

PSEUDOMONAS VE ACINETOBACTER SUŞLARINDA METALLO BETA-LAKTAMAZ ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF METALLO BETA-LACTAMASES IN *PSEUDOMONAS* AND *ACINETOBACTER* STRAINS

Zülal AŞÇI TORAMAN

Yusuf YAKUPOĞULLARI

Ahmet KIZIRGİL

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Elazığ

Anahtar Sözcükler: Metallo beta-laktamaz, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, karbapenem

Keywords: Metallo beta-lactamase, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, carbapenem

Geliş: 19 Şubat 2004

Kabul 19 Mart 2004

ÖZET

Karbapenem grubu antibiyotikler, Gram-olumsuz çomaklardaki beta-laktamaz aracılı direnç mekanizmalarına karşı oldukça etkili antibiyotiklerdir. Ancak son zamanlarda, plazmit bağlantılı karbapenemaz enzimlerinin, çeşitli ülkelerden artan sıklıkta bildirildiği görülmektedir. Bu çalışmanın amacı, *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* suşlarında metallo beta-laktamaz üretim sıklığını araştırmak idi. 2002-2003 yıllarında, yaklaşık 18 aylık süre içerisinde, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çeşitli klinik örneklerden 407 *Pseudomonas* ve 152 *Acinetobacter* suşu soyutlanmıştır. Bunlardan, 42 (%10.3) *Pseudomonas* ve 14 (%9.2) *Acinetobacter* suşu, disk difüzyon yöntemi ile yapılan antibiyotik duyarlılık testinde karbapenemlere karşı dirençli olarak bulunmuştur. E-Test-MBL stripleri ile karbapenem dirençli suşlarda metallo enzim araştırması yapılmış; 42 *Pseudomonas* suşunun 10'unda (%24) ve 14 *Acinetobacter* suşunun üçünde (%21) metallo beta-laktamaz üretimi saptanmıştır. Tüm *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* suşlarının metallo beta-laktamaz üretim sıklığı sırasıyla %2.5 ve %2 olarak bulunmuştur. Hastanelerde, karbapenemaz üreten bakterilere karşı uygun önlemlerin alınması gerektiği düşünülmüştür.

SUMMARY

Carbapenems have been the most successful antibiotics in evading beta-lactamase associated resistance. Nevertheless, more recently, there is an increase in reports on plasmid-encoded carbapenemases from different countries. The purpose of this study was to determine the frequency of carbapenemase production in *Pseudomonas* and *Acinetobacter* strains. In the Microbiology Laboratory, Fırat University Hospital, 2002-2003, in nearly 18 months, 407 *Pseudomonas* and 152 *Acinetobacter* strains were isolated. Forty-two (10.3%) of *Pseudomonas* and 14 (9.2%) of *Acinetobacter* strains were found as carbapenem resistant in the disk-diffusion antibiotic susceptibility test. Metallo beta-lactamase production was investigated in these carbapenem-resistant strains with E-Test-MBL technique, and 10 (24%) *Pseudomonas* and 3 (21%) *Acinetobacter* strains were found to be metallo enzyme producers. Overall, metallo beta-lactamase production of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* strains were determined as 2.5% and 2%, respectively. It is concluded that the preventive measurements are necessary in hospitals against metallo enzyme producer organisms.

GİRİŞ

Günümüze kadar bir çok beta-laktamaz enzimi tanımlanmıştır. Her yeni enzim sayesinde bakterilerin bazı antibiyotiklere karşı duyarlılıkları azalmakta veya tamamen

kaybolmaktadır. İmipenem veya meropenemden herhangi birini veya her ikisini de hidrolize edebilen enzimlere karbapenemazlar denir. Çoğunlukla IMP ve VIM türü olan bu enzimler, aktif bölgelerinde taşıdıkları metal iyonları

nedeniyle Metallo Beta-Laktamazlar (MBL) olarak ta adlandırılırlar (1).

Bazı bakterilerin doğal yapısında karbapenemleri hidrolize eden enzimlerin taşındığı, 80'li ve 90'lı yıllardaki çalışmalarda bildirilmiştir (2, 3). Bu bakterilerin çoğu, çevresel ortamlarda sık bulunan ve klinik önemleri az olan türler olduğu için, karbapenemaz üretimlerinin insan sağlığı üzerindeki olumsuz potansiyeli düşük olarak kabul edilmiştir (4). Ancak son on yılda plazmitlerle taşınmaya başlaması ve diğer bakterilere aktarılabilir hale geldiğinin saptanması ile metallo beta-laktamazların klinik önemi artmıştır (1). Kazanılmış karbapenemaz enzimlerinin, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* ve *Enterobacteriaceae* ailesinden *Klebsiella*, *Escherichia coli* ve *Enterobacter* gibi suşlardan zaman geçtikçe daha sık bildirildiği görülmektedir (5, 6). Karbapenemaz üreten bakteriler, neredeyse tüm beta-laktamlara karşı dirençli olmakla birlikte, bu direnci engelleyebilecek klinik kullanımı olanaklı olan herhangi bir beta-laktamaz inhibitörü de bulunmamaktadır (4-7). Ayrıca bu suşlar, beta-laktam olmayan ilaçlara da sıklıkla dirençli olmaktadır (5).

Pseudomonas aeruginosa ve *Acinetobacter baumannii*, özellikle hastanede yatan ve ciddi hastalığı bulunan kişilerde yüksek mortalite ile sonuçlanan infeksiyonlara neden olurlar (8). Bu iki nozokomiyal etken, birçok antibiyotiğe karşı bazı intrinsik mekanizmalar sayesinde direnç geliştirebilmektedir. Bu mekanizmaların başında, antibiyotiği hücre dışına pompalayan eflüks sistemleri ve antibiyotikler için giriş kapısı olabilecek por proteinlerin sentezinin azaltılması veya tamamen durdurulması bulunmaktadır (9). Antibiyotikleri hidrolize ederek etkilerini bozan enzimlerin üretimi, diğer bir direnç yoludur. *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* suşlarında hızla yayılan ve geniş antibakteriyel direnç spektrumuna neden olan metallo enzimler, Türkiye hastaneleri için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır.

Bu çalışmada, bir üniversite hastanesi olan Fırat Tıp Merkezi'nde karbapenem dirençli bulunan *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* suşlarında MBL üretim sıklığı araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bakteri türleri: Fırat Üniversitesi Tıp Merkezi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda, 1 Ocak 2002 – 30 Mayıs 2003 tarihleri arasında, çeşitli klinik örneklerden soyutlanan *Pseudomonas* ve *Acinetobacter*

suşları çalışmaya alındı. Bakteriler, kalitatif bakteriyolojik yöntemler, API ID 32 E ve API GN (bio-Merieux/Fransa) sistem ticari kitleri kullanılarak tanımlandı.

Antibiyotik duyarlılık testi: Bakteri kolonilerinden, steril serum fizyolojik içerisinde 0.5 Mc Farland bulanıklıkta hazırlanan süspansiyon, Mueller-Hinton Agar'a yayıldıktan sonra besiyerinin yüzeyine aralarında imipenem ve meropenemin de bulunduğu çeşitli antibiyotik emdirilmiş disklerden (Oxoid/İngiltere) yerleştirildi; 36° C'de 18-24 saatlik aerobik inkübasyonu takiben, antibiyotik diskleri etrafında oluşan inhibisyon zon çapları ölçüldü ve NCCLS (10) kriterlerine göre yorumlanarak bakterilerin antibiyotik duyarlılıkları saptandı. İmipenem ve/veya meropenem çapı 16 mm'den az bulunan suşlar karbapenemlere karşı dirençli veya az duyarlı olarak kabul edilip, metallo-beta-laktamaz üretiminin araştırılması için -40° C'de saklandı.

Metallo beta-laktamaz üretiminin araştırılması: Disk difüzyon yöntemi ile yapılan antibiyotik duyarlılık deneyinde karbapenemlere dirençli olarak saptanan *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* suşlarında MBL üretimi E-Test (E-Test MBL) (AB Bio Disk/İsveç) yöntemi ile araştırıldı. Kolonilerinden 0.5 Mc Farland bulanıklıkta hazırlanan bakteri süspansiyonu, Mueller-Hinton Agar'a yayıldıktan sonra besiyeri yüzeyine bir ucunda imipenem (IP), diğer ucunda imipenem + EDTA (IPI) bulunan E-test şeritleri yerleştirildi. 36° C'de 18-24 saatlik aerobik inkübasyonu takiben oluşan inhibisyon elipsinin E-Test şeritlerini kestiği noktalar kaydedildi. Okunan imipenem MİK değeri, imipenem + EDTA değerine oranlandı. Üretici firma önerileri uyarınca bu iki değer oranı $8 \leq$ olan suşlar, metallo beta-laktamaz üreticisi kabul edildi.

BULGULAR

Yaklaşık 18 aylık bir süreçte Klinik Mikrobiyoloji Labaratuvarı'nda çeşitli klinik örneklerden, 407 *Pseudomonas* ve 152 *Acinetobacter* suşu soyutlanmıştır. NCCLS (10) önerileri uyarınca disk-difüzyon yöntemi ile yapılan rutin antibiyotik duyarlılık testinde, 42 (%10.3) *Pseudomonas* ve 14 *Acinetobacter* suşu (%9.2) karbapenemlere dirençli olarak bulunmuştur. Dirençli bakterilerde, E-Test yöntemi ile metallo beta-laktamaz üretimi araştırılmış ve 10 *P. aeruginosa* (%2.5) ve üç *A. baumannii* (%2) suşunda metallo-enzim üretimi saptanmıştır. Karbapenem dirençli olarak saptanan suşların MBL üretim sıklığı, psödomonaslar için %24, asinetobakterler için %21 olarak bulunmuştur.

E-test ile saptanan metallo beta-laktamaz üretimi Şekil 1'de ve metallo beta-laktamaz üreticisi olarak saptanan bakterilerin izole edildikleri klinik örneğe göre sayısal dağılımları Tablo 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. *Pseudomonas aeruginosa* suşunun E-test ile Mueller Hinton Agar'daki MBL üretimini gösteren bir fotoğraf. E-test çubuğu, imipenem ile EDTA ile inhibitörün etkisini karşılaştırarak, imipenem MİK değerinde yaklaşık 96 kat düşüş gözlemlenmektedir.

Tablo 1. Metallo enzim üreticisi olarak saptanan suşların soyutlandıkları klinik örnekler göre dağılımı*

Klinik örnek	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>
	Sayı	Sayı
Kan	2	-
Beyin-omurilik sıvısı	1	-
İdrar	1	1
İntübasyon tübü	3	1
Trakeal aspirasyon	1	-
Yara	2	1
Toplam	10	3

* Toplam örnekler içinde solunum sistemi ve yaradan izole edilen suşların sayısal çoğunluğu dikkat çekicidir (n: 8, % 61.5).

TARTIŞMA

Beta-laktamlar, bakterilerce oluşturulan enfeksiyonlara karşı en sık kullanılan antimikrobiyal ilaçlardır. Üçüncü ve dördüncü jenerasyon sefalosporinleri hidrolize eden genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz enzimlerinin hastanelerde yaygınlaşması ile bu direnç karşı en başarılı antibiyotikler olan karbapenemler daha yoğun olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu ise bakteriler arasında, karbapeneme dirençli suşlar lehine seçici baskı oluşumuna neden olmuştur (5, 8, 9). Yoğun imipenem kullanı-

mının bir süre sonra karbapeneme dirençli *P. aeruginosa* suşlarının ortaya çıkışını kolaylaştırdığı bildirilmiştir (11). Psödomonaslar, karbapenemlere karşı değişik mekanizmalar yoluyla dirençli olabilirler. Opr D ve Opr M, hücre zarında bulunan ve karbapenemlerin hücre içine geçişini sağlayan por proteinleridir. Bu proteinlerin az sentezlendiği veya sentezlenmediği indüklenebilir kromozomal beta-laktamaz üreten suşlarda, karbapenemlere karşı yüksek MİK düzeylerinde duyarlılık veya direnç gözlenmektedir (7). Ayrıca Mex-A ve Mex-B eflüks sistemi ile karbapenemler hücre dışına pompalanarak etkinlikleri azaltılmaktadır. Bu pompa sisteminin up-regülasyonu ile dirençte artış izlenir (9, 12).

Karbapenamazlar, Ambler'in moleküler sınıflamasına göre A, B ve D grubunda yer almaktadır. Klavulanat ile kısmen inhibe olan A grubu enzimler ile birlikte D grubu enzimlerin klinik önemleri, B grubundakilere göre, daha düşük kabul edilmektedir (4). Etkinlik için çinko veya kadmium gibi bazı katyonlara gereksinim gösteren B grubu karbapenemazlardan olan metallo beta-laktamazlar, ortamdaki metal iyonlarını bağlayan EDTA veya merkaptobileşikler gibi metal şelatörleri ile inhibe olmaktadır (1, 4, 7, 13). Ancak bu inhibitörlerden herhangi biri klinik kullanım için uygun değildir. Payne ve arkadaşları (14), metallo enzim üzerinde aktif bölgedeki metal iyonunun bağlanarak enzimin inhibisyonuna neden olan ve mero-penem MİK değerinin duyarlı sınırlara inmesini sağlayan trisiklik doğal ürünler geliştirilmiştir. Ancak bu bileşikler, sadece *Bacteroides fragilis*'in Ccr-A metallo enzimine karşı etkin bulunup, *Stenotrophomonas maltophilia* ve psödomonasların ürettiği karbapenemazlar üzerine herhangi bir inhibitör etki sağlayamamıştır (14). *In vivo* kullanımı olanaklı inhibitörlerin geliştirilmesi için yeni çalışmalara gereksinim vardır.

Karbapenemaz genlerinin kaynağı henüz aydınlatılamamıştır. Bin dokuz yüz doksan bir yılında, plazmitle aktarılabilen ilk IMP enzimi Japonya'dan bildirildiğinde bunu yine uzak doğudan çeşitli çalışmalar takip etmiş, daha sonra Avrupa kökenli yayınlar ile yeni IMP enzimleri bildirilerek tanımlanmıştır (15-20). Doksanlı yılların sonuna doğru Yunanistan, İtalya ve Fransa'dan klinik örneklerden soyutlanan psödomonas ve acinetobakter suşlarında ilk VIM tipi enzimler bildirilmiştir (21-23). Japonya'da bir *Shigella flexneri* suşunda IMP-3 tipi metallo enzim üretimi saptandığında, karbapenemazların toplum kökenli etkenlere yayıldığı düşünülmüştür. Ancak günümüzde, klinik açıdan önemli olan metallo enzim üreticisi suşlar çoğunlukla hastane kökenli olarak karşımıza çıkmak-

tadır (24). Çalışmamızda, soyutlanan 13 kökenin hepsi (%100) hastane kökenli olarak bulunmuştur. Metallo enzim ürettiği saptanan bakterilerin, hastalardan izole edildikleri süre incelendiğinde, iki *P. aeruginosa* suşunun, hastalarının hastaneye yatışından altı ve yedi gün sonra soyutlandığı, asinetobakterlerden en erken izolasyonun ise onuncu günde olduğu gözlenmiştir. Karbapenemaz üreten psödomonasların ortalama ortaya çıkış süreleri 10 gün, asinetobakterlerin ise yaklaşık 14 gün olduğu bulunmuştur.

Metallo beta-laktamaz üreten suşlar penisilinler, sefalosporinler ve karbapenemlere karşı dirençlidirler. Aztreonam bu kuralın dışında kalır ancak, karbapenemaz üreticisi bakteriler bu antibiyotiğe de sıklıkla başka yollarla dirençli olarak bulunur (7). Yapılan çalışmalarda, metallo enzim üreten psödomonas ve asinetobakter suşlarının, kinolon ve aminoglikozitlere yüksek oranda dirençli olduğu gösterilmiştir (5, 7). IMP-1 metallo enzim üreten *P. aeruginosa* suşlarındaki integrinlerde hem karbapenemaz, hem de amikasin asetil-transferaz enzimlerinin birlikte kodlandığı bildirilmiştir (9).

Klinik kökenlerde metallo enzim üretiminin saptanması için moleküler veya fenotipik yöntemler kullanılabilir. Fenotipik yöntemlerin hemen hemen hepsi, inhibitör maddenin ortama eklenmesi ile enzim inhibisyonunun gözlenmesi temeline dayanır. Yong ve arkadaşlarınca (25), imipenem ve imipenem+EDTA diskleri kullanılarak rutin metallo enzim araştırması için kullanılabilecek bir yöntemin geliştirildiği bildirilmiştir. Migliavacca ve ark. (26), yine imipenem ve EDTA ile bir mikrodilüsyon yöntemi geliştirmişler ve yaklaşık %95 duyarlılık ile MBL tespiti yapılabildiğini bildirmişlerdir. Çalışmada kullanılan E-Test-MBL (AB Bio-Disk/İsveç) yönteminde, PZR ile enzim geninin saptandığı suşlarda %94 duyarlılık ve %95 özgüllük ile MBL tespiti yapılabildiği gösterilmiştir (27). Yine bu çalışmada, enzim üretiminin saptanması için kullanılabilecek besi yerleri ve inhibitör maddeler karşılaştırılmış; Mueller Hinton Agar en uygun besiyeri, EDTA ise en başarılı inhibitör madde olarak bildirilmiştir.

Gerekli önlemlerin erkenden alınması ve antibiyoterapinin başarısı için metallo enzim üreten suşların saptan-

masının yararlı olacağı açıktır. Tanıma testlerinin rutin kullanımı ile hastanelerdeki karbapenemaz üretiminin gerçek sıklığı daha iyi anlaşılacaktır. Bu konudaki çalışmalar henüz sınırlı sayıda olmakla birlikte, Lee ve ark (28), 1997'de yaptıkları çalışmada, karbapenem dirençli psödomonas suşlarında PZR ile VIM-2 metallo beta-laktamaz üretim sıklığını %9 olarak bildirmişlerdir. Bu çalışmada, karbapenem dirençli psödomonasların fenotipik olarak metallo enzim üretim sıklığı %24, asinetobakterlerin ise %20 olarak saptanmıştır. Çalışmada, karbapenemaz üreticisi olarak tanımlanan psödomonas ve asinetobakter suşları alt tür düzeyinde, *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* olarak bulunmuştur.

Karbapenemaz üreten bakterilerin neden olduğu, özellikle hayatı tehdit eden ciddi infeksiyonların sağaltımında antibiyotik kullanımı ve sonuçları hakkında yeterince klinik veri bulunmamaktadır (12). Bu suşlara karşı etkili olabilecek antibiyotik sayısı oldukça sınırlıdır. Bellais ve ark. (29), deney hayvanlarında metallo enzim üreten psödomonas suşları ile oluşturdukları pnömonilerde, bazı beta-laktam antibiyotikleri normalin üç-dört katı kadar yüksek dozda kullanmışlar ve karbapenemlerin de dahil olduğu beta-laktam antibiyotiklerin, infeksiyonun sağaltımında yeterince etkili olmadığını saptamışlardır. Bir olgu bildirisinde, Toraman ve Yakupoğulları (30), bir yenidoğanda, metallo enzim üreten ve sadece amikasin ve siprofloksasine duyarlı; karbapenemler ve diğer tüm beta-laktam antibiyotiklere yüksek MİK düzeyinde dirençli nozokomiyal bir *P. aeruginosa* meninjitini tanımlamışlardır. Söz konusu olguya, üç gün boyunca meropenem infüzyonu yapılmasına karşın klinik yakınmaların düzelmemesi hatta daha da kötüleşmesi üzerine, yenidoğan hastaya yüksek doz ve uzun süreli siprofloksasin kullanımı zorunda kalındığı bildirmiştir.

Antibiyotik direnci, Türkiye hastanelerinde ciddi bir sağlık sorunudur. Bu sorunun hızla büyümesinin başlıca nedenin, yoğun ve uygunsuz antibiyotik kullanımı olduğu bilinmektedir. Antibiyotik kullanım kurallarının uygulanması, direnç sorunun çözümüne katkı sağlayacaktır. Gram-olumsuz çomakların MBL üretimi, ülkemiz için yeni olmakla birlikte, gerekli önlemlerin alınması için bu problemin ciddi boyutlara ulaşması beklenmemelidir.

KAYNAKLAR

1. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram negative aerobes. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8: 321-31.
2. Lim HM, Pene JJ, Shaw RW. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Bacillus cereus* 5/B/6 beta-lactamase II structural gene. *J Bacteriol* 1988; 170: 2873-8.
3. Massidda O, Rossolini GM, Satta G. The *Aeromonas hydrophila* CphA gene: molecular heterogeneity among class-B metallo-beta-lactamases. *J Bacteriol* 1991; 173: 4611-7.

4. Poirel L, Nordmann P. Acquired carbapenem hydrolyzing beta-lactamases and their genetic support. *Curr Pharm Biotechnol* **2002**; 3: 117-27.
5. Livermore DM. The impact of carbapenemases on antimicrobial development and therapy. *Curr Opin Investig Drugs* **2002**; 3: 218-24.
6. Yan JJ, Ko WC, Tsai SH, Wu HM, Wu JJ. Outbreak of infection with multidrug resistant *K. pneumoniae* carrying *bla*-(IMP-8) in a university medical center in Taiwan. *J Clin Microbiol* **2001**; 39: 4433-9.
7. Livermore DM. Acquired carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* **1997**; 39: 673-6.
8. Di Martino P, Gagniere H, Berry H, Bret L. Antibiotic resistance and virulence properties of *P. aeruginosa* strains from mechanically ventilated patients with pneumonia in intensive care unit: comparison with imipenem resistant extra-respiratory tract isolates from uninfected patients. *Microbes Infect* **2002**; 4: 613-20.
9. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *P. aeruginosa* : our worst nightmare? *Clin Infect Dis* **2002**; 34: 634-40.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*. Approved Standards M2 A7. Wayne, PA: NCCLS, **2000**.
11. Rahal JJ, Urban C, Horn D, et al. Class restriction of cephalosporin use to control total cephalosporin resistance in nosocomial *Klebsiella*. *JAMA* **1998**; 280: 1233-7.
12. Livermore DM. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *J Antimicrob Chemother* **2001**; 47: 247-50.
13. Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, et al. Convenient test for screening metallo beta-lactamase producing Gram negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol* **2000**; 38: 40-3.
14. Payne DJ, Hueso-Rodriguez JA, Boyd H, et al. Identification of a series of tricyclic natural products as potent broad-spectrum inhibitors of metallo beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**; 46: 1880-6.
15. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **1991**; 35: 147-51.
16. Takahashi A, Yomoda S, Kobayashi I, et al. Detection of carbapenemase producing *A. baumannii* in a hospital. *J Clin Microbiol* **2000**; 38: 526-9.
17. Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, et al. Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *S. marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **1994**; 38: 71-8.
18. Hirakata Y, Izumikawa K, Yamaguchi H, et al. Rapid detection and evaluation of clinical characteristics of emerging multiple drug resistant Gram negative rods carrying the metallo beta-lactamase gene b1a(IMP). *Antimicrob Agents Chemother* **1998**; 42: 2006-11.
19. Riccio ML, Franceschini N, Boschi B, et al. Characterization of the metallo beta lactamase determinant of *A. baumannii* AC 54/97 reveals the existence of b1a(IMP) allele variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrob Agents Chemother* **2000**; 44: 1229-35.
20. Iyobe S, Kusadokoro H, Ozaki N, et al. Amino acid substitutions in a variant of IMP-1 metallo beta-lactamase. *Antimicrob Agent Chemother* **2000**; 44: 2023-7.
21. Tsakris A, Pournaras S, Woodford N, et al. Outbreak of infections caused by *P. aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. *J Clin Microbiol* **2000**; 38: 1290-2.
22. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, et al. Cloning and characterization of bla(VIM) a new integron borne metallo beta-lactamase gene from a *P. aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* **1999**; 43: 1584-90.
23. Poirel L, Lambert S, Turkoglu S, et al. Characterization of Class 1 integrons from *P. aeruginosa* that contain the b1a(VIM-2) carbapenem hydrolyzing beta-lactamase gene and of two novel aminoglycoside resistance gene cassettes. *Antimicrob Agents Chemother* **2001**; 45: 546-52.
24. Lombardi G, Luzzaro F, Docquier JD, et al. Nosocomial infections caused by multi drug resistant isolates of *Pseudomonas putida* producing VIM-1 metallo beta-lactamase. *J Clin Microbiol* **2002**; 40: 4051-5.
25. Yong D, Lee K, Yum JH, et al. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo beta-lactamase producing clinical isolates of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.* *J Clin Microbiol* **2002**; 40: 3798-801.
26. Migliavacca R, Docquier JD, Mugnaioli C, et al. Simple microdilution test for detecting of metallo beta-lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* **2002**; 40: 4388-90.
27. Walsh TR, Bolmstrom A, Qvarnstrom A, Gales A. Evaluation of a new E-Test for detecting metallo beta-lactamase in routine clinical testing. *J Clin Microbiol* **2002**; 40: 2755-9.
28. Lee K, Lim JB, Yum JH, et al. B1a (VIM-2) cassette containing novel integrons in metallo beta-lactamase producing *P. aeruginosa* and *P. putida* isolates disseminated in a Korean hospital. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**; 46: 1053-8.
29. Bellais S, Mimoz O, Leotard S, Jacolot A, Petitjean O, Nordmann P. Efficacy of beta-lactams for treating experimentally induced pneumonia due to carbapenem hydrolyzing metallo beta-lactamase producing strain of *P. aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**; 46: 2032-4.
30. Toraman ZA, Yakupogullari Y. Carbapenemase producing *P. aeruginosa* and ciprofloxacin use in neonatal intensive care units. *J Hosp Infect* **2003**; 54: 164-5.

İLETİŞİM

Prof. Dr. Zülal AŞÇI TORAMAN
Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
23100 ELAZIG
e-posta: zulalasci@yahoo.com