acinetobacter* 'lerde ise % 43 olarak bulunmuştur. Bulgularımız ülkemizde belirlenen direnç oranları arasında yer almakla birlikte çok dirençli suşların görüldüğü bölgelerdeki *Pseudomonas* 'larda görülen direnç oranlarına göre daha düşük değerler elde edilmiştir. *Acinetobacter* 'lerde ise *Pseudomonas* 'lara göre daha yüksek imipenem direnci görülmesine rağmen çok dirençli *Acinetobacter* suşlarının görüldüğü çalışmalardan daha düşük veriler elde edilmiştir.

MBL üreten bakterilerdeki direncin yayılımı tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde, hatta hastanemizde de önemli klinik sorunlar arasındadır. Dahada önemlisi bu enzimlerin kromozomal kökenli MBL'mi, integronlar içerisinde yer alan aktarılabılır genlerden olduğu ile ilgili daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. MBL enzim sentezinden sorumlu olan gen integronlar içerisinde bulunan gen kasetleri içerisinde yer almaktadır. İntegronların tek başlarına hareket yetenekleri yoktur ve aynı zamanda içlerinde bir ya da daha fazla gen kaseti taşıyabilen genetik elemanlardır. Bir bakteride ise birden fazla integron bulunabilir. Bu gen kasetlerinin düzeyi ve ekspresyonu bakteride bulunan integron sayısına ve 5' bölgesinde bulunan promotör bölgesinin aktif olmasına bağlıdır (124).

İntegronların hareket etme yeteneklerinin olmamasına rağmen plazmitler ve transpozonlar içerisinde bulunma özelliklerine bağlı olarak bir bakteriden diğer bakteriye, hatta integronlar içerisinde yer alan gen kasetleri bir integrondan diğerine geçebilmekte böylece direncin yayılmasına neden olmaktadır.

MBL üreten bakterilerdeki direncin yayılımı aynı genotip içerisinde klonal bir şekilde olabildiği gibi bakteriden bakteriye gen transferi ile horizontal şekilde de olabilir. İtalya Yunanistan, Kore, Çin, Tayvan ve Japonya'da yapılan çalışmalarda MBL üreten *P. aeruginosa* isolatlarının aynı genotipte olduğunu gösteren bulgular elde edilmiş, bu sonuçlar da direncin klonal yayıldığı düşüncesini desteklemiştir. Kore'de yapılan başka bir çalışmada ise MBL üreten *P. aeruginosa* isolatında bulunan VIM-2 tip enzim üreten integron yapısının başka bir bakteride yani VIM-2 üreten *Acinetobacter* suşunda bulunan integron yapısı ile aynı olduğu saptanmış bu çalışma da direncin horizontal yayıldığı görüşlerine katkıda bulunmuştur (126, 127).

Bakteriler MBL enzim üretimi sonucunda aztreonam dışındaki bütün beta laktam antibiyotiklere yani karbapenemlere, sefalosporinlere ve sefamisinlere dirençli olurlar. Bu enzimi üreten bakterilerle oluşan infeksiyonların tedavisinde bu antibiyotikler kullanılamaz. Önemli bir diğer sorun da aminoglikozid grubu antibiyotik direncine neden olan aacA4 geni ile MBL enzimini kodlayan gen kasetlerinin yan yana bulunması aminoglikozid direncine de neden olabileceğinden bu grup antibiyotiklerin kullanımı da sınırlanmaktadır. Böylece beta laktam antibiyotiklerinin dışında kanamisin, neomisin, amikasin ve streptomisin gibi aminoglikozid grubu antibiyotiklerin hepsinde direnç gelişimi gözlenmektedir(128).

Çalışmaya aldığımız imipeneme dirençli izolatlarımızdan *A. baumannii*'nin yaklaşık % 69'unda ve *P. Aeruginosa*'nın ise % 58'inde amikasin direnci gözlenmektedir (bakınız tablo 4).

MBL üreten bakterilerin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında erken tanısı hem dirençli isolatların yayılmasını önlemek hem de klinisyenleri tedavi konusunda erken bilgilendirmek açısından son derece önemli ve gereklidir. MBL üreten suşların oranlarının zamanla artış göstermesi laboratuvarlarda rutinde kolay uygulanabilen özgüllüğü yüksek duyarlı yöntemlerin bulunmasını zorunlu hale getirmiştir. Bu amaç için geliştirilen fenotipik yöntemlerden MBL E test, kombine disk testi, çift disk sinerji testi ve modifiye Hodge testinin duyarlılığı ve özgüllüğü ile ilgili ürekli çalışmalar yapılmaktadır. Hala duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek bir test yönteminin bulunmaması araştırmacıları daha fazla çalışma yapmaya yönlendirmiştir. Yapılan çalışmaların çoğunda bir veya iki fenotipik yöntem uygulanmış, sonuçlar PCR analizi ile doğrulanmıştır. Bizim çalışmamızda ise dört farklı fenotipik yöntemle MBL enzimi varlığı saptanmaya çalışılmıştır. Bu yöntemler MBL E test, kombine disk testi, çift disk sinerji testi ve modifiye Hodge testidir (110, 129).

Bu çalışmada imipeneme dirençli olduğu saptanan 61 *Acinetobacter baumannii* ve 52 *Pseudomonas aeruginosa* isolatı seçildi. Bu isolatlar aynı zamanda florokinolon grubunda yer alan siprofloksasiline, aminoglikozit grubunda yer alan tobramisine ve beta-laktam grubunda yer alan antibiyotiklerden (meropenem, imipenem, ceftazidim, sefoperazon/sulbaktam) en az bir tanesine daha dirençli idi. MBL enzim saptanmasında kullanılan testlerin genelinde mantık enzimin metal

şelatör tarafından inhibisyonu temeline dayanır. Bu prensibe dayanan testlerden bir tanesi kombine disk yöntemidir. Yan ve arkadaşları 2004 yılında yaptıkları çalışmada kombine disk yöntemi ile imipenem dirençli *Pseudomonas* larda % 86,7 oranında MBL pozitifliği saptamışlar ve testin duyarlılığının %70 olduğunu belirtmişlerdir(110).

Altoparlak ve arkadaşları; Erzurum'da karbapenemlere dirençli 40 *P.aeruginosa* ve *A. baumannii* suşunun imipenem-EDTA kombine disk yöntemi ile 22 (% 55)'sinde pozitiflik bulmuşlardır (130).

Çalışmamızda ise kombine disk testi ile 61 *A. baumannii* isolatının 46'sında (% 75), 52 *P. aeruginosa*'nın 32'sinde (% 61,5) MBL pozitifliği saptanmıştır. MBL üreten isolatlarda imipenem MİK değerinin ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$ ise kombine disk difüzyon testinin uygulanamayacağı vurgulanmaktadır. İmipenem MİK değeri ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$ olan bütün bakterilerdeki MBL enzimi kombine disk difüzyon yöntemi kullanılarak tesbit edilebilmiştir (110).

Çalışmaya alınan izolatlardan bazılarının imipenem dirençli ve MİK değerinin ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$ altında olması nedeniyle kombine disk testinin MBL enzimini saptamada tek başına yeterli olamayacağı düşünülse de bu sonuçlar PCR gibi moleküler yöntemlerle doğrulanmadığı için bu değer gerçekte MBL enzim üretimini yansıtmıyorsa tartışmaya açık bir konu olmakla birlikte, imipenem direncinin başka direnç mekanizmaları ile oluşma olasılığı da akılda bulundurulmalıdır.

Çift disk sinerji testi ile ilgili bir çok çalışma yapılmış ve MBL tesbitinde kolay uygulanabilir, duyarlı bir yöntem olduğu konusunda veriler elde edilmiştir. Substrat olarak imipenem veya ceftazidim, inhibitör madde olarak da EDTA veya 2-MPA kullanılabilir. Lee ve arkadaşlarının 2003 yılında yaptıkları çalışmada imipenem dirençli ve orta derecede dirençli ceftazidime dirençli *Acinetobacter* ve *Pseudomonas* türlerinde imipenem-EDTA ve ceftazidim-2-MPA kombinasyonlarını denemişler ve EDTA'nın metal şelatörü olarak daha etkin olduğu konusunda veriler elde etmişler. İmipenem-EDTA çift disk sinerji testinin MBL saptanmasındaki duyarlılığının *Pseudomonas* türlerinde yaklaşık %89, *Acinetobacter* türlerinde ise %100 olduğunu bulmuşlardır. Lee ve arkadaşlarının 2001 yılında yaptığı başka bir çalışmada MBL enzimi saptamış olan 530 *Acinetobacter* ve *Pseudomonas* türünde IPM hidrolizi

açısından spektrofotometrik olarak bakıldığında bu suşların hepsinin IPM hidrolize ettiği saptanmış ve testin duyarlılığını % 100 olarak bildirilmiştir (131, 132)

Jesudasan ve arkadaşları imipenem-EDTA çift disk sinerji testinin modifiye Hodge testine göre daha duyarlı olduğu yönünde bulgulara rastlamışlardır (133).

Çalışmamızda ise çift disk sinerji testi ile 61 *A. baumannii* isolatından 51'inde (% 84) *P. aeruginosa*'da 52 isolattan 38'inde (% 73) MBL pozitifliği saptandı. Diğer fenotipik yöntemlerden daha yüksek oranlarda *P. aeruginosa* da MBL pozitifliği tesbit edildi. Özellikle çift disk sinerji testinin imipeneme orta duyarlı *P. aeruginosa* da MBL E test yönteminden daha duyarlı olduğu gözlemlendi.

MBL E test yöntemi, E test stripleri ticari olarak kolayca bulunabildiği için MBL tayininde sık kullanılan fenotipik testlerdendir. Diğer fenotipik testlerin çoğunda olduğu gibi EDTA varlığında MBL enziminin inhibisyonu temeline dayanan bir testtir. Test stribinin bir tarafına imipenem diğer tarafında ise EDTA katkılı imipenem bulunmaktadır. Değerlendirirken MİK değerleri okunarak değerlendirildiği için değerlendirmenin daha objektif olduğu söylenebilir. Bu yöntemin tek dezavantajı imipeneme duyarlı ve orta derecede duyarlı bakterlerdeki MBL üretimini saptamada yetersiz kalmasıdır. Bu nedenle imipeneme duyarlı bakterilerde MBL enzimi tesbiti için başka fenotipik yöntemler uygulanmalıdır.

Bizim yaptığımız çalışmada ise MBL E test yöntemi ile *A. baumannii* isolatının 49'unda (% 80) gibi yüksek bir oranda bulunurken *P. aeruginosa* isolatının 21'inde (% 40) MBL pozitifliğinin olması *P. aeruginosa*'nın orta duyarlı suşlarında çalışmaya dahil edilmesi yanında, diğer testlerle de *P. aeruginosa*'da *A. baumannii* isolatlarından daha düşük oranda MBL pozitifliği saptanmış olması başka direnç mekanizmalarının etkili olabileceğini akla getirmiştir. Yan ve arkadaşları imipeneme dirençli isolatlarda E test uygulamışlar ve E test sonuçlarına göre MBL negatif olan suşları PCR yöntemi ile de negatif veya tanımlanamaz değerde bulduklarını belirterek MBL saptanması için E testin kullanışlı olduğunu savunmuşlardır (110).

Walsh ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptıkları başka bir çalışmada da E test yöntemi ile MBL saptanan 31 *Pseudomonas* bakterisinin ancak 25 tanesinde PCR yöntemi ile MBL enzimi bulunduğu saptanmıştır (134). Yunanistan'da yapılan bir çalışmada hastanedeki salgın sırasında 53 *P. aeruginosa* isolatında E test yöntemi ile

imipeneme dirençli suşlardan 44 tanesinde MBL pozitif bulunmuş. Daha sonra bu suşlara PCR yöntemi uygulanmış ve E test yönteminin MBL ürettiği saptanan 3 suşu tesbit edemediği görülmüştür. Bu da E test yönteminin yanlış pozitif sonuç verebildiği gibi yanlış negatif sonuç da verebildiğini göstermiştir.

Ülkemizde yapılan çalışmalara baktığımızda Toraman ve arkadaşları 2004 yılında MBL varlığını E test yöntemi ile tesbit etmişler ve PCR yöntemi ile doğrulamışlardır. Diğer çalışmada ise Şişli Etfal hastanesinde Bayraktar ve arkadaşları karbapeneme dirençli 27 *P. aeruginosa* isolatından 17 tanesinde MBL pozitifliği saptamışlar, daha sonra PCR yöntemi ile sonuçların doğrulandığını bildirmişlerdir (135, 136).

Bizim çalışmamızda ise MBL E test yöntemi ile 61 *A. baumannii* isolatından 49'unda (% 80), 52 *P. aeruginosa* isolatının 21'inde (% 40) MBL pozitif bulundu. İmipeneme dirençli suşlarda MBL E test yöntemi güvenilir kabul edilirken çalışmaya aldığımız özellikle imipeneme orta duyarlı *P. aeruginosa*'da ve *A. baumannii*'de testin duyarlılığının düşük olduğunu gözlemledik.

Modifiye Hodge testi ise MBL tesbitinde kullanılan diğer fenotipik yöntemdir. Bu test diğer fenotipik yöntemlerden farklı olarak MBL inhibisyonu temeline dayanmaz. İmipeneme duyarlı olan bir bakterinin MBL enzimi üreten bakteri varlığında imipenemin etkisiz hale gelmesi sonucu diskin etrafında üremenin görülmesi ile test pozitifliği saptanır. Lee ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada imipeneme dirençli olduğu saptanan *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter spp.* isolatlarında modifiye Hodge testi ile MBL enzim tesbitinden sonra PCR analizi yapılmış ve testin duyarlılığı %100, özgüllüğü ise % 88 oranında bulunmuştur (132).

Jesudasan ve arkadaşları ise imipeneme dirençli Gram negatif nonfermenter bakterilerde MBL pozitifliğini %56 oranında bulduklarını bildirmiş, karşılaştırma yapıldığında ise imipenem-EDTA çift disk sinerji testinin modifiye Hodge testine göre daha duyarlı olduğunu belirtmişlerdir (133).

Çalışmamızda modifiye Hodge testi ile 61 *Acinetobacter baumannii* isolatından 45'ünde (% 74), 52 *P. aeruginosa* isolatının 30'ünde (% 49) MBL pozitifliği saptanmıştır.

Hastanemiz izolatlarında 4 farklı yöntemle tespit etmiş olduğumuz bu oranlar ülkemiz ve dünyada yapılmış diğer çalışmalardaki oranlara benzerlik göstermekle birlikte özellikle *A. baumannii* suşlarında daha yüksek olarak tespit edilen, fakat *P. aeruginosa* izolatlarında da azımsanamayacak düzeyde tespit etmiş olduğumuz MBL pozitiflik oranları hastanemizde önemli nozokomiyal infeksiyon ajanları arasında kabul edilen bu bakteri gruplarında MBL aktivitesinin takibi açısından uyanık olma gereksinimimizi ortaya koymaktadır.

Diğer taraftan MBL üreten bakterilerin neden olduğu infeksiyonların tedavisinde karşılaşılan güçlükler hem dünyada hemde ülkemizde kaygıyla izlenmektedir. CLSI'de MBL üretimini saptamak için önerilen standart bir yöntem hala bulunmamaktadır. MBL varlığını göstermek için uygulanan fenotipik yöntemlerden hangisinin daha iyi bir yöntem olduğu konusunda netlik oluşmamıştır, bu konuda tüm dünyada ve ülkemizde çalışmalar sürmektedir. Kullanılan yöntemlerin hiçbirisi tek başına yeterli olamamaktadır. Bu nedenle fenotipik yöntemlerle tesbit edilen MBL pozitif izolatların hidroliz deneyi ve PCR analizi gibi moleküler yöntemlerle doğrulandığı ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. ÖZET

Çalışmamız Ocak 2007–Aralık 2007 tarihleri arasında mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 52 *P. aeruginosa* ve 61 *A. baumannii* olmak üzere toplam 113 bakteri kökeni ile yapılmıştır.

Bakterilerin tanımlanması standart klinik mikrobiyolojik yöntemler ile yapılmış, bu yöntemlerle tanımlamanın yapılamadığı durumlarda BBL Crystal İdentification Systems (BD, USA) sistemleri kullanılmıştır. Bakterilerin invitro koşullarda antibiyotiklere direnç durumları CLSI önerileri doğrultusunda disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiş, MBL üretimi kombine disk yöntemi, çift disk sinerji, modifiye Hodge testi ve E test yöntemleri ile araştırılmıştır.

İmipenem dirençli Acinetobacter kökenlerinde MBL üretimi kombine disk metodu ile % 75, IMP-EDTA çift disk sinerji testi ile % 84, modifiye Hodge testi ile % 74, E test ile % 80; imipenem dirençli Pseudomonas kökenlerinde kombine disk metodu ile %62, IMPEDTA çift disk sinerji testi ile % 73 Modifiye Hodge testi ile % 58 ve E test ile % 40 oranında bulunmuştur.

MBL üreten bakterilerin aztreonam dışında tüm beta laktamlara dirençli olmaları ve klinik uygulamada uygun bir MBL inhibitörünün bulunmaması, ayrıca MBL ile aminoglikozid direnç genlerinin genetik olarak birarada bulunması epidemiyolojik açıdan MBL varlığının tespit edilmesini çok önemlidir. MBL araştırılmasında hızlı, basit, duyarlılık ve özgüllüğü yüksek olan iyi bir fenotipik tarama yöntemine gerek vardır.

Günümüzde var olan tarama yöntemlerinin hiçbiri yeterli değildir. Bu sebeple tarama sonuçlarının moleküler yöntemlerle doğrulanması gereklidir. Yaptığımız çalışma hastanemizde MBL üreten suşların belirlenmesi ve kontrolü ile ilgili olarak daha ileri araştırmaların yapılması gerektiğini düşündürmüştür.

Anahtar sözcükler: MBL üretimi, Pseudomonas, Acinetobacter, fenotipik yöntemler.

7. SUMMARY

A total of 113 strains (52 *Pseudomonas*, 61 *Acinetobacter*), isolated from clinical specimens sent to our Microbiology and Clinical Microbiology laboratory between the dates of January 2006–2007, were studied. The bacteria were identified by standard clinical microbiological tests, BBL Crystal Identification Systems (BD, USA).

The *in vitro* antimicrobial resistance of bacteria was determined by the disk diffusion method according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guideline. The MBL production was found using combined disk method, double disk synergy test, modified Hodge test and E test.

Among imipenem resistant *Acinetobacter* strains, the MBL production determined by combined disc method was found as 75 %. The MBL production was found as 84 % by IPM-EDTA double disk synergy test, as 74 % by modified Hodge test and as 80 % by E test. In imipenem resistant *Pseudomonas* strains, the MBL production was found as 62 % by combined disc method, as 73 % by IPM-EDTA double disk synergy test, 58 % by modified Hodge test and as 40 % by E test.

The determination of the presence of MBL is very important in point of epidemiologic view because MBL producing bacteria are resistant to all beta lactams except aztreonam and also because the MBL and aminoglycosid resistance gene were present together genetically. Additionally there is not a MBL inhibitor for clinical treatment. There is a need of quick, easy phenotypic screening test with high specificity and sensitivity.

Today neither of the present screening methods are sufficient. For this reason there is a need to confirm the screening results by molecular techniques. This study suggested the need for advanced studies for the determination and control of MBL producing strains in our hospital.

Key words: MBL production, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, phenotypic methods

8. KAYNAKLAR

1. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. The Nonfermentative Gram-Negative Bacilli. Lippincott Williams and Wilkins. Sixth Edition, 2006; 309-75.
2. Enoch D A, Birkett C I, Ludlam H A. Non-Fermentative Gram-negative bacteria. International Journal of Antimicrobial Agents, 2007;(3):33-41.
3. Bahar H, Esen N. Acinetobacter ve Non-fermantatif basiller. İçinde Topçu AW., Söyletir G., Doğanay M. Editörler. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji, Nobel Tıp Kitabevi. 1618-27.
4. Schreckenberger P C, Graevenitz A. Acinetobacter, Achromobacter, Alcaligenes, Moraxella, Methylobacterium and other nonfermentative gram-negative rods. In: Murray P R, Baron E J, Pfaller M A, Tenover F C, Tenover R H (Eds). Manual of Clinical Microbiology. 7 th ed. Washington DC: ASM press, 1999;539-60.
5. Bergogne-Berezin E, Towner K J. Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: Microbiological, clinical and epidemiological features. Clin Microbiol Rev, 1996; 9: 148-65.
6. Akalın H. Çoğul Dirençli Gram Negatif Bakteriler. Doğanay M, Ünal S. Hastane İnfeksiyonları. Ankara Bilim TıpYayınevi, 2003; 269-89
7. Berezin B E, Towner K J. Acinetobacter spp. As nosocomial pathogens: Microbiological, Clinical and Epidemiological Features. Clin Microbiol. Rev, 1996; 9: 148-65.
8. Towner K J. Clinical importance and antibiotic resistance of Acinetobacter spp. J. Med. Microbiol, 1997; 46: 721-46.
9. Levin A S. Multiresistant Acinetobacter infections: a role for sulbactam combinations in overcoming an emerging worldwide problem. Clin Microbiol Infect, 2002; 8: 144-153.
10. Erdem B, Ustaçelebi, Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara, 1999; 552-57.
11. Bilgehan H. Non-fermantatif Gram olumsuz basiller. Klinik Mikrobiyoloji Barış Kitabevi, İzmir, 1995: 161-178.
12. Bergagne E. Pseudomonas and miscellaneous gram negative bacilli. In: Colman J, Powerdyly GW eds. Infectious Diseases. Second ed., Toronto, 2004; 1733-48.
13. Usluer G. Çoklu dirençli patojenler: Epidemiyolojive kontrol. Flora, 2002; 7: 135-41.
14. Yucesoy M, Yulug N, Kocagöz S, Unal S, Çetin S, Çalangu S. Antimicrobial resistance of gramnegative isolates from intensive care units in Turkey: comparison to previous three years. J Chemother, 2000; 12:294-98.

15. Cunha B A. Antibiotic resistance. Antibiotic therapy, Part I. Medical Clinics of North America, 2000;84: 1407- 29.
16. Mayer K H, Opal J M, Medeiros A A: Mechanisms of antibiotic resistance. Mandell, Bennet T, Dolin (eds) Principles and Practice of Infectious Diseases, 1994; 13:1015–18.
17. Gür D. Hastane infeksiyonlarında önem kazanan gram-negatif bakterilerde antibiyotiklere direnç mekanizmaları. Hastane İnfeksiyonları Dergisi, 1997;1:38–45.
18. Opal S M, Medeiros A A. Molecular mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. In: Mandell G L, Bennett J E, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. Sixth edition, Pennsylvania: Elsevier Churchill Livingstone Inc, 2005; 253–70.
19. Malouin F, Bryan LE. Modification of penicillin-binding proteins as mechanisms of beta-lactam resistance. Antimicrob Agents Chemother, 1986; 30:1–5.
20. Spratt BG. Resistance to beta-lactam antibiotics mediated by alterations of penicillin-binding proteins. In: Bryan LE (Ed.). Handbook of Experimental Pharmacology. Berlin: Springer-Verlag, 1989; 77–100.
21. Livermore DM. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics. Scand J Infect Dis 1991;(Suppl 78):7–16.
22. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21 st century: Characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. Clin Microbial Rev 2001;14:933–51.
23. Cornaglia G, Mazzariol A, Fontana R. The astonishing complexity of antibiotics resistance. Clin Microbial Infect, 2000;6(Suppl 3):93–94.
24. Patricia A. Bradford, Phd. What's new in β -lactamases? Current Infectious Disease Reports 2001; 3:13–19.
25. Bush K. Characterization of β -lactamases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1989; 259–263.
26. Gür D. Beta-laktamazların sınıflandırılması. Flora Dergisi 1996;1:80–86.
27. Bush K, Jacoby G A, Medeiros A A. A functional classification scheme for betalactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother. 1995;39:1211–33.
28. Yüce A. Antimikrobik ilaçlara direnç kazanma mekanizmaları. Klimik Dergisi 2001;14 (2): 42–46.
29. Negri M C, Morrossini M I, Blazquero J, Bacquero F. Antibiotic resistance in hospital infections: the role of newer cephalosporins. Clin Microb Infect. 2000; 6(13): 95–7.
30. Wiedemann Bi Dietz H, Preifle D. Induction of β lactamase in *Enterobacter aerogenes*. Clin Infect Dis 1998; 27(11): 42–47.

31. Mederios AA. B-lactamases: Quality and resistance. *Clin Microbiol infect.* 1997; 3(14): 2–9.
32. Wiedemann Bi Dietz H, Preifle D. İnduction of blactamase in *Enterobacter aerogenes* *Clin Infect Dis.* 1999; 28(9): 4–7.
33. Livermore D M. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbial Rev.* 1995; 8: 557–84.
34. Güllü N, Gürol Y, Bülüç M, Bal Ç. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında görülen beta-laktam direnç fenotipleri ve antibiyotik duyarlılıkları. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi* 2003; 7: 141–147.
35. Gür D. Antibiyotiklere direnç mekanizmaları. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S. *Antibiyotikler. Bilimsel Tıp Kitabevi.* Ankara 2003: 31–42.
36. Yuluğ N. Beta-laktamazlar ve klinik açıdan önemi. *ANKEM Derg,* 1997; 11. 205–7.
37. Livermore D M. Beta-lactamase mediated resistance and opportunities for its control. *J Antimicrob Chemother,* 1998;41(D): 24–41.
38. Danel F, Hall L M C, Gür D, Akalın H E, Livermore D M. Transferable production of PER–1 beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *J -Antimicrob Chemother,* 1995; 35: 281–94.
39. Vahapoğlu H, Hall L M, Mülazımoğlu L et al. Resistance to extended spectrum cephalosporins, caused by PER–1 beta-lactamase in *Salmonella typhimurium* from tanbul, Turkey. *J Med Microbiol* 1995; 43: 294–99.
40. Hall L M C, Livermore D M, Gür D, Akova M, Akalın H E. OXA–11, an extendedspectrum variant of OXA–10 (PSE-) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother,* 1993; 37: 1637–44.
41. AMYES sgb. Carbepenamase. *ANKEM Derg,* 1997; 11:221–24.
42. Donald H M, Scaite W, Anyes S G B, Young H K. Sequence analysis of ARI 1, a novel OXA blactamase responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter boumanii* 6b92 *Antimicrob Agents Chemother,* 2000; 44:196–99.
43. Quiroga A M, Franceshini N, Rossolini G M, Gutking G, Bonfiglio G, Franchino L, Amicosante G. İnteraction of cefotetan and the metallo betalactamases produced in *Aeromonas spp* and invitro activity. *Chemother.* 2000; 46: 177–83.
44. Bimbaum J, Kahan F M, Kroop H. Carpapenems, a new class of beta-lactam antibiotics: Discovery and development of imipenem-cilastatin. *Am J Med,* 1985; 78(6A): 3–21.
45. Harold C, Neu M D. Relation of structural properties of beta-lactam antibiotics to antibacterial activity. *Am J Med,* 1985; (2A): 2–13.
46. Bonfiglio G, Russo G, Nicoletti G. Recent developments in carbapenems. *Expert Opin Investig Drugs.* 2002;11(4): 529–44.

47. Rasmussen B A, Bush K. Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997; 41: 223–32.
48. Massidda O, Rossolini G M, and Satta G. The *Aeromonas hydrophila* cphA gene: molecular heterogeneity among class B metallo- β -lactamases. *J. Bacteriol*, 1991; 173: 4611–17.
49. Oh E. J, Lee S, Park Y J, Park J J, Park K, Kim S I, Kang M W and Kim B K. Prevalence of metallo- β -lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean university hospital and comparison of screening methods for detecting metallo- β -lactamase. *J. Microbiol. Methods*, 2003; 54: 411–18.
50. Garau G., Bebrone C, Anne C, Galleni M, Frere J M and Dideberg O A Metallo- β -lactamase enzyme in action: Crystal structures of the monozinc carbapenemase CphA and its complex with biapenem. *J. Mol. Biol*, 2005; 345: 785–95.
51. Docquier J D, Lamotte-Brasseur J, Galleni M G, Amicosante J, Frere and Rossolini G M. On functional and structural heterogeneity of VIM-type metallo- β -lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003; 51: 257–66.
52. Lim H M, Pene J J and Shaw R W. Cloning, nucleotide sequence and expression of the *Bacillus cereus* 5/B/6 β -lactamase II structural gene. *J. Bacteriol.* 1988; 170: 2873–78.
53. Chen Y H, Succi J, Tenover F C and T M. Koehler. β -Lactamase genes of the penicillin-susceptible *Bacillus anthracis* Sterne strain. *J. Bacteriol.* 2003; 185: 823–30.
54. Walsh T R, Hall L, Assinder S J, Nichols W W, Cartwright S J, MacGowan A. P and Bennett P M. Sequence analysis of the L1 metallo- β -lactamase from *Xanthomonas maltophilia*. *Biochim. Biophys. Acta* 1994; 1218: 199–201.
55. Massidda O, Rossolini G M and Satta G. The *Aeromonas hydrophila* cphA gene: molecular heterogeneity among class B metallo- β -lactamases. *J. Bacteriol.* 1991; 173: 4611–17.
56. Rossolini G M, Franceschini N, Lauretti L, Caravelli B, Riccio M L, Galleni M, Frere J M and Amicosante G. Cloning of a *Chryseobacterium* (Flavobacterium) meningosepticum chromosomal gene (blaACME) encoding an extended-spectrum class A β -lactamase related to the *Bacteroides cephalosporinases* and the VEB-1 and PER β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999; 43: 2193–99.
57. Bellais S, Poirel L, Leotard S, Naas T and Nordmann P. Genetic diversity of carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamases from *Chryseobacterium* (Flavobacterium) indologenes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000; 44: 3028–34.
58. Boschi L, Mercuri P S, Riccio M L, Amicosante G, Galleni M, Frere J M and Rossolini G M. The *Legionella* (Fluoribacter) gormanii metallo- β -lactamase: a new member of the highly divergent lineage of molecular-subclass B3 β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44: 1538–43.
59. Simm A M, Higgins C S, Pullan S T, Avison M B, Niumsup P, Erdozain O P, Bennett M and Walsh T R. A novel metallo- β -lactamase, Mbl1b, produced by the environmental bacterium *Caulobacter crescentus*. *FEBS Lett.* 2001; 509: 350–354.

60. Mammeri H, Bellais S and Nordmann P. Chromosome-encoded β -lactamases TUS-1 and MUS-1 from *Myroides odoratus* and *Myroides odoratimimus* (Formerly *Flavobacterium odoratum*), new members of the lineage of molecular subclass B1 metalloenzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46: 3561–67.
61. Rossolini G M, Condemi M A, Pantanella F, Docquier J D, Amicosante G and Thaller M C. Metallo- β -lactamase producers in environmental microbiota: new molecular class B enzyme in *Janthinobacterium lividum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001; 45: 837–844.
62. Naas T, Bellais S and Nordmann P. Molecular and biochemical characterization of a carbapenem-hydrolysing β -lactamase from *Flavobacterium johnsoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003; 51: 267–273.
63. Saavedra M J, Peixe L, Sousa J. C, Henriques I, Alves A and Correia A. Sfh-1, a subclass B2 metallo- β -lactamase from a *Serratia fonticola* environmental isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47: 2330–33.
64. Walsh T R, MacGowan A P and Bennett P M. Sequence analysis and enzyme kinetics of the L2 serine β -lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997; 41: 1460–1464.
65. Rasmussen B A and E Kovacs. Identification and DNA sequence of a new *Bacteroides fragilis* insertion sequence-like element Plasmid. 1991; 25: 141–44.
66. Thompson J S and Malamy M H. Sequencing of the gene for an imipenem-cefoxitin-hydrolyzing enzyme (CfiA) from *Bacteroides fragilis* TAL2480 reveals strong similarity between CfiA and *Bacillus cereus* β -lactamase BCII. *J. Bacteriol.* 1990; 172: 2584–93.
67. Lee K, Lee W G, Uh Y, Ha G Y, Cho J and Chong Y. VIM- and IMP-type metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in Korean hospitals. *Emerg. Infect. Dis.* 2003; 9: 868–71.
68. Lombardi G, Luzzaro F, Docquier J D, Riccio M L, Perilli M, Coli A, Amicosante G, Rossolini G M and Toniolo A. Nosocomial infections caused by multidrug-resistant isolates of *Pseudomonas putida* producing VIM-1 metallo- β -lactamase. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40: 4051–55.
69. Lauretti L, Riccio M L, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R and Rossolini G M. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999; 43: 1584–1590.
70. Poirel L, Lambert T, Turkoglu S, Ronco E, Gaillard J and Nordmann P. Characterization of class 1 integrons from *Pseudomonas aeruginosa* that contain the blaVIM-2 carbapenem-hydrolysing β -lactamase gene and of two novel aminoglycoside resistance gene cassettes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001; 45: 546–52.
71. Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, Ito H, Wacharotayankun R, Ohsuka S, Kato N and Ohta M. A novel integron-like element carrying the metallo- β -lactamase gene blaIMP. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995; 39: 1612–1615.

72. Bennett, P. M. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 1999; 43: 1–4.
73. Walsh T R, M, Toleman A, Hryniewicz W, Bennett P M and Jones R N. Evolution of an integron carrying blaVIM–2 in Eastern Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003; 52: 116–119.
74. Toleman M A, Biedenbach D, Bennett D, Jones R N and Walsh T R. Genetic characterization of a novel metallo- β -lactamase gene, blaIMP–13, harboured by a novel Tn5051-type transposon disseminating carbapenemase genes in Europe: report from the SENTRY worldwide antimicrobial surveillance programme. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003; 52: 583–90.
75. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M and Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991; 35: 147–51.
76. Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H, F. Yoshimura and Kato N. Molecular characterization of an enterobacterial metallo- β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994; 38: 71–78.
77. Yano H, Kuga A, Okamoto R, Kitasato H, Kobayashi T and Inoue M. Plasmid-encoded metallo- β -lactamase (IMP–6) conferring resistance to carbapenems, especially meropenem. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001; 45: 1343–48.
78. Cornaglia G, M. L. Riccio, A. Mazzariol, L. Lauretti, R. Fontana and Rossolini G M. Appearance of IMP–1 metallo- β -lactamase in Europe. *Lancet* 1999; 353: 899–900.
79. Daiyasu H, Osaka K, Ishino Y and Toh H. Expansion of the zinc metallo-hydrolase family of the β -lactamase fold. *FEBS Lett.* 2001; 503: 1–6.
80. Lauretti L, Riccio M L, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998; 43: 1584–90.
81. Lombardi G, Luzzaro F, Docquier J D, Riccio M L, Perilli M, Coli A, Amicosante G, Rossolini G M and Toniolo A. Nosocomial infections caused by multidrug-resistant isolates of *Pseudomonas putida* producing VIM–1 metallo- β -lactamase. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40: 4051–55.
82. Scoulica E V, Neonakis I K, Gikas A I and Tselentis YJ. Spread of blaVIM–1-producing *E. coli* in a university hospital in Greece. Genetic analysis of the integron carrying the blaVIM–1 metallo- β -lactamase gene. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2004; 48: 167–172.
83. Poirel L, Collet L and Nordmann P. Carbapenem-hydrolyzing metallo β -lactamase from a nosocomial isolate of *Pseudomonas aeruginosa* in France. *Emerg. Infect. Dis* 2000; 6: 84–85.
84. Lamotte-Brasseur J, Docquier J D, Galleni M, Amicosante G, Frere J M and G. M. Rossolini. On functional and structural heterogeneity of VIM-type metallo- β -lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003; 51: 257–66.

85. Lagatolla C, Tonin E.A, Monti-Bragadin C, Dolzani L, Gombac F, Bearzi C, Edalucci E, Gionechetti F and Rossolini G M. Endemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with acquired metallo- β -lactamase determinants in European hospital. *Emerg. Infect. Dis.* 2004; 10: 535–38.
86. Cardoso O, Leitao R, Figueiredo A, Sousa J C, Duarte A and Peixe L V. Metallo- β -lactamase VIM-2 in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Portugal. *Microb. Drug Resist.* 2002; 8: 93–97.
87. Mendes R E, Castanheira M, Garcia P, Guzman M, Toleman M A, Walsh T R and Jones R N. First isolation of blaVIM-2 in Latin America: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48: 1433–34.
88. Prats G, Miro E, Mirelis B, Poirel L, Bellais S and Nordmann P. First isolation of a carbapenem-hydrolyzing β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46: 932–33.
89. Sardelic S, Pallecchi L, Punda-Polic V and Rossolini G M. 2003. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*-carrying VIM-2 metallo- β -lactamase determinants, Croatia. *Emerg. Infect. Dis.* 9: 1022–23.
90. Walsh T R, Toleman M A, Hryniewicz W, Bennett P M and Jones R N. Evolution of an integron carrying blaVIM-2 in Eastern Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003; 52: 116–119.
91. Yatsuyanagi J, Saito S, Harata S, Suzuki N, Ito Y, Amano K and Enomoto K. Class 1 integron containing metallo- β -lactamase gene blaVIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48: 626–28.
92. Yum J H, Yong D, Lee K, Kim H S and Chong Y. A new integron carrying VIM-2 metallo- β -lactamase gene cassette in a *Serratia marcescens* isolate. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2002; 42: 217–219.
93. Yan J J, Hsueh P R, Ko W C, Luh K T, Tsai S H, Wu H M and Wu J J. Metallo- β -lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001; 45: 2224–28.
94. Pournaras S, Tsakris A, Maniati M, Tzouvelekis L S and Maniatis A N. Novel variant (blaVIM-4) of the metallo- β -lactamase gene blaVIM-1 in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46: 4026–28.
95. Bahar G, Mazzariol A, Koncan R, Mert A, Fontana R G, Rossolini M and Cornaglia G. Detection of VIM-5 metallo- β -lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey. *J. Antimicrob. Chemother.* 2004; 54: 282–283.
96. Toleman M A, Rolston K, Jones R N and Walsh T R. BlaVIM-7, an evolutionarily distinct metallo- β -lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48: 329–332.

97. Pagniez G, Radice M, Amoroso A, Famiglietti A and Gutkind G. Abstr. 44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, abstr. Washington, D. C. 2004; C1–293
98. Simm A M, Toleman M A, Murphy T A, Gales A C, Biedenbach D J, Jones R N and Walsh T R. Molecular characterization of SPM–1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J. Antimicrob. Chemother.* 2002; 50: 673–79.
99. Poirel L, Magalhaes M, Lopes and Nordmann P. Molecular analysis of metallo- β -lactamase gene blaSPM–1-surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48: 1406–09.
100. Murphy T A, Simm A M, Toleman M A, Jones R N and Walsh T R. Biochemical characterization of the acquired metallo- β -lactamase SPM–1 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47: 582–87.
101. Castanheira M, Toleman M A, Jones R N, Schmidt F J and Walsh T R. Molecular characterization of a β -lactamase gene, blaGIM–1, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48: 4654–61.
102. Bebrone, C. Metallo- β -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochemical Pharmacology*. Belgium.2007; 9444; 1–16
103. Daiyasu H, K. Osaka, Y. Ishino and H. Toh. Expansion of the zinc metallo-hydrolase family of the β -lactamase fold. *FEBS Lett.* 2001; 503: 1–6.
104. Osaka K, Ishino Y, Daiyasu H and Toh H. Expansion of the zinc metallo-hydrolase family of the β -lactamase fold. *FEBS Lett.* 2002; 53: 1–6.
105. Goto M, Takahashi T, Yamashita F, Koreeda A, Mori H, Ohta M and Arakawa Y. Inhibition of the metallo- β -lactamase produced from *Serratia marcescens* by thiol compounds. *Biol. Pharm. Bull.* 1997; 20: 1136–40.
106. Toney J H, Cleary K A, Hammond G G, Yuan X, May W J, Hutchins S M, Ashton W T and Vanderwall D E. Structure-activity relationships of biphenyl tetrazoles as metallo- β -lactamase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1999; 9: 2741–46.
107. Payne D J, Hueso-Rodriguez J A, Boyd H, Concha N O, Janson C A, Gilpin M, Bateson J H, Cheever C, Niconovich N L, Pearson S, Rittenhouse S, Tew D, Diez E, Perez P, De La Fuente J, Rees M and Rivera-Sagredo A. Identification of a series of tricyclic natural products as potent broad-spectrum inhibitors of metallo- β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46: 1880–86.
108. Tsang W. Y, A. Dhanda, C. J. Schofield, J. M. Frere, M. Galleni and M. I. Page. The inhibition of metallo- β -lactamase by thioxo-cephalosporin derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004; 14: 1737–39.
109. Buynak J D, Chen H, Vogeti L, Gadhachanda V R, Buchanan C A, Palzkill T, Shaw R W, Spencer J and Walsh T R. Penicillin-derived inhibitors that simultaneously target both metallo- and serine- β -lactamases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004; 14: 1299–304.

110. Yana J J, Wub J J, Tsaia T S, Chuang L C. Comparison of the double-disk, combined disk, and Etest methods for detecting metallo B-lactamases in gram-negative bacilli., *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2004; 49: 5–11.
111. Payne D J, Cramp R, Bateson J H, Neale J and Knowles D. Rapid identification of metallo- and serine β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1994; 38: 991–96.
112. Timothy R, Walsh T, Mark A, Toleman M. Laurent Poirel and Patrice Nordmann2. Metallo- β -Lactamases: the Quiet before the Storm? *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; 18: 306–25.
113. Giuseppe C, Akova M, Amicosante G, Cauda R. Metallo- β -lactamases as emerging resistance determinants in Gram-negative pathogens: open issues. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2007; 29: 380–88.
114. Urban C, Segal-Maurer S and Rahal J J. Considerations in control and treatment of nosocomial infections due to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Infect. Dis*. 2003; 36: 1268–74.
115. Oha E J, Leea S, Parka YJ, Parka JJ, Parka K, Sang-II Kimb, Kangb M W, Kima B K. Prevalence of metallo-h-lactamase among *Pseudomonasaeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean University hospital and comparison of screening methods for detecting metallo-h-lactamase., *Journal of Microbiological Methods* 2003; 54: 411–18.
116. Franklin C, Liolios L and Peleg A.Y. Phenotypic Detection of Carbapenem-Susceptible MetalloB lactamase producing Gram-Negative Bacilli in the Clinical Laboratory, *Journal Of Clinical Microbiology*. Sept. 2006; 3139–44.
117. Bayraktar B, Yıldız D, Bulut E. Yoğun Bakım Ünitesindenizole Edilen Karbapeneme Dirençli *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Metallobetalaktamaz Üretiminin Araştırılması *Türk Mikrobiyol Cem Derg*. 2004; 34: 248–52.
118. Gülay Z. Gram Negatif Çomaklarda Antibiyotik Direnci: 2003–2004 Türkite Haritası, *Ankem Derg* 2005; 19(Ek2): 66–77.
119. Cesur S, Albayrak F, Birengel S, Kolcu Z, Tekeli E. Çeşitli Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının karbapenem ve diğer antibiyotiklere duyarlılıkları. *Türk Mik cem Derg* 2002; 33: 203–06
120. Akan O A. Antibiyotik resistance of *Acinetobacter baumanii* isolates data from İbni Sina Hospital for the year 2002 *Mikrobiyol Bul*. 2003; 37: 241–46
121. Tatman Oktun M, Gürcan S, Özer B, Shakkrylanbaran N. Annual trends in antibiotic resistance of nasocomial *Acinetobacter baumaniistrains* and teh effect of synergistic antibiotic combinations. *New Microbiol* 2004; 27: 1–8.
122. Yücel M, Gündüz E, Yağcı S, Karakoç A E, Önde U, Acar N. *Pseudomonasve Acinetobacter türlerinde antibiyotik direnç oranlarının belirlenmesi*. *Türk Mik Cem Kongre Kitapçığı* 2002:280.

123. Toraman Aşçı Z, Çelik A. Investigation of antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter*. *Wich isolated from Clinical specimens. Frat med journ*: 2003; 8.
124. Patridge S, Brown H, Hall R. Characterization and movement of the class 1 integron known as Tn2521 and Tn1405. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46: 1288–94.
125. Laraki N, Galenli M, Thamm I, Riccio M, Amicossante G, Frere J, Rossolini G. Structure of In31, a bla_{IMP} containing *Pseudomonas aeruginosa* integron phylogenically related to In5, which carries an unusual array of gene cassettes. *Antimicrob Agents Chemother.*, 1991;43:890-901.
126. Lee K, Lim J B, Yum J H, et al. 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* 2002; 46: 1053–8.
127. Pournaras S, Maniati M, Petinaki E, Tzouvelekis L S, Tsakris A, Legakis NJ and Maniatis A N. Hospital outbreak of multiple clones of *Pseudomonas aeruginosa* carrying the unrelated metallo-β-lactamase gene variants blaVIM–2 and blaVIM–4. *J. Antimicrob. Chemother*. 2003; 51: 1409–14.
128. Walsh T R, Toleman M A, Hryniewicz W, Bennett P M and Jones RN. Evolution of an integron carrying blaVIM–2 in Eastern Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J. Antimicrob. Chemother*. 2003; 52: 116–119.
129. Park Y J, Oh E J, Lee S, Park J J, Park K, Kim S I, Kang M W and Kim B K. Prevalence of metallo-β-lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean university hospital and comparison of screening methods for detecting metallo-β-lactamase. *J. Microbiol. Methods* 2003; 54: 411–18.
130. Altoparlak U, Aktas F, Celebi D, Ozkurt Z, Akcay M N. Prevalence of metallo-beta-lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from burn wounds and in vitro activities of antibiotic combinations against these isolates. *Burns* 2005; 31: 707–10.
131. 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* 2003; 41: 4623–9.
132. Lee K, Chong Y, Shin H B, et al. Modified Hodge test and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7: 88–91.
133. Jesudason M V, Kandathil A J, Balaji V. Comparison of two methods to detect carbapenemase and metallo-beta-lactamase-production in clinical isolates. *Indian J Med Res* 2005; 121: 780–83
134. Walsh T R, Balmström A, Owarnström A, Gales A. Evaluation of a new Etest for detecting metallo-beta-lactamases in routine clinical testing. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2755–9.

135. Toraman Z A, Yakupogulları Y, Kizirgil A. Detection of metallo-beta-lactamase production and antibiotic resistance with Etest method in *Pseudomonas*, *Acinetobacter* and *Klebsiella* strains in Turkey. *J Infect Chemother* 2004; 10: 257–61.
136. Bayraktar B, Yıldır D, Bulut E. Yoğun bakım ünitesinden elde edilen karbapeneme dirençli *Pseudomonas aeruginosa* larında metallobeta laktamaz üretiminin araştırılması. *Türk Mikrobiyol. Cem Derg.* 2004; 34: 248–52.