

β-LAKTAMAZE U LABORATORIJU I NJIHOVA ULOGA U REZISTENCIJI **I. DIO: Evolucija bakterijske rezistencije uzrokovane β-laktamazama**

β-LACTAMASES IN LABORATORY AND THEIR ROLE IN RESISTANCE **PART I.: Evolution of bacterial resistance mediated by β-lactamases**

BRANKA BEDENIĆ*

Deskriptori: Beta-laktamaze – klasifikacija, genetika, metabolizam; Beta-laktamska rezistencija

Sažetak. β-laktamaze su najčešći uzrok bakterijske rezistencije na β-laktamske antibiotike. One se fenotipski klasificiraju na temelju izoelektrične točke, supstratnog profila, osjetljivosti na inhibitore i genetskog podrijetla. Kromosomske β-laktamaze tipične su za pojedine bakterijske vrste, dok su plazmidne prenositelj između različitih vrsta i rodova. Određivanjem sekvencije β-laktamaza gena možemo te enzime podijeliti u 4 razreda: A, B, C i D. Sposobnost β-laktamaza da izazovu rezistenciju ovisi o lokalizaciji, kinetici i količini enzima, kao i o fizikalno-kemijskim uvjetima. Prve β-laktamaze opisane su kod stafilokoka vrlo brzo nakon uvođenja penicilina. Plazmidne β-laktamaze širokog spektra pojavile su se sredinom 60-ih godina prošlog stoljeća a razgrađuju peniciline i neke cefalosporine prve generacije. U tu skupinu spadaju TEM-1, TEM-2, SHV-1, ROB, BRO, OXA i PSE β-laktamaze. Prenose se konjugacijom među različitim vrstama i sojevima gram-negativnih bakterija. Noviji β-laktamski antibiotici danas su ugroženi pojavom β-laktamaza proširenog spektra (ESBL), inhibitor-rezistentnih β-laktamaza i karbapenemaza. β-laktamaze proširenog spektra pojavile su se prije 20 godina, a nastale su mutacijama od parentalnih TEM i SHV-1 β-laktamaza, koje mijenjaju konfiguraciju aktivnog središta i šire spektar njihove aktivnosti. Hidroliziraju oksimino-cefalosporine i aztreonam. Njihova brza i točna laboratorijska detekcija važna je za pravilan odabir terapije. Terapijske mogućnosti za liječenje infekcija uzrokovanih enterobakterijama koje proizvode β-laktamaze proširenog spektra ograničene su zbog multiple rezistencije koja uključuje i ne-β-laktamske antibiotike. Karbapenemi su zasada antibiotici izbora za liječenje takvih infekcija.

Descriptors: Beta-lactamases – classification, genetics, metabolism; Beta-lactam resistance

Summary. β-lactamases are the commonest cause of bacterial resistance to β-lactam antibiotics. They have been classified phenotypically by their isoelectric point, substrate profile, susceptibility to inhibitors and genetic origin. Chromosomal β-lactamases are typical for certain bacterial species and plasmid β-lactamases are transferable between different species and genera. Sequencing of β-lactamase genes enabled to divide them into four classes: A, B, C and D. The ability of a β-lactamase to confer resistance depends on its location, kinetics, quantity and physicochemical conditions. First β-lactamases were described soon after introduction of penicillin. Plasmid-mediated broad-spectrum β-lactamases appeared in the middle 60-s of the XX century and confer resistance to penicillins and some first generation cephalosporins. They include TEM-1, TEM-2, SHV-1, ROB, BRO, OXA and PSE β-lactamases and are transferred by conjugation between different species and strains of Gram-negative bacteria. The new β-lactam agents nowadays are compromised mostly by extended-spectrum β-lactamases, inhibitor-resistant β-lactamases and carbapenemases. Extended-spectrum β-lactamases (ESBLs) were described for the first time 20 years ago and are derived from the parental TEM and SHV-1 β-lactamases by mutations that alter the configuration of the active site to expand their spectrum of activity. They hydrolyse oxymino-cephalosporins and aztreonam. The rapid and accurate laboratory detection of ESBLs is important for choosing appropriate antibiotic therapy. Infections caused by *Enterobacteriaceae* producing ESBLs pose a therapeutic problem due to multiple antibiotic resistance which includes non-β-lactam antibiotics as well. Carbapenems are the first-line antibiotics for treatment of such infections.

Liječ Vjesn 2004;126:314–324

β-laktamski antibiotici dijele se na peniciline, cefalosporine, monobaktame i karbapeneme. Zbog svoje izvanredne selektivne toksičnosti izazivaju vrlo malo nuspojava tako da se vrlo često rabe u liječenju lakših i težih infekcija. β-laktamski antibiotici pridonose 50% globalne potrošnje antibiotika i ta je intenzivna potrošnja važan selekcijski činitelj za nastanak rezistencije. Postoje tri glavna mehanizma nastanka rezistencije: modifikacija PBP-molekula (proteini koji vežu penicilin), smanjena permeabilnost zbog promjena u proteinima vanjske membrane ili produkcija β-laktamaza.¹ Neke bakterije, kao npr. *Pseudomonas aeruginosa*, mogu razviti rezistenciju na β-laktame zbog aktivnog izbacivanja (efluka) tih antibiotika iz stanice.^{2,3} Modifikacije PBP-molekula rezultiraju nemogućnošću vezanja β-laktamskog antibiotika na ciljne molekule ili dolazi do vezanja, ali nema učinka, tj. ne dolazi do inhibicije sinteze

peptidoglikana.⁴ Taj je mehanizam važan za rezistenciju kod gram-pozitivnih koka, dok su β-laktamaze predominantan uzrok rezistencije kod gram-negativnih bakterija¹.

Klasifikacija β-laktamaza

β-laktamaze možemo karakterizirati na temelju hidrolitičke aktivnosti, izoelektrične točke, osjetljivosti prema inhibitorima i genetskog podrijetla (kromosomske ili plazmidne). Supstratni profil određujemo na temelju brzine hidrolize benzil-

* 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.

penicilina ili cefaloridina. β -laktamaze koje brže hidroliziraju benzilpenicilin od cefaloridina spadaju u penicilinaze, a one koje imaju veći afinitet za cefaloridin u odnosu na benzilpenicilin spadaju u cefalosporinaze.¹ Osjetljivost na inhibitore određuje se na temelju inaktivacije enzima u prisutnosti kloksacilina, klavulanata, aztreonama i p-kloromerkuribenzoata.¹

Nedostatak fenotipske klasifikacije β -laktamaza leži u činjenici da točkaste mutacije β -laktamaza gena značajno mijenjaju

supstratnu specifičnost i osjetljivost na inhibitore te na taj način mijenjaju grupu u koju je enzim svrstan. Zbog toga se sve više β -laktamaze svrstavaju na temelju sekvencije aminokiselina po Ambleru.⁵ Po toj klasifikaciji β -laktamaze se svrstavaju u 4 grupe označene slovima od A do D. Grupe A, C i D obuhvaćaju evolucijski različite grupe serinskih esteraza, dok grupa B obuhvaća enzime koji sadržavaju cink kao kofaktor. Usporedba različitih klasifikacijskih shema prikazana je na tablici 1.

Tablica 1. Usporedba molekularne i fenotipske klasifikacije β -laktamaza
Table 1. Comparison of molecular and phenotypic classification of β -lactamases

Strukturna grupa po Ambleru Structural class – Ambler	Funkcijska grupa po K. Bush Functional group – Bush	Grupa po Richmondu i Sykesu Richmond and Sykes class	Supstratni profil ¹ / Substrate profile						Inhibicija ² / Inhibition		
			penicilin	karbenicilin carbenicillin	oksacilin oxacillin	cefaloridin cephaloridine	aztreonam	imipenem	klavulanat clavulanate	aztreonam	EDTA
Serin β-laktamaze Serine β-lactamases											
A	2a	N ³	+++	+	–	+/–	–	–	++	–	–
A	2b	II i III	+++	+	+	++	–	–	++	–	–
A	2be	III i IV	+++	+	+	++	++	–	++	–	–
A	2br	N ³	+++	+	+	+	–	–	–	–	–
A	2c	II i V	++	+++	+	+	–	–	+	–	–
A	2e	Ic	++	++	–	++	++	–	++	–	–
A	2f	N ³	++	+	N	+	++	++	+	–	–
C	1	I osim Ic	++	+	–	+++	–	–	–	++	–
D	2d	V	++	+	+++	+	–	–	V	–	–
nesvrstane unclassified	4	N ³	++	++	++	V	–	–	–	–	–
Cink β-laktamaze Zinc β-lactamases											
B	3	N ³	++	++	++	++	–	++	–	–	++

¹ aktivnost: +++ najbolji supstrat, ++ dobar supstrat, + podliježe hidrolizi, +/- slab supstrat, – stabilan prema hidrolizi, V – varijabilan unutar grupe, ? nije sigurno utvrđeno

activity: +++ preferred substrate, ++ good substrate, + hydrolysed, +/- barely hydrolysed, – stable to hydrolysis, V – variable within the group, ? uncertain

² inhibicija: ++ jaka inhibicija kod svih članova grupe, + umjerena inhibicija, V – inhibicija varijabilna unutar grupe, – zanemariva inhibicija
inhibition: ++ strong inhibition of all members of the class, + moderate inhibition, V – inhibition varies within the class, – negligible inhibition

³ N – nije određeno / not determined

(Podaci preuzeti iz: Livermore D. β -lactamase mediated resistance and opportunities for its control. J Antimicrob Chemother 1998;41(Suppl D):25–41, uz dozvolu izdavača.)

Genska regulacija sinteze β -laktamaza

Kromosomske β -laktamaze

β -laktamaze se u malim količinama mogu utvrditi gotovo kod svih bakterija, čak i kod β -hemolitičkih streptokoka.⁶ Danas se zna da su se prave β -laktamaze, npr. AmpC cefalosporinaze enterobakterija, pojavile davno prije upotrebe antibiotika. Smatra se da one imaju određenu fiziološku funkciju u sintezi peptidoglikana ili su se pojavile da zaštite bakteriju od β -laktama koje proizvode bakterije i gljive iz okoliša. Sigurno je da je klinička upotreba β -laktamskih antibiotika najvažniji selekcijski činitelj koji utječe na produkciju β -laktamaza među patogenim bakterijama.¹ Kromosomske β -laktamaze dijele se na konstitutivne i inducibilne.^{6–8} Konstitutivne β -laktamaze se proizvode bez obzira na prisutnost β -laktamskog spoja. Bazalna proizvodnja tih enzima ovisi o vrsti bakterije. Konstitutivnu produkciju β -laktamaza grupe A imaju *Escherichia coli* i *Klebsiella* spp., dok inducibilne β -laktamaze (grupa C) proizvode *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Serratia* spp., *Providentia* spp. i *Pseudomonas aeruginosa*. *Pseudomonas cepacia*, *Citrobacter diversus* i *Proteus vulgaris* imaju inducibilnu grupu A β -laktamaza, dok *Sthenotrophomonas maltophilia* ima inducibilnu grupu B karbapenemaza.¹ Inducibilne β -laktamaze proizvode

se u značajnim količinama jedino u prisutnosti β -laktamskih antibiotika.

Plazmidne β -laktamaze

Plazmidne β -laktamaze kodirane su prenosivim genskim elementima kao što su plazmidi i transposoni. Rezistencija uvjetovana proizvodnjom tih enzima prenosiva je iz jedne bakterijske stanice u drugu konjugacijom ili transdukcijom preko bakteriofaga. Plazmidne β -laktamaze nazivaju se još i sekundarne β -laktamaze jer se nalaze kao dodatni enzimi uz kromosomske koje su specifične za vrstu.¹ Prvi enzim tog tipa otkriven je 1965. kod *E. coli* i nazvan je TEM β -laktamaza. U principu plazmidne β -laktamaze razlikuju se od kromosomskih, ali postoje preklapanja. SHV-1 β -laktamaza je česta plazmidna β -laktamaza kod enterobakterija, ali je i tipična kromosomska β -laktamaza u *Klebsiella pneumoniae*,⁹ a BIL-1, CMY-1, CMY-2, CMY-3, FOX-1, LAT-1, MIR-1 i MOX-1 i mnoge druge plazmidne β -laktamaze su AmpC enzimi kodirani genima koji su s kromosoma iz rodova *Enterobacter* i *Citrobacter* spp. preneseni na plazmid.¹⁰ Vjerojatno je da sve plazmidne β -laktamaze potječu od kromosomskih iako je izvor kod mnogih tipova nepoznat. Distribucija β -laktamaza odražava prenosivost struktura na kojima su locirani geni koji ih kodiraju. Plazmidne β -laktamaze nisu specifične za vrstu kao kromosom-

ske, nego je moguće širenje među različitim vrstama i rodovima bakterija. Za TEM β -laktamaze se vjerovalo da su specifične za enterobakterije, ali poslije su dokazane kod *P. aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Haemophilus influenzae* i *Neisseria* spp.^{1,10,11} Neke od plazmidnih β -laktamaza rijetko se nalaze na plazmidima. Primjer je SHV-1 β -laktamaza koju najčešće susrećemo kao kromosomsku β -laktamazu kod klepsijela,⁹ dok je PSE-4 β -laktamaza u *P. aeruginosa* gotovo uvijek kodirana transposonima koji su uključeni u kromosom.¹²

Uloga beta-laktamaza u nastanku rezistencije

Sposobnost β -laktamaza da uzrokuju rezistenciju ovisi o brzini hidrolize pojedinih supstrata, afinitetu enzima za određene supstrate, količini enzima i propusnosti vanjske membrane kod gram-negativnih bakterija. Međusobni odnos svih tih činitelja može se prikazati matematički kod enterobakterija.^{13,14} U *P. aeruginosa* treba uzeti u obzir i efluks koji aktivno izbacuje β -laktamske antibiotike iz bakterijske stanice.¹⁵ Sposobnost β -laktamaza da izazovu rezistenciju ovisi i o uvjetima. MIK-ovi (minimalne inhibitorne koncentracije) većine β -laktamskih supstrata rastu s veličinom inokuluma, što valja i očekivati jer više bakterijskih stanica proizvodi više enzima i zaštita je bolja. Izraženi inokulumski efekt dokazan je kod stafilokoka i penicilina,¹⁶ ureidopenicilina i *Klebsiella* spp.,¹⁷ cefalosporina prve generacije i producenata TEM-1 β -laktamaze¹⁸ te kod cefalosporina treće generacije i gram-negativnih bakterija – producenata TEM i SHV- β -laktamaza proširenog spektra (ESBL)¹⁹. U principu jako izraženi inokulumski efekt kod određenog antibiotika je kontraindikacija za njegovu upotrebu kod teških infekcija, ali ne i u profilaksi. Važan činitelj je i količina enzima koji proizvede određena bakterija.¹ Bakterije mogu pod selekcijskim djelovanjem antibiotika mutirati tako da proizvode veću količinu β -laktamaze zbog povećanja broja plazmidnih kopija, većeg broja genskih kopija na istome plazmidu ili zbog mutacija u promotorskoj regiji β -laktamaza gena.²⁰

Enterobakterije koje proizvode β -laktamaze proširenog spektra mogu biti *in vitro* osjetljive na cefalosporine treće generacije, npr. cefotaksim ili ceftriakson, ali unatoč tome često dolazi do terapijskih neuspjeha ako se oni primjenjuju za liječenje infekcija uzrokovanih takvim bakterijama. Nadalje sojevi *E. coli* koji proizvode TEM-1 i TEM-2 β -laktamaze mogu *in vitro* biti osjetljivi na starije cefalosporine kao što su cefaleksim i cefuroksim, ali njihova djelotvornost *in vivo* može biti upitna.^{1,18}

β -laktamski antibiotici prve generacije i rani problemi s β -laktamazama

Uvođenje antibiotika u kliničku primjenu u ranim 40-im godinama prošlog stoljeća smatra se jednim od najvažnijih dostignuća medicine. Najveći nedostatak je razvoj rezistencije. Kada je bio prvi put uveden u kliničku primjenu 1944, benzilpenicilin je bio djelotvoran protiv 95% izolata *Staphylococcus aureus*, a 5% je proizvodilo β -laktamazu i bilo je rezistentno. Nakon 5 godina postotak rezistentnih izolata popeo se na 50% zbog prijenosa gena i selekcije rezistentnih sojeva, a već sredinom 1980. je iznad 90% stafilokoka bilo otporno na penicilin.²¹ Stafilokokna β -laktamaza spada u molekularnu grupu A, a po Karen Bush je svrstana u grupu 2a. Po Richmondu i Sykesu bila je podijeljena u 4 tipa koji su se označavali slovima od A do D na temelju reakcije s antiserumima. Izoelektrično fokusiranje koje se rabi za razlikovanje β -laktamaza gram-negativnih bakterija kod stafilokoka ne zadovoljava jer su njihovi enzimi slabo topljivi oko izoelektrične točke.²² Tipiziranje stafilokoknih β -laktamaza može se izvršiti na temelju brzine hidrolize cefazolina, cefaloridina i nitrocefina.^{23,24} Stafi-

lokokna β -laktamaza izlučuje se ekstracelularno i smanjuje koncentraciju antibiotika u vanjskome mediju. Zbog toga MIK-ovi penicilina značajno rastu uz porast inokuluma jer više bakterijskih stanica proizvodi više enzima i veća količina antibiotika može biti razgrađena.²⁵ Sve četiri stafilokokne β -laktamaze hidroliziraju benzilpenicilin, aminopeniciline i karboksipeniciline, dok su izoksazolipenicilini stabilni u prisutnosti tih enzima.²⁵

Sličan razvoj rezistencije uslijedio je i nakon što su u ranim 60-im godinama prošlog stoljeća uvedeni prvi β -laktami djelotvorni prema gram-negativnim bakterijama.⁷ Do 70-ih godina 20. stoljeća otkriće novih lijekova i derivata postojećih nadmašivalo je evoluciju mikrobne rezistencije. Tijekom 70-ih i 80-ih godina horizontalno širenje rezistencije putem konjugativnih plazmida i transposona postajalo je sve učestalije. Neke gram-negativne bakterije su intrinzično rezistentne na β -laktamske antibiotike jer proizvode konstitutivno velike količine kromosomske β -laktamaze. Tako npr. ampicilin, amoksicilin i karboksipenicilini (karbenicilin i tikarcilin) ne pokazuju aktivnost protiv *Klebsiella* spp. koje proizvode velike količine SHV-1 ili kromosomske K 1 β -laktamaze.¹ Slično su ampicilin, amoksicilin i cefalosporini prve generacije nedjelotvorni protiv gram-negativnih bakterija s inducibilnom grupom A β -laktamaza kao što su *Proteus vulgaris*, *Citrobacter diversus* i onih s inducibilnim AmpC β -laktamazama, npr. *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Providencia* spp., *Serratia* spp. i *Pseudomonas aeruginosa*. Te su vrste postale klinički važne nakon što su uvedeni u terapijsku primjenu β -laktami koji djeluju na ostale gram-negativne bakterije.²⁵

Sljedeća važna posljedica uvođenja β -laktama bila je pojava plazmidnih β -laktamaza koje su kodirane ekstrakromosomskim genskim elementima. Najvažnija plazmidna β -laktamaza je TEM-1 koja se prvi put pojavila 1965. u *E. coli*,²⁶ a nakon toga se masovno proširila među enterobakterijama. Danas oko 20 do 60% enterobakterija, ovisno o geografskom području i vrsti bakterije, posjeduje TEM-1 β -laktamazu.¹ Rjeđe se pojavljuju ostale plazmidne β -laktamaze kao što su TEM-2, SHV-1 i OXA-1.²⁵⁻²⁷ Tijekom 70-ih godina prošlog stoljeća gen koji kodira TEM-1 β -laktamazu proširio se na osjetljive gram-negativne štapiće,²⁷ *Pseudomonas* spp.²⁸ i *Vibrio cholerae*.¹¹ TEM-1 je jedina plazmidna β -laktamaza u *Neisseria gonorrhoeae* je pronađena je u <1 do 40% izolata ovisno o geografskom području.¹ U *Haemophilus influenzae* pojavljuje se u 2 do 40% izolata ovisno o zemlji i kapsularnom tipu.²⁵ Osim TEM-1 β -laktamaze kod te vrste nalazimo i ROB-1 β -laktamazu koja je po supstratnome profilu slična TEM enzimima.²⁹ Kod *Pseudomonas* spp. je prevalencija plazmidnih β -laktamaza manja od 10%. U tom rodu su PSE β -laktamaze najčešće plazmidne β -laktamaze i hidroliziraju karboksipeniciline kao što su tikarcilin i karbenicilin, a spadaju u grupu 2c po K. Bush.²⁸

BRO-1, BRO-2 i BRO-3 su jedine plazmidne β -laktamaze kod *Moraxella catarrhalis*.³⁰⁻³² Počele su se pojavljivati u kasnim 70-im godinama prošlog stoljeća i od tog vremena su se proširile na više od 90% izolata.³³ Po supstratnom profilu su penicilinaze. Izazivaju rezistenciju na penicilin, ampicilin, amoksicilin i karboksipeniciline.³⁴⁻³⁹ Snažno su inhibirane klavulanskom kiselinom kao i većina ostalih plazmidnih β -laktamaza.⁴⁰⁻⁴² BRO-1 je najčešći tip.^{30,33} Izolati koji sadržavaju taj enzim rezistentniji su u odnosu na one koji posjeduju BRO-2 ili BRO-3. Tri tipa BRO β -laktamaza mogu se međusobno razlikovati na temelju rasporeda vrpca prilikom izoelektričnog fokusiranja.⁴³ BRO-2 β -laktamaza može dati lažno negativni rezultat čak i ako se testiranje provodi nitrocefonom vjerojatno zbog toga što se luči u manjim količinama od BRO-1.⁴³ Detekcija BRO β -laktamaza je jednostavna zbog nedostatka permeabilne barijere u *M. catarrhalis*, a najčešće se rabi nitrocefinski test.⁴⁴ Na temelju antibiograma može se pretpostaviti da je soj

producent BRO β -laktamaza ako nema inhibicijske zone oko penicilinskog diska.⁴⁴ β -laktamaza-pozitivni sojevi pokazuju značajan inokulumski efekt pri testiranju osjetljivosti na β -laktamske antibiotike.⁴⁵ Za terapiju infekcija koje uzrokuje β -laktamaza-pozitivna *M. catarrhalis* treba preporučiti kombinaciju amoksicilina i klavulanske kiseline, a alternativno se mogu primijeniti oralni cefalosporini, makrolidi ili azalidi.^{36,37}

Gotovo sve ranije navedene plazmidne β -laktamaze: TEM-1, TEM-2, SHV-1, PSE-1, PSE-4 i sva tri BRO-tipa spadaju u

molekularnu grupu A. Izuzetak je OXA-1 koji spada u grupu D.¹ Svi su ti enzimi, uključujući i OXA-1, vezani uz sličan fenotip rezistencije koji je posljedica hidrolize penicilina: ampicilina, amoksicilina, tikarcilina i karbenicilina. Uz to je obično izražena i rezistencija na ureidopeniciline (azlocilin, mezlocilin i piperacilin) i prvu generaciju cefalosporina osim ako se enzim ne proizvodi u vrlo maloj količini.²⁵ Na tablici 2. prikazana je supstratna specifičnost pojedinih plazmidnih β -laktamaza.

Tablica 2. Usporedba supstratnog profila najčešćih plazmidnih β -laktamaza
Table 2. Comparison of the substrate profiles of most frequent plasmid mediated β -lactamases

Tip enzima Type of enzyme	Vrsta – najčešći domaćin Most frequent host species	β -laktamski antibiotici – supstrati navedenih enzima β -lactam antibiotics – substrates of the respective enzymes	β -laktamski antibiotici – nisu supstrati navedenih enzima β -lactam antibiotics – not substrates of the respective enzymes	Inhibicija klavulanskom kiselinom Inhibition by clavulanic acid
TEM-1, TEM-2, SHV-1	<i>Enterobacteriaceae</i>	penicilin G, aminopenicilini, karbenicilini, neki cefalosporini 1. gen. penicillin G, aminopenicillins, some 1st. gen. cephalosporins	cefalosporini 2, 3. i 4. gen., cefamicini, karbapenemi cephalosporins 2, 3 and 4 gen., cephameycins, carbapenems	+
Klasične OXA i PSE Classic OXA and PSE ROB	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Haemophilus influenzae</i>	penicilin G, ureidopenicilini, karboksipenicilini penicillin G, ureidopenicillins, carboxypenicillins penicilin G, aminopenicilini, karboksipenicilini penicillin G, aminopenicillins, carboxypenicillins	cefalosporini 1, 2, 3. i 4. gen., cefamicini, karbapenemi cephalosporins 2, 3 and 4 gen., cephameycins, carbapenems cefalosporini 1, 2, 3. i 4. gen., cefamicini, karbapenemi cephalosporins 2, 3 and 4 gen., cephameycins, carbapenems	V +
BRO (1-3)	<i>Moraxella catarrhalis</i>	penicilin G, aminopenicilini, karboksipenicilini penicillin G, aminopenicillins, carboxypenicillins	cefalosporini 1, 2, 3. i 4. gen., cefamicini, karbapenemi cephalosporins 1, 2, 3 and 4 gen., cephameycins, carbapenems	+
ESBL-TEM i SHV	<i>Enterobacteriaceae</i>	penicilini i cefalosporini 1–4. gen. penicillins and cephalosporins 1–4 gen.	cefamicini, karbapenemi cephameycins, carbapenems	+
ESBL-CTX-M	<i>Enterobacteriaceae</i>	penicilini i cefalosporini 1–4. gen. penicillins and cephalosporins 1–4 gen. ¹	cefamicini, karbapenemi cephameycins, carbapenems	+
ESBL-OXA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i>	penicilini i cefalosporini 1–4. gen. penicillins and cephalosporins 1–4. gen.	cefamicini, karbapenemi cephameycins, carbapenems	–
ESBL-AmpC	<i>Enterobacteriaceae</i>	penicilini i cefalosporini 1–4. gen., cefamicini penicillins and cephalosporins 1–4. gen., cephameycins	karbapenemi carbapenems	V ²
karbapenemaze grupa A carbapenemases – class A (SME, IMI, NMC)	<i>Enterobacteriaceae</i>	penicilini, aztreonam, karbapenemi ³ penicillins, aztreonam, carbapenems	aminotiazol, cefalosporini aminothiazol cephalosporins	+
karbapenemaze grupa B carbapenemases – class B (IMP)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Serratia marcescens</i>	karbapenemi, penicilini, cefalosporini ⁴ penicillins, cephalosporins, carbapenems	aztreonam	

¹ MIK-ovi cefotaksima su viši nego ceftazidima i aztreonama / MICs of cefotaxime are higher than those of ceftazidime and aztreonam

² V-varijabilno unutar grupe / Variable within the group

³ Brzina hidrolize imipenema je veća nego meropenema / Hydrolysis rate of imipenem is higher than of meropenem

⁴ Postoji podjednaka rezistencija na imipenem i meropenem / There is equal resistance to imipenem and meropenem

β -laktamaza-stabilni penicilini i cefalosporini i novije β -laktamaze

Stabilnost β -laktamskih antibiotika prema β -laktamazama može se postići vezanjem supstituenta na β -laktamski prsten koji će onemogućiti pristup aktivnom ostatku serina u molekuli β -laktamaze ili premještanjem vode iz aktivnog središta, što onemogućuje završavanje procesa hidrolize.⁴⁶ Postoji više načina da se to izvede, npr. vezanje acilne grupe na amino-grupu u molekuli 6-aminopenicilanske kiseline ili 7-aminocetofalosporanske kiseline ili zamjena vodika na ugljikovu atomu br. 6 kod penicilina ili 7 kod cefalosporina s jednom α -metoksi-grupom.^{46,47}

Problem stafilokokne β -laktamaze bio je riješen uvođenjem β -laktamaza stabilnih penicilina: metecilina i izoksazolidpenicilina.^{23,24} Rezistencija koja se pojavila na te antibiotike posljedica je njihova smanjenog afiniteta za PBP-molekule, a ne hidrolize β -laktamazama iako rezistencija niskog stupnja na te antibiotike može biti povezana s hiperprodukcijom β -laktamaza.¹ Nedostatak stafilokokne β -laktamaze proširenog spektra vjerojatno je posljedica ekstracelularne lokalizacije tog enzima. Kada bi stafilokoki proizvodili oksacilinazu, ona bi zaštitila jednako i druge bakterije koje se nalaze u okolišu, što ne bi bilo korisno za stafilokoke.¹ Mutacije PBP-a daju selektivnu prednost stafilokoku pred drugim bakterijama.

Stabilnost prema β -laktamazama bilo je znatno teže postići kod gram-negativnih vrsta jer one proizvode veći broj različitih β -laktamaza.⁷ Među penicilinima jedino temocilin koji je 6- α -metoksi-analog tikarcilina pokazuje stabilnost u prisutnosti β -laktamaza gram-negativnih bakterija. Kod cefalosporina ugradnja oksimino-aminotiazol-7-acilnog postraničnog lanca koji je prisutan kod većine cefalosporina treće generacije štiti od hidrolize β -laktamazama širokog spektra (TEM-1, TEM-2 i SHV-1).⁴⁷

Prisutnost 7 α -metoksi-grupe u molekuli cefamicina (cefoksitin, cefotetan, cefmetazol i moksalaktam) osigurava zaštitu tih antibiotika od TEM-1 i SHV-1 β -laktamaza, kao i prema Cep-A kromosomskoj β -laktamazi koju proizvodi *Bacteroides fragilis*, što čini tu skupinu antibiotika djelotvornima prema anaerobima.⁴⁷

Beta-laktamaze proširenog spektra

Stabilnost cefalosporina treće generacije prema β -laktamazama nije na žalost bila duga vijeka jer su se početkom 80-ih godina pojavile β -laktamaze proširenog spektra. β -laktamaze proširenog spektra nastaju mutacijom TEM ili SHV-enzima. Većina takvih mutacija se događa prilikom upotrebe cefalosporina treće generacije koji vrše selekcijski pritisak i omogućavaju preživljavanje mutantima.⁴⁸⁻⁵¹ One omogućuju adaptaciju bakterijama na nove β -laktamske antibiotike. Spadaju u grupu A po Ambleru.⁵

Mutacija SHV ili TEM-enzima mijenja konfiguraciju aktivnog mjesta što širi spektar njihove aktivnosti. Ti enzimi su snažno inhibirani klavulanskom kiselinom i sulbaktamom. Nisu aktivni prema cefamicinima s α -metoksi-supstituentom na poziciji 7 kao što su cefoksitin ili cefotetan iako se u novije vrijeme pojavljuju β -laktamaze proširenog spektra koje vuku podrijetlo od AmpC β -laktamaza vrsta *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii* i *P. aeruginosa*, a uzrokuju rezistenciju na cefamicine i nisu inhibirane suicidalnim inhibitorima.^{52,53} Najvažniji predstavnici takvih enzima su FOX-1⁵³ i 2⁵⁴ i MOX-1, MIR-1 i CMY-1 i 2,⁵⁵⁻⁵⁸ CMY-8⁵⁹ β -laktamaze. Kod tih enzima došlo je do prijenosa kromosomskih gena koji kodiraju AmpC β -laktamaze na plazmid koji je prenosiv među različitim enterobakterijama. Ta vrsta β -laktamaza proširenog spektra javlja se sa sve većom učestalošću u većini zemalja. β -laktamaze proširenog spektra iz TEM i SHV-porodice hidroliziraju cefalosporine prve, druge i treće generacije, aminopeniciline i monobaktame. Karbapenemi su u pravilu pošteđeni. MIK-ovi cefepima i cefpiroma mogu biti povišeni za bakterije koje proizvode neke tipove SHV β -laktamaza kao što su SHV-4 i SHV-5.^{60,61} β -laktamaze proširenog spektra pojavljuju se češće kod klepsijela nego kod ostalih gram-negativnih bakterija. Moguće objašnjenje za takvu distribuciju tražilo se u intenzivnijoj ekspresiji rezistencije kod *K. pneumoniae*. Da bi se testirala ta hipoteza, plazmidi koji kodiraju β -laktamaze proširenog spektra unášeni su konjugacijom u osjetljive izolate *E. coli*, *E. cloacae*, *C. freundii* ili *Serratia marcescens*, ali nije dokazana značajna razlika u MIK-ovima ceftazidima, cefotaksima, ceftriaksona ili aztreonama. Budući da β -laktamaze proširenog spektra nastaju mutacijom, drugo moguće objašnjenje za epidemiologiju te rezistencije bilo je da je frekvencija mutacija češća kod klepsijela nego kod ostalih gram-negativnih bakterija, ali je i ta hipoteza odbačena.⁶² U početku su β -laktamaze proširenog spektra bile ograničene samo na *K. pneumoniae*⁶³ i *E. coli*, međutim u novije vrijeme se sve češće pojavljuju i u drugim vrstama enterobakterija kao što su *Salmonella typhimurium*,^{64,65} *Salmonella mbandaka*,⁶⁶ *Shigella flexneri*,⁶⁷ *Morganella morganii*,⁶⁸ *Proteus mirabilis*⁶⁹ i *Enterobacter gergoviae*,⁷⁰ kao i kod nefermentativnih bakterija.^{71,72}

OXA β -laktamaze proširenog spektra

U grupu β -laktamaza proširenog spektra spadaju i OXA β -laktamaze koje su svrstane u grupu D po Ambleru.⁵ Te β -laktamaze proširenog spektra uzrokuju rezistenciju na ceftazidim, cefotaksim i ceftriakson, kao i na monobaktam aztreonam.^{73,74} Većina oksacilinaza proširenog spektra nastaje točkastim mutacijama od OXA-2 (OXA-15) ili OXA-10 (OXA-11, 13, 14, 15, 16, 17 i 19) osim OXA-18. Aktivnost tih serinskih β -laktamaza nije značajno inhibirana klavulanskom kiselinom osim OXA-18.⁷⁵ OXA-11, 14 i 19 pretežno kompromitiraju aktivnost ceftazidima, dok OXA-17 snažnije razgrađuje cefotaksim. OXA-10 varijante uzrokuju rezistenciju na cefepim, ali nižeg stupnja nego na ceftazidim. OXA-23 (ARI-1) i OXA-24 hidroliziraju i karbapeneme,⁷⁶ a identificirane su u izolatima *Acinetobacter baumannii* iz Ujedinjenog Kraljevstva. Ostale OXA β -laktamaze proširenog spektra pronađene su uglavnom u izolatima *P. aeruginosa* iz Turske.⁷⁵ Najnoviji tip tih enzima je OXA-37 koji uzrokuje visoki stupanj rezistencije na β -laktame, a izoliran je iz kliničkog izolata *A. baumannii*.⁷⁷ Oksacilnazni geni locirani su na plazmidima i integronima.⁷⁵

CTX-M β -laktamaze

Od 1990. identificirano je 26 članova CTX-M porodice β -laktamaza proširenog spektra. Pripadaju u grupu A po Ambleru, a dobro hidroliziraju cefotaksim i ceftriakson, dok je ceftazidim slab supstrat za njih, što znači da im je fenotip rezistencije suprotan nego kod većine TEM i SHV β -laktamaza.⁷⁸ Te β -laktamaze nastale su mutacijom kromosomskih β -laktamaza gena od gram-negativnog genusa *Kluyvera*. Izoelektrična točka tih enzima kreće se oko 8,6. Prvi put su se pojavile u Južnoj Americi,^{79,80} a danas su otkrivene u velikom broju zemalja, npr. u Poljskoj (CTX-M-3),⁸¹ Španjolskoj (CTX-M-9⁸² i CTX-M-14),⁸³ Francuskoj (CTX-M-1, CTX-M-3 i CTX-M-14),⁸⁴ Keniji (CTX-M-12),⁸⁵ Kini (CTX-M-9, CTX-M-13, CTX-M-14),⁸⁶ Tajvanu (CTX-M-14 i CTX-M-3),⁸⁷ Brazilu (CTX-M-8)⁸⁸ i Ujedinjenom Kraljevstvu.⁷⁹ Zbog sve većeg širenja tog tipa β -laktamaza potrebno je da laboratoriji testiraju osjetljivost hospitalnih izolata i na ceftazidim i na cefotaksim i da posumnjaju na ESBL ako postoji smanjena osjetljivost bilo na jedan ili na drugi antibiotik. Druga mogućnost je testiranje osjetljivosti na cefpodoksim koji podliježe hidrolizi i klasičnim TEM/SHV β -laktamazama proširenog spektra, kao i CTX-M β -laktamazama. Na temelju izoelektrične točke mogu se razlikovati od TEM i SHV β -laktamaza. Konačna identifikacija tih enzima obavlja se analizom sekvencije *bla*_{CTX-M} gena.⁷⁹

Kliničko značenje β -laktamaza proširenog spektra

Poznata je činjenica da bakterije koje posjeduju β -laktamaze proširenog spektra često uzrokuju epidemije nozokomijalnih infekcija⁸⁹⁻¹⁰⁰ na bolničkim odjelima koje je teško kontrolirati. Prisutnost ESBL-gena na plazmidu predstavlja potencijal za rapidno širenje među patogenim bakterijama, što je već često zapaženo u svijetu.¹⁰¹

Rizični činitelji za kolonizaciju i infekciju ESBL pozitivnim organizmima su:

1. Prijam u jedinicu za intenzivnu skrb
2. Nedavni kirurški zahvat
3. Instrumentalni zahvati (arterijski, centralni venski i urinarni kateteri)
4. Produženi boravak u bolnici
5. Terapija antibioticima, posebno cefalosporinima širokog spektra.^{98,99,101}

U novije vrijeme je zapaženo da su stacionari za starije osobe važan rezervoar ESBL-pozitivnih bakterija koji pridonose i njihovu širenju u bolničkom ambijentu nakon primitka u bolnicu.^{100,101} Većina takvih bolesnika ima ESBL-pozitivne *E. coli* u debelom crijevu.¹⁰² Važan činitelj rizika je česta primjena antibiotika u toj populaciji.¹⁰²

ESBL-producente vrlo je teško iskorijeniti nakon što invadiraju bolnicu. Jedan od razloga je i intenzivna gastro-intestinalna kolonizacija i veliki broj koloniziranih bolesnika koji služe kao rezervoar u jedinicama za intenzivnu skrb. Jedna od mjera za suzbijanje epidemija je ograničavanje upotrebe cefazidima. Prema američkom iskustvu obustava empirijske primjene cefazidima kao monoterapije kod febrilne neutropenije i primjena trojne terapije koja se sastoji od aminoglikozida, antipseudomonasnog penicilina i antistafilokoknoga semisintetskog penicilina pridonijela je zaustavljanju epidemije ESBL-infekcija.⁹⁹ Druga mjera je izolacija koloniziranih bolesnika. Neki autori predlažu selektivnu dekontaminaciju crijeva kod koloniziranih bolesnika za kontrolu epidemije, primjenom neomicina, polimiksina i nalidiksične kiseline, ali se pokazalo da takva mjera dovodi do povećane kolonizacije stafilokokima, enterokokima i multirezistentnim izolatima *P. aeruginosa*.¹⁰³

Važnost laboratorijske detekcije i identifikacije β -laktamaza proširenog spektra

Metode za detekciju β -laktamaza proširenog spektra bazi-
raju se na sinergističkom učinku cefalosporina treće genera-
cije i klavulanske kiseline. Najčešći test za dokaz β -laktamaza
proširenog spektra u laboratoriju je dvostruki disksinergistički
test kod kojeg se stavlja disk s amoksicilinom i klavulanskom
kiselinom u sredinu ploče, a oko njega se na udaljenosti od 2
do 3 cm stavljaju diskovi cefalosporina i aztreonama. Širenje
inhibicijske zone prema centralnom disku označava pozitivni
rezultat testa.¹⁰⁴ Prednost te metode je jednostavnost i niska
cijena, a nedostatak je da optimalna udaljenost između disko-
va varira ovisno o pojedinom soju. Postoji i modifikacija te
metode kod koje se inkorporira klavulanska kiselina u koncen-
traciji od 4 mg/L u podlogu i nakon toga se postavljaju disko-
vi cefalosporina na površinu ploče. Test se smatra pozitivnim
ako dođe do proširenja zone inhibicije oko cefalosporinskog
diska od najmanje 10 mm u prisutnosti klavulanata.¹⁰⁵ Kod
testa disk na disk stavlja se disk s amoksicilin/klavulanatom
na površinu cefalosporinskih diskova i određuje se širina inhi-
bicijske zone oko cefalosporinskog diska s diskom i bez diska
s klavulanatom na njemu.¹⁰⁶ Trodimenzionalni test ima veću
specifičnost od dvostrukog diskdifuzijskog testa, ali je kom-
pliciraniji za izvođenje.¹⁰⁷ β -laktamaze proširenog spektra
mogu se dokazati i na temelju određivanja MIK-ova cefalo-
sporina samih i uz dodatak klavulanske kiseline, s pomoću E-
testa¹⁰⁸ ili s pomoću Vitek ESBL-testa.¹⁰⁹ U novije vrijeme
preporučuje se upotreba cefpodoksima kao indikatorskog cefa-
losporina zbog toga što on podliježe hidrolizi TEM, SHV i
CTX-M β -laktamazama tako da omogućuje detekciju ESBL-a
iz sve tri porodice.¹¹⁰ Na tablici 3. prikazani su najčešći testovi
za dokaz ESBL u kliničkim laboratorijima. β -laktamaze
proširenog spektra mogu se dokazati i molekularnim metoda-
ma, npr. amplifikacijom *bla*_{TEM} ili *bla*_{SHV} gena uz pomoć lan-
čane reakcije polimerazom.^{111,112}

Postoji više činitelja koji otežavaju detekciju β -laktamaza
proširenog spektra. Jedan od problema leži u činjenici da struk-
turni gen koji kodira ESBL može biti vezan uz jaki ili slabi
promotor. Slabi promotor dovest će do niskog stupnja produk-
cije β -laktamaze, dok će jaki promotor biti udružen s visokim
stupnjem produkcije enzima i jače izraženom rezistencijom.
Uz nisku produkciju enzima i MIK-ovi cefalosporina mogu
biti niski, što otežava detekciju.^{113,114} Nadalje SHV-geni mogu

Tablica 3. Fenotipski testovi za detekciju β -laktamaza proširenog spektra
pogodni u kliničkim mikrobiološkim laboratorijima

Table 3. Phenotypic tests for detection of extended-spectrum β -lacta-
mases suitable for clinical microbiology laboratories

Test	Referenca Reference
Dvostruki disk-sinergistički test Double disc-synergy test	104
Disk-difuzijski test potenciran inhibitorom Inhibitor-potentiated disc-diffusion test	105
Disk na disk-test Disc on disc test	106
Trodimenzionalni test Threedimensional test	107
ESBL-E-test	108
Vitek ESBL-test	109
Određivanje MIK-a oksiminocefalosporina s klavulanskom kiselinom i bez nje MIC determination of oximinocephalosporins with and without clavulanate	110

biti inaktivirani u prisutnosti insercijskih elemenata iako se
odvija hibridizacija s genskom probom. Zbog toga molekular-
ni testovi indiciraju produkciju SHV β -laktamaze, ali nema
aktivnog enzima.^{114,115} Moguće je i da su mikrobiološki krite-
riji za dokaz ESBL-a previše rigidni. ESBL su poznate kao
kinetički nedjelotvorni enzimi.¹¹⁶ U sojeva s niskim stupnjem
produkcije β -laktamaze, MIK-ovi β -laktama proširenog spektra
mogu se samo neznatno sniziti u prisutnosti inhibitora, zbog
malog doprinosa ESBL fenotipskoj rezistenciji.¹¹³

S praktičnog stajališta važno je odgovoriti je li nužno znati
proizvodi li uzročnik infekcije ESBL ili ne ako su MIK-ovi
cefalosporina niski. S epidemiološkog stajališta odgovor je po-
zitan. Ako je prisutan ESBL-gen, postoji opasnost od njego-
va prijenosa na plazmid s većim brojem kopija i višim stup-
njem rezistencije. Kao što je zapaženo kod hospitalnih epide-
mija, MIK-ovi epidemijskih izolata obično rastu tijekom vre-
mena kao posljedica pojave novih multirezistentnih plazmida
s različitim markerima rezistencije i s jačom ekspresijom rezi-
stencije.^{117,118}

Inokulumski efekt je važan faktor kod ESBL-producenta.
MIK-ovi cefalosporina dramatično rastu kada se veličina ino-
kuluma poveća sa standardne vrijednosti od 5×10^5 na 5×10^7 .
Buduci da se testovi osjetljivosti izvode uz inokulum od 10^5 ,
oni u većini slučajeva ne detektiraju rezistenciju.¹¹⁹ Inokulum-
ski efekt je jače izražen kod *K. pneumoniae* nego kod *E. coli*.
ESBL-pozitivne *E. coli* su češće kolonizacijski mikroorganizmi
nego *K. pneumoniae* tako da testovi osjetljivosti u većem
broju slučajeva previde kolonizaciju ESBL-pozitivnim *E. coli*
nego infekciju.¹²⁰

Posljedica neprepoznavanja ESBL-producenta može rezul-
tirati netočnom evaluacijom antimikrobne osjetljivosti i lošim
odabirom terapije za bolesnika. ESBL-geni mogu se lako pre-
nositi s *K. pneumoniae* na sojeve *E. coli*. Takvi sojevi *E. coli*
mogu kolonizirati bolesnike koji napuštaju bolnicu i zatim dise-
miniraju takve izolate u svojoj okolini. ESBL-geni imaju mo-
gućnosti prijenosa na jače rezistentne plazmide tako da na kraju
domaćin postane koloniziran visokorezistentnim organizmom.¹¹³

Lažno pozitivni rezultati pri fenotipskoj detekciji ESBL-a
mogu nastati zbog hiperprodukcije SHV-1 β -laktamaze¹²¹ ili
kod multiplih β -laktamaza širokog spektra u istom izolatu.¹²²
Lažno negativni rezultati fenotipske detekcije koja se bazira
na sinergizmu s klavulanskom kiselinom zapaženi su zbog raz-
ličite aktivnosti β -laktamaza prema pojedinim supstratima, zbog
prisutnosti multiplih β -laktamaza ili ako postoje dodatni me-
hanizmi rezistencije, npr. promjene u porinima.¹²³ Detekcija
ESBL-a može biti otežana kod enterobakterija koje imaju in-

ducibilne kromosomske AmpC β -laktamaze kao što su *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Morganella morganii*, *Providencia* spp. i *Serratia* spp. Klavulanat djeluje kao induktor tih β -laktamaza koje zatim mogu razgraditi indikatorski cefalosporin i maskirati sinergistički efekt zbog inhibicije ESBL-a. *P. aeruginosa* također je problem ne samo zbog AmpC β -laktamaza nego i zbog impermeabilnosti mnogo većeg stupnja nego kod enterobakterija kao i zbog efluksa antibiotika.¹¹⁰ U slučaju ranije navedenih bakterija rezistencija na oksiminocefalosporine uključujući i one indikatorske za ESBL (ceftazidim, cefotaksim, cefpodoksim) ovisi češće o mutacijskoj hiperprodukciji AmpC β -laktamaza nego o ESBL-u. U principu se ESBL-producenti mogu razlikovati od AmpC-hiperproducenta na temelju osjetljivosti na cefotetan.¹¹⁰ U slučaju *P. aeruginosa* visoki stupanj rezistencije na ceftazidim (MIK > 64 mg/L), kao i rast kolonija do ruba diska upućuje na ESBL, dok AmpC-hiperproducenti i mutantni s efluksom i impermeabilnošću obično imaju rezistenciju na ceftazidim nižeg stupnja. Sinergizam s klavulanatom je nepouzdan za detekciju ESBL-a u ove bakterije.¹¹⁰

Terapija infekcija uzrokovanih bakterijama koje proizvode β -laktamaze proširenog spektra

In vitro karbapenemi (imipenem i meropenem), kao i cefamiciini iskazuju konzistentnu aktivnost prema ESBL-producentima jer su otporni na hidrolizu tim enzimima. Rezistencija na karbapeneme je u *K. pneumoniae* zasada vrlo rijetka.^{124,125} Plazmidi koji kodiraju ESBL često sadržavaju i gene rezistencije za ne- β -laktamske antibiotike kao što su aminoglikozidi, sulfonamidi, tetraciklini, kloramfenikol i trimetoprim.¹²⁶ Plazmidna rezistencija na kinolone je rijetka u *K. pneumoniae*, ali je zapaženo da su ESBL-producenti u visokom postotku rezistentni i na tu skupinu antibiotika.^{127,128}

Uloga cefalosporina treće generacije

Producenti TEM i SHV β -laktamaza ceftazidimaznog tipa obično su *in vitro* osjetljivi na cefotaksim,^{104,128} ali je usprkos tomu opće prihvaćeno da se ESBL-pozitivni izolati izvještavaju kao rezistentni na sve β -laktame osim karbapenema, bez obzira na rezultat *in vitro* testa.¹²⁹ Razlog tomu su terapijski neuspjesi kod njihove primjene za liječenje infekcija uzrokovanih bakterijama produktozima ESBL-a unatoč tomu što *in vitro* testovi pokazuju osjetljivost.^{19,130-132} Terapijski neuspjesi su češći ako je infekcija lokalizirana izvan urinarnog trakta.¹³³⁻¹³⁵ Mogući uzrok terapijskih neuspjeha jest izraženi inokulumski efekt, kao i evolucija rezistencije u toku terapije zbog selektivskog pritiska antibiotika.¹³⁶

Postoje međutim i dokumentirane studije o kliničkoj djelotvornosti cefotaksima u liječenju infekcija koje uzrokuju ESBL-producenti.¹³⁶ Neki autori smatraju da bi ga trebalo davati u visokim dozama, ako *in vitro* testovi pokazuju djelotvornost.¹³⁶

Uloga cefalosporina četvrte generacije

Cefepim je stabilniji prema β -laktamazama u odnosu na cefalosporine treće generacije i neki *in vivo* eksperimenti na životinjama pokazuju njegovu djelotvornost prema ESBL-produktorima,¹³⁷ ali pozitivni klinički rezultati na ljudima nisu tako očiti.¹²⁸ Smanjena djelotvornost je posljedica izraženog inokulumskog efekta¹¹⁹ kao i kod cefalosporina treće generacije i mutacija koje dovode do hiperprodukcije, posebno SHV-5 β -laktamaze.¹³⁶

Uloga cefamicina

Cefamiciini ne podliježu hidrolizi β -laktamazama iz TEM i SHV-porodice, ali ih razgrađuju plazmidne AmpC β -laktama-

ze koje se sve češće pojavljuju. Drugi je problem njihova smanjena djelotvornost kod mutanata s defektnim porinima.^{126,138,139} Zbog navedenih razloga cefamiciini se smatraju terapijom drugog izbora za infekcije uzrokovane ESBL-producentima. Cefotetanu bi trebalo dati prednost pred cefoksitinom.^{128,136}

Uloga kombinacija s inhibitorima

Uloga kombinacija β -laktama s inhibitorima (npr. amoksicilin+klavulanat, tikarcilin-klavulanat, piperacilin+tazobaktam, cefoperazon+sulbaktam) upitna je zbog više razloga. Prvo, njihova djelotvornost se smanjuje s porastom inokuluma, kao i kod cefalosporina, a osim toga aktivnost im je umanjena kod hiperprodukcije pojedinih tipova β -laktamaza i gubitka porina.¹²⁸ Pokusi na animalnim modelima nisu dokazali njihovu antibakterijsku djelotvornost.^{140,141} Piperacilin/tazobaktam pokazao se aktivnijim prema TEM-producentima, dok su SHV-2, 3, 4 i 5-producenti obično rezistentni.¹³⁶ Sulbaktam je slabije aktivan prema SHV- β -laktamazama od klavulanske kiseline. U SAD-u je na tržištu dostupan i cefoperazon u kombinaciji sa sulbaktamom. Takva kombinacija je djelotvorna ne samo prema ESBL-producentima nego i prema *A. baumannii*.¹⁴² Kod kombiniranih pripravaka važno je izabrati sastojke sa sličnim farmakokinetičkim svojstvima budući da kombinacija djeluje optimalno ako obje komponente u isto vrijeme uđu u bakterijsku stanicu. Drugi je problem što kombinacija s inhibitorom može uzrokovati mutacije u TEM ili SHV-molekuli koje dovode do pojave inhibitor-rezistentnih TEM (IRT) i SHV- β -laktamaza.¹⁴² Sulbaktam ima jači potencijal selekcije IRT od tazobaktama.¹⁴²

Uloga karbapenema

Karbapenemi su antibiotici izbora za liječenje infekcija uzrokovanih ESBL-producentima. Rezistencija na karbapeneme kod ESBL-pozitivnih bakterija zasada je vrlo rijetka i posljedica je udruženog djelovanja β -laktamaza i defekta u porinima.^{124,125,143} Meropenem ima prednost pred imipenemom jer ima niže MIK-ove za enterobakterije i ne mora se davati u kombinaciji s cilastatinom zbog toga što je otporan na humanu renalnu dihidropeptidazu, tako da ima manje neuroloških nuspojava.¹²⁸ U kontroliranim kliničkim studijama bakteriemija uzrokovanih ESBL-producirajućim sojevima *K. pneumoniae* i *E. coli* pokazalo se da je mortalitet značajno niži kod bolesnika koji su dobivali karbapeneme u odnosu na bolesnike koji su bili tretirani neodgovarajućim antibioticima. Primjena karbapenema u prvih pet dana infekcije ima pozitivan efekt.⁹⁸ Također se pokazalo da osobe kolonizirane ESBL-pozitivnim klepsijelama imaju veću vjerojatnost mortaliteta od sepse u odnosu na kontrolnu populaciju.⁹⁸

Biapenem je najnoviji karbapenem u fazi istraživanja koji pokazuje još veću stabilnost prema β -laktamazama i jednako kao i meropenem ne zahtijeva primjenu cilastatina. U kliničkim studijama dokazao je bakteriološku djelotvornost u liječenju intraabdominalnih infekcija, infekcija donjeg dijela respiratornog trakta i kompliciranih urinarnih infekcija kod odraslih osoba.¹⁴⁴ Valja očekivati da će i on biti lijek izbora za liječenje nozokomijalnih infekcija uzrokovanih ESBL-producentima.

Uloga aminoglikozida

Aminoglikozidi se za terapiju sistemskih infekcija uzrokovanih ESBL-pozitivnim enterobakterijama primjenjuju jedino u kombinaciji s β -laktamima.¹²⁸ Plazmidi koji kodiraju ESBL mogu sadržavati i gene rezistencije na aminoglikozide.¹²⁶ Postoje izvještaji o neuspjehu terapije aminoglikozidima u kombinaciji s ceftazidimom kod infekcija uzrokovanih ESBL-pozitivnim klepsijelama.¹⁴⁵

Uloga kinolona

Kinoloni se rabe uglavnom za liječenje infekcija urinarnog trakta uzrokovanih ESB�-pozitivnim enterobakterijama. Jedan od problema leži u činjenici da su ESB�-producenti često rezistentni i na ovu grupu antibiotika iako ta rezistencija najčešće nije plazmidna.¹²⁸ Kinoloni mogu biti odgovorni za promjenu u distribuciji bakterija koje uzrokuju hospitalne infekcije. Pod njihovim selekcijskim pritiskom ESB�-pozitivne klespijele mogu biti zamijenjene kinolon-rezistentnim sojevima *A. baumannii* i enterokokima kao hospitalnim patogenima koji se još teže eradiciraju.¹⁴²

Zbog gore navedenih razloga potrebno je opsežno testiranje osjetljivosti prije odabira antimikrobne terapije kod infekcija uzrokovanih ESB�-producentima.¹³⁶ Preporuke za terapiju kod teških infekcija uzrokovanih ESB�-pozitivnim bakterijama dane su na tablici 4. Radi prevencije širenja ESB�-produce-

nih tipova ESB�-a u određenoj zemlji odražava odabir primjene antibiotika. U srednjoj Europi prevladavala je prije SHV-5 β-laktamaza,^{150–153,157} a danas se sve češće javlja SHV-12.^{148,158,159} Sve veći broj bakterijskih vrsta stječe rezistenciju na veliki broj β-laktamskih antibiotika zahvaljujući njima tako da su terapijske mogućnosti sve skućenije. Nedjelotvorna terapija povećava mortalitet, produžuje boravak u bolnici i potiče nozokomijalno širenje multirezistentnih gram-negativnih bakterija.^{128,136}

Karbapenemi zasada predstavljaju antibiotike izbora, ali dugoročno rješenje treba tražiti u restrikciji primjene antibiotika, kontroli infekcija, mjerama hospitalne higijene i razvoju novih antibiotika u budućnosti. β-laktami su još uvijek vrlo korisni antibiotici, ali treba čuvati njihovu djelotvornost racionalnom upotrebom.

LITERATURA

Tablica 4. Preporuke za terapiju infekcija uzrokovanih mikroorganizmima koji proizvode β-laktamaze proširenog spektra (ESBL)

Table 4. Treatment recommendations for infections caused by organisms producing extended-spectrum β-lactamases

Tip infekcije Type of infection	Terapija prvog izbora First-line therapy	Alternativna terapija Second-line therapy
Bakterijemija Bacteremia	Karbapenem (imipenem ili meropenem) Carbapenem (imipenem or meropenem)	Ciprofloksacin Ciprofloxacin
Infekcije respiratornog trakta Respiratory tract infections	Karbapenem ili meropenem Carbapenem (imipenem or meropenem)	Ciprofloksacin Ciprofloxacin
Intraabdominalne infekcije Intra-abdominal infections	Karbapenem ili meropenem Carbapenem (imipenem or meropenem)	Ciprofloksacin ili cefamicin Ciprofloxacin or cephamicin
Infekcije urinarnog trakta Urinary tract infection	Ciprofloksacin Ciprofloxacin	Amoksisilin/ klavulanat Amoxycillin/ clavulanate
Meningitis	Meropenem	Dodatak polimiksina B Addition of polymyxin B

* (Podaci su preuzeti od: Paterson DL. Recommendation for treatment of severe infections caused by Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β-lactamases (ESBLs). Clin Microbiol Infect 2000;6(9):460–463, Table 1, uz dozvolu izdavača.)

nata u bolnicama potrebno je racionalizirati upotrebu antibiotika, posebno cefalosporina širokog spektra. Prema mišljenju nekih autora preporučuje se izbjegavati primjenu sporopenetrijujućih cefalosporina kao što je cefazidim jer oni imaju veći potencijal selekcije mutacija koje dovode do proširenog spektra od brzopenetrijujućih kao što je cefotaksim. U principu, što je duže vrijeme potrebno da bi antibiotik ušao u bakterijsku stanicu, veći je rizik od nastanka mutacija.¹⁴²

Zaključak

Značenje β-laktamaza proširenog spektra ogleda se u dubini, širini i rasprostranjenosti. Dubinu predstavlja broj antibiotika koji hidroliziraju, širinu predstavlja broj različitih bakterijskih vrsta koje ih posjeduju, a rasprostranjenost se odnosi na geografsku distribuciju tih enzima.⁹⁸

Rezistencija uzrokovana ESB�-om velik je zdravstveni problem u sve većem broju zemalja u svijetu. U Europi su ESB� pronađene u velikom broju zemalja kao što su Francuska,¹⁴⁶ Njemačka,⁵¹ Španjolska,⁹¹ Ujedinjeno Kraljevstvo,¹⁴⁷ Švicarska,¹⁴⁸ Nizozemska,¹⁴⁹ Austrija,¹⁵⁰ Italija,¹⁵¹ Poljska,¹⁵² Hrvatska,¹⁵³ Mađarska,¹⁵⁴ Grčka¹⁵⁵ i Turska.¹⁵⁶ Prevalencija pojedinih

1. Livermore DM. β-lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. J Antimicrob Chemother 1998;41(Suppl D):25–41.
2. Li X, Ma D, Livermore DM, Nikaido H. Role of efflux pumps in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: active efflux as a contributing factor to β-lactam resistance. Antimicrob Ag Chemother 1994;38:1742–52.
3. Poole K. Bacterial multidrug resistance: emphasis on efflux mechanisms and *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother 1994;34:453–6.
4. Fontana R, Valisena S, Cornaglia G. Comparative affinities for penicillin-binding proteins of multipolar ionic amphoteric cephalosporins in Gram-negative bacteria. J Chemother 1996;8(Suppl. 2):23–30.
5. Ambler RP. The structure of β-lactamases. Philos Trans R. Soc. London Ser. B. 1980;289:321–31.
6. Sykes RB, Matthew M. The β-lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to β-lactam antibiotics. J Antimicrob Chemother 1976;2:115–57.
7. Matthew M. Plasmid mediated β-lactamases of gram-negative bacteria: distribution and properties. J Antimicrob Chemother 1979;5:349–58.
8. Sykes RB, Matthew M. Detection, assay and immunology of β-lactamases. U: Hamilton-Miller MT, Smith JT, ur. β-lactamases. London: Academic Press Ltd, 1979, str. 17–49.
9. Chavez J, Ladona MG, Segura C, Coira A, Reig R, Ampurdanes C. SHV-1 β-lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agent Chemother 2001;45(10):2856–61.
10. Jacoby GA, Medeiros AA. More extended-spectrum β-lactamases. Antimicrob Ag Chemother 1991;35:1697–704.
11. Rahal K, Gerbaud B, Chabbart A. Characterization d'un facteur de resistance transferable chez *Vibrio cholerae* biotype el tor. Ann. Inst. Pasteur 1973;124(Suppl B):245–7.
12. Livermore DM, Pitt TL, Jones CS, Crees-Moris JA, Williams RJ. PSE-4 β-lactamase: a serotype specific enzyme in *Pseudomonas aeruginosa*. J Med Microbiol 1985;19:45–53.
13. Zimmermann W, Rosselet A. Function of the outer membrane of *Escherichia coli* as a permeability barrier to β-lactam antibiotics. Antimicrob Agents Chemother 1977;12:368–72.
14. Nikaido H, Normark S. Sensitivity of *Escherichia coli* to various β-lactams is determined by the interplay of outer membrane permeability and degradation by β-lactamases: a quantitative predictive treatment. Mol Biol 1987;1:29–36.
15. Livermore DM, Davy KWM. Invalidity for *Pseudomonas aeruginosa* of an accepted model of bacterial permeability to β-lactam antibiotics. Antimicrob Agents Chemother 1991;35:916–21.
16. Sabath LD, Garner C, Wilcox C, Finland M. Effect of inoculum and of β-lactamase on the anti-staphylococcal activity of thirteen penicillins and cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother 1975;8:344–9.
17. Fu K, Neu HC. Piperacillin, a new penicillin active against many bacteria resistant to other penicillins. Antimicrob Agents Chemother 1978;13:358–67.
18. Williams JD. The correlation of *in-vitro* susceptibility tests with *in-vivo* results of antibiotic treatment. Scand J Infect Dis 1978;13:64–6.
19. Rice LB, Yao JD, Klimm K, Eliopoulos GM, Moellering RC. Efficacy of different β-lactams against an extended-spectrum β-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* strain in the rat intra-abdominal sepsis model. Antimicrob Agents Chemother 1991;35:1243–4.
20. Wu PJ, Shannon K, Philips I. Effect of hyperproduction of TEM-1 β-lactamase on *in vitro* susceptibility of *Escherichia coli* to β-lactam antibiotics. Antimicrob Agents Chemother 1994;38:494–8.
21. Lacey RW. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* and streptococci. Brit Med Bull 1984;40:77–83.
22. Kernodle DS, McGraw PA, Stratton CW, Kaiser AB. Use of extracts versus whole-cell bacterial suspensions in the identification of *Staphylococcus aureus* β-lactamase variants. Antimicrob Agent Chemother 1990;34:420–5.

23. Zygmunt DJ, Stratton CW, Kernodle DS. Characterization of four β -lactamases produced by *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agent Chemother 1992;36:440–5.
24. McDouglas LK, Thornsberry C. The role of β -lactamase in *Staphylococcus aureus* resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. J Clin Microbiol 1986;23:832–9.
25. Livermore DM. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev 1995;8(4):557–584.
26. Livermore DM, Moosdeen MA, Lindridge P, Kho P, Williams JD. Behavior of TEM-1 β -lactamase as a resistance mechanism to mezlocilin, ampicillin, and azlocilin in *Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother 1986; 17:139–46.
27. Sanders CC, Sanders WE. β -lactam resistance in Gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. Clin Infect Dis 1992;15:824–39.
28. Livermore DM. β -lactamases of *Pseudomonas aeruginosa*. Antibiotics and Chemotherapy 1991;44:215–20.
29. Joly B, Delmas C, Rich C, Prere MF, Livrelli V, Dabernat H. Un nouveau mecanisme de resistance a l'ampicilline per production de β -lactamase ROB-1 chez une souche d' *Haemophilus influenzae* isolee en France. Presse Med 1987;16:916–17.
30. Labia R, Barthelemy M, Le Bouguennec CB, Hoi-Dang Van AB. Classification of β -lactamases from *Branhamella catarrhalis* in relation to penicillinases produced by other bacteria species. Drugs 1986;31(suppl. 3): 40–7.
31. Christensen JJ, Keiding J, Schumacher H, Bruun B. Recognition of a new *Branhamella catarrhalis* β -lactamase – BRO-3. J Antimicrob Chemother 1991;28(5):774–5.
32. Xiaotian Z, Yipu C. β -lactamase producing *Branhamella catarrhalis* in Beijing, China. Pediatr Infect Dis J 1988;7(10):744.
33. Eliasson I. β -lactamases in respiratory tract bacteria. Characterisation of β -lactamases in *Branhamella catarrhalis* (disertacija). Lund, Svedska: University of Lund, 1990, str 27–44.
34. Fung CP, Yeo SF, Livermore DM. Susceptibility of *Moraxella catarrhalis* to β -lactam antibiotics in relation to β -lactamase pattern. J Antimicrob Chemother 1994;33:215–222.
35. Doern GV, Brueggemann AB, Pierce G, Hogan T, Preston-Holley H Jr, Rauch A. Prevalence of antimicrobial resistance among 723 outpatient clinical isolates of *Moraxella catarrhalis* in the United States in 1994 and 1995: results of a 30-center national surveillance study. Antimicrob Agent Chemother 1996;40(12):2884–6.
36. Stobberingh EE, Wunderink M, Philips M, Houben A. *Branhamella catarrhalis*: β -lactamase production and sensitivity to oral antibiotics, including new cephalosporins. J Antimicrob Chemother 1987;20:765–70.
37. Stobberingh EE, Davies B, van Boven CPA. *Branhamella catarrhalis*: antibiotic sensitivities and β -lactamases. J Antimicrob Chemother 1984; 13:55–64.
38. Doern GV, Siebers KG, Hallick LM, Morse SA. Antibiotic susceptibility of β -lactamase-producing strains of *Branhamella* (*Neisseria*) *catarrhalis*. Antimicrob Agent Chemother 1980;17(1):24–9.
39. Doern GV, Jones RN. Antimicrobial susceptibility testing of *Haemophilus influenzae*, *Branhamella catarrhalis* and *Neisseria gonorrhoeae*. Antimicrob Agent Chemother 1988;32(12):1747–53.
40. Cooper CE, Slocombe B, White AR. Effect of low concentrations of clavulanic acid on the in-vitro activity of amoxycillin against β -lactamase producing *Branhamella catarrhalis* and *Haemophilus influenzae*. J Antimicrob Chemother 1990;26:371–80.
41. Farmer T, Reading C. β -lactamases of *Branhamella catarrhalis* and their inhibition by clavulanic acid. Antimicrob Agent Chemother 1982;21(3): 506–8.
42. Slocombe B. Inhibition of β -lactamases in *Branhamella catarrhalis*. Drugs 1986;31(Suppl.3):79–81.
43. Wallace RJ, Steingrube VA, Nash DR, Hollis DG, Flanagan C, Brown BA, Labidi A, Weaver RE. BRO β -lactamases of *Branhamella catarrhalis* and *Moraxella* subgenus *Moraxella*, including evidence for chromosomal β -lactamase transfer by conjugation in *B. catarrhalis*, *M. nonliquefaciens* and *M. lacunata*. Antimicrob Agents Chemother 1989;33 (11):1845–54.
44. Doern GV, Tubert TA. Detection of β -lactamase activity among clinical isolates of *Branhamella catarrhalis* with six different β -lactamase assays. J Clin Microbiol 1987;25(8):1380–3.
45. Doern GV, Tubert T. Effect of inoculum size on results of microtube broth dilution susceptibility test with *Branhamella catarrhalis*. J Clin Microbiol 1987;1576–8.
46. Frere JM. β -lactamases and bacterial resistance to antibiotics. Mol. Microbiol 1995;16:385–95.
47. Abraham EP. Cephalosporins 1945–1986. Drugs 1987;34(Suppl 2):1–14.
48. Philippon A, Labia R, Jacoby GA. Extended-spectrum β -lactamases. Antimicrob Agent Chemother 1989;33:1131–6.
49. Philippon A, Paul G, Vedel G, Nevot P. Resistance plasmidique aux cephalosporines de 3^e generation. Presse Med 1988., 17:1883–9.
50. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. Infection 1983;6:315–7.
51. Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutzling RM, Wiedemann B. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. Antimicrob Agent Chemother 1985., 28(2):302–7.
52. Gonzales-Leiza M, Perez-Diaz JC, Ayala J, Casellas JM, Martinez-Beltran J, Bush K, Baquero F. Gene sequence and biochemical characterization of FOX-1 from *Klebsiella pneumoniae*, a new AmpC-type plasmid-mediated β -lactamase with two molecular variants. Antimicrob Agent Chemother 1994;38(9):2150–7.
53. Horii T, Arakawa Y, Ohta M, Ichiyama S, Rochaporn W, Kato N. Plasmid-mediated AmpC-type β -lactamase isolated from *Klebsiella pneumoniae* confers resistance to broad-spectrum β -lactams, including moxalactam. Antimicrob Agent Chemother 1993;37(5):984–90.
54. Bauernfeind A, Wagner S, Jungwirth R, Schneider I, Meyer D. A novel class C β -lactamase conferring resistance to cephamycins. Antimicrob Agent Chemother 1997;41(9):2041–6.
55. Koeck JL, Arlet G, Philippon A, Basmaciogullari S, Vi Thien H, Buisson Y, Cavallo JD. A plasmid-mediated CMY-2 β -lactamase from an Algerian clinical isolate of *Salmonella senftenberg*. FEMS Microbiology Letters 1997;152:255–60.
56. Winkour PL, Wonstein DL, Hoffman LJ, Uhlenhopp EK, Doern GV. Evidence for transfer of CMY-2 AmpC β -lactamase plasmids between *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and humans. Antimicrob Agents Chemother 2001;45(10):2716–22.
57. Navarro F, Perez-Trallero E, Marimon JM, Aliaga R, Gomariz M, Mirelis B. CMY-2 producing *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli* strains isolates in Spain (October 1999–December 2000). J Antimicrob Chemother 2001;48:383–9.
58. Decre D, Verdet C, Raskine L, Blanchard H, Burghoffer B, Philippon A, Sanson-Le Pors MJ, Petit JC, Arlet G. Characterization of CMY-type β -lactamases in clinical strains of *Proteus mirabilis* and *Klebsiella pneumoniae* in four hospitals in the Paris area. J Antimicrob Chemother 2002; 50(5):681–8.
59. Yan JJ, Wu SM, Tsai SH, Wu JJ, Su JJ. Prevalence of SHV-12 among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases and identification of a novel AmpC enzyme (CMY-8) in Southern Taiwan. Antimicrob Agent Chemother 2000;44(6):1438–1442.
60. Wiseman L, Lamb HM. Cefpirome: a review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and clinical efficacy in the treatment of severe nosocomial infections and febrile neutropenia. Drugs 1997;54(1): 117–40.
61. Barradell LB, Bryson HM. Cefepime: a review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. Drugs 1994;47(3): 471–505.
62. Katsanis G, Jacoby G. The frequency of extended-spectrum β -lactamases in isolates of *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother 1992;29: 345–53.
63. Urban C, Rahal J. *Klebsiella* and extended-spectrum β -lactamases. International Journal of Antimicrobial Agents 1997;8:37–43.
64. Tzouveleakis LS, Gazouli M, Markogiannakis A, Paraskaki E, Legakis NJ, Tzelepi E. Emergence of resistance to third-generation cephalosporins amongst *Salmonella typhimurium* isolates in Greece: report of the first three cases. J Antimicrob Chemother 1998;42:273–5.
65. Gazouli M, Sidorenko SV, Tzelepi E, Kozlova NS, Gladin DP, Tzouveleakis LS. A plasmid-mediated β -lactamase conferring resistance to cefotaxime in a *Salmonella typhimurium* clone found in St Petersburg, Russia. J Antimicrob Chemother 1998;41:119–21.
66. Poupard MC, Chanal C, Sirot D, Labia R, Sirot J. Identification of CTX-2, a novel cefotaximase from *Salmonella mbandaka* isolate. Antimicrob Agent Chemother 1991;35(7):1498–500.
67. Fortineau N, Naas T, Gaillot O, Nordmann P. SHV-type extended-spectrum β -lactamase in a *Shigella flexneri* clinical isolate. J Antimicrob Chemother 2001;47:685–688.
68. Tessier F, Arpin C, Allery A, Quentin C. Molecular characterization of a TEM-21 β -lactamase in a clinical isolate of *Morganella morganii*. Antimicrob Agent Chemother 1998;42(8):2125–7.
69. Pitout JDD, Thomson KS, Hanson ND, Ehrhardt AF, Moland ES, Sanders CC. β -lactamases responsible for resistance to expanded-spectrum cephalosporins in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* isolates in South Africa. Antimicrob Agent Chemother 1998;42 (6):1350–4.
70. Cheng Y, Chen M. Extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Enterobacter gergoviae* and *Escherichia coli* in China. Antimicrob Agent Chemother 1994;38(12):2838–42.
71. Luzzaro F, Mantengoli E, Perilli M, Lombardi G, Orlandi V, Orsatti A, Amicosante F, Rossolini G, Toniolo A. Dynamics of a nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended-spectrum β -lactamase. J Clin Microbiol 2001;39(5): 1865–70.
72. Blahova J, Hupkova-Lešicka M, Kralikova K, Krcmery V. Extended-spectrum β -lactamase reactions in *Stenotrophomonas maltophilia*. Infection 1998;26(3):187–188.

73. Jacoby GA. Genetics of extended-spectrum β -lactamases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13(Suppl. 1):2–11.
74. Aubert D, Poirel L, Ali AB, Goldstein FW, Nordmann P. OXA-35 is an OXA-10 related β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 2001;48(5):717–21.
75. Poirel L, Girlich D, Naas T, Nordmann P. OXA-28, an extended-spectrum variant of OXA-10 β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and its plasmid-and integron-located gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(2):447–53.
76. Aubert D, Poirel L, Chevalier J, Leotard S, Pages JM, Nordmann P. Oxacillinase-mediated resistance to cefepime and susceptibility to ceftazidime in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(6):1615–20.
77. Navia MM, Ruiz J, Vila J. Characterization of an integron carrying a new class D β -lactamase (OXA-37) in *Acinetobacter baumannii*. *Microbial Drug Resistance-Mechanisms Epidemiology and Disease* 2002;8(4):261–5.
78. Neuwirth C, Siebor E, Pruneaux M, Zarnayova M, Simonin C, Labia R. First isolation of CTX-M-15 producing *Escherichia coli* from two French patients. *J Antimicrob Chemother* 2003;51(2):471–3.
79. Alobwede I, Zali FHM, Livermore DM, Heritage J, Todd N, Hawkey PM. CTX-M extended-spectrum β -lactamase arrives in the UK. *J Antimicrob Chemother* 2003;51(2):470–1.
80. Radice M, Power P, Di Conza J, Gutkind G, Bonnet R, Sirot D i sur. Early dissemination of CTX-M derived enzymes in South America. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:602–4.
81. Baraniak A, Fiett J, Sulikowska A, Hryniewicz W, Gniadkowski M. Countrywide spread of CTX-M-3 extended-spectrum β -lactamase-producing microorganisms of the family *Enterobacteriaceae* in Poland. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:151–9.
82. Sabate M, Tarrago R, Navarro F, Miro E, Verges C, Barbe J, Prats G. Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase (CTX-M-9) from *Escherichia coli* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(7):1970–3.
83. Bou G, Cartelle M, Tomas M, Cenle D, Molina F, Moure R, Eiros JM, Guerrero A. Identification and broad dissemination of the CTX-M-14 β -lactamase in different *Escherichia coli* strains in the northwest area of Spain. *J Clin Microbiol* 2002;40(11):4030–6.
84. Dutour C, Bonnet M, Marchadin H, Boyer M, Chanal C, Sirot D, Sirot J. CTX-M-1, CTX-M-3 and CTX-M-14 β -lactamases from *Enterobacteriaceae* isolated in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(2):534–7.
85. Kariuki S, Corkill JE, Revathi G, Musoke R, Hart CA. Molecular characterization of a novel plasmid-encoded cefotaximase (CTX-M-12) found in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Kenya. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(7):2141–3.
86. Chanawong A, M'Zali FH, Heritage J, Xiong JH, Hawkey PM. Three cefotaximases CTX-M-9, CTX-M-13 and CTX-M-14 among *Enterobacteriaceae* in the People's Republic of China. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(3):630–7.
87. Yu WL, Winkour PL, Von Stein DL, Pfaller MA, Wang JH, Jones RN. First description of *Klebsiella pneumoniae* harboring CTX-M β -lactamases (CTX-M-14 and CTX-M-3) in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(4):1098–100.
88. Bonnet R, Sampaio JLM, Labia R, De Champs C, Sirot D, Chanal C, Sirot J. A novel CTX-M β -lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brasil. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(7):1936–1942.
89. Revathi G, Shannon KP, Stapleton PD, Jain BK, French GL. An outbreak of extended-spectrum β -lactamase producing *Salmonella senftenberg* in a burns ward. *J Hospit Infect* 1998;40:295–302.
90. Luzzaro F, Perilli M, Migliavacca R, Lombardi G, Micheletti P, Agodi A, Stefani S, Amicosante G, Pagani L. Repeated epidemics caused by extended-spectrum β -lactamase producing *Serratia marcescens* strains. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17:629–36.
91. Morosini MI, Rafael C, Martinez-Beltran J, Negri MC, Perez-Diaz JC, Baquero F, Blazquez J. New extended-spectrum TEM β -lactamase from *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isolated in a nosocomial outbreak. *Antimicrob Agent Chemother* 1995;39(2):458–61.
92. Pagani L, Perilli M, Migliavacca R, Luzzaro F, Amicosante G. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains causing outbreaks in intensive care units in Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19:765–72.
93. Arlet G, Sanson-le Pors MJ, Rouveau M, Fournier G, Marie O, Schlemmer B, Philippon A. Outbreak of nosocomial infections due to *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-4 β -lactamase. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990;9(11):797–803.
94. Neuwirth C, Siebor E, Lopez J, Pechinot A, Kazmierczak A. Outbreak of TEM-24 producing *Enterobacter aerogenes* in an intensive care unit and dissemination of the extended-spectrum β -lactamase to other members of the family *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 1996;34(1):76–9.
95. Fiett J, Palucha A, Miaczynska B, Stankiewicz M, Przdono-Mordarska H, Hryniewicz W, Gniadkowski M. A novel complex mutant β -lactamase, TEM-68, identified in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from an outbreak of extended-spectrum β -lactamase producing *Klebsiellae*. *Antimicrob Agent Chemother* 2000;44(6):1499–505.
96. Nouvellon M, Pons JL, Sirot D, Combe ML, Lemeland JF. Clonal outbreaks of the extended-spectrum β -lactamase producing strains of *Klebsiella pneumoniae* demonstrated by antibiotic susceptibility testing, β -lactamase typing, and multifocus enzyme electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1994;32(10):2625–7.
97. Rice LB, Willey SH, Papanicolaou GA, Medeiros AA, Eliouopoulos GM, Moellering JR, Jacoby GA. Outbreak of ceftazidime resistance caused by extended-spectrum β -lactamase at a Massachusetts chronic-care facility. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34(11):2193–2199.
98. Rahal JJ. Extended-spectrum β -lactamases: how big is the problem? *Clin Microbiol Infect* 2000;6(Suppl.2):2–6.
99. Quinn JP. Clinical significance of extended-spectrum β -lactamases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13(Suppl.1):39–42.
100. Bradford PA, Urban C, Jaswal A, Mariano N, Rasmussen BA, Projan SJ, Rahal JJ, Bush K. SHV-7, a novel cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase, identified in *Escherichia coli* isolates from hospitalized nursing home patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39(4):899–905.
101. Emery CL, Weymouth LA. Detection and clinical significance of extended-spectrum β -lactamases in a tertiary-care medical center. *J Clin Microbiol* 1997;35(8):2061–2067.
102. Einhorn AE, Neuhauser MM, Bearden DT, Quinn JP, Pendland SL. Extended-spectrum β -lactamases: Frequency, risk factors, and outcomes. *Pharmacother* 2002;22(1):14–20.
103. Brun-Buisson C, Legrand P, Raus A, Richard C, Montravers F, Besbes M, Meakings J, Soussy CJ, Lemaire F. Intestinal decontamination for control of nosocomial multi-resistant gram-negative bacilli. *Ann Int Med* 1989;110:873–87.
104. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988;10:867–78.
105. Ho PL, Chow KH, Yuen KY, Ng WS, Chau PY. Comparison of a novel, inhibitor-potentiated disc-diffusion test with other methods for the detection of extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 1998;42:49–54.
106. MacKenzie FM, Miller CA, Gould IM. Comparison of screening methods for TEM and SHV-derived extended-spectrum β -lactamases. *Clin Microbiol Infect* 2002;8(11):715–24.
107. Thomson KS, Sanders CC. Detection of extended-spectrum β -lactamases in the members of the family *Enterobacteriaceae* – comparison of the double-disc and 3-dimensional tests. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:1877–82.
108. Cormican MG, Marshall SA, Jones RN. Detection of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing strains by the E test ESBL screen. *J Clin Microbiol* 1996;34(8):1880–4.
109. Sanders CC, Barry AL, Washington JA, Shubert C, Moland ES, Traczewski MM, Knapp C, Mulder R. Detection of extended-spectrum β -lactamase-producing members of the family *Enterobacteriaceae* with the Vitek ESBL test. *J Clin Microbiol* 1996;34(12):2997–3001.
110. Livermore DM, Brown DFJ. Detection of β -lactamase-mediated resistance. *J Antimicrob Chemother* 2001;48(Suppl.S1):59–64.
111. Nuesch-Inderbinen MT, Haechler H, Kayser FH. Detection of genes coding for extended-spectrum SHV β -lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method, and comparison with E test. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15:398–402.
112. Randegger CC, Haechler H. Real-time PCR and melting curve analysis for reliable and rapid detection of SHV extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(6):1730–6.
113. Bush K. Is it important to identify extended-spectrum β -lactamase-producing isolates? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15(5):361–4.
114. Podbielski, Schonling J, Melzer B, Haase G. Different promoters of SHV-2 and SHV-2a β -lactamase lead to diverse levels of cefotaxime resistance in their bacterial producers. *J Gen Microbiol* 1991;137:1667–75.
115. Garbang-Chenon A, Godard V, Labia R, Nicolas JC. Nucleotide sequence of SHV-2 β -lactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:1444–6.
116. Soweck JA, Singer SB, Ohringer S, Malley MF, Dougherty TJ, Gougoutas JZ, Bush K. Substitution of lysine at position 104 or 240 of TEM-1pTZ18R β -lactamase enhances the effect of serine-164 substitution on the hydrolysis or affinity for cephalosporins and the monobactam aztreonam. *Biochemistry* 1991;30:3179–88.
117. Quinn JP, Miyashiro D, Sahn D, Flamm R, Bush K. Novel plasmid-mediated β -lactamase (TEM-10) conferring selective resistance to ceftazidime and aztreonam in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agent Chemother* 1989;33:1451–6.
118. Rasheed JK, Jay C, Metchock B, Berkowitz F, Weigel L, Crellin J, Steward C, Hill B, Medeiros AA, Tenover C. Evolution of extended spectrum β -lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. *Antimicrob Agent Chemother* 1997;41(3):647–53.
119. Kenneth ST, Smith-Moland E. Cefepime, piperacillin-tazobactam, and the inoculum effect in test with extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agent Chemother* 2001;45(12):3548–54.

120. Jett BD, Ritchie DJ, Reichley R, Bailey TC, Sahn DF. Susceptibility of ESBL-producing organisms. *Antimicrob Agent Chemother* 1995;39:1187–90.
121. Miro E, del Cuerdo M, Navarro F, Sabate M, Mirelis B, Prats G. Emergence of clinical *Escherichia coli* isolates with decreased susceptibility to ceftazidime and synergistic effect with co-amoxiclav due to SHV-1 hyperproduction. *J Antimicrob Chemother* 1998;42:535–8.
122. Wu TL, Su LH, Lauderdale TL, Lin FM, Leu HS, Lin TY Ho M. Outer membrane protein change combined with co-existing TEM-1 and SHV-1 β -lactamases lead to false identification of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2001;47:755–61.
123. Steward CD, Rasheed JK, Huber SK, Biddle JW, Raney PM, Anderson GJ, Williams PP, Brittain KL, Oliver A, McGowan JE, Tenover FC. Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards extended-spectrum β -lactamase detection methods. *J Clin Microbiol* 2001;39(8):2864–72.
124. Bradford PA, Urban C, Mariano N, Projan SJ, Rahal JJ, Bush K. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC β -lactamase and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41(3):563–9.
125. MacKenzie FM, Forbes KJ, Dorai-John TM, Amyes SG. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet* 1997;350:783.
126. Vatopoulos AC, Philippon A, Tzouveleki LS, Komninou Z, Legakis NJ. Prevalence of a transferable SHV-5 type β -lactamase in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Greece. *J Antimicrob Chemother* 1990;26:635–48.
127. Martinez-Martinez I, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 1998;351:797–9.
128. Paterson DL. Recommendation for treatment of severe infections caused by *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs). *Clin Microbiol Infect* 2000;6(9):460–3.
129. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 5th ed. Approved Standard M7-A5. NCCLS, Wayne, PA, 2000.
130. Paterson DL, Ko WC, von Gottberg A, Casellas JM, Mulazimoglu L, Klugman KP, Bonomo RA, Rice L, McCormack JG, Yu VL. Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum β -lactamases: implication for the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 2001;39(6):2206–12.
131. Karas JA, Pillay DG, Muckart D, Sturm W. Treatment failure due to extended-spectrum β -lactamase. *J Antimicrob Chemother* 1996;37:203–4.
132. Paterson DL, Yu VL. Extended-spectrum β -lactamases: a call for improved detection and control. *Clin Infect Dis* 1999;29:1419–22.
133. Brun-Buisson C, Legrand P, Philippon A, Montravers F, Ansquer M, Duval J. Transferable enzymatic resistance to third generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet* 1987;ii:302–6.
134. Siu LK, Lu PL, Hsueh PR, Lin FM, Chang SC, Luh KT, Ho M, Lee CY. Bacteremia due to extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric oncology ward: clinical features and identification of different plasmids carrying both SHV-5 and TEM-1 genes. *J Clin Microbiol* 1999;37:4020–7.
135. Schiappa DA, Hayden MK, Matushek MG, Hashemi FN, Sullivan J, Smith KY, Miyashiro D, Quinn JP, Weinstein RA, Trenholme GM. Ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* bloodstream infection, a case-control and molecular epidemiologic investigation. *J Infect Dis* 1996;174:529–36.
136. Essack SY. Treatment options for extended-spectrum β -lactamase-producers. *FEMS Microbiology Letters* 2000;190:181–4.
137. Ronco E, Lawrence C, Nauciel C. Comparative activity of cefepime, ceftazidime and imipenem in a mouse infection caused by *Klebsiella pneumoniae* producing a broad spectrum β -lactamase. *Pathol Biol* 1998;46:651–5.
138. Pangon B, Bizet C, Bure A. In vivo selection of a cephamycin resistant, porin deficient mutant of *Klebsiella pneumoniae* producing TEM-3 β -lactamase. *J Infect Dis* 1989;159:1005–6.
139. Weber DA, Sander CC, Bakken JS, Quinn JP. A novel chromosomal TEM derivative and alterations in outer membrane proteins together mediate selective ceftazidime resistance. *J Infect Dis* 1990;162:460–5.
140. Fantin B, Pangon B, Potel G, Caron F, Valle E, Vallois JM, Mohler J, Bure A, Philippon A, Carbon C. Activity of sulbactam in combination with ceftiraxone in vitro and in experimental endocarditis caused by *Escherichia coli* producing SHV-2-like β -lactamase. *Antimicrob Agent Chemother* 1990;34(4):581–6.
141. Caron F, Gutmann L, Bure A, Pangon B, Vallois JM, Pechinot A, Carbon C. Ceftiraxone-sulbactam combination in rabbit endocarditis caused by a strain of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-broad-spectrum TEM-3 β -lactamase. *Antimicrob Agent Chemother* 1990;34(11):2070–4.
142. Amyes SGB, Miles RS. Extended-spectrum β -lactamases: the role of inhibitors in therapy. *J Antimicrob Chemother* 1998;42:415–7.
143. Martinez-Martinez L, Pascual A, Hernandez-Alles S, Alvarez-Diaz D, Suarez AI, Tran J, Benedi VH, Jacoby GA. Roles of β -lactamases and porins in activities of carbapenems and cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agent Chemother* 1999;43(7):1669–73.
144. Perry CM, Ibbotson T. Biapenem. *Drugs* 2002;62(15):2221–34.
145. Smith CE, Tillman SB, Howel AW, Longfield RN, Jorgensen JH. Failure of ceftazidime-amikacin therapy for bacteremia and meningitis due to *Klebsiella pneumoniae* producing an extended-spectrum β -lactamase. *Antimicrob Agent Chemother* 1990;34:1290–3.
146. Petit A, Sirot DL, Chanal CM, Sirot JL, Labia R, Gerbaud G, Cluzel RA. Novel plasmid-mediated β -lactamase in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* more resistant to ceftazidime than to other broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agent Chemother* 1988;32(5):626–30.
147. Payne DJ, Marriott MS, Amyes SGB. Characterisation of a unique ceftazidime-hydrolysing β -lactamase, TEM-E2. *J Med Microbiol* 1990;32:131–4.
148. Nuesch-Inderbinen MT, Kayser FH, Haechler H. Survey and molecular genetics of SHV β -lactamases in *Enterobacteriaceae* in Switzerland: two novel enzymes, SHV-11 and SHV-12. *Antimicrob Agent Chemother* 1997;41(5):943–9.
149. Yuan M, Hall LM, Savelkoul PHM, Vandenbroucke-Grauls CMJ, Livermore DM. SHV-13, a novel extended-spectrum β -lactamase, in *Klebsiella pneumoniae* isolates from patients in an intensive care unit in Amsterdam. *Antimicrob Agent Chemother* 2000;44(4):1081–4.
150. Prodinger WM, Fille M, Bauernfeind A, Stemplinger I, Amann S, Pfaußler B, Lass-Flörl C, Dierich MP. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 β -lactamase: parallel outbreaks due to multiple plasmid transfer. *J Clin Microbiol* 1996;34(5):564–8.
151. Marchese A, Arlet G, Schito GC, Lagrange PH, Philippon A. Detection of SHV-5 extended-spectrum β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15:245–8.
152. Gniadkowski M, Schneider I, Jungwirth R, Hryniewicz W, Bauernfeind A. Ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from three Polish hospitals: identification of three novel TEM- and SHV-5 type extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agent Chemother* 1998;42(3):514–20.
153. Bedenić B, Žagar Ž. Extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Zagreb, Croatia. *J Chemother* 1998;10(6):449–59.
154. Pragai Z, Koczian Z, Nagy E. Characterization of the extended-spectrum β -lactamases and determination of the antibiotic susceptibilities of *Klebsiella pneumoniae* isolates in Hungary. *J Antimicrob Chemother* 1998;42:401–3.
155. Prinakis E, Tzelepi E, Gazouli M, Mentis AF, Tzouveleki LS. Characterization of a novel SHV β -lactamase variant that resembles the SHV-5 enzyme. *FEMS Microbiology Letters* 1996;139:229–34.
156. Danel FL, Hall MC, Gur D, Akalin HE, Livermore DM. Transferable production of PER-1 β -lactamase amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Ankara, Turkey. *J Antimicrob Chemother* 1995;35:281–94.
157. Bauernfeind A, Rosenthal E, Eberlein E, Holley M, Schweighart S. Spread of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 β -lactamase among hospitalized patients. *Infection* 1993;21(1):24–8.
158. Bedenić B, Randegger C, Stobberingh E, Haechler H. Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamases from *Klebsiella pneumoniae* strains, isolated in Zagreb, Croatia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20:505–508.
159. Laksai Y, Severino M, Perilli M, Amicosante G, Bonfiglio G, Stefani S. First identification of an SHV-12 extended-spectrum β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Italy. *J Antimicrob Chemother* 2000;45:349–51.