

## İMİPENEME DİRENÇLİ PSEUDOMONAS SUŞLARINDA SAPTANAN DİRENÇ MEKANİZMALARI\*

Arif KAYGUSUZ, Betigül ÖNGEN, Nezahat GÜRLER,  
Kurtuluş TÖRECİ

### ÖZET

İmipeneme dirençli bulunan 6 *Pseudomonas aeruginosa* ve 1 *Pseudomonas vesicularis* suşunun, izoelektrik noktalarına, kloksasilin ve klavulanik asitle inhibisyonuna bakılarak beta-laktamazları, ayrıca dış membrandaki D2 porin proteinleri incelenmiştir. 5 *P.aeruginosa* suşunda D2 porin yokluğu ile kromozomal beta-laktamaz dirençten sorumlu bulunmuş, D2 porini bulunan 1 *P.vesicularis* ve 1 *P.aeruginosa* suşunda, antibiyotiğin hücre dışına atılımının veya başka mekanizmaların dirençten sorumlu olabileceği düşünülmüştür.

### SUMMARY

*Resistance mechanisms in imipenem resistant Pseudomonas strains.*

In imipenem resistant 6 *P.aeruginosa* and 1 *P.vesicularis* strains, beta-lactamases with isoelectric focusing, inhibition profile with cloxacilin or clavulanic acid, and the outer membran D2 porin protein were investigated. Responsible resistance mechanisms were attributed to D2 porin deficiency and chromosomal beta-lactamases in 5 *P.aeruginosa* strains, whereas active efflux or other mechanisms were considered to be responsible for resistance in 1 *P.vesicularis* and 1 *P.aeruginosa* strains which had D2 porins.

### GİRİŞ

İmipenem, meropenem ve sadece Japonya'da kullanılan panipenem gibi karbapenemler bilinen en geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklerdir. Yeni sefalosporinler ve monobaktamlardan farklı olarak, AmpC beta-laktamazlardan ve plazmid kaynaklı genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlardan (GSBL) etkilenmezler. Bu nedenle birçok beta-laktam antibiyotiğe dirençli *Enterobacteriaceae* ve *Pseudomonas* türleri ile oluşan infeksiyonların tedavisinde özel bir öneme sahiptirler (14,15).

Metisiline dirençli stafilokoklar, *Enterococcus faecium*, *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* karbapenemlere dirençlidir. Karbapenem direnci *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* suşlarında giderek artmakta, diğer Gram negatif bakteri suşlarında ise oldukça düşük oranda saptanmaktadır (1,13,15).

Kromozomal mutasyon sonucu, imipenemin bakteri hücresine girişini sağlayan küçük çaplı D2 porininin kaybı *P.aeruginosa* suşlarında en önemli direnç mekanizmasıdır (13,15).

\*12. Antibiyotik ve Kemoterapi (ANKEM) Kongresi'nde sunulmuştur (2-6 Haziran 1997, Antalya).  
İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Çapa, İstanbul.

Bu çalışmada 1996 yılında çeşitli muayene maddelerinden izole edilen imipeneme dirençli 6 *P.aeruginosa* ve 1 *P.vesicularis* suşunda saptanan direnç mekanizmaları bildirilecektir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Klasik mikrobiyolojik yöntemlerle *P.aeruginosa* veya *Pseudomonas* cinsi olarak tanımlanmış ve NCCLS önerilerine göre yapılan disk difüzyon testi ile imipeneme ve meropeneme dirençli bulunan 7 suş, Zeneca İlaç Şirketinin İngiltere'deki Antibiyotik Geliştirme Merkezi'ne gönderilmiştir. Burada imipenem, meropenem ve seftazidimin bu suşlar için MIC'ları saptanmış, suşlardan elde edilen beta-laktamazlar izoelektrik noktalarına, kloksasilin ve klavulanik asit ile inhibisyona bakılarak tanımlanmış ve ayrıca dış mebrandaki porin proteinleri incelenmiştir.

## BULGULAR

Suşların 6'sı *P.aeruginosa*, 1'i *P.vesicularis* (9672 no'lu suş) olarak tanımlanmıştır. Tüm imipeneme, 3'ü meropeneme dirençli, 4'ü meropeneme orta derecede duyarlı bulunmuştur.

*P.aeruginosa* suşlarının izoelektrik noktaları  $pI > 7$  olan ve/veya kloksasilin ile inhibe olan kromozomal AmpC beta-laktamaz oluşturdukları saptanmıştır. *P.vesicularis* suşunun izoelektrik noktası  $pI: 7.35$  olarak saptanan beta-laktamazının diğer özellikleri belirlenememiştir. 5 *P.aeruginosa* suşunda D2 proteini bulunmadığı saptanmıştır. Bu suşlardan biri seftazidime orta derecede duyarlı, diğerleri duyarlı bulunmuştur. D2 porini bulunan 1 *P.aeruginosa* suşu ile yine D2 porini bulunan *P.vesicularis* suşu seftazidim, imipenem ve meropeneme dirençli bulunmuştur.

Sonuçlar tabloda gösterilmiştir.

Tablo. İmpeneme dirençli *Pseudomonas* suşlarının özellikleri.

Suş No.	MIC (mg/l)			D2 porin	pI	Beta-laktamaz
	İmpenem	Meropenem	Seftazidim			
1813	16	8	2	Yok	-	Kromozomal
48076*	32	8	16	Yok	8.06, 7.68, 6.48	Kromozomal
48547	32	32	8	Yok	-	Kromozomal
1568	32	8	2	Yok	-	Kromozomal
1031	32	8	2	Yok	8.15	Kromozomal
9672**	64	64	128	Var	7.35	?
9600	32	32	128	Var	8.3	Kromozomal

\* Yüksek düzeyde kromozomal beta-laktamaz oluşturan (dereprese mutant) suş.

\*\* *P.vesicularis* olarak tanımlanmıştır. Diğerleri *P.aeruginosa*'dır.

## TARTIŞMA

Bakterilerde karbapenem direnci tüm diğer antibiyotiklerde olduğu gibi intrinsik (doğal) veya sonradan kazanılmış olabilir.

Gram pozitif bakterilerden *Bacillus cereus*, Gram negatif bakterilerden *S.maltophilia*, *Flavobacterium odoratum* ve *Legionella gormanii* suşlarının tümü, ürettikleri beta-laktamazlar nedeniyle doğal olarak karbapenemlere dirençli olmakla birlikte, *S.maltophilia* dışındakiler klinik örneklerden seyrek olarak izole edilirler(1,11,13,22). *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* suşlarının çoğu muhtemelen karbapenemaz aktivitesi olan kromozomal ve iyi tanımlanmamış bir beta-laktamaz ile imipeneme intrinsik direnç gösterirler (13). *Aeromonas* cinsi bakteri suşlarının çoğu sefalosporinlere ve penisilinlere etkisiz olmaları nedeniyle nitrosefin ile saptanamayan ve “gerçek karbapenemaz” olarak adlandırılan beta-laktamaz üretmekle birlikte, klinikte kullanılan imipenem dozlarına genellikle direnç göstermezler (22). Anaerop bakterilerden *Bacteroides fragilis* suşlarının çok az (< %1) bir kısmında karbapenemaz saptanmaktadır (13,22). Tüm bu bakterilerin beta-laktamazları, Ambler sınıflamasında B grubunda, Bush sınıflamasında 3. grupta yer alırlar. EDTA ile inhibe olup, klavulanik asitle inhibe olmazlar. Aztroenamı hidrolize edemezler. İmipenemi ve meropenemi iyi hidrolize ederler. Çoğu penisilin ve sefalosporinleri de hidrolize ettiklerinden ve/veya doğal olarak karbapenemaz oluşturan suşlarda genellikle birden fazla beta-laktamaz bulunduğundan, bu suşların çoğu birçok beta-laktam antibiyotiğe de dirençli bulunurlar. Bu bakterilerin enzimleri aktif bölgesinde çinko iyonu bulunduğundan metallo-beta-laktamazlar, karbapenemleri de hidrolize ettiklerinden karbapenemazlar olarak adlandırılırlar. Bir *B.fragilis* izolatu dışında tüm bu bakterilerde enzimler kromozomda kodlanırlar (11,13,15,22).

Bu sayılanlar dışındaki bakterilerde karbapenem direnci sonradan kazanılır. Gram pozitif bakterilerden metisiline dirençli stafilokoklar PBP-2' ve *E. faecium* suşları PBP-5 gibi tüm beta-laktamlara afinitesi az olan penisilin bağlayan proteinleri ile karbapenemler dahil beta-laktam antibiyotiklere direnç kazanırlar (13).

Gram negatif bakteri suşlarında karbapenemlere karşı sonradan kazanılan direnç *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* suşları dışında çok seyrek (1,13). Gram negatif bakteriler kromozomda veya seyrek olarak plazmidde kodlanabilen beta-laktamazlar / karbapenemazlar, geçirgenlik azalması (1,4,7,12,13), antibiyotiğin aktif şekilde dışarı atılması (8,17) veya PBP'lerde oluşan değişiklik (3,5) gibi mekanizmaların tek başına veya birlikte bulunması ile karbapenemlere direnç kazanabilirler.

Gram negatif bakterilerde, karbapenemazlara bağlı olarak sonradan kazanılan direnç Japonya, İngiltere, ABD, Fransa, Arjantin, Brezilya ve Küba gibi ülkelerde izole edilen çok az sayıda *P.aeruginosa*, *A.baumannii*, *S.marcescens*, *E.cloacae* suşlarında ve bir *K.pneumoniae* suşunda saptanmıştır (1,15,22).

IMP-1 enzimi sonradan kazanılan karbapenemazlar içinde en önemlisidir ve bugüne dek sadece Japonya'da izole edilen suşlarda saptanmıştır (15). İlk kez 1991 yılında izole edilen bir *S.marcescens* suşunda (21), daha sonra *P.aeruginosa*, *S.marcescens* suşlarında kromozomda ve plazmidde kodlanan (7,14,15,22), bir *K.pneumoniae* suşunda da plazmidde kodlanan IMP-1 enzimi bildirilmiştir (22). *P.aeruginosa* suşlarında plazmidde kodlanan ama henüz karakterize edilmeyen enzimler (18, 26), IMP-1 ile benzerlik göstermektedir ve IMP-1 olarak tanımlanmaları güçlü bir olasılıktır. Enzimi kodlayan genin plazmidlerle *Enterobacteriaceae* ve *Pseudomonas*'lar arasında taşınabilmesi (7) ve integronla ilişkili bulunması (2) karbapenem direncinin çabucak yayılması gibi istenmeyecek bir olasılığı aklı getirmekte ve bu suşların karbapenemlerin kullanımı ile giderek yayılabileceği düşünülmektedir (15,22). IMP-1 Ambler sınıflamasında B grubunda, Bush sınıflamasında 3. grupta yer alır ve bu gruptaki enzimlerle benzer özellikler gösterir (22). Bu gruptaki enzimler aztroenama etkisiz olmakla birlikte, IMP-1 oluşturan

suşlar başka mekanizmalarla aztroenama genellikle dirençlidirler (15). Sonuçta IMP-1 oluşturan suşlar genellikle tüm beta-laktamlara ve eğer IMP-1 integron üzerinde taşınıyorsa AAC (6')-Ib enzimi nedeniyle tobramisin, netilmisin ve amikasin de dirençli bulunurlar (15). IMP-1 geni taşıyan suşların bir kısmı imipeneme duyarlı bulunabilmekte, bu da dirençte geçirgenliğin ve/veya genin ekspresyonunun da önemli olabileceğini düşündürmektedir (15).

IMI-1, NMC-A ve Sme-1 olarak adlandırılan enzimler bugüne kadar ABD, İngiltere ve Fransa'da izole edilen 3'er *Enterobacter cloacae* ve *S.marcescens*'ten olmak üzere toplam 6 suşta saptanmıştır (13,16,22). Sme-1 *S.marcescens*, NMC-A ve IMI-1 *E.cloacae* suşlarından izole edilmişlerdir (14,19,20,22,27). IMI-1 ve NMC-A genleri %90 homoloji göstermektedir. Bu genler Sme-1 ile %70 homoloji göstermektedir (22,23). Bu enzimler, Ambler sınıflamasında A grubunda, Bush sınıflamasında 2f grubunda yer alırlar. Aktif bölgelerinde serin bulunur ve serin beta-laktamazlar olarak adlandırılırlar. Kromozomda kodlanan bu (ekzotik!) enzimler moleküler ve fonksiyonel olarak birbirlerine benzerler; aztroenamı parçalar ve klavulanik asit ile inhibe olurlar. İmipenemi meropenemden daha iyi hidrolize ederler (13,16,22).

ARI-1 enzimi ilk kez İngiltere'de izole edilen bir *A.baumannii* suşunda saptanan ve plazmid üzerinde kodlanan, serin beta-laktamaz özelliğinde karbapenemazdır (24). Son yıllarda ARI-1'e benzeyen ARI-2 enzimi tanımlanmış, Arjantin, Küba ve Brezilya'da imipenemi hidrolize edebilen başka beta-laktamazlar da bildirilmiştir (1). *A.baumannii* suşlarında antibiyotiğin hücre içine alımında azalma (15) ve PBP'lerde oluşan değişikliğe bağlı (5) imipenem direnci de bildirilmiştir. Latin Amerika'da *Acinetobacter* suşlarında %35'lere varan imipenem direnci bildirilmektedir (1).

D2 porini imipenemin hücre içine girişini sağlar ve yaklaşık  $10^{-7}$  sıklığında oluşan kromozomal mutasyon sonucu D2 porininin kaybı, *P.aeruginosa* suşlarında imipenem direncinden sorumlu en önemli mekanizmadır (13,16). Porin kaybına bağlı imipenem direnci, böyle suşların stabil olmaması nedeniyle *Enterobacteriaceae*'de seyrek (13,15,16). Bu mekanizma ile tüm beta-laktamların MIC'u yükselmekle birlikte, D2 porini bulunmayan *P.aeruginosa* suşları, eğer başka direnç mekanizmaları birlikte bulunmuyorsa genellikle imipenem dışındaki antipsödomonas özellik gösteren beta-laktamlara duyarlı bulunurlar (13). D2 porinini kayben *P.aeruginosa* suşlarındaki imipenem direncinde, indüklenebilir kromozomal AmpC (tip-1) enzimlerinin de katkısı olmaktadır (12,13).

Çalışmamızda 7 suşun 5'inde D2 porini yokluğu ve kromozomal AmpC beta-laktamaz oluşturma imipenem direncinden sorumlu bulunmuştur. Bu suşların 4'ü seftazidime duyarlı bulunmuştur. Yine bu suşların 4'ünde kromozomal AmpC beta-laktamazlardan imipeneme oranla daha az etkilenen meropenemin MIC'u, Livermore (13) tarafından da bildirildiği gibi imipeneme göre 1-2 dilüsyon daha düşük bulunmuştur. D2 porini bulunan 2 suşta ise imipenem ve meropenem direnci antibiyotiklerin aktif dışarı atılımı ile açıklanabilir (8,13). Ancak aktif atılım ile meropenem ve birçok beta-laktamın MIC'u artarken imipenemin MIC'u değişmez (13) ve bu nedenle bu iki suş için doyurucu bir açıklama yapılması güçleşmektedir. Birçok antibiyotiğin *P.aeruginosa* suşlarında *Enterobacteriaceae* suşlarından daha yüksek MIC'u vermesi, önceleri bakterinin daha az geçirgen olması ile açıklanırken, bugün antibiyotiğin aktif şekilde hücre dışına atılmasının *P.aeruginosa* suşlarındaki bu göreceli intrinsik direncin en önemli nedeni olduğu düşünülmektedir (8,16). Aktif atılım birbirleriyle yapısal benzerlik göstermeyen birçok antibiyotiğe karşı dirençten sorumlu bir mekanizma olarak da önem kazanmaktadır (8,9,10).

Karadeniz Teknik Üniversitesi'nde izole edilen imipeneme dirençli 4 *P.aeruginosa* suşunda da D2 porini saptanmamış ve 3'ü meropeneme dirençli, 1'i ise orta derecede duyarlı bulunmuştur (28).

Kuzey Amerika'da 1988-1992 yıllarında 16 merkezden toplanan 1182 *P.aeruginosa* suşu ile yapılan bir çalışmada imipenem direnci %13, meropenem direnci %4 olarak bulunmuştur. İmipeneme dirençli bulunan 147 suşun %44'ü meropeneme duyarlı, %27'si orta derecede duyarlı; meropeneme dirençli bulunan 49 suşun ise %86'sı imipeneme dirençli olarak saptanmıştır. Meropenemin MIC'u genellikle imipeneminkinden daha düşük bulunmuştur. Meropenemin daha etkili bulunması, AmpC beta-laktamazlardan etkilenmemesi ve dış membrandan geçişinin D2 porini ile olmaması ile açıklanmıştır. Aynı çalışmada meropenemin klinik faz çalışması sırasında izole edilen ilave 92 suşun 4'ü imipeneme, 3'ü meropeneme dirençli bulunmuş, 92 suşun hiçbirinde karbapenemaz saptanmamıştır. Kuzey Amerika'da izole edilen dirençli suşlarda, karbapenemazlar dışında diğer çeşitli mekanizmaların karbapenem direncinden sorumlu olabileceği sonucuna varılmıştır (6).

İngiltere'de 1993 yılında izole edilen 1991 *P.aeruginosa* suşunda azlosilin, karbenisilin, seftazidim, imipenem ve meropeneme direnç araştırılmış, 4 mg/1 imipenem veya meropenem konsantrasyonlarına dirençli 59 suş saptanmıştır. Bu suşlardan 39'u imipeneme, 10'u meropeneme, 10'u imipeneme ve meropeneme dirençli bulunmuştur. Sadece imipeneme dirençli bulunan 39 suştan aşırı beta-laktamaz üretimi saptanmayan 27'sinde, meropenem dışında denenen beta-laktamların MIC'u imipeneme duyarlı suşlardaki gibi bulunmuş, meropenemin MIC'unda ise 2-3 kat artış saptanmıştır. Sadece imipeneme dirençli olan diğer 12 suşun aşırı beta-laktamaz üretmeyen 7'si intrinsik dirençli, 5'i ise aşırı beta-laktamaz üretimi (dereprese mutant) nedeniyle denenen penisilinlere ve sefalosporinlere dirençli bulunmuştur. Bu bulgularla suşlardaki imipenem direnci D2 porini yokluğu ile açıklanmıştır. Meropeneme dirençli bulunan 20 suştan aşırı beta-laktamaz üretmeyen 17'si denenen penisilinlere ve sefalosporinlere dirençli bulunmuştur. İki suşda aşırı beta-laktamaz üretimi (stabil dereprese mutant) saptanmış, bir suş ise diğer tüm beta-laktamlara duyarlı bulunmuştur. Meropenem direnci imipenem direncinden daha düşük bulunmakla birlikte, meropenem direnci anlamlı şekilde diğer beta-laktamlara dirençle birlikte bulunmuştur. Bu bulgular diğer beta-laktamlara direnç sağlayan intrinsik dirençten meropenemin de etkilendiğini düşündürmüştür (4).

Japonya'da 1992-1994 yıllarında izole edilen 3700 *P.aeruginosa* suşunun 132'sinde imipenem direnci saptanmış, IMP-1 probu ile hibridizasyon veren 15 suşta, imipenem direncinin aktarılabildiği belirlenmiştir (25). IMP-1 saptanmayan 117 suşda ise karbapenem direnci AmpC enzimlerinin yüksek düzeyde sentezi ile açıklanmıştır (1).

Az sayıda suşla yapılmış olmakla birlikte, elde ettiğimiz sonuçlar, *P.aeruginosa*'da karbapenem direncinin D2 porini yokluğuna ve kromozomal AmpC beta-laktamazlarına bağlı olduğunu ve ülkemizde de bu suşların bulunduğunu göstermektedir. İmipenem ile tedavi edilen hastaların %10-15'inde bu şekilde dirençli suşların seçildiği bildirilmektedir (6). Bu nedenle imipenem veya diğer karbapenemlerin gereksiz kullanımından kaçınılması gerekir.

TEŞEKKÜR : *P.aeruginosa* suşlarında karbapenemlere direnç mekanizmalarının araştırılmasını sağlayan Zeneca Abdi İbrahim İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş.'ye teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

- 1- Amyes SGB: Carbapenemases, *ANKEM Derg* 11: 221 (1997).
- 2- Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, Ito H, Wacharotayankun R, Ohsuka S, Kato H, Ohta M: A novel integron-like element carrying the metallo- $\beta$ -lactamase gene bla<sub>IMP</sub>. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 1612 (1995).
- 3- Bellido F, Veuthey C, Blaser J, Bauernfeind A, Pechere JC: Novel resistance to imipenem associated with an altered PBP-4 in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate, *J Antimicrob Chemother* 25: 57 (1990).
- 4- Chen HY, Yuan M, Livermore DM: Mechanisms of resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected in the UK in 1993, *J Med Microbiol* 43: 300 (1995).
- 5- Gehrlein M, Leying H, Cullmann W, Wendt S, Opferkuch W: Imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* is due to altered penicillin-binding proteins, *Chemotherapy* 37: 405 (1991).
- 6- Iaconis JP, Pitkin DH, Sheikh W, Nadler HL: Comparison of antibacterial activities of meropenem and six other antimicrobials against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from North American studies and clinical trials, *Clin Infect Dis* 24 (Suppl 2): S191 (1997).
- 7- Ito H, Arakawa Y, Ohsuka S, Wacharotayankun R, Kato N, Ohta M: Plasmid determined dissemination of the  $\beta$ -lactamase gene bla<sub>IMP</sub> among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*, *Antimicrob Agents Chemother* 39: 824 (1995).
- 8- Keith P: Bacterial multidrug resistance-emphasis on efflux mechanisms and *Pseudomonas aeruginosa*, *J Antimicrob Chemother* 34:453 (1994).
- 9- Li X-Z, Livermore DM, Nikaido H: Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin, *Antimicrob Agents Chemother* 38: 1732 (1994).
- 10- Li X-Z, Ma D, Livermore DM, Nikaido H: Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: active efflux as a contributing factor to  $\beta$ -lactam resistance, *Antimicrob Agents Chemother* 38: 1742 (1994).
- 11- Livermore DM: Carbapenemases, *J Antimicrob Chemother* 29:609 (1992).
- 12- Livermore DM: Interplay of impermeability and chromosomal  $\beta$ -lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrob Agents Chemother* 36: 2046 (1992).
- 13- Livermore DM: Bacterial resistance to carbapenems, "D L Jungkind (ed): *Antimicrobial Resistance: A Crisis in Health Care* " kitabinda s.25, Plenum Press, New York (1995).
- 14- Livermore DM:  $\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance, *Clin Microbiol Rev* 8: 557 (1995).
- 15- Livermore DM: Acquired carbapenemases, *J Antimicrob Chemother* 39:673 (1997).
- 16- Livermore DM, Williams JD:  $\beta$ -lactams: Mode of actions and mechanisms of bacterial resistance "V Lorian (ed): *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 4. baskı" kitabinda s.502, Williams and Wilkins, Baltimore (1996).
- 17- Masuda N, Sakagawa E, Ohya S: Outer membrane proteins responsible for multiple drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrob Agents Chemother* 39: 645 (1995).
- 18- Minami S, Akama H, Araki H, Watanabe Y, Narita H, Iyobe S, Mitsuhashi S: Imipenem and cephem resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying plasmids coding for class B  $\beta$ -lactamase, *J Antimicrob Chemother* 37:433 (1996).
- 19- Naas T, Vendel L, Sougakoff W, Livermore DM, Nordmann P: Cloning and sequence analysis of the gene for a carbapenem-hydrolysing class A  $\beta$ -lactamase, Sme-1, from *Serratia marcescens* S6, *Antimicrob Agents Chemother* 38: 1262 (1994).

- 20- Nordmann P, Mariotte S, Naas T, Labia R, Nicolas MH: Biochemical properties of a carbapenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamase from *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*, *Antimicrob Agents Chemother* 37: 939 (1993).
- 21- Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H, Yoshimura F, Kato N: Molecular characterization of an Enterobacterial metallo  $\beta$ -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance, *Antimicrob Agents Chemother* 38: 71 (1994).
- 22- Rasmussen BA, Bush K: Carbapenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamases, *Antimicrob Agents Chemother* 41: 223 (1997).
- 23- Rasmussen BA, Bush K, Keeney D, Yang Y, Hare R, O'Gara C, Medeiros AA: Characterization of IMI-1  $\beta$ -lactamase, a class A carbapenem-hydrolysing enzyme from *Enterobacter cloacae*, *Antimicrob Agents Chemother* 40: 2080 (1996).
- 24- Scaife W, Young HK, Paton RH, Amyes SGB: Transferable imipenem-resistance in *Acinetobacter* species from a clinical source, *J Antimicrob Chemother* 36: 585 (1995).
- 25- Senda K, Arakawa Y, Nakashima K, Ito H, Ichiyama S, Shimokata K, Kato N, Ohta M: Multifocal outbreaks of metallo- $\beta$ -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad spectrum  $\beta$ -lactams including carbapenems, *Antimicrob Agents Chemother* 40: 349 (1996).
- 26- Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S: Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrob Agents Chemother* 35: 147 (1991).
- 27- Yang Y, Wu P, Livermore DM: Biochemical characterization of a  $\beta$ -lactamase that hydrolyses penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates, *Antimicrob Agents Chemother* 34: 755 (1990).
- 28- Zeneca Abdi İbrahim İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş. : Kişisel yazışma (1996).