

BETA-LAKTAMAZE I NJIHOVA ULOGA U REZISTENCIJI

II. DIO: Beta-laktamaze u 21. stoljeću

BETA-LACTAMASES AND THEIR ROLE IN RESISTANCE PART 2: Beta-lactamases in 21st century

BRANKA BEDENIĆ*

Deskriptori: Beta-laktamaze – klasifikacija, metabolizam, antagonisti i inhibitori; Beta-laktamska rezistencija – genetika; Beta-laktamski antibiotici – farmakologija; Enzimski inhibitori – farmakologija; Gram-negativne bakterije – enzimologija, učinci lijekova

Sažetak. Rezistencija na β -laktamske antibiotike sve se više povećava, najviše zbog produkcije različitih β -laktamaza. Zbog mogućnosti da plazmidi akviriraju različite determinante rezistencije, sve više bolničkih bakterijskih izolata postaje rezistentno na velik broj različitih antibiotika. Najvažnije β -laktamaze koje ugrožavaju upotrebu β -laktamskih antibiotika u današnje su vrijeme β -laktamaze proširenog spektra, inhibitor-rezistentne TEM i SHV- β -laktamaze i karbapenemaze. Karbapenemaze su β -laktamaze koje hidroliziraju karbapeneme. Svrstane su u molekularne grupe A, B i C. Grupa A obuhvaća karbapenemaze osjetljive na inhibiciju klavulanskom kiselinom. Većina je kodirana kromosomski, ali neke od njih su i plazmidne kao KPC u *Klebsiella pneumoniae* i GES-2 u *Pseudomonas aeruginosa*. U grupi B su metalo- β -laktamaze iz IMP i VIM-serije. Karbapenemaze iz grupe D su najčešće u *Acinetobacter baumannii*, a uzrokuju rezistenciju na karbapeneme ako postoje i drugi mehanizmi rezistencije kao npr. promjene u porinima. Inhibitor-rezistentne β -laktamaze jedan su od najvažnijih uzroka rezistencije na β -laktam-inhibitorske kombinacije. Rezistencija na takve formulacije može biti također uzrokovana hiperprodukcijom TEM-1- β -laktamaze, modifikacijama proteina vanjske membrane ili produkcijom OXA- β -laktamaza. IRT-enzimi nastaju od parentalnih TEM-1 i TEM-2- β -laktamaza točkastim mutacijama u β -laktamaznome genu. Česta primjena β -laktamaznih inhibitora u bolnicama i u općoj medicini selekcionira sojeve s takvim mutacijama u hospitalnoj i izvanbolničkoj sredini.

Descriptors: Beta-lactamases – classification, metabolism, antagonists and inhibitors; Beta-lactam resistance – genetics; Beta-lactams – pharmacology; Enzyme inhibitors – pharmacology; Gram-negative bacteria – enzymology, drug effects

Summary. Resistance to β -lactam antibiotics continues to increase, mostly due to the presence of various β -lactamases. As a result of the ability of the plasmids to acquire additional resistance determinants, many of the β -lactamase producing pathogens became multidrug resistant. The most important β -lactamases which compromise the use of β -lactams nowadays are extended-spectrum β -lactamases, inhibitor-resistant TEM and SHV β -lactamases and carbapenemases. Carbapenemases are β -lactamases which hydrolyse carbapenems. They belong to molecular classes A, B, and D. Class A comprises carbapenemases sensitive to inhibition by clavulanic acid. Most of them are chromosomally encoded, but some of them are plasmid-mediated such as KPC-1 in *Klebsiella pneumoniae* and GES-2 in *Pseudomonas aeruginosa*. The class B carbapenemases are metallo- β -lactamases of the IMP or VIM group. The class D carbapenemases are the most frequent in *Acinetobacter baumannii* but confer resistance to carbapenems only if other resistance mechanisms such as porin alterations, are present. Inhibitor resistant β -lactamases are one of the most important causes of resistance to β -lactam-inhibitor combinations. The resistance to these formulations can be also due to hyperproduction of TEM-1 β -lactamase, modifications of the outer membrane proteins or production of OXA-type enzymes. IRT enzymes are derived from parental TEM-1 or TEM-2 β -lactamases by point mutations in the β -lactamase gene. The frequent use of β -lactamase inhibitors in hospitals and general practice pose a selection pressure which favours spread of such strains in hospitals and community.

Liječ Vjesn 2005;127:12–21

Uloga kromosomskih AmpC- β -laktamaza u rezistenciji na novije cefalosporine

Kromosomske β -laktamaze gotovo su ubikvitarnе kod enterobakterija osim kod salmonela, ali značajno variraju u količini, načinu produkcije i doprinosu rezistenciji.¹ Neke vrste imaju β -laktamaze koje spadaju u molekularnu grupu A, a neke u grupu C. Ekspresija može biti inducibilna, konstitutivna visokog stupnja ili konstitutivna niskog stupnja, što ovisi o vrsti i soju.^{2,3}

AmpC- β -laktamaze su kromosomske β -laktamaze koje su inducibilne u većine sojeva *Enterobacter* spp., *C. freundii*, *Serratia* spp., *Morganella morganii*, *Providencia* spp. i *P. aeruginosa*.^{4,5} Cefalosporini prve generacije, ampicilin i amoksisicilin induciraju AmpC- β -laktamaze i podložni su hidrolizi tim enzimima, pa su kao posljedica toga AmpC-inducibilni sojevi rezistentni. Cefalosporini treće generacije, cefuroksim, piperacilin i aztreonam su također labilni u prisutnosti tih β -laktamaza, ali su slabi induktori pa su zbog toga β -laktamaza-inducibilni sojevi osjetljivi ako ne postoje drugi mehanizmi rezistencije.⁶ Problem kod primjene cefalosporina kod bakterija s

inducibilnim AmpC- β -laktamazama jest selekcija dereprimiranih mutanata koji proizvode velike količine β -laktamaze neovisno o prisutnosti induktora kao rezultat genske mutacije. Takvi su mutanti rezistentni na gotovo sve peniciline i cefalosporine.⁷ Karbapenemi su jaki induktori AmpC- β -laktamaza, ali su stabilni u njihovoj prisutnosti, međutim mogu antagonizirati učinak cefalosporina i penicilina ako se primjenjuju zajedno s njima.⁸

Dereprimirani mutanti danas se sve češće pojavljuju u izolatima *Enterobacter* spp., *C. freundii* i *Serratia* spp. Njihova prevalencija je porasla s > 5% na 25 do 40% u većini bolnica u SAD-u^{4,5} i Europi.¹ Za to su odgovorni selekcija cefalosporinima širokog spektra i širenje sojeva u bolničkom ambijentu. Rizik selekcije dereprimiranih mutanata u toku terapije ovisi o tipu infekcije i uzročnom agensu. Najviši postotak hiperpro-

* Zavod za mikrobiologiju, ŠNZ »A. Štampar« (doc. dr. sc. Branka Bedenić, dr. med.)

Adresa za dopisivanje: Doc. dr. sc. B. Bedenić, Zavod za mikrobiologiju, ŠNZ »A. Štampar«, Rockefellerova 4, 10000 Zagreb

Primljeno 16. siječnja 2003., prihvaćeno 16. prosinca 2004.

ducenata se selekcionira tokom liječenja sepse koju uzrokuju *Enterobacter* spp.,⁹ zatim pneumonije,⁴ a vrlo malo kod infekcija urinarnog trakta zbog toga što koncentracije antibiotika na tim mjestima premašuju MIK za dereprimirane sojeve.⁴ Takvi izolati rezistentni su na većinu cefalosporina uključujući i treću generaciju, cefamicine, aminopeniciline i monobaktame. Osjetljivi su jedino na temocilin i karbapeneme. Cefepim i cefpirom obično zadržavaju umjerenu aktivnost koja se gubi u prisutnosti većeg inokuluma.^{1,10} Piperacilin i tikarcilin su slabije aktivni prema dereprimiranim mutantima nego prema inducibilnim sojevima, ali imaju manji potencijal selekcije dereprimiranih mutanata nego cefalosporini proširenog spektra.¹¹ Karbapenemi pokazuju podjednaku aktivnost prema dereprimiranim i inducibilnim organizmima i ne selekcioniraju dereprimirane mutante *in vivo* i *in vitro*. Oni mogu inducirati produkciju β -laktamaze, ali taj je efekt prolazan i ima terapijsko značenje jedino ako se karbapenemi primjenjuju zajedno s novijim cefalosporinima, što nije preporučljivo zbog antagonističkog učinka.¹ Klavulanska kiselina također djeluje kao induktor AmpC- β -laktamaza i može antagonizirati djelovanje partnerskog β -laktama kod bakterija s inducibilnom ekspresijom kromosomskih β -laktamaza.^{12,13} U terapiji infekcija uzrokovanih takvim organizmima preporučuje se primjena karbapenema, kinolona ili temocilina.¹

Kako se može prepoznati u laboratoriju AmpC-inducibilna enterobakterija? Najbolji je način precizna identifikacija vrste. Preporuka je da se *Enterobacter* spp., *C. freundii*, *Serratia* spp., *Providencia* spp. i *M. morgani* označe kao rezistentni na sve cefalosporine treće generacije, osim ako se radi o izolatima iz urina gdje se mogu postići visoke koncentracije cefalosporina.^{6,14} Objašnjenje za to je činjenica da AmpC-inducibilni organizam dobiven od bolesnika prije početka terapije može biti osjetljiv na cefalosporin, međutim prilikom kliničke primjene tih lijekova može doći do selekcije dereprimiranih mutanata i do terapijskog neuspjeha.¹⁵ Takva preporuka ne vrijedi za *P. aeruginosa* jer ta vrsta vrlo brzo mutira i postaje rezistentna i na alternativne lijekove kao što su karbapenemi i fluorokinoloni.⁶

AmpC-inducibilna vrsta može se jednostavno otkriti u laboratoriju s pomoću cefoksitin/cefotaksim disk-antagonističkog testa. Na ploču zasijanu testiranim sojem treba postaviti disk cefoksitina I disk cefotaksima na udaljenosti od 25 mm. Inducibilnost se može prepoznati na temelju suženja inhibicijske zone oko diska s cefotaksimom u smjeru prema cefoksitinskom disku.^{16,17} Budući da je klavulanska kiselina induktor AmpC- β -laktamaza, pojava sitnih kolonija unutar inhibicijske zone oko ko-amoksiklav diska može biti indikator.¹⁵

Karbapenemaze

Karbapenemi se razlikuju od penicilina po tome što imaju nezasićenu vezu između C2 i C3-atoma na poziciji 1 tiazolidinskog prstena. Oni se međusobno razlikuju po konfiguraciji postraničnog lanca na C2 i C6-atomu.¹⁸ Hidroksietilni lanac na položaju C6 u trans-konfiguraciji daje izrazitu stabilnost prema β -laktamazama. Njihova velika djelotvornost *in vitro* rezultat je dobre penetracije kroz vanjsku membranu gram-negativnih bakterija i visokog afiniteta za PBP-molekule.¹⁹ Vežu se za PBP-1 i PBP-2-molekule i izazivaju stvaranje sferoplasta i lizu stanica bez stvaranja filamenata. Najvažniji predstavnici su imipenem i meropenem. Meropenem je u odnosu na imipenem slabije aktivan prema gram-pozitivnim bakterijama, ali je zato djelotvorniji prema gram-negativnim bakterijama, posebno prema enterobakterijama, *P. aeruginosa*, *H. influenzae* i gonokokima. Prednost meropenema je i u tome što nije osjetljiv na dihidropeptidazu koja se nalazi na četkastoj membrani bubrenih tubula pa se može davati bez cilastatina.²⁰

Široki spektar karbapenema je posljedica i njihove izrazite stabilnosti prema β -laktamazama. Imipenem i meropenem su otporni na hidrolizu plazmidnim β -laktamazama grupe A, C i D uključujući i β -laktamaze proširenog spektra iz TEM i SHV-porodice, PER-1 i AmpC- β -laktamaze.¹ Imipenem je jak induktor kromosomskih β -laktamaza grupe I po Richmondu i Sykesu koje proizvode *E. cloacae*, *C.* i *P. aeruginosa*. Za razliku od cefoksitina i cefalosporina širokog spektra indukcija β -laktamaze ne utječe na njegovu djelotvornost *in vitro* budući da je otporan na hidrolizu induciranim enzimom.²⁰ Indukcija β -laktamaza uzrokuje antagonizam prema penicilinima i cefalosporinima ako se primjenjuje s njima u kombinaciji.

Dereprimirani mutanti koji proizvode konstitutivno velike količine β -laktamaze zbog genske mutacije obično su rezistentni na peniciline i cefalosporine širokog spektra, ali zadržavaju osjetljivost prema imipenemu. To je posljedica brze penetracije kroz vanjsku membranu i stabilnosti prema β -laktamazama.¹⁹ Zbog toga klinička upotreba imipenema nije dovela do rezistencije na taj antibiotik kod enterobakterija. Međutim rezistencija na imipenem se pojavljuje kod *P. aeruginosa* tokom terapije kao rezultat promjena u permeabilnost, a ne zbog hidrolize β -laktamazama.²¹

Otpornost karbapenema prema β -laktamazama nije potpuna. Metallo- β -laktamaze molekularne grupe B koje sadržavaju cink kao kofaktor mogu hidrolizirati karbapeneme. Njih nalazimo u izolatima *P. aeruginosa* i *Stenotrophomonas maltophilia*. Prvi takav enzim nazvan je IMP-1 i prvi put je opisan kod *P. aeruginosa*,²² da bi kasnije bio pronađen i kod *S. marcescens* i kod *K. pneumoniae*.²³ On dovodi do rezistencije na sve β -laktame osim monobaktama. Karbapenemaze koje uzrokuju stećenu rezistenciju na karbapeneme spadaju u grupe A, B i D po Ambleru.²⁴ U grupi A nalaze se karbapenemaze koje su inhibirane klavulanskom kiselinom, a pojavljuju se rijetko. Pripadaju u grupu 2f po K. Bush.³ Mogu biti kodirane kromosomski kao NMC-A, Sme-1, Sme-2, Sme-3 i IMI-1 u *E. cloacae* i *S. marcescens*²⁵ ili plazmidno kao KPC-1 u *K. pneumoniae*²⁶ ili GES-2 u *P. aeruginosa*.²⁷ NMC-A je bila prva karbapenemaza iz grupe A izolirana iz kliničkog izolata *E. cloacae* 1990. u Francuskoj.²⁸ Bolesnik je dobio prethodno imipenem. Izolat je pokazivao smanjenu osjetljivost na imipenem, aztreonam i u manjoj mjeri meropenem, a zadržao je potpunu osjetljivost na cefalosporine proširenog spektra. NMC-A signifikantno hidrolizira amino i karboksipeniciline, cefalotin, imipenem i aztreonam. Njegova je aktivnost djelomično inhibirana klavulanskom kiselinom, tazobaktamom i sulbaktamom. NMC-A pokazuje srodnost s penicilinazama proširenog spektra iz TEM i SHV-porodice. NMC-A-gen je kodiran kromosomski, a ekspresija je inducibilna.²⁹

SME-1- β -laktamaza identificirana je iz dva klinička izolata *S. marcescens* u Londonu prije nego što su se pojavili karbapenemi na tržištu.³⁰ Sojevi su bili rezistentni na amino, karboksi i ureidopeniciline, rane cefalosporine, imipenem i aztreonam. Iako SME-1 dijeli samo 68% aminokiselinskog identiteta s NMC-A po supstratnom profilu vrlo su slični.³¹ Moguće je da su izolati *S. marcescens* koji sadržavaju *bla*_{SME}-gen podvrste *S. marcescens* koje prirodno sadržavaju te determinante rezistencije. Nedavno su se pojavile SME-2 i SME-3- β -laktamaze koje su nastale točkastim mutacijama od SME-1, a proširene su u pojedinim dijelovima SAD-a.³²

IMI-1 je kromosomski kodirana karbapenemaza iz grupe A po Ambleru pronađena u izolatima *E. cloacae* iz južne Kalifornije.³³ IMI-1 ima 95% aminokiselina identičnih s NMC-A, inducibilna je i ima sličan supstratni profil.³⁴

KPC-1 je novi enzim grupe A izoliran iz sojeva *K. pneumoniae* iz SAD-a koji su bili rezistentni na karbapeneme, cefalosporine proširenog spektra i aztreonam.^{26,34} KPC-1 je osjetljivija na inhibiciju klavulanskom kiselinom i tazobaktamom od ranije

navedenih enzima, a ekspresija joj nije inducibilna. KPC-1 pokazuje slabo izraženu aminokiselinsku srodnost s ostalim karbapenemazama iz grupe A.^{34,35} Hidrolizira peniciline, prvu i drugu generaciju cefalosporina, aztreonam i karbapeneme (meropenem jednako kao imipenem). Za razliku od ostalih karbapenemaza iz ove skupina kodirana je plazmidno, a plazmid sadržava i ESBL-gen.³⁵

GES-2-β-laktamaza nastala je točkastom mutacijom od β-laktamaze proširenog spektra GES-1. GES-2-β-laktamaza otkrivena je u izolatu *P. aeruginosa* iz Južne Afrike.^{27,36} Hidrolitička aktivnost tog enzima prema karbapenemima slabije je izražena u odnosu na ostale karbapenemaze iz grupe A. Soj je bio rezistentan na cefalosporine proširenog spektra, a umjeren osetljiv na karbapeneme. Gen za tu β-laktamazu kodiran je samoprenosivim plazmidom od 100 kb.³⁴

Karbapenemaze iz grupe A mogu se razlikovati od metalo-β-laktamaza iz grupe B po tome što izazivaju veći stupanj rezistencije na imipenem nego na meropenem (MIK je obično niži od prijelomne točke), izražena je rezistencija na aztreonam, ali ne na cefalosporine treće generacije i osetljive su na inhibiciju klavulanskom kiselinom.^{36,37} Iako su karbapenemaze u grupi A stečene i nisu tipične za vrstu, njihovi su geni integrirani u kromosom i nisu samoprenosive. U većini slučajeva sojevi koji ih proizvode izolirani su prije nego što su karbapenemi došli u kliničku upotrebu. Zbog toga ti enzimi ne predstavljaju veliku prijetnju kao metalo-β-laktamaze iako se ne može isključiti mogućnost prijelaza njihovih gena na prenosive genske elemente kao što su plazmidi i transposoni.³⁷ Podjela karbapenemaza iz grupe A prikazana je na tablici 1.

Grupa B obuhvaća klinički najvažnije karbapenemaze. To su metalo-β-laktamaze iz IMP ili VIM-serije. One su se pojavile u cijelome svijetu, ali najviše izvještaja ima iz Europe,³⁸⁻⁴¹ jugoistočne Azije⁴² i Japana.⁴³ Geni koji ih kodiraju nalaze se na plazmidima i integronima, a mogu hidrolizirati gotovo sve β-laktame osim aztreonama. Opisane su i epidemije nozokomijalnih infekcija uzrokovanih organizmima koji proizvode metalo-β-laktamaze.³⁴

IMP-1 je prva karbapenemaza iz te skupine pronađena u Japanu 1991. u kliničkom izolatu *S. marcescens*. Ona kao i većina metalo-β-laktamaza ima vrlo širok supstratni profil koji uključuje cefalosporine treće i četvrte generacije i karbapene-

me (imipenem, meropenem, panipenem). Jedino monobaktami ne podliježu hidrolizi. To su enzimi koji imaju cink kao kofaktor i zbog toga je njihova aktivnost inhibirana s EDTA, a ne klavulanskom kiselinom, sulbaktamom ili tazobaktamom.^{34,44} Kasnije je IMP-1-β-laktamaza utvrđena i kod ostalih enterobakterija,³⁴ kod *P. aeruginosa*,⁴⁵ *Pseudomonas cepacia*,⁴⁶ *Pseudomonas putida*⁴⁷ i *Acinetobacter baumannii*.^{47,48} To upućuje na horizontalni prijenos *bla*_{IMP}-gena posebno između *P. aeruginosa* i *S. marcescens*. *bla*_{IMP}-geni obično su locirani na velikim samoprenosivim plazmidima kod enterobakterija.⁴⁶ Utvrđeno je da izolati *P. aeruginosa* koji sadržavaju *bla*_{IMP}-gen pokazuju različite fenotipove rezistencije. Neki su rezistentni, a neki osetljivi na karbapeneme. Za to postoje dva objašnjenja. Prvo da rezistencija zahtijeva još jedan faktor – najčešće impermeabilnost, i drugo da ne dolazi uvijek do sinteze aktivnog enzima u prisutnosti *bla*_{IMP}-gena.^{49,50} Ako postoji funkcionalan IMP-1-enzim, izražena je rezistencija na karbapeneme, peniciline i cefalosporine koja se ne može ponovno uspostaviti ni s jednim postojećim inhibitorom. Iako je aztreonam otporan na hidrolizu tim enzimom, sojevi koji ga proizvode često imaju dodatne mehanizme rezistencije na taj antibiotik.^{51,52} Aminoglikozidi su također često nedjelotvorni jer integroni koji sadržavaju *bla*_{IMP-1} često determiniraju i acetyl-transferazu koja razgrađuje aminoglikozide.⁵³

IMP-2-β-laktamaza pronađena je u izolatu *A. baumannii* u Italiji 1997.⁵⁴ Gen koji ju kodira nalazi se na integronu koji sadržava i gene rezistencije na aminoglikozide.³⁴

IMP-3-β-laktamaza identificirana je iz izolata *Shigella flexneri* iz Japana.⁵⁵ Razlikuje se u dvije aminokiseline od IMP-1. IMP-3 ne hidrolizira značajno benzilpenicilin, ampicilin, cefotazidim i imipenem. Zbog toga se smatra da je ona progenitor IMP-1-β-laktamaze.⁵⁶ Otkriće IMP-3 β-laktamaze u *S. flexneri* upućuje na širenje metalo-karbapenemaza među izvanbolničkim patogenima.³⁴

IMP-4 je β-laktamaza nađena u izolatu *Acinetobacter* iz hemokultura iz Hong Konga u periodu između 1994. i 1998.⁵⁷ Ti izolati bili su rezistentni na većinu β-laktama uključujući i imipenem. IMP-4 je nađena i u izolatu *Citrobacter youngae* iz 1998. također iz Hong Konga. Gen koji kodira tu β-laktamazu nalazi se na plazmidu i može se prenijeti konjugacijom s *C. youngae* na *E. coli*.⁵⁸

Tablica – Table 1. Karbapenemaze iz grupe A po Ambleru / Carbapenemases belonging to class A according to Ambler

Tip karbapenemaze Type of carbapenemase	Supstratni profil / Substrate profile				Lokacija β-laktamaznog gena Location of β-lactamase gene	Inhibicija klavulanatom Inhibition by clavulanic acid	Inhibicija s EDTA Inhibition by EDTA	Vrsta-domaćin Host-species	Zemlja podrijetla Country of origin	Referenca Reference
	Karboksipenicilini Carboxypenicillins	Novi cefalosporini ¹ New cephalosporins	Karbapenemi Carbapenems	Aztreonam						
NMC-a	R	S	I/R ²	R	kromosom chromosome	+/-	-	<i>E. cloacae</i>	Francuska France	28
SME-1	R	S	I/R	R	kromosom chromosome	+	-	<i>S. marcescens</i>	Ujedinjeno Kraljevstvo United Kingdom	30
SME-2	R	S	I/R	R	kromosom chromosome	+	-	<i>S. marcescens</i>	SAD United States	32
SME-3	R	S	I/R	R	kromosom chromosome	+	-	<i>S. marcescens</i>	SAD United States	32
IMI-1	R	S	I/R	R	kromosom chromosome	+	-	<i>E. cloacae</i>	SAD United States	33
KPC-1	R	R	R	R	plazmid plasmid	+	-	<i>K. pneumoniae</i>	SAD United States	26
GES-2	R	S	I	R	plazmid plasmid	+	-	<i>P. aeruginosa</i>	Južna Afrika South Africa	27

¹ Cefalosporini treće i četvrte generacije/Cephalosporins of third and fourth generation

² MIK imipenema je značajno viši nego meropenema/MIC of imipenem significantly higher than of meropenem

R – rezistentan/resistant; S – osetljiv/susceptible; I – umjeren osetljiv/intermediate susceptible

IMP-5- β -laktamaza je otkrivena u Portugalu u izolatu *A. baumannii*.³⁴

IMP-6-metalo- β -laktamaza izolirana je iz *S. marcescens* iz urina u Japanu 1996.⁴³ Razlikuje se od IMP-1 u samo jednoj aminokiselini. Soj je bio rezistentan na gotovo sve β -laktamske antibiotike uključujući piperacilin, piperacilin/tazobaktam, cefalosporine treće i četvrte generacije, aztreonam i karbapeneme. MIK-ovi meropenema i panipenema bili su viši nego imipenema. Enzim je pokazivao snažnu hidrolitičku aktivnost prema karbapenemima, ali smanjenu aktivnost prema penicilinima iako je soj bio rezistentan i na te antibiotike zbog dodatne TEM-1- β -laktamaze. *Bla*_{IMP-6}-gen bio je lociran na plazmidu.⁴³

IMP-7- β -laktamaza otkrivena je u izolatu *P. aeruginosa* koji je bio izvor hospitalne epidemije na Tajlandu.³⁴

IMP-8- β -laktamaza nađena je u izolatu *K. pneumoniae* iz Tajvana koji je sadržavao još i SHV-12 i TEM-1- β -laktamazu. Soj je pokazivao visok stupanj rezistencije na sve β -laktamske antibiotike uključujući i karbapeneme, s tim da je MIK meropenema bio znatno viši nego imipenema. Aztreonam je također imao visok MIK, što je vjerojatno posljedica prisutnosti dodatne SHV-12- β -laktamaze. IMP-8 razlikuje se od IMP-2 u dvije aminokiseline, a gen koji ju kodira lociran je na integronu.⁵⁹ Taj je enzim kasnije otkriven i u izolatu *Enterobacter cloacae* također iz Tajvana,⁶⁰ a opisane su i epidemije nozokomijalnih infekcija na Tajvanu koje su bile uzrokovane izolatima *K. pneumoniae*, producentima IMP-8- β -laktamaze.⁶¹ IMP-12- β -laktamaza opisana je prvi put u Italiji u kliničkom izolatu *P. putida* iz urina. Enzim je bio kodiran neprenosivim plazmidom od 50 kb. Ta β -laktamaza dobro hidrolizira cefalosporine i karbapeneme dok su temocilin i aztreonam otporni prema tom enzimu.⁶²

Druga važna skupina metalo- β -laktamaza nalazi se u porodici VIM. VIM-1 je prva β -laktamaza iz te grupe, a izolirana je iz izolata *P. aeruginosa* iz Verone 1997.⁶³ Iako ima samo 30% aminokiselina zajedničkih s IMP- β -laktamazama, pokazuje sličan supstratni profil koji uključuje sve β -laktame osim aztreonama. *Bla*_{VIM-1}-gen nalazi se na integronu koji je sadržavao i gen za aminoglikozid-acetiltransferazu. Opisane su epidemije hospitalnih infekcija u Italiji uzrokovanih izolatima *P. aeruginosa*⁶⁴ i *P. putida*⁶⁵ koji produciraju VIM-1- β -laktamazu. Nedavno je *bla*_{VIM-1}-gen pronađen i u izolatu *Achromobacter xylosoxydans* iz iste bolnice u kojoj je prvi put opisana VIM-1- β -laktamaza. Gen se nalazio na nekonjugativnom plazmidu od 30 kb koji je također sadržavao gene rezistencije na aminoglikozide.

VIM-2- β -laktamaza identificirana je iz izolata *P. aeruginosa* iz hemokulture od neutropeničnog bolesnika iz Marseilleja.⁶⁶ Izolat je bio rezistentan gotovo na sve β -laktame uključujući ceftazidim, cefepim i imipenem, dok je zadržao osjetljivost na aztreonam. U periodu između 1996. i 1998. izolirano je još 20 izolata *P. aeruginosa* i s VIM-2- β -laktamazom s različitih odjela iz iste bolnice.³⁴ Budući da se taj dio Francuske nalazi blizu Italije, može se zaključiti da se radi o regionalnom širenju sojeva *P. aeruginosa* koji proizvode tu β -laktamazu.³⁴ VIM-2 je usko srodan s VIM-1 i sadržava 90% aminokiselina zajedničkih s tim enzimom. VIM-2 je nađen kasnije i u izolatu *P. aeruginosa* iz Pariza, a gen za taj enzim bio je lociran na integronu koji je sadržavao i dva nova gena rezistencije na aminoglikozide.⁶⁷ VIM-2- β -laktamaza nedavno je nađena i u *C. izolat* *freundii* iz Tajvana⁶⁰ i u izolatu *E. cloacae* dobivenom iz peritonealnog eksudata od bolesnika s cirozom jetre iz Južne Koreje,⁶⁸ a postoji izvještaj i o pojavi VIM-2- β -laktamaze iz izolata *P. aeruginosa* u Hrvatskoj.⁴² Svi navedeni izolati pokazivali su sličan fenotip rezistencije prema β -laktamskim antibioticima. Analiza kinetičkih parametara pokazala je da oba enzima pokazuju visok afinitet prema karbapenemskim supstratima i visoku hidrolitičku aktivnost, dok je brzina hidrolize ce-

falosporina varijabilna. VIM-2 je u odnosu na VIM-1 osjetljivija na kelatore kao što je EDTA (etilen-diamin-tetraoctena kiselina), što upućuje na to da su cinkovi ioni kod VIM-2 labavije vezani na enzim.⁶⁹

VIM-3 je nedavno otkrivena β -laktamaza iz VIM-serije iz kliničkih izolata *P. aeruginosa* s Tajvana. Sojevi su imali visoke MIK-ove ureidopenicilina, cefalosporina treće generacije i karbapenema, s tim da je MIK imipenema bio viši nego meropenema. MIK aztreonama bio je nizak osim kod nekoliko izolata koji su vjerojatno imali neke druge mehanizme rezistencije na taj antibiotik. Ta β -laktamaza bila je kodirana kromosomski.⁷⁰ VIM-4- β -laktamaza opisana je nedavno u izolatima *K. pneumoniae* i *E. cloacae* u Italiji kod bolesnika koji je prethodno dobivao terapiju karbapenemima.⁷¹

U grupi B nedavno je opisana i jedna nova β -laktamaza koja nije srodna s plazmidnim β -laktamazama iz IMP i VIM-serije. Naziva se JOHN-1, a izolirana je iz bakterije *Flavobacterium johnsoniae*. Enzim je izazivao rezistenciju na amino i ureidopeniciline, cefalosporine uskog i proširenog spektra i cefamicine. MIK-ovi karbapenema bili su samo neznatno povišeni. Aztreonam je otporan na hidrolizu tim enzimom, iako je soj *F. johnsoniae* bio rezistentan i na taj antibiotik. Međutim rezistencija nije bila prenosiva na recipijent pa se smatra da je uzrokovana nekim drugim mehanizmom, a ne samim enzimom. JOHN-1- β -laktamaza osjetljiva je na inhibiciju s EDTA, ali ne s klavulanskom kiselinom, kao i sve metalo- β -laktamaze.⁷² Biokemijski je srodna metalo- β -laktamazama koje proizvode *Chryseobacterium meningosepticum* i *Chryseobacterium indologenes*. Ima epidemiološko značenje kao rezervoar metalo- β -laktamaza gena u okolišu.⁷³ Metalo- β -laktamaze koje inaktiviraju imipenem pronađene su i kod *Bacillus cereus* i *Flavobacterium odoratum*. *Bacteroides fragilis* posjeduje nekoliko različitih karbapenemaza. β -laktamaze grupe B kodirane su na kromosomu (Cca-gen) kod 2 do 3% izolata *B. fragilis* iako manje od pola tih sojeva producira značajne količine enzima. Obilna ekspresija Cca-gena zahtijeva inkorporaciju insercijske sekvencije uz β -laktamazni gen tako da je opasnost od širenja sojeva koji hiperproduciraju tu β -laktamazu zasad ograničena. SPM-1- β -laktamaza nedavno je opisana u kliničkom izolatu *P. aeruginosa* u Brazilu, preferira cefalosporine kao supstrat i pokazuje strukturnu srodnost s IMP- β -laktamazama.⁷⁴ Podjela metalo- β -laktamaza prikazana je na tablici 2.

U grupi D nalaze se karbapenemaze koje se sve češće pojavljuju u *A. baumannii*, ali slabo utječu na osjetljivost prema imipenemu i meropenemu. Budući da su MIK-ovi karbapenema samo neznatno povišeni, te β -laktamaze često ostaju neprepoznate.⁷⁵ Te β -laktamaze spadaju u oksacilinaze³⁴ i opisane su u različitim dijelovima svijeta. OXA-23 (ARI-1) potječe iz Škotske,⁷⁵ OXA-24⁷⁶ i OXA-25⁷⁷ iz Španjolske, OXA-26⁷⁷ iz Belgije i OXA-27 iz Singapura.⁷⁷ Hidrolitička svojstva oksacilinaza su slična. One slabo hidroliziraju imipenem i meropenem i ne razgrađuju cefalosporine proširenog spektra i aztreonam. Njihova aktivnost inhibirana je klavulanskom kiselinom osim kod OXA-23, dok su rezistentne na inhibiciju metalnim kelatorima kao što je EDTA. OXA-24 i OXA-27 hidroliziraju benzilpenicilin i cefalosporine, dok je hidroliza oksacilina i kloksacilina nemjerljiva.³⁴ Ti enzimi izazivaju rezistenciju na karbapeneme jedino ako postoji i neki drugi mehanizam, npr. impermeabilnost ili efluks.⁷⁸ Rezistencija na karbapeneme u te se vrste može pojaviti i zbog mutacije ciljnih molekula.^{79,80} Klasifikacija oksacilinaza prikazana je na tablici 3.

Za fenotipsku detekciju metalo- β -laktamaza u rutinskom laboratoriju preporučuje se upotreba E-testa koji se bazira na redukciji MIK-a imipenema ili ceftazidima u prisutnosti EDTA ili 2-merkaptopropionske kiseline koji djeluju kao inhibitori te grupe β -laktamaza,⁸¹ a postoji i dvostruki disk-sinergistički test u kojem se rabe kelatori metalnih iona (EDTA) kao inhibitori β -laktamaza.^{82,83} Za detekciju metalo- β -laktamaza u *P.*

Tablica – Table 2. *Karbapenemaze iz grupe B po Ambleru / Carbapenemases belonging to class B according to Ambler*

Tip karbapenemaze Type of carbapenemase	Supstratni profil / Substrate profile Karboksipenicilini Carboxypenicillins				Novi cefalosporini ¹ New cephalosporins		Karbapenemi Carbapenems	Aztreonam	Lokacija β -laktamaznog gena Location of β -lactamase gene	Inhibicija klavulanatom Inhibition by clavulanic acid	Inhibicija s EDTA Inhibition by EDTA	Vrsta-domaćin Host-species	Zemlja podrijetla Country of origin	Referenca Reference
Grupa B/Class B														
IMP-1	R	R	R	S	plazmid/plazmid	–	+	<i>S. marcescens</i>	Japan	44				
IMP-2	R	R	R	S	plazmid/plazmid	–	+	<i>A. baumannii</i>	Italija/Italy	54				
IMP-3	R	R	R	S	plazmid/plazmid	–	+	<i>S. flexneri</i>	Japan	55				
IMP-4	R	R	R	S	plazmid/plazmid	–	+	<i>A. baumannii</i>	HongKong	57				
IMP-5	R	R	R	S	plazmid/plazmid	–	+	<i>A. baumannii</i>	Portugal	34				
IMP-6	R	R	R	S	plazmid/plazmid	–	+	<i>S. marcescens</i>	Japan	43				
IMP-7	R	R	R	S	plazmid/plazmid	–	+	<i>P. aeruginosa</i>	Tajland Thailand	34				
IMP-8	R	R	R	S	plazmid/plazmid	–	+	<i>K. pneumoniae</i>	Tajvan/Taiwan	59				
IMP-9	R	R	R	S	plazmid/plazmid	–	+	<i>P. aeruginosa</i>	Japan	34				
IMP-12	R	R	R	S	plazmid/plazmid	–	+	<i>P. aeruginosa</i>	Italija/Italy	62				
IM-1	R	R	R	S	plazmid/plazmid	–	+	<i>P. aeruginosa</i>	Italija/Italy	63				
IM-2	R	R	R	S	plazmid/plazmid	–	+	<i>P. aeruginosa</i>	Francuska France	66				
IM-3	R	R	R	S	kromosom chromosome	–	+	<i>P. aeruginosa</i>	Tajvan/Taiwan	70				
IM-4	R	R	R	S	plazmid/plazmid	–	+	<i>Enterobacter cloacae</i>	Italija/Italy	71				

R – rezistentan/resistant; S – osjetljiv/susceptible

Tablica – Table 3. *Oksacilinaze s aktivnošću karbapenemaza / Oxacillinases with carbapenemase activity*

Tip karbapenemaze Type of carbapenemase	Supstratni profil / Substrate profile Karboksipenicilini Carboxypenicillins				Novi cefalosporini ¹ New cephalosporins		Karbapenemi Carbapenems	Aztreonam	Lokacija β -laktamaznog gena Location of β -lactamase gene	Inhibicija klavulanatom Inhibition by clavulanic acid	Inhibicija s EDTA Inhibition by EDTA	Vrsta-domaćin Host-species	Zemlja podrijetla Country of origin	Referenca Reference
OXA-23 ARI-1)	R ²	S	I	S	Nije poznato Not known	–	–	<i>A. baumannii</i>	Škotska Scotland	75				
OXA-24	R	S	I	S	Kromosom Chromosome	+	–	<i>A. baumannii</i>	Španjolska Spain	76				
OXA-25	R	S	I	S	Nije poznato Not known	+	–	<i>A. baumannii</i>	Španjolska Spain	77				
OXA-26	R	S	I	S	Nije poznato Not known	+	–	<i>A. baumannii</i>	Belgija Belgium	77				
OXA-27	R	S	I	S	Nije poznato Not known	+	–	<i>A. baumannii</i>	Singapur Singapore	77				

¹ Cefalosporini treće i četvrte generacije/Cephalosporins of third and fourth generation; R – rezistentan/resistant; S – osjetljiv/susceptible; I – umjereno osjetljiv/intermediate susceptible

aeruginosa može se izvesti i mikrodilucijski test koji određuje MIK imipenema s EDTA i bez nje.⁸⁴

Rezistencija na karbapeneme najveći je problem kod *P. aeruginosa*. Treba naglasiti da osim karbapenemazama rezistencija na te antibiotike može biti uzrokovana gubitkom porina (najčešće OprD) i jače je izražena kod imipenema nego kod meropenema,^{85,86} multiantibiotskim efluksom uz pomoć sistema MexAB-OprM koji osim karbapenema obuhvaća i druge nesrodne antibiotike kao što su eritromicin, tetraciklini i gentamicin^{87,88} i hiperprodukcijom kromosomskih AmpC- β -laktamaza. Smatra se da je intrinzična rezistencija *P. aeruginosa* na β -laktame posljedica međudjelovanja različitih mehanizama rezistencije.⁸⁹

Inhibitor-rezistentne TEM i SHV-beta-laktamaze

Uloga inhibitora u terapiji

Plazmidne β -laktamaze širokog (TEM-1, TEM-2 i SHV-1) i proširenog spektra (derivati iz TEM i SHV-porodice) snažno

su inhibirane klavulanskom kiselinom i sulbaktamom. Prvo su se pojavile u *Klebsiella* spp., napose *Klebsiella pneumoniae* i *Klebsiella oxytoca*⁹⁰⁻⁹⁵ iako se mogu širiti i među ostale članove porodice *Enterobacteriaceae*^{92,96} budući da su geni koji ih kodiraju obično smješteni na plazmidima.⁹⁷ One su selekcionirane zahvaljujući porastu upotrebe cefalosporina pogotovo novijih generacija nakon 1980. Ti antibiotici stvoreni su da nadvladaju rezistenciju uzrokovanu β -laktamazama koja je ugrožavala upotrebu penicilina i starijih generacija cefalosporina. Mnoge klepsijele koje produciraju ESBL proširile su se u bolnicama i uzrokuju epidemije nozokomijalnih infekcija koje se vrlo teško liječe.^{98,99} One se obično uspješno liječe upotrebom fluorokinolona. Taj pristup nije doveo do porasta rezistencije na tu skupinu antibiotika među klepsijelama, ali je doveo do promjena u distribuciji vrsta koje uzrokuju hospitalne infekcije u bolnicama.¹⁰⁰ Zapažena je učestalija pojava kinolon-rezistentnih sojeva *Acinetobacter baumannii*¹⁰¹⁻¹⁰⁴ i enterokoka u bolničkim sredinama¹⁰⁵ gdje se obilno primjenjuju ti lijekovi. Na taj su način ESBL-pozitivne enterobakterije zamijenjene još opasnijim i podmuklijim multirezistentnim bak-

terijama tako da se postavlja pitanje bi li neke druge terapijske opcije bile povoljnije.

β -laktamaze proširenog spektra nastale su modifikacijom od uobičajenih TEM i SHV- β -laktamaza širokog spektra. One su prošle seriju mutacija na različitim mjestima u aktivnom središtu enzima čime se širi spektar ili mijenja afinitet vezanja enzima za pojedine cefalosporine.⁹⁵ Važan proces je širenje aktivnog centra što omogućuje većim cefalosporinskim molekulama da uđu u njega. Iako praktički svaka mutacija TEM ili SHV-jezgre povećava sposobnost hidrolize pojedinih cefalosporinskih supstrata, svaka pojedina mutacija pridonosi razlikama u fenotipskoj ekspresiji.⁹⁴ ESBL-derivati parentalnih TEM- β -laktamaza obično sadržavaju mutacije na položajima koji favoriziraju rezistenciju na cefazidim i ostale sporo penetrirajuće cefalosporine.⁹⁵ U pravilu, samo nakon multiplih mutacija enzim uzrokuje značajnu rezistenciju na cefotaksim i ostale brzo penetrirajuće cefalosporine.^{94,95} ESBL-derivati SHV-enzima svi imaju aminokiselinsku supstituciju na položaju 238 koja pridonosi visokom stupnju rezistencije prema brzo penetrirajućim cefalosporinima.⁹⁷ U mnogim područjima TEM-derivati dominiraju i smatra se da je upotreba brzo penetrirajućih cefalosporina manje učinkovita u selekciji ESBL-pozitivnih klesijela u odnosu na sporo penetrirajuće agense. Čini se da što je brži pristup cefalosporina PBP-molekulama, manja je mogućnost dobivanja proširenog spektra mutacijama.⁹⁶ To nije još dokazano, ali široka upotreba brzo prodirućih dvoionskih cefalosporina cefepima i cefpiroma može objasniti problem. Zasad se smatra da je bolje primijeniti cefotaksim ili ceftriakson jer je manja mogućnost izazivanja mutacija koje dovode do proširenog spektra enzima, a izbjegavati cefazidim.

Progresija mutacija u genu β -laktamaza potrebnih za postizanje proširenog spektra reducira vezanje amoksicilina i snižava MIK tog antibiotika. Druga općenita karakteristika je da mutacije povećavaju vezanje klavulanske kiseline.^{106,107} To znači da je trostupanjka mutacija kao npr. kod TEM-5- β -laktamaze mnogo manje kompetitivna u prisutnosti ko-amoksiklava nego progenitorski enzimi. Čak je dokazano da kod TEM-5 producirajućih bakterija u prisutnosti ko-amoksiklava dolazi do reverzije u TEM-1.¹⁰⁶

Upravo zbog uloge cefalosporina u selekciji ESBL-pozitivnih sojeva danas se ponovno sve više pribjegava primjeni amoksicilina u kombinaciji s antibiotikom iz neke druge skupine za empirijsku terapiju kod izvanbolničkih pneumonija. Isto tako i u kirurgiji se ponovno prešlo na upotrebu amoksicilina kombiniranog s gentamicinom.

Parenteralni cefalosporini masovno se primjenjuju u bolnicama, ali kod izvanbolničkih pacijenata dominira primjena amoksicilina samog ili u kombinaciji s klavulanskom kiselinom. To objašnjava zbog čega se ESBL-pozitivne bakterije rijetko javljaju u izvanbolničkoj sredini u kojoj dominira selektivni utjecaj amoksicilina. Ta se situacija međutim u današnje vrijeme mijenja jer se pojavljuju oralni cefalosporini novijih generacija, npr. ceftributen, cefetamet, cefdinir, cefiksime i rabe se za liječenje respiratornih infekcija koje uzrokuje β -laktamaza-pozitivni *H. influenzae* ili *M. catarrhalis*. Neki od njih se ponašaju kao sporo prodorni parenteralni cefalosporini¹⁰⁸ i djeluju kao snažni selektori mutacija na aminokiselinskim ostacima 164, 240 i 104 u molekuli TEM- β -laktamaze. Čak i ako ne selekcioniraju navedene mutacije, omogućuju preživljavanje sojevima koji ih imaju. Negativna strana cefalosporina treće generacije je i njihov slab učinak na penicilin-rezistentne pneumokoke.¹⁰⁹

Ko-amoksiklav bi se mogao rabiti umjesto cefalosporina, ali problem kod takvog pristupa je što visokoadaptibilna TEM-1-molekula može doživjeti niz pojedinačnih mutacija koje uzrokuju rezistenciju na inhibitore. Te mutacije uzrokuju ami-

nokiselinsku supstituciju na položaju Arg244 ili Met69¹¹⁰ i rezultat primjene ko-amoksiklava može biti nastajanje inhibitor-rezistentnih TEM- β -laktamaza (IRT). Identifikacija TEM mutacija nakon izlaganja ESBL-pozitivnih bakterija ko-amoksiklavu vrlo je teška. Te su mutacije u svijetu nađene u oko 10% ESBL-pozitivnih hospitalnih sojeva *E. coli*.¹¹¹ Ako bakteriju koja sadržava IRT sa supstitucijom na položaju Arg244 izložimo cefalosporinima, favorizirane su mutacije koje vraćaju mutiranu TEM-molekulu natrag u originalnu TEM-1- β -laktamazu.¹¹² Iz toga proizlazi da cefalosporini i inhibitori β -laktamaza imaju suprotan učinak u selekciji mutacija u TEM-molekuli. Rješenje tog problema moglo bi biti u povezivanju cefalosporina s inhibitorom β -laktamaza. Kombinacija cefepirazona i sulbaktama već je u kliničkoj upotrebi u SAD-u. U Velikoj Britaniji sulbaktam je dostupan jedino u kombinaciji s ampicilinom i ima samo ograničenu primjenu. U Francuskoj je sulbaktam dostupan kao pojedinačni agens tako da se može kombinirati s novijim cefalosporinima prema odabiru liječnika. Obično se kombinira s brzo prodornim cefalosporinima i to bi moglo najšire pokriti sve mutacije. Sulbaktam je posebno djelotvoran i protiv *Acinetobacter baumannii*.¹¹³ Postoje dva argumenta protiv kombinacija cefalosporina sa sulbaktamom. Prvi je da efikasnost inhibitora u velikoj mjeri ovisi o komparativnoj farmakokinetici partnerskog β -laktama. Važno je da inhibitor dostigne bakterijsku stanicu u isto vrijeme kao i partnerski β -laktamski antibiotik. Druga je zamjerka da takva kombinacija proizvodi paralelne mutacije u TEM i SHV-jezgru. Oba tipa mutacija već su pronađena zajedno u TEM-molekuli i dovode do umjerenog stupnja rezistencije na oba cefalosporina i inhibitor.¹¹⁴ Enzim je zadržao prošireni spektar koji dominira nad rezistencijom na inhibitor.¹¹⁵

U svakom slučaju rezistencija na inhibitore kod enterobakterija mnogo je manji problem nego rezistencija na kinolone kod *A. baumannii*. β -laktami su iznimka među antibioticima u tome što su modifikacije u njihovoj molekuli uvijek rješavale problem bakterijske rezistencije na starije pripadnike te skupine. Cefalosporini su i sada vrlo djelotvorni lijekovi, ali treba nastojati sačuvati njihovu efikasnost racionalnim propisivanjem i kombiniranjem s inhibitorima β -laktamaza.¹¹⁵

Inhibitor-rezistentne TEM- β -laktamaze

Uvod

Povećana i nekontrolirana upotreba β -laktamskih antibiotika (penicilina i cefalosporina) dovodi do pojave rezistencije na navedene antibiotike pri čemu oni postaju nedjelotvorni ponajprije zbog pojave i širenja enzimatske rezistencije uvjetovane bakterijskim β -laktamazama. Dvije su strategije uvedene za rješavanje tog problema. Prvo, uvode se novi β -laktamski antibiotici s povećanom stabilnošću prema β -laktamazama. Drugi je pristup kombiniranje β -laktamskog antibiotika s inhibitorom β -laktamaza (klavulanska kiselina, sulbaktam, tazobaktam) koji štiti β -laktamsku molekulu od enzimatskog napada. Osnova takvog pristupa je sinergistički učinak dviju molekula: inhibitor blokira aktivnost β -laktamaze što štiti penicilin ili cefalosporin od hidrolize.¹¹⁶ Kombinacija penicilina podložnog hidrolizi s inhibitorom β -laktamaza predstavlja uspješnu strategiju za prevladavanje rezistencije uzrokovane TEM β -laktamazama.¹¹⁷ Osjetljivost izolata *E. coli* na inhibitore može biti smanjena kod hiperprodukcije nemodificirane TEM- β -laktamaze ili zbog modifikacije proteina vanjske membrane ili se može raditi o kombinaciji tih dvaju mehanizama.¹¹⁷⁻¹¹⁹ Rezistenciji može pridonijeti i produkcija OXA- β -laktamaza ili hiperprodukcija cefalosporinaza.^{120,121} Od 1990. je zapaženo da učinak inhibitora β -laktamaza može biti ugrožen pojavom mutiranih TEM- β -laktamaza koje su nazivane inhibitor-rezistentne TEM- β -laktamaze – IRT.^{122,123}

Epidemiologija IRT- β -laktamaza

IRT su dosada opisane samo u Europi, i to u Francuskoj,¹²²⁻¹³⁰ Španjolskoj,¹³¹ Ujedinjenom Kraljevstvu^{121,132} i Portugalu¹³³ (tablica 4). Vjerojatno je da su bakterijski sojevi koji stvaraju IRT

Tablica 4. Glavna svojstva inhibitor-rezistentnih TEM- β -laktamaza
Table 4. Main features of inhibitor-resistant TEM β -lactamases

Tip IRT Type of IRT	Drugi naziv Alternative name	Izoelektrična točka Isoelectric point	Zemlja podrijetla Country of origin	Referenca Reference
TEM-30	IRT-2	5.2	Francuska/France	123
TEM-31	IRT-1	5.2	Francuska/France	123
TEM-32	IRT-3	5.4	Španjolska/Spain	131
TEM-33	IRT-5	5.4	Francuska/France	124
TEM-34	IRT-6	5.4	Francuska/France	124
TEM-35	IRT-4	5.2	Francuska/France	125
TEM-36	IRT-7	5.2	Francuska/France	124
TEM-37	IRT-8	5.2	Francuska/France	126
TEM-38	IRT-9	5.2	Francuska/France	126
TEM-39	IRT-10	5.4	Francuska/France	126
TEM-40	IRT-11	5.4	Francuska/France	126
TEM-44	IRT-13	5.4	Francuska/France	129
TEM-45	IRT-14	5.2	Francuska/France	128
TEM-51	IRT-15	5.2	Francuska/France	129
TEM-58	IRT-16	5.2	Francuska/France	130
TEM-59	IRT-17	5.2	Francuska/France	154
TEM-80	IRT-24	5.2	Francuska/France	137

prošireni i na drugim kontinentima, ali nedostatak izvještaja je vjerojatno posljedica neadekvatnih tehnika za detekciju IRT-fenotipa. IRT su dokazane samo kod enterobakterija, najčešće *E. coli*, ali i u 3 soja *K. pneumoniae*^{134,135} i 10 izolata *Proteus mirabilis*.¹²⁷ Prisutnost IRT je 1993. opisana i u izolatima *E. coli* i *Citrobacter freundii* iz telećeg fecesa.¹³⁶ Nedavno je opisana nova IRT koja se naziva TEM-80 u kliničkom izolatu *Enterobacter cloacae*, a smatra se da je plazmid koji kodira tu β -laktamaznu prenesen iz izolata *E. coli* iz istog bolesnika koji je također sadržavao navedeni enzim.¹³⁷ IRT-enzimi nisu nikada opisani u *H. influenzae* iako se ko-amoksiklav često propisuje za liječenje infekcija uzrokovanih β -laktamaza-positivnim sojevima te bakterije. Moguće je objašnjenje visoka intrinzična aktivnost penicilina prema tim sojevima ili neadekvatan broj bakterija u prirodnom rezervoaru (orofarinks) da bi došlo do spontanosti točkastih mutacija u plazmidnom TEM-genu.¹³⁸ Nadalje, ta vrsta proizvodi samo male količine β -laktamaze. Zapaženo je da se IRT osobito učestalo javljaju u izolatima *E. coli* iz urinarnog trakta (4,9%).¹³⁹

Detekcija IRT- β -laktamaza

IRT-fenotip je karakteriziran rezistencijom na β -laktam-inhibitorske kombinacije uz očuvanu osjetljivost na cefalosporine za razliku od fenotipa kod hiperprodukcije penicilinaze. Teško je utvrditi fenotip rezistencije koji bi omogućio pouzdanu detekciju IRT-produktora.¹⁴⁰⁻¹⁴³ Na temelju fenotipskih karakteristika teško ih je razlikovati od OXA- β -laktamaza.^{144,145} IRT-producenti obično imaju visoki MIK amoksicilina i tikarcilina (>4096 mg/L). Dodatak klavulanske kiseline (2 mg/L) smanjuje MIK amoksicilina i tikarcilina za najviše dva razrjeđenja, što je nedovoljno da bi soj postao osjetljiv na te antibiotike. Stupanj rezistencije na piperacilin je niži nego na amoksicilin i tikarcilin. Ti sojevi obično su umjereno osjetljivi na piperacilin (MIK – 8–64 mg/L), a rezistencija se javlja u manjem postotku sojeva (39%). Dodatak tazobaktama (4 mg/L) smanjuje MIK piperacilina i čini 84% sojeva osjetljivima na piperaci-

lin/tazobaktamsku kombinaciju.¹⁴⁶ To je posljedica veće intrinzične aktivnosti piperacilina prema takvim sojevima. Kombinacija piperacilina i tazobaktama pokazuje dobar bakteriostatki učinak protiv IRT-sojeva, ali joj nedostaje baktericidni učinak pri koncentracijama od $1 \times$ MIK, $2 \times$ MIK i $4 \times$ MIK.¹⁴⁶ IRT-producente je potrebno razlikovati od hiperproducentata TEM-1 ili grupe C β -laktamaza koji su češći uzročnici rezistencije na inhibitore. Rjeđe je rezistencija posljedica produkcije OXA ili PSE- β -laktamaza.¹⁴⁷

Genska osnova produkcije IRT- β -laktamaza

Tri *bla*-gena nazvana TEM-1A, TEM 1B i TEM-2 kodiraju dvije β -laktamaze koje su nazvane TEM-1 i TEM-2. Postoji ukupno devet razlika u sekvencijama nukleotida između tih gena na pozicijama 32, 175, 226, 317,346, 436, 604, 682 i 925.¹⁴⁸ Molekularna različitost IRT-enzima istraživana je DNA-amplifikacijom s pomoću lančane polimerazne reakcije (PCR), analize polimorfizma restrikcijskih fragmenata (RFLP) i direktnog sekvenciranja oligonukleotida. IRT- β -laktamaze dijele se u tri grupe na temelju molekularne strukture. Prva grupa su one koje vuku podrijetlo od TEM-1A- β -laktamaze, druga grupa vuče podrijetlo od TEM-1B β -laktamaze i treća od TEM-2.¹⁴⁶ Do hiperprodukcije IRT- β -laktamaza može doći zbog mutacije promotora.¹⁴⁹ Opisane su dvije supstitucije nukleotida u promotorskoj regiji: C32→T i G162→T.¹²⁸ Prva supstitucija nađena je u promotorskoj regiji TEM-2 gena u 15 kliničkih izolata *E. coli*.¹⁴⁹ Druga supstitucija je pronađena u β -laktamaznim genima TEM-30 (IRT-2), TEM-34(IRT-6), TEM-35 (IRT-4), TEM-36 (IRT-7), TEM-37 (IRT-8), TEM-39 (IRT-10) i TEM-45 (IRT-14) β -laktamaze.¹³⁰ Transverzija G162→T također je opisana kao mehanizam hiperprodukcije TEM-1- β -laktamaze u dva klinička izolata *Shigella flexneri* iz Hong Konga.¹⁵⁰ Istraživanja genske strukture IRT- β -laktamaza upućuju na konvergentnu evoluciju IRT-enzima budući da su se mutacije koje uzrokuju rezistenciju na inhibitore pojavljivale nezavisno u različitim dijelovima gena kao odgovor na selektivni pritisak zbog kliničke upotrebe β -laktamaznih inhibitora.¹⁴⁶

Inhibitor-rezistentne SHV- β -laktamaze

U grupi SHV- β -laktamaza rezistenciju na inhibitore pokazuje SHV-10- β -laktamaza koja je derivat SHV-5- β -laktamaze, a nastala je točkastom mutacijom na poziciji 130 pri čemu je serin zamijenjen glicinom. Enzim je zadržao sposobnost hidrolize penicilina, ali je njegova aktivnost prema cefalosporinima značajno reducirana.¹⁵¹

Zaključak

Rezistencija na β -laktamske antibiotike nastavlja se povećavati najčešće zbog β -laktamaza gram-negativnih bakterija. Tokom zadnjih 25 godina pojavio se velik broj β -laktamaza proširenog spektra koje kompromitiraju upotrebu cefalosporina novijih generacija i metalo- β -laktamaza koje hidroliziraju karbapeneme. Budući da plazmidi mogu akvirirati različite determinante rezistencije, mnoge gram-negativne bakterije su postale multirezistentne. U kombinaciji sa smanjenom permeabilnošću i efluksom takvi organizmi uzrokuju infekcije nelječive zasada dostupnim antibioticima.¹⁵² Najvažnije grupe β -laktamaza koje uzrokuju terapijske probleme su β -laktamaze proširenog spektra, inhibitor-rezistentne TEM i SHV- β -laktamaze i karbapenemaze, a posebnu prijetnju predstavlja i činjenica da se geni koji ih kodiraju nalaze na mobilnim genskim strukturama kao što su plazmidi i transposoni.

Terapijske mogućnosti ograničene su na kombinacije antibakterijskih lijekova iz različitih strukturalnih grupa ili u nekim slučajevima moraju biti primijenjeni stariji toksičniji antibiotici kao što su polimiksin B ili kolistin. U budućnosti će možda

biti moguće modificirati molekulu karbapenema da se postigne stabilnost ili razviti inhibitori cink- β -laktamaza s merkaptopoetenom kiselinom ili tioesterima.¹⁵³

LITERATURA

- Livermore DM. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev 1995;8:557-84.
- Bush K. Characterization of β -lactamases. Antimicrob Agent Chemother 1989;33:259-76.
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structures. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:1211-33.
- Sanders CC, Sanders WE. β -lactam resistance in Gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. Clin Infect Dis 1992;15:824-39.
- Livermore DM, Yang YJ. β -lactamase lability and inducer power of newer β -lactam antibiotics in relation to their activity against β -lactamase-inducibility mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. J Infect Dis 1987;155:775-81.
- Livermore DM, Brown DFJ. Detection of β -lactamase-mediated resistance. J Antimicrob Chemother 2001;48:59-64.
- Livermore DM. Clinical significance of β -lactamase induction and stable derepression in Gram-negative rods. Eur J Clin Microbiol 1987;6:439-45.
- Phillips I, Shannon K. Class I β -lactamases. Induction and Derepression. Drugs 1989;37:402-7.
- Chow JW, Fine MJ, Shlaes DM, Quinn JP, Hooper DC, Johnson MP. *Enterobacter* bacteremia: clinical features and emergence of antibiotic resistance during therapy. Ann Int Med 1991;115:585-90.
- Johnson CC, Livornese L, Gold MJ, Pitsakis PG, Taylor S, Levinson ME. Activity of cephepime against ceftazidime-resistant Gram-negative bacilli using low and high inocula. J Antimicrob Chemother 1995;35:765-73.
- Livermore DM. β -lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. J Antimicrob Chemother 1988;41:25-41.
- Livermore DM, Akova M, Wu P, Yang Y. Clavulanate and β -lactamase induction. J Antimicrob Chemother 1989;24:23-33.
- Farmer TH, Reading C. The effects of clavulanic acid and sulbactam on β -lactamase biosynthesis. J Antimicrob Chemother 1988;22:105-11.
- Livermore DM, Williams JD. β -lactams: mode of activity and mechanisms of bacterial resistance. U: Lorian V, ur. Antibiotics in Laboratory Medicine. Williams and Wilkins; Baltimore; 2000, str. 502-578.
- Livermore DM, Winstanley TG, Shannon KP. Interpretative reading: recognising the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. J Antimicrob Chemother 2001;48:59-64.
- Moritz VA, Carson PB. Cefoxitin sensitivity as a marker for inducible β -lactamases. J Med Microbiol 1986;21:203-7.
- Sanders CC, Sanders WE, Goering RV. In vitro antagonism of β -lactam antibiotics by cefoxitin. Antimicrob Agents Chemother 1982;21:968-75.
- Albers-Schonberg G, Arison BH, Hensen DD, Hirschfeld J, Hoogsteen K, Kaczka EA. Structure and absolute configuration of thienamycin. J Am Chem Soc 1989;100:6491-9.
- Kahan FM, Kropp H, Sundelof JG, Birnbaum J. Thienamycin: development of imipenem-cilastatin. J Antimicrob Chemother 1983;12:1-35.
- Kropp H, Gerckens L, Sundelof JG, Kahan FM. Antibacterial activity of imipenem: the first thienamycin antibiotic. Rev Infect Dis 1985;7:S389-S410.
- Milatovic D, Braveny I. Development of resistance during antibiotic therapy. Eur J Clin Microbiol 1987;6:234-44.
- Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agent Chemother 1991;35:147-51.
- Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H. Molecular characterization of a enterobacterial metallo- β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that show imipenem resistance. Antimicrob Agent Chemother 1994;38:781-8.
- Ambler RP, Coulson AF, Frere JM *i sur*. The structure numbering scheme for the class β -lactamases. Biochem J 1991;276:269-71.
- Gales AC, Biedenbach DJ, Winokur P, Hacek DM, Pfaller MA, Jones RN. Carbapenem-resistant *Serratia marcescens* isolates producing Bush group 2f β -lactamase (SME-1) in the United States: results from the MYSTIC Programme. Diagn Microbiol Infect Dis 2001;39:125-7.
- Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ *i sur*. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:1151-61.
- Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, De Champs C, Dove M, Nordmann P. GES-2, a class A β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:2598-603.
- Nordmann P, Mariotte S, Naas T, Labia R, Nicolas MH. Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing β -lactamase from *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 1993;37:939-46.
- Naas T, Nordmann P. Analysis of a carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase from *Enterobacter cloacae* and its LysR-type regulatory protein. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:7693-7.
- Yang YJ, Wu PJ, Livermore DM. Biochemical characterization of a β -lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. Antimicrob Agents Chemother 1990;34:755-8.
- Naas T, Vandael L, Sougakoff W, Livermore DM, Nordmann P. Cloning and sequence analysis of the gene for a carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase, SME-1 from *Serratia marcescens* S6. Antimicrob Agents Chemother 1994;38:1262-70.
- Queenan AM, Torres-Viera C, Gold HS. SME type carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamases from geographically diverse *Serratia marcescens* strains. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:3035-9.
- Rasmussen BA, Bush K, Keeney D. Characterization of IMI-1 β -lactamase, a novel class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. Antimicrob Agents Chemother 1996;40:2080-6.
- Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. Clin Microbiol Infect 2002;8:321-31.
- Raquet X, Lamotte-Brasseur J, Bouillenne F, Frere JM. A disulfide bridge near the active site of carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamases might explain their unusual substrate profile. Proteins 1997;27:47-58.
- Livermore DM, Woodford N. Carbapenemases: a problem in waiting? Curr Opin Microbiol 2000;3:489-95.
- Rasmussen BA, Bush K. Carbapenem hydrolyzing β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1997;41:223-32.
- Mavroidi A, Tsakris A, Tzelepi E. Carbapenem-hydrolyzing VIM-2 metallo- β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* from Greece. J Antimicrob Chemother 2000;46:1041-2.
- Prats G, Miro I, Mirelis B, Poirel L, Bellais S, Nordman P. First isolation of a carbapenem hydrolyzing β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Spain. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:2080-3.
- Cornaglia G, Riccio ML, Mazzariol A. Appearance of IMP-1 metalloenzymes in Europe. Lancet 1999;353:899-900.
- Sardelić S, Pallechi I, Punda-Polić V, Rossolini GM. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*-carrying VIM-2 metallo- β -lactamase determinants in Croatia. Emerg Infect Dis 2003;9:1022-3.
- Yan JJ, Hsueh PR, Ko WC. Metallo- β -lactamases in clinical isolates in Taiwan and identification of VIM-3 a novel variant of VIM-2 enzyme. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:2224-8.
- Yano H, Kuga A, Okamoto R, Kitasato H, Kobayashi T, Inoue M. Plasmid-encoded metallo- β -lactamase (IMP-6) conferring resistance to carbapenems, especially meropenem. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:1343-8.
- Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R *i sur*. Molecular characterization of an enterobacterial metallo- β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. Antimicrob Agents Chemother 1994;38:71-8.
- Senda K, Arakawa Y, Nakashima K *i sur*. Multifocal outbreaks of metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum β -lactams, including carbapenems. Antimicrob Agents Chemother 1996;40:349-53.
- Hirakata Y, Izumikawa K, Yamaguchi T. Rapid detection and evaluation of clinical characteristics of emerging multiple-drug-resistant gram-negative rods carrying the metallo- β -lactamase gene *bla*_{IMP}. Antimicrob Agents Chemother 1998;42:2006-11.
- Kurokawa H, Yagi T, Shibata N, Shibayama K, Arakawa Y. Worldwide proliferation of carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. Lancet 1999;354:955.
- Takahashi A, Yomoda S, Kobayashi I *i sur*. Detection of carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in a hospital. J Clin Microbiol 2000;38:526-9.
- Minami S, Araki H, Yasuda T, Akama M, Iyobe S, Mitsuhashi S. High level imipenem resistance associated with imipenem-hydrolyzing β -lactamase production and outer membrane alteration in a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. Int J Exp Clin Chemother 1993;6:21-8.
- Senda K, Arakawa Y, Nakashima K *i sur*. Multifocal outbreaks of metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum β -lactams including carbapenems. Antimicrob Agents Chemother 1996;40:349-53.
- Ito H, Arakawa Y, Ohsuka S, Wacharotayankun R, Kato N, Ohta M. Plasmid-mediated dissemination of the metallo- β -lactamase gene *bla*_{IMP} among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:824-9.
- Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1991;35:147-51.
- Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K *i sur*. A novel integron-like element carrying the metallo- β -lactamase gene *bla*_{IMP}. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:1612-5.
- Riccio ML, Franceschini N, Boschi L *i sur*. Characterization of the metallo- β -lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of *bla*_{IMP} allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:1229-350.

55. O'Hara, Haruta S, Sawai T, Tsunoda M, Iyoba S. Novel metallo-β-lactamase mediated by a *Shigella flexneri* plasmid. *FEMS Microbiol Lett* 1998;162:201–6.
56. Iyobe S, Kusadokoro H, Ozaki J i sur. Amino-acid substitutions in a variant of IMP-1 metallo-β-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:2023–7.
57. Chu YW, Afzal-Shah M, Houang ETS i sur. IMP-4 a novel metallo-β-lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. Collected in Hong-Kong between 1994 and 1998. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:710–14.
58. Hawkey PM, Xiong J, Ye H, Li H, M'Zali FH. Occurrence of a new metallo-β-lactamase IMP-4 carried on a conjugative plasmid in *Citrobacter youngae* from the People's Republic of China. *FEMS Microbiol Lett* 2001;194:53–7.
59. Yan JJ, Ko WC, Wu JJ. Identification of a plasmid encoding SHV-12, TEM-1, and a variant of IMP-2 metallo-β-lactamase, IMP-8, from a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2368–71.
60. Jan JJ, Ko WC, Chuang CL, Wu JJ. Metallo-β-lactamase producing Enterobacteriaceae isolates in a university hospital in Taiwan: prevalence of IMP-8 in *Enterobacter cloacae* and first identification of VIM-2 in *Citrobacter freundii*. *J Antimicrob Chemother* 2002;50:503–11.
61. Jing-Jou Y, Ko WC, Tsai SH, Wu HM, Wu JJ. Outbreak of infection with multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying *bla*_{IMP-8} in a University Medical Center in Taiwan. *J Clin Microbiol* 2001;39:4433–9.
62. Docquier JD, Riccio ML, Mugnaioli C i sur. IMP-12, a new plasmid-encoded metallo-β-lactamase from a *Pseudomonas putida* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:1522–8.
63. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A i sur. Cloning and characterization of *bla*_{VIM}, a new integron-borne metallo-β-lactamase gene from *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1584–90.
64. Cornaglia G, Mazzariol A, Rossoline GM, Fontana R. Hospital outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1, a novel transferable metallo-β-lactamase. *Clin Infect Dis* 2000;31:1119–25.
65. Lombardi G, Luzzaro F, Docquier JD i sur. Nosocomial infections caused by multidrug-resistant isolates of *Pseudomonas putida* producing VIM-1 metallo-β-lactamase. *J Clin Microbiol* 2002;40:4051–5.
66. Poirel L, Naas T, Nicolas D i sur. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-β-lactamase and its plasmid-and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:891–7.
67. Poirel L, Lambert T, Turkoglu S, Ronco E, Gaillard JL, Nordmann P. Characterization of a class 1 integrons from *Pseudomonas aeruginosa* that contain the *bla*_{VIM-2} carbapenem-hydrolyzing β-lactamase gene and of two novel aminoglycoside resistance gene cassettes. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:546–52.
68. Jeong SH, Lee K, Chong Y i sur. Characterization of a new integron containing VIM-2, a metallo-β-lactamase gene cassette, in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:397–400.
69. Docquier JD, Brasseur JL, Galleni M, Amicosante G, Frere JM, Rossolini GM. On functional and structural heterogeneity of VIM type metallo-β-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:257–66.
70. Yan JJ, Hsueh PR, Ko WC i sur. Metallo-β-lactamase in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2224–8.
71. Luzzaro F, Docquier JD, Colinson C i sur. Emergence in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* clinical isolates the VIM-4 metallo-β-lactamase encoded by a conjugative plasmid. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:648–50.
72. Naas T, Bellais S, Nordmann. Molecular and biochemical characterization of a carbapenem-hydrolyzing β-lactamase from *Flavobacterium johnsoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:267–73.
73. Bellais S, Aubert D, Naas T, Nordmann P. Molecular and biochemical heterogeneity of class B carbapenem hydrolyzing β-lactamases in *Chryseobacterium meningosepticum*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1878–86.
74. Murphy TA, Simm AM, Toleman MA, Jones RN, Walsh TR. Biochemical characterization of the acquired metallo-β-lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(2):582–7.
75. Donald HM, Scaife W, Amyes SGB, Young H. Sequence analysis of ARI-1 a novel OXA β-lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:196–9.
76. Bou G, Oliver A, Martinez-Beltran J. OXA-24, a novel class D β-lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1556–61.
77. Afzal-Shah M, Woodford N, Livermore DM. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27 molecular class D β-lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:583–8.
78. Bou G, Cervero G, Dominguez MA, Quereda C, Martinez-Beltran J. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high level carbapenem resistance in a *A. baumannii* is not due solely to the presence of β-lactamases. *J Clin Microbiol* 2000;38:3299–305.
79. Gehrlein M, Leying H, Cullmann W, Wendt S, Opferkuch W. Imipenem-resistance in *Acinetobacter baumannii* is due to altered penicillin-binding proteins. *Chemotherapy* 1991;37:405–12.
80. Vivian A. Genetic organisation of *Acinetobacter*. U: Townner KJ, Bergogne-Berezin R-E, Fewson CA, ur. *The Biology of Acinetobacter: Taxonomy, Clinical Importance, Molecular Biology, Physiology, Industrial Relevance*. New York, Plenum Press, 191–200.
81. Walsh TR, Bolstrom A, Qvarnstrom A, Gales A. Evaluation of a new E-test for detecting metallo-β-lactamases in routine clinical testing. *J Clin Microbiol* 2002;40:2755–9.
82. Iyobe S. Metallo-β-lactamase producing bacteria. *Nippon Rinsho* 2001;59:701–6.
83. Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K i sur. Convenient test for screening metallo-β-lactamase-producing Gram-negative bacteria using thiol compounds. *J Clin Microbiol* 2000;38:40–3.
84. Migliavacca R, Docquier JD, Mugnaioli C i sur. Simple microdilution test for detection of metallo-β-lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 2002;40:4388–90.
85. Pai H, Kim JW, Kim J, Lee JH, Choe KW, Gotoh N. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:480–4.
86. Okamoto K, Gotoh N, Nishino T. *Pseudomonas aeruginosa* reveals high intrinsic resistance to penem antibiotics: penem resistance mechanisms and their interplay. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1964–71.
87. Kievit TR, Parkins MD, Gillis RJ i sur. Multidrug efflux pumps: expression patterns and contribution to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1761–70.
88. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis* 2002;34:634–40.
89. Livermore DM, Woodford N. Carbapenemases: a problem in waiting? *Current opinion in Microbiology* 2000;3:489–95.
90. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandol and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 1983;11:315–7.
91. Gnidadkowski M, Palucha A, Grzesiowski P, Hryniewicz W. Outbreak of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a Pediatric Hospital in Warsaw, Poland: Clonal spread of TEM-47 extended-spectrum β-lactamase (ESBL)-producing strain and transfer of a plasmid carrying the SHV-5 like ESBL-encoding gene. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:3079–85.
92. Philippon A, Labia R, Jacoby G. Extended-spectrum β-lactamases. *Antimicrob Agent Chemother* 1989;33:1131–6.
93. Philippon A, Ben Redjep S, Fournier G, Ben Hassen A. Epidemiology of extended-spectrum β-lactamases. *Infection* 1989;17:347–54.
94. Payne DJ, Amyes SGB. Transferable resistance to extended-spectrum β-lactams: a major threat or a minor inconvenience? *J Antimicrob Chemother* 1991;27:255–61.
95. Jacoby GA, Medeiros AA. More extended-spectrum β-lactamases. *Antimicrob Agent Chemother* 1991;35:1697–704.
96. Weber DA, Sanders CC, Bakken JS, Quinn JP. A novel chromosomal TEM derivative and alterations in outer membrane proteins together mediate selective ceftazidime resistance in *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1990;162:460–5.
97. Sirot D. Extended-spectrum plasmid mediated β-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 1995;36:19–34.
98. Quinn JP. Clinical significance of extended-spectrum β-lactamases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:S39–42.
99. Livermore DM, Yuan M. Antibiotic resistance and production of extended-spectrum β-lactamases amongst *Klebsiella* spp from intensive care units in Europe. *J Antimicrob Chemother* 1996;38:409–24.
100. Khurana CM, Wojack BR. Prevalence of ciprofloxacin resistance in multiresistant gram-negative intensive care unit isolates. *Infection* 1994;22:S99–S104.
101. Amyes SGB, Thomson CJ. Antibiotic resistance in the ICU: the eve of destruction. *British Journal of Intensive Care* 1995;5:263–71.
102. Jones RN, Kehrberg EN, Erwin MR, Anderson SC and the Fluoroquinolone Resistance Surveillance Group. Prevalence of important pathogens and antimicrobial activity of parenteral drugs at numerous medical centers in the United States, I. Study on the threat of emerging resistance: real or perceived? *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* 1994;19:203–15.
103. Vila J, Ruiz J, Goni P, Jimenez de Anta T. Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV parC gene of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 1997;39:757–62.
104. Amyes SGB. β-lactam resistance and the use of inhibitor combinations. *J Med Microbiol* 1997;46:728–31.
105. Zervos MJ, Bacon AE, Patterson JE, Schaberg DR, Kauffman CA. Enterococcal superinfection in patients treated with ciprofloxacin. *J Antimicrob Chemother* 1988;21:113–5.
106. Du Bois SK, Marriott M, Amyes SGB. Can clavulanic acid reverse extended-spectrum β-lactamase mutations? In: Program and Abstracts of

- the Thirty-Third Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, New Orleans, 1993. Abstract 582.
107. Soweck JA, Singer SB, Ohringer S, Malley MF, Dougherty TJ, Gougoutas JZ. Substitutions of lysine at position 104 or 240 of TEM-1 pTZ18R β -lactamase enhances the effect of serine-164 substitution on hydrolysis or affinity for cephalosporins and the monobactam aztreonam. *Biochemistry* 1991;30:3179–88.
 108. Payne DJ, Amyes SGB. Stability of cefdinir (CI-983, FK-482) to extended-spectrum plasmid-mediated β -lactamases. *J Med Microbiol* 1993;38:114.
 109. Bauernfeind A, Jungwirth R, Schweighart S, Theopold M. Antibakterielle Aktivität und β -Laktamase Stabilität von elf Oralcephalosporinen. *Infection* 1990;8:S155–67.
 110. Saves I, Burlet-Shiltz O, Swaren P *in sur*. The asparagine to aspartic acid substitution at position 276 of TEM-35 and TEM-36 is involved in the β -lactamase resistance to clavulanic acid. *J Biol Chem* 1995;270:18240–5.
 111. Henquell C, Sirot D, Chanal C, De Champs C, Chatron P, Lefeuvre B. Frequency of inhibitor-resistant TEM β -lactamases in *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections in France. *J Antimicrob Chemother* 1994;34:707–14.
 112. Thomson CJ, Amyes SGB. Back mutations to the TEM-1 β -lactamase from TRC-1 lead to restored sensitivity to clavulanic acid. *J Med Microbiol* 1995;42:429–32.
 113. Visalli MA, Jacobs MR, Moore TD, Renzi FA, Appelbaum PC. Activities of β -lactams against *Acinetobacter genospecies* as determined by agar dilution and E test MIC methods. *Antimicrob Agent Chemother* 1997;41:767–70.
 114. Sirot D, Recule C, Chaibi EB, Bret L, Croize J, Chanal-Claris C. A complex mutant of TEM-1 β -lactamase encountered in both IRT-4 and extended-spectrum TEM-15, produced by an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agent Chemother* 1997;41:1322–5.
 115. Amyes SGB, Miles RS. Extended-spectrum β -lactamases: the role of inhibitors in therapy. *J Antimicrob Chemother* 1998;42:415–17.
 116. Martinez JL, Vicente MF, Delgado-Iribarren A, Perez-Diaz JC, Baquero F. Small plasmids are involved in amoxicillin-clavulanate resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:595.
 117. Wu PJ, Shannon K, Phillips I. Effect of hyperproduction of TEM-1 β -lactamase on in vitro susceptibility of *Escherichia coli* to β -lactam antibiotics. *Antimicrob Agent Chemother* 1994;38:494–8.
 118. Wu PJ, Shannon K, Phillips I. Mechanisms of hyperproduction of TEM-1 β -lactamase by clinical isolates of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 1995;36:927–39.
 119. Reguera JA, Baquero F, Perez-Diaz JC, Martinez JL. Factors determining resistance to β -lactam combined with β -lactamase inhibitors in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 1991;27:569–75.
 120. Bergstrom S, Normark S. β -lactam resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* caused by elevated production of the AmpC-mediated chromosomal β -lactamase. *Antimicrob Agent Chemother* 1979;16:427–33.
 121. Thomson CJ, Amyes SGB. TRC-1: emergence of a clavulanic acid resistant TEM β -lactamase in a clinical strain. *FEMS Microbiology Letters* 1992;70:113.
 122. Vedel G, Belaouaj A, Gilly L *in sur*. Clinical isolates of *Escherichia coli* producing TRI β -lactamases: novel TEM-enzymes conferring resistance to β -lactamase inhibitors. *J Antimicrob Chemother* 1992;30:449–62.
 123. Belaouaj A, Lapoumeroulie C, Canica MM *in sur*. Nucleotide sequences of the genes coding for the TEM-like β -lactamases IRT-1 and IRT-2 (formerly called TRI-1 and TRI-2). *FEMS Microbiology Letters* 1994;120:75–80.
 124. Zhou XY, Bordon F, Sirot D, Kitzis MD, Gutmann L. Emergence of clinical isolates *Escherichia coli* producing TEM-1 derivatives or an OXA-1 β -lactamase conferring resistance to β -lactamase inhibitors. *Antimicrob Agent Chemother* 1994;38:1085–9.
 125. Brun T, Peduzzi J, Canica MM *in sur*. Characterization and amino-acid sequence of IRT-4, a novel TEM-type enzyme with a decreased susceptibility to β -lactamase inhibitors. *FEMS Microbiology Letters* 1994;120:111–17.
 126. Henquell C, Chanal C, Sirot D, Labia R, Sirot J. Molecular characterization of nine different types of mutants among 107 inhibitor-resistant TEM β -lactamases from clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:427–30.
 127. Bret L, Chanal C, Sirot D, Labia R, Sirot J. Characterization of an inhibitor-resistant enzyme IRT-2 derived from TEM-2 β -lactamase produced by *Proteus mirabilis* strains. *J Antimicrob Chemother* 1996;38:183–91.
 128. Canica MM, Lu CY, Krishnamoorthy R, Pau GC. Molecular diversity and evolution of *bla*_{TEM} genes encoding β -lactamases resistant to clavulanic acid in clinical *Escherichia coli*. *J Mol Evolution* 1997;44:57–65.
 129. Bret L, Chaibi EB, Chanal-Claris C, Sirot D, Labia R, Sirot J. Inhibitor-resistant TEM (IRT) β -lactamases with different substitutions at position 244. *Antimicrob Agent Chemother* 1997;41:2547–9.
 130. Speldooren V, Heym B, Labia R, Nicolas-Chanoine MH. Discriminatory detection on inhibitor-resistant β -lactamases in *Escherichia coli* by single-strand conformation polymorphism PCR. *Antimicrob Agent Chemother* 1998;42:879–84.
 131. Blazquez J, Baquero MR, Canton R, Alos I, Baquero F. Characterization of a new TEM type β -lactamase resistant to clavulanate, sulbactam, and tazobactam in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agent Chemother* 1993;37:2059–63.
 132. Stapleton P, Wu P, King A, Shannon K, French G, Phillips I. Incidence and mechanisms of resistance to the combinations of amoxicillin and clavulanic acid in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agent Chemother* 1995;39:2478–83.
 133. Canica M, Ferreira M, Ferreira E. Phenotype and molecular characterization of the first inhibitor-resistant TEM-derived β -lactamase identified in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(11):3688–9.
 134. Lemozy J, Sirot D, Chanal C *in sur*. First characterization of inhibitor-resistant TEM (IRT) β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* strains. *Antimicrob Agent Chemother* 1995;39:2580–2.
 135. Bermudes H, Jude F, Arpin C, Quentin C, Morand A, Labia R. Characterization of an inhibitor-resistant TEM β -lactamase in a novel strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agent Chemother* 1997;41:222.
 136. Hunter JE, Corkill JE, Mc Lennan AG, Fletscher JN, Hart CA. Plasmid encoded β -lactamases resistant to inhibition by clavulanic acid produced by calf faecal coliforms. *Research in Veterinary Science* 1993;55:367–70.
 137. Arpin C, Labia R, Dubois V, Noury P, Souquet M, Quentin C. TEM-80, a novel inhibitor-resistant β -lactamase in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1183–9.
 138. Nicolas-Chanoine MH. Inhibitor-resistant β -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 1997;10:1–3.
 139. Navarro ME, Mirelis B, Sabate M, Rivera A, Coll P, Prats G. Prevalence of clinical isolates of *Escherichia coli* producing inhibitor-resistant β -lactamases at University Hospital in Barcelona, Spain, over a 3 year period. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:3991–4.
 140. Bemer-Melchior, Gilly P, Jugroot-Klotz K, Brun T, Nevot P, Paul G. Etude de la resistance a l' amoxicilline et a l' association amoxicilline-clavulanique dans 231 souches cliniques d' *Escherichia coli* isolées en 1992 a l'hopital Cochin. *Pathol Biol* 1995;43:760–5.
 141. Romaszko JP, Bret L, Henquell C, Sirot D, Chanal C, Sirot J. Detection of inhibitor-resistant TEM β -lactamases by disc-diffusion method. *Patol Biol* 1995;43:306–9.
 142. Sirot D, Chanal C, Henquell C, Labia R, Sirot J, Cluzel R. Clinical isolates of *Escherichia coli* producing multiple TEM mutants resistant to β -lactamase inhibitors. *J Antimicrob Chemother* 1994;33:1117–26.
 143. Acar J, Chardon H, Choutet P *in sur*. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. *Pathol Biol* 1996;44:1–8.
 144. Libert JM, Naudin F, Mougeout C, Sirot D. Detection en routine des β -lactamases TEM résistantes aux inhibiteurs (IRT) et des oxacillinasés (OXA) chez *Escherichia coli*. *Pathol Biol* 1997;45:34–40.
 145. Romaszko JP, Bret L, Henquell C, Sirot D, Chanal C, Sirot J. Detection of β -lactamases resistant to inhibitors (IRT) by the disk-diffusion method. *Patol Biol* 1995;43:306–9.
 146. Chairibi EB, Sirot D, Paul G, Labia R. Inhibitor-resistant TEM β -lactamases: phenotypic, genetic and biochemical characteristics. *J Antimicrob Chemother* 1999;43:447–58.
 147. Feric C, Ferreira E, Correia JD, Goncalves J, Canica M. Patterns and mechanisms of resistance to β -lactams and β -lactamase inhibitors in uropathogenic *Escherichia coli* isolates from dogs in Portugal. *J Antimicrob Chemother* 2002;49:77–85.
 148. Sutcliffe JG. Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1978;75:3737–41.
 149. Hawley DK, McClure WR. Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucleic Acid Research* 1983;11:2237–55.
 150. Siu LK, Ho PL, Yuen KY, Wong SSS, Chau PY. Transferable hyperproduction of TEM-1 β -lactamase in *Shigella flexneri* due to a point mutation in the Pribnow box. *Antimicrob Agent Chemother* 1997;41:468–70.
 151. Prinakis EE, Miriagou V, Tzelepi E, Gazouli M, Tzouveleki L. Emergence of an inhibitor-resistant β -lactamase (SHV-10) derived from an SHV-5 variant. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:838–40.
 152. Bush K. β -lactamases of increasing clinical importance. *Curr Pharm Des* 1999;5:839–45.
 153. Bush K. Antimicrobial options for treatment of nosocomial Gram-negative infections caused by multidrug-resistant strains. *International Journal of Infectious Diseases* 2004;8:poster:46.004.
 154. Bermudes HF, Jude E, Chaibi C *in sur*. Molecular characterization of TEM-59 (IRT-17); a novel inhibitor-resistant TEM-derived β -lactamase in a clinical isolate of *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1657–61.