

Antybiotykooporność Gram-ujemnych pałeczek wytwarzających beta-laktamazy

Magdalena Rzewuska

z Katedry Nauk Przedklinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

Jednymi z najczęściej stosowanych w lecznictwie związków chemicznych o działaniu antybakteryjnym są antybiotyki beta-laktamowe, nazywane beta-laktamami. Wspólną ich cechą jest obecność w cząsteczce pierścienia beta-laktamowego. W ciągu prawie 80 lat, począwszy od wykrycia w 1929 r. penicyliny, związki te stały się najliczniejszą grupą antybiotyków. Beta-laktamy podzielone są na kilka grup o odmiennej budowie

strukturalnej, w której rozróżnia się rdzeń typowy dla danej grupy i określoną liczbę różnych podstawników. Zaliczane są do nich penicyliny, cefalosporyny, monobaktamy, karbapenemy oraz inhibitory beta-laktamaz. Antybiotyki te mają różny zakres działania przeciwbakteryjnego w zależności od przynależności do grupy. W początkowym okresie stosowania penicylin uzyskiwano bardzo dobre efekty terapeutyczne

i uznano je za leki o wyjątkowej skuteczności. Niestety, wkrótce okazało się, że niektóre drobnoustroje wykazują oporność na ich działanie, związaną między innymi z aktywnością beta-laktamaz, enzymów rozkładających beta-laktamy. Wielkie nadzieje wiązano z nowymi grupami antybiotyków beta-laktamowych, takimi jak cefalosporyny, ale wiadomo już, że bakterie wykształciły mechanizmy oporności również na te związki, a odsetek szczepów opornych wciąż wzrasta. Obecnie intensywnie prowadzone są badania mające na celu poznanie mechanizmów oporności bakterii na szerokie spektrum antybiotyków beta-laktamowych oraz sposobów jej przekazywania. W ostatnich latach istotnym problemem stały się zakażenia wywołane przez szczepy Gram-ujemnych pałeczek wytwarzające beta-laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym – ESBL (extended-spectrum

Antibiotic resistance in Gram-negative rods producing beta-lactamases

Rzewuska M., Department of Preclinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences – SGGW

Many different types of resistance to antibiotics have been identified in Gram-negative bacteria. It may be an intrinsic characteristic or acquired by selection for mutation or by acquisition of a resistance gene from other microorganism. Synthesis of beta-lactamases is the predominant mechanism of resistance to beta-lactams, the most frequently used antibiotics. Bacteria producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBL), metallo-beta-lactamases (MBL) or AmpC beta-lactamases are of exceptional clinical significance. Infections caused by multidrug-resistant strains of Gram-negative rods severely limit treatment options and complicate therapy. Thus the aim of this review was to present some crucial problems of appropriate antimicrobial management of multi-drug resistant bacteria infections.

Keywords: antibiotic resistance, extended-spectrum beta-lactamases, metallo-beta-lactamases, AmpC beta-lactamases.

beta-lactamases) oraz metallo-beta-laktamazy – MBL (metallo-beta-lactamases; 1). Rozpoznanie lekooporności związanej z tego typu enzymami jest niezwykle przydatne w ustaleniu właściwej antybiotykoterapii, która powinna być skuteczna i niepowodująca powiększenia się populacji wieloopornych szczepów bakteryjnych.

Mechanizm działania antybiotyków beta-laktamowych

Strukturą komórkową, na którą oddziałują antybiotyki beta-laktamowe jest ściana komórkowa bakterii. Stanowi ona zewnętrzną część komórki, nadając jej sztywność i chroniąc przed działaniem różnych niekorzystnych czynników. Ściana komórkowa występuje u zdecydowanej większości bakterii. U bakterii Gram-dodatnich zbudowana jest z grubej warstwy peptydoglikanu, a u Gram-ujemnych jest cieńsza, o złożonej budowie. Warstwa peptydoglikanu u bakterii Gram-ujemnych jest związana z błoną zewnętrzną, która jest strukturą lipidowo-wielocukrowo-białkową. W błonie wewnętrznej znajdują się tzw. białka porynowe, które tworzą kanały, przez które cząsteczki wnikają do wnętrza komórki. Białka porynowe różnią się powinowactwem do związków chemicznych o różnej budowie. Niektóre z nich warunkują przenikanie antybiotyków do komórki, a zmiany stopnia powinowactwa lub zmniejszenie ich liczby może spowodować efekt oporności na dany antybiotyk.

Antybiotyki beta-laktamowe działają na etapie syntezy ściany komórkowej.

Prekursory peptydoglikanu powstają w cytoplazmie, skąd są transportowane do błony cytoplazmatycznej, w której znajdują się białka o aktywności transpeptydaz, przyłączające nowe elementy do tworzonej warstwy peptydoglikanu. Niektóre z tych transpeptydaz cechują się powinowactwem do antybiotyków beta-laktamowych i są nazywane białkami wiążącymi penicylinę (penicillin binding proteins – PBP). Połączenie z antybiotykiem powoduje inaktywację transpeptydaz, co prowadzi do zahamowania syntezy ściany komórkowej, a w efekcie do śmierci komórki. Warunkiem bakterio-bójczej aktywności antybiotyku jest obecność w jego cząsteczce nienaruszonego pierścienia beta-laktamowego oraz działanie na bakterie będące w fazie aktywnej namnażania. U bakterii występują różne typy PBP o określonych funkcjach, np. związane z podziałem komórki czy z jej wydłużaniem, a zatem inaktywacja przez antybiotyk początkowo może wywołać różne zmiany w budowie i kształcie komórki, tj. wydłużenie lub pęcznienie, ale ostatecznie powoduje jej liżę. Najczęściej dochodzi do pęknięcia komórki w wyniku wzrostu ciśnienia osmotycznego lub uaktywnienia autolizyn, co ma miejsce u bakterii Gram-dodatnich. Białka wiążące penicylinę u różnych rodzajów, gatunków czy szczepów bakterii różnią się powinowactwem do poszczególnych antybiotyków beta-laktamowych, co wyjaśnia różnice w skuteczności leków. Na efektywność działania antybiotyku wpływa nie tylko stopień powinowactwa do PBP, ale również liczba tych białek w komórce, ich dostępność dla antybiotyku oraz obecność różnych mechanizmów inaktywujących go. W przypadku bakterii Gram-ujemnych antybiotyk, aby dotrzeć do docelowego miejsca wiązania musi pokonać barierę błony zewnętrznej oraz przedostać się przez przestrzeń periplazmatyczną, w której mogą znajdować się enzymy o aktywności beta-laktamaz.

Spektrum działania antybiotyków beta-laktamowych

Antybiotyki beta-laktamowe są związkami o szerokim spektrum działania bakterio-bójczego, zarówno wobec bakterii Gram-ujemnych, jak i Gram-dodatnich. Nie są aktywne, natomiast wobec bakterii niemających ściany komórkowej, np. z rodzaju *Mycoplasma*. Oczywiście skuteczność poszczególnych antybiotyków zależy od ich budowy oraz wrażliwości na działanie czynników warunkujących odporność bakterii. W przypadku niektórych bakterii Gram-dodatnich, które nie wytwarzają autolizyn, występuje zjawisko „tolerancji” antybiotyku. Polega ono na hamowaniu namnażania się bakterii w obecności antybiotyku, a po jego usunięciu ze

środowiska następuje przywrócenie funkcji życiowych. Wobec takich bakterii antybiotyki beta-laktamowe w stężeniach konwencjonalnych wykazują działanie bakteriostatyczne.

Wśród penicylin różni się m.in. penicyliny naturalne wrażliwe na penicylinazy (np. benzylopenicylina, feneticylina), penicyliny przeciwwgronkowcowe odporne na penicylinazy (np. oksacylina, kloksacylina, metycylina), penicyliny o szerokim zakresie działania wobec bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych (np. ampicylina, amoksylicyna, karbenicylina). Penicyliny naturalne działają przede wszystkim na bakterie Gram-dodatnie, wśród bakterii Gram-ujemnych wrażliwe są m.in. *Neisseria* spp. i *Bordetella* spp. Penicyliny o szerokim zakresie działania wobec bakterii Gram-ujemnych, w tym *Pseudomonas aeruginosa*, należą głównie do karboksypenicylin i ureidopenicylin (np. tikarcylina, azlocylina, piperacylina).

Cefalosporyny zawierają w cząsteczce pierścień zwany cefemem, który zbudowany jest z beta-laktamu i dihydrotiazyny. Cefem wykazuje większą oporność na działanie beta-laktamaz niż penam, występujący w penicylinach, co sprawia, że ta grupa antybiotyków ma szersze spektrum działania antybakteryjnego. Skuteczność cefalosporyn wobec różnych bakterii wiąże się także z obecnością w cząsteczce podstawników, np. grupy metoksy-, grupy iminometoksy-, czy grupy metylotiotetrazolowej, które obecne są u większości cefalosporyn III i IV generacji. Zakres działania bakterio-bójczego stanowi kryterium, dokonanego przez Williama podziału cefalosporyn, który został przedstawiony w tabeli 1 (2). Wyróżniono pięć grup cefalosporyn: 0 – aktywne wobec bakterii, głównie Gram-dodatnich, w podobnym stopniu co penicyliny; 1 – aktywne wobec bakterii Gram-dodatnich, odporne na penicylinazę gronkowcową; 2 – o szerokim zakresie działania, wykazujące większą aktywność wobec bakterii Gram-ujemnych niż należące do grupy 0; 3 – o szerokim zakresie działania, wykazujące wysoką aktywność wobec *Pseudomonas aeruginosa*; 4 – o stosunkowo niewielkim spektrum działania, ale bardzo odporne na beta-laktamazy, cechujące się wysoką aktywnością wobec beztlenowych pałeczek z rodzaju *Bacteriodes*. Podział cefalosporyn na generacje wiąże się z czasem wprowadzenia ich do leczenia oraz z opornością na działanie beta-laktamaz. Na ogół kolejne generacje charakteryzują coraz wyższą oporność na te enzymy. Cefalosporyny nie są aktywne w stosunku do chlamydii, mikoplazm, rickettsji i z reguły enterokoków.

Karbapenemy (np. imipenem, meropenem) są pochodnymi tienamycyn, a cechą charakterystyczną, decydującą o ich wysokiej oporności na beta-laktamazy, jest

ustawienie bocznego łańcucha w pozycji *trans*, a nie *cis*, jak u pozostałych beta-laktamów. Antybiotyki te wykazują oporność na działanie licznych beta-laktamaz wytwarzanych przez różne bakterie, i co się z tym wiąże mają najszerszy zakres działania spośród wszystkich antybiotyków beta-laktamowych, zarówno wobec bakterii Gram-ujemnych, jak i Gram-dodatnich.

Monobaktamy (np. aztreonam) cechuje wąski zakres działania przeciwbakteryjnego ograniczony do tlenowych i względnie beztlenowych pałeczek Gram-ujemnych. Antybiotyki te są odporne na działanie wielu beta-laktamaz, z wyjątkiem wytwarzanych przez *Klebsiella oxytoca* i *Burkholderia cepacia* oraz typu ESBL. Monobaktamy nie są aktywne wobec bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych beztlenowców.

Inhibitory beta-laktamaz nie są stosowane jako typowe antybiotyki, nie mają działania przeciwbakteryjnego. Związki te mają budowę beta-laktamową i też mogą być substratami dla enzymów beta-laktamowych, z tym że ulegają powolniejszemu rozkładowi. Stosowane łącznie z antybiotykami beta-laktamowymi blokują beta-laktamazy, podwyższając skuteczność działania bakteriobójczego antybiotyku. Nie do wszystkich beta-laktamaz związki te mają jednakowe powinowactwo, a zatem nie zawsze wykazują działanie blokujące. Tak jest w przypadku enzymów typu MBL. Często odporne na inhibitory są bakterie Gram-dodatnie o oporności typu MRSA. Obecnie w leczeniu stosowane są trzy inhibitory beta-laktamaz: kwas klawulanowy, sulbaktam oraz tazobaktam.

Mechanizmy oporności bakterii na antybiotyki beta-laktamowe

Komórka bakteryjna może wykazywać jednocześnie kilka mechanizmów warunkujących oporność na antybiotyki beta-laktamowe. Proces nabywania i modyfikowania oporności przez bakterie ma charakter ciągły, zachodzi szczególnie intensywnie w populacjach szczepów klinicznych, zwłaszcza szpitalnych, które poddawane są stałemu działaniu różnych antybiotyków. Kontakt z antybiotykami może wywoływać oporność indukowaną lub pojawienie się oporności na nowe beta-laktamy, co jest bardzo groźne, ponieważ może prowadzić do powstawania tzw. wieloopornych szczepów, i to nie tylko wśród bakterii patogennych, ale także wśród bakterii będących składnikami mikroflory normalnej.

Głównym mechanizmem obronnym bakterii przed działaniem antybiotyków beta-laktamowych jest wytwarzanie białek o aktywności beta-laktamaz. Enzymy te hydrolizują wiązanie amidowe w pierścieniu beta-laktamowym, co powoduje inaktywację antybiotyku (3). Skuteczność działania beta-laktamaz

Tabela 1. Podział cefalosporyn wg Williama (2)

Grupa	Generacja	Antybiotyk (przykłady)
0	I	Cefadroksyl Cefaleksyna Cefradyna
	II	Cefaklor Cefprozil
1	I	Cefalotyna Cefazolina Cefapiryna
	II	Cefamandol Cefuroksym Cefotiam
2	III	Cefotaksym Ceftriakson Cefodizim Cefetamet-piwoksyl
	III	Cefoperazon Cefsulodyna Ceftazidim
3	IV	Cefepim
	II	Cefamycyny: Cefmetazol Cefoksytyna Cefotetan

Tabela 2. Podział beta-laktamaz bakteryjnych (4, 5)

Klasa enzymu	Budowa centrum aktywnego	Przedstawiciele klasy – przykłady (grupa)
A	seryna	penicyliny hamowane przez inhibitory (gr. 2b) penicyliny niehamowane przez inhibitory (gr. 2br) karbapenicyliny (gr. 2c) β-laktamazy o rozszerzonym spektrum działania – ESBL (gr. 2be) karbapenemazy hamowane przez inhibitory (gr. 2f)
B	cynk	karbapenemazy, metalo-β-laktamazy – MBL (gr. 3)
C	seryna	cefalosporynazy AmpC (gr. 1)
D	seryna	oksacyliny (gr. 2d)
E	cynk	β-laktamazy wytwarzane przez szczepy z rodzaju <i>Xanthomonas</i>

zależy przede wszystkim od poziomu produkcji enzymu, specyfiki jego aktywności oraz stopnia powinowactwa do określonego antybiotyku. Beta-laktamazy bakterii Gram-dodatnich wydzielane są na zewnątrz komórki. Działając w środowisku zewnętrznym, inaktywują cząsteczki antybiotyku, do którego mają powinowactwo. W rezultacie chronią nie tylko komórki bakteryjne, z których pochodzą, ale i inne znajdujące się w środowisku bakterie, w tym również takie, które nie mają zdolności wytwarzania własnych beta-laktamaz. Na przykład niektóre gronkowce wchodzące w skład mikroflory normalnej mogą wytwarzać penicyliny, które będą chroniły przed działaniem penicylin bakterie patogeniczne, naturalnie wrażliwe na te antybiotyki. Występowanie takiego zjawiska, zwanego kopatogennością, należy brać pod uwagę, zwłaszcza gdy mimo ukierunkowanej wskazaniem antybiogramu terapii,

nie uzyskuje się oczekiwanego jej efektu. U bakterii Gram-ujemnych beta-laktamazy znajdują się w przestrzeni perioplazmatycznej i nie przenikają przez błonę zewnętrzną do środowiska. Działają one zatem na antybiotyk dopiero po jego przejściu przez błonę zewnętrzną, wewnątrz przestrzeni perioplazmatycznej, zanim dotrze on do znajdujących się w błonie cytoplazmatycznej docelowych białek PBP.

Obecnie znanych jest około 340 beta-laktamaz o różnej swoistości i pochodzeniu (3). Zostały one sklasyfikowane w kilku systemach o różnych kryteriach podziału. Jednym z nich, najczęściej stosowanym, jest podział beta-laktamaz na pięć klas w oparciu o różnice strukturalne według Amblera (4). Podział uwzględniający różnice funkcjonalne został dokonany przez Busha (5). Obie te klasyfikacje w wielu punktach są zbieżne, przedstawiono je w tabeli 2. Mianownictwo

beta-laktamaz nie jest jednolite i związane jest z różnymi ich właściwościami.

Beta-laktamazy są kodowane przez geny (*bla*) znajdujące się w chromosomie bakteryjnym lub w plazmidach, często związane z tzw. ruchomymi elementami genetycznymi, np. transpozonomami lub integronami. Geny chromosomalne są najczęściej charakterystyczne dla określonego gatunku bakterii. Natomiast geny plazmidowe mogą być przekazywane pomiędzy różnymi szczepami, gatunkami, a nawet rodzajami bakterii, nieraz odległymi filogenetycznie. U bakterii Gram-ujemnych występują beta-laktamazy kodowane przez geny chromosomalne lub plazmidowe, natomiast u Gram-dodatnich głównie przez geny plazmidowe. Do powstawania nowego typu oporności dochodzi najczęściej w wyniku mutacji. Jeżeli zachodzi ona w genie plazmidowym, to rozprzestrzenia się wśród bakterii na drodze transformacji lub koniugacji i populacja szczepów opornych szybko się powiększa.

Wytwarzanie beta-laktamaz przez bakterie może mieć charakter konstytutywny lub indukowany. Enzymy konstytutywne są wytwarzane przez komórki w sposób ciągły, a ich poziom nie zależy od obecności antybiotyku w środowisku i jest stałą cechą szczepu lub gatunku bakterii. Obecność beta-laktamazy konstytutywnej produkowanej w odpowiedniej ilości może być przyczyną tzw. naturalnej oporności na antybiotyki, do którego ma ona powinowactwo. Bardzo wiele beta-laktamaz bakterii Gram-ujemnych ma charakter konstytutywny. W przypadku beta-laktamaz indukowanych warunkiem ich produkcji przez bakterie jest indukcja przez antybiotyki beta-laktamowy obecny w środowisku. Synteza tych enzymów zachodzi do momentu usunięcia induktora ze środowiska, a więc warunkuje oporność czasową. Niekiedy jednak może dojść w trakcie indukcji do mutacji i indukowana beta-laktamaza jest wytwarzana przez bakterię w sposób ciągły, nawet po usunięciu induktora, a więc wytwarza się oporność trwała na określony antybiotyk – zjawisko to nazywane jest de-represją trwałą (6). Induktorem może być różny beta-laktam, niekiedy nie ten, który jest przez daną beta-laktamazę rozkładany. Przykładami silnych induktorów są cefamycyny i karbapenemy, które indukują wytwarzanie wielu beta-laktamaz, chociaż same na działanie większości z nich są odporne (6). Indukcja jest reakcją występującą z pewnym opóźnieniem. Zjawisko to sprzyja narastaniu oporności na beta-laktamy w populacji bakterii, które miały kontakt z induktorami, ale nie zostały zabite. Zatem należy szczególnie rozważnie stosować w leczeniu antybiotyki o silnych właściwościach indukcyjnych i unikając ich nadużywania.

Poza enzymatycznymi mechanizmami, które unieczynniają antybiotyki beta-laktamowe, u bakterii Gram-ujemnych oporność na nie może być związana z przepuszczalnością błony zewnętrznej. Na skutek zmniejszenia liczby białek porynowych w błonie zewnętrznej (outer membrane proteins – OMP) lub ich modyfikacji antybiotyków nie może być transportowany do przestrzeni periplazmatycznej, gdzie znajdują się docelowe białka PBP. Taki charakter może mieć m. in. oporność na karbapenemy u *Pseudomonas aeruginosa* lub *Acinetobacter* spp. (7). Bakterie mogą również wytwarzać PBP o zmienionej budowie, tak że tracą one powinowactwo do antybiotyku beta-laktamowego lub ulega ono osłabieniu (8). Zjawisko to najlepiej poznane jest u bakterii Gram-dodatnich, czego przykładem może być oporność gronkowców na metycylinę (szczepy MRSA – methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*).

Najsłabiej poznany mechanizm oporności na beta-laktamy jest wpływ antybiotyku z wnętrza komórki bakteryjnej na skutek aktywności białek działających na zasadzie pompy (efflux pump; 9). Takie aktywne usuwanie antybiotyku z komórki może warunkować również oporność na tetracykliny, chloramfenikol, aminoglikozydy czy chinolony.

Wprowadzenie do lecznictwa nowych antybiotyków o szerokim zakresie działania, niewrażliwych na „stare” beta-laktamazy może prowadzić do selekcji szczepów wytwarzających nowe typy tych enzymów. Zjawisko narastania oporności bakterii jest jednym z najpoważniejszych problemów terapeutycznych, zwłaszcza w przypadkach epidemii szpitalnych (10). Szczególnie trudne do zwalczania są szczepy Gram-ujemnych bakterii wytwarzające beta-laktamazy typów ESBL, MBL i AmpC (cefalosporynazy).

Beta-laktamazy typu ESBL

Szczep bakterii wytwarzającej beta-laktamazy o rozszerzonym spektrum działania (ESBL) wyizolowano po raz pierwszy w 1983 r. w Niemczech (11). Były to pałeczki *Klebsiella pneumoniae*, u których wykryto beta-laktamazę rozkładającą cefotaksym. Enzym ten powstał w wyniku mutacji w genie „starej” beta-laktamazy SHV-1 (sulfhydryl variable) i różnił się tylko jednym aminokwasem od pierwotnego białka.

Beta-laktamazy typu ESBL inaktywują penicyliny i przede wszystkim cefalosporyny I-III generacji oraz monobaktamazy (aztreonam), a wykazują słabą aktywność wobec cefamycyn i nie inaktywują karbapenemów. Ich działanie jest hamowane przez inhibitory beta-laktamaz, tj. kwas klawulanowy czy sulbaktam. Trzeba zaznaczyć, że w przypadku niektórych

szczepów wytwarzających ESBL obserwowany jest wzrost wartości MIC (minimal inhibitory concentration) dla cefalosporyn IV generacji, tj. cefepim (12).

Geny kodujące ESBL są zlokalizowane w plazmidach lub chromosomach (w transpozonomach lub integronach). Występują u bakterii z rodziny Enterobacteriaceae, głównie z rodzajów *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Salmonella*, a także u tlenowych pałeczek, tj. *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., *Stenotrophomonas* spp. Szczepy wytwarzające ESBL najczęściej należą do szczepów wieloopornych i na ogół w szybkim tempie rozprzestrzeniają się w środowisku, wywołując np. groźne epidemie szpitalne (13, 14).

Enzymy ESBL zaliczane są do klasy A według Amblera, grupy 2be i 2d według Busha (15). Pochodzą od beta-laktamaz o szerokim spektrum działania (broad spectrum beta-lactamases) należących do grupy 2b, tj. beta-laktamazy SHV czy TEM, i nazywane są odpowiednio ESBL typu SHV i ESBL typu TEM (15). U niektórych bakterii wykryto również inne ESBL, jak np. typu PER m.in. u *Acinetobacter* spp., typu VEP, m.in. u *Pseudomonas* spp. i *Enterobacter cloacae*, typu BES m.in. u *Serratia marcescens* czy typu CTX-M m.in. u *Proteus* spp. (16). Beta-laktamazy te różnią się zakresem hydrolizowanych substratów (17). Do ESBL niektórzy autorzy zaliczają także beta-laktamazy typu OXA (grupa 2d), które hydrolizują kloksacylinę i oksycylinę, a w mniejszym stopniu cefalosporyny. Występują one przede wszystkim u *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli*, rzadziej u innych pałeczek Gram-ujemnych (18).

Istotny jest fakt, że poszczególne szczepy bakteryjne mogą wytwarzać więcej niż jeden typ beta-laktamaz, a te, u których stwierdza się kilka typów, są szczepami o fenotypie wieloopornym (15, 19). Drobnostrój wytwarzające ESBL wykrywane są na całym świecie, w tym w Polsce, i głównie związane są z zakażeniami szpitalnymi (20, 21, 22, 23).

Beta-laktamazy typu MBL

W połowie lat 90. ubiegłego wieku zidentyfikowano enzymy hydrolizujące szerokie spektrum antybiotyków beta-laktamowych, w tym karbapenemy (24). Charakterystyczną ich cechą okazała się obecność jonu cynku w centrum aktywnym. Nazywano te enzymy metalo-beta-laktamazami (MBL), zwane są też karbapenemazami, chociaż nazwa ta określa wszystkie enzymy rozkładające karbapenemy. Zaklasyfikowano je do klasy B, grupy 3 według Busha. Są one niewrażliwe na inhibitory beta-laktamaz, natomiast ich aktywność jest hamowana przez EDTA, co jest związane z chelatującym działaniem

tego związku (25). MBL nie rozkładają aztreonamu.

Rozróżnia się kilka molekularnych typów MBL, tj. IMP, VIM, GIM, SPM czy SIM (26). Geny kodujące MBL zlokalizowane są w chromosomie lub plazmidach, gdzie występują w postaci kaset w strukturach integronowych. Sprzyja to łatwemu rozprzestrzenianiu się tych genów w populacji bakterii różnych gatunków, a szczepy wytwarzające MBL (głównie typów IMP oraz VIM) wykrywane są na całym świecie (25, 26).

Beta-laktamazy MBL występują u Gram-ujemnych pałeczek, głównie tlenowych, tj. *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp. i *Acinetobacter* spp., a także u niektórych z rodziny Enterobacteriaceae, np. *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Morganella* spp. (26, 27).

Ogromne zagrożenie stanowią, nienależące do MBL, niedawno zidentyfikowane beta-laktamazy o aktywności karbapenemaz, nazwane KPC, zaklasyfikowane do klasy A i grupy 2f według Busha (28). Enzymy te hydrolizują karbapenemy, penicyliny, cefalosporyny oraz aztreonam i są hamowane przez kwas klawulanowy oraz tazobaktam. Beta-laktamazy typu KPC wykryto w szczepach m.in. *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Serratia* spp. (29).

Beta-laktamazy typu AmpC

Beta-laktamazy AmpC są enzymami zaliczonymi do klasy C i grupy 1 według Busha. Są to cefalosporyny o zróżnicowanym poziomie aktywności w zależności od gatunku bakterii, stosunkowo trudne do identyfikacji. Częściowo mogą łączyć się z elementarnymi ścianami komórkowej bakterii, czym przypominają PBP. Cefalosporyny AmpC rozkładają wszystkie penicyliny i cefalosporyny (głównie I i II generacji) z wyjątkiem cefepimu, nie hydrolizują aztreonamu, chociaż niektóre mogą go wiązać (1). Enzymy te nie hydrolizują karbapenemów i nie są hamowane przez kwas klawulanowy.

Cefalosporyny AmpC wytwarzane są przez bakterie Gram-ujemne, głównie z rodzajów *Acinetobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Escherichia*, *Klebsiella* spp., *Serratia* spp., *Morganella* spp., *Providencia* spp. i *Pseudomonas* (30, 31).

Ekspresja niektórych enzymów AmpC jest indukowana przez beta-laktamy. W przypadku nadprodukcji enzymu lub derepresji (produkcja konstytutywna w wyniku mutacji) obserwowana jest u bakterii oporność na cefalosporyny III generacji (1). Do takiego zjawiska może dochodzić w trakcie stosowania antybiotyków, które są słabymi induktorami, a jednocześnie mogą być substratami, np. cefalosporyny III generacji, na które wrażliwość stopniowo zaczyna zmniejszać się w czasie leczenia (1). Dlatego dla celów

terapeutycznych należy albo potraktować szczepy AmpC-dodatnie za odporne na cefalosporyny III generacji, albo brać pod uwagę dokładne wskazania antybiogramu.

Występowanie beta-laktamaz u Gram-ujemnych bakterii izolowanych od zwierząt

Zdecydowana większość danych na temat beta-laktamaz pałeczek Gram-ujemnych dotyczy enzymów wytwarzanych przez bakterie wyizolowane od ludzi, głównie przez szczepy szpitalne. Poza szpitalami szczepy wytwarzające ESBL wykrywano również w domach opieki społecznej, domach dziecka oraz w przypadkach zakażeń pozaszpitalnych (32, 33, 34). Wydaje się, że ważnym rezerwuarem tych bakterii mogą być zwierzęta hodowlane, domowe i dzikie (35). W ostatnich latach zaczęło się pojawiać coraz więcej prac opisujących szczepy bakterii izolowane od zwierząt, wytwarzające beta-laktamazy typów ESBL i AmpC, chociaż wciąż jest ich stosunkowo niewiele. Natomiast dotychczas brak doniesień dotyczących szczepów pochodzenia zwierzęcego wytwarzających typowe metalo-beta-laktamazy.

Beta-laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL) wykryto u szczepów *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae* wyizolowanych od koni (36). Od bydła wyizolowano m.in. szczepy *Salmonella enterica* produkujące cefalosporyny typu AmpC, a także *E. coli* wytwarzające ESBL typu CTX (37, 38). Szczepy *E. coli* produkujące beta-laktamazy typu CTX stwierdzono też w kale świń (39).

Obecność wieloopornych szczepów stwierdzono również u zwierząt towarzyszących człowiekowi. W badaniach przeprowadzonych we Włoszech stwierdzono kilka typów beta-laktamaz w szczepach *E. coli* pochodzących od chorych i zdrowych psów oraz kotów (40). Bakterie były wyizolowane z kału, z treści jelit lub z narządów wewnętrznych. Wszystkie charakteryzowały się wysoką opornością w stosunku do antybiotyków z różnych grup, w tym szerokiego spektrum cefalosporyn, chinolonów i aminoglikozydów. W wykonanych w Chile badaniach geny kodujące ESBL wykryto u 20% badanych szczepów *E. coli* wyizolowanych od psów i kotów (41). W Polsce wśród pałeczek *E. coli* wyizolowanych od chorych psów i kotów, ekspresję ESBL wykryto u 2% badanych szczepów (42). Były to szczepy wyizolowane z wymazów pobranych z ucha oraz z nosa od psów. Przypadki występowania ESBL stwierdzono także w szczepach *E. coli* wyizolowanych z kału dzikich zwierząt, tj. miewy, sowy, jelenie, lisy (43, 44).

Coraz częstsze są doniesienia o izolacji bakterii o oporności typu ESBL z próbek produktów pochodzenia zwierzęcego.

Dotyczy to m.in. mięsa drobiowego, w którym stwierdzono obecność szczepów *Salmonella enterica* oraz *E. coli* o fenotypie ESBL-dodatnim (45, 46, 47). Również w szczepach bakteryjnych izolowanych z surowego mleka wykryto kilka typów ESBL (48).

Postępowanie w przypadku zakażeń wywołanych przez szczepy wytwarzające beta-laktamazy

W leczeniu zakażeń bakteryjnych podstawowym etapem powinno być rozpoznanie czynnika etiologicznego i oznaczenie jego wrażliwości na chemioterapeutyki. Najwłaściwszym postępowaniem jest wybór leku na podstawie wskazań antybiogramu. Przy obecnej, obszernej wiedzy na temat oporności bakterii trzeba mieć świadomość, że prawidłowe ustalenie lekowności szczepów w rutynowym badaniu może być trudne, zwłaszcza w odniesieniu do bakterii Gram-ujemnych. Oznaczenie lekowności powinno polegać na ustaleniu wartości MIC dla badanych chemioterapeutyków, a także na określeniu profilu beta-laktamaz wytwarzanych przez bakterie. Ekspresję beta-laktamaz można wykrywać kilkoma metodami, m.in. krążkowo-dyfuzyjną z odpowiednio dobranymi antybiotykami, specjalnymi E-testami lub metodami zautomatyzowanymi, np. w systemie BD Phoenix. Badania te należy wykonywać według zaleceń CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Rutynowo powinno się oznaczać beta-laktamazy typu ESBL, MBL i AmpC u wszystkich klinicznych szczepów należących do rodziny Enterobacteriaceae oraz u pałeczek tlenowych, tj. *Stenotrophomonas* spp., *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp. i *Acinetobacter* spp. Niestety, często interpretacja oznaczeń fenotypowych jest trudna i wtedy w wątpliwych przypadkach można przeprowadzić badanie genetyczne, polegające na poszukiwaniu genów kodujących beta-laktamazy (12). Oznaczenia takie wykonywane są przez ośrodki referencyjne (w Polsce przez Narodowy Instytut Leków w Warszawie).

Mimo coraz szerszej wiedzy na temat mechanizmów oporności bakterii, w tym działania ESBL i MBL, niewiele jej elementów dotychczas znalazło zastosowanie kliniczne. Walka z zakażeniami bakteryjnymi wciąż jest trudna, niekiedy nieskuteczna z uwagi na złożone, często jednocześnie występujące różne mechanizmy oporności bakterii. Aby ograniczyć selekcję szczepów opornych, należy w jak najmniejszym stopniu poddawać je działaniu antybiotyków w nieskutecznych dawkach. O ile to możliwe powinno się stosować antybiotyki „niższych” generacji (według wskazań antybiogramu), a nie nadużywać antybiotyków „wyższych” generacji, ponieważ ich stosowanie prowadzi do powstawania beta-laktamaz o coraz szerszym spektrum

działania i narastania oporności w populacji bakterii. W rozważny sposób należy stosować te antybiotyki, o których wiadomo, że są silnymi induktorami beta-laktamaz, czyli karbapenemy i cefamycyny, rezerwując je do zwalczania zakażeń szczepami opornymi na inne antybiotyki.

Niekorzystne jest dłuższe utrzymywanie się w organizmie subinhibicyjnych stężeń antybiotyku, ponieważ generuje to powstawanie szczepów opornych. Wskazane jest zatem stosowanie antybiotyków tak, by stężenie leku w surowicy powyżej wartości MIC utrzymywało się jak najdłużej pomiędzy kolejnymi dawkami. Jak wynika z badań, w przypadku beta-laktamów jednym z ważniejszych wskaźników PK/PD (pharmacokinetic/pharmacodynamic) warunkującym skuteczność *in vivo* tych antybiotyków jest wartość $T_{>MIC}$ (czas, w jakim stężenie leku w surowicy przekracza MIC). W badaniach na modelach zwierzęcych wykazano, że w przypadku zakażeń pałeczkami Enterobacteriaceae maksymalną skuteczność cefalosporyn uzyskuje się, gdy stężenie leku powyżej MIC utrzymywane jest przez 60–70% czasu pomiędzy dawkami (49). Procent $T_{>MIC}$ dla penicylin jest niższy niż dla cefalosporyn i wynosi 25–35 (50).

Bakteriami charakteryzującymi się wysoką opornością na beta-laktamy są pałeczki *Acinetobacter*. Z badań przeprowadzonych na szczepach wytwarzających ESBL wynika, że najwyższą aktywność wobec nich wykazują imipenem oraz ampicylina z sulbaktamem (51). Obserwowana jest także dobra skuteczność karbapenemów wobec ESBL-dodatnich szczepów *E. coli* oraz *Klebsiella* spp.

Zjawisko narastania oporności wśród bakterii chorobotwórczych zmusza badaczy do coraz intensywniejszych poszukiwań nowych skuteczniejszych antybiotyków. Niestety, dotychczas można uznać ten wyścig za przegrany. W odpowiedzi na wprowadzone do praktyki klinicznej w latach 80. ubiegłego wieku cefalosporyny III generacji w ciągu kilku lat pojawiły się szczepy odporne. Cefalosporyny wyższych generacji, tj. cefepim, również mogą nie być wystarczająco skuteczne wobec niektórych szczepów pałeczek rodziny Enterobacteriaceae wytwarzających ESBL (52). Dlatego strategia walki ze wzrastającą lekoopornością pałeczek Gram-ujemnych nie powinna opierać się jedynie na stosowaniu coraz nowszych antybiotyków, ale na sięganiu do leków starszych, rzadziej używanych, mimo często większej ich toksyczności. Przykładem mogą być kolistyna i rifampicyna, które są antybiotykami ostatniej szansy w leczeniu u ludzi ciężkich zakażeń wywołanych szczepami opornymi na wszystkie beta-laktamy, łącznie z karbapenemami (53, 54).

Na podstawie ostatnich badań wydaje się, że w walce ze szczepami wieloopornymi

znacznie skuteczniejsza jest antybiotykoterapia złożona (np. kombinacja fluorochinolonów z beta-laktamami i amikacyną) niż monoterapia (51, 55). Przykładem synergistycznego działania mogą być dane o zwiększonej, wobec wieloopornych szczepów *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Acinetobacter* spp., aktywności lewofloksacyliny i ciprofloksacyliny podawanych w połączeniu z ceftazidimem lub cefepimem, a także w połączeniu z piperacyliną z tazobaktamem oraz imipenemem (56). Stosowanie kilku antybiotyków nie tylko zwiększa skuteczność leczenia, ale także zmniejsza ryzyko selekcji szczepów bardziej opornych.

Podsumowanie

Obserwowany od wielu lat sukcesywny wzrost liczby szczepów bakteryjnych wieloopornych związany jest w dużej mierze z powszechnym stosowaniem antybiotyków, niekiedy w sposób nieracjonalny. Problem ten staje się tym groźniejszy, że perspektywy szybkiego wprowadzenia do lecznictwa nowych, bardziej skutecznych preparatów są odległe. Zagadnienie lekooporności, zwłaszcza w odniesieniu do bakterii wytwarzających beta-laktamazy o rozszerzonym spektrum substratów, powinno być uwzględniane przy ustalaniu antybiotykoterapii, która powinna zawsze być oparta na wskazaniach antybiogramu, tak aby nie prowadziła do rozprzestrzeniania się oporności w populacji szczepów, zwłaszcza klinicznych. Biorąc pod uwagę skomplikowane mechanizmy oporności występujące u bakterii należy bardzo ostrożnie dokonywać wyboru stosowanych leków, pamiętając, że na kontakt z antybiotykami, szczególnie nowych generacji, drobnoustroje niezwykle szybko odpowiadają wytworzeniem nowych beta-laktamazy o coraz szerszym spektrum działania. Fakt obecności genów warunkujących lekooporność różnego typu u bakterii występujących u zwierząt oraz w produktach pochodzenia zwierzęcego wskazuje na istotne zagrożenie związane z możliwością szybkiego rozprzestrzeniania się wieloopornych szczepów w środowisku człowieka.

Piśmiennictwo

- Jacoby G.A.: AmpC [beta]-Lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 2009, **22**, 161-82.
- Williams J.D.: Classification of cephalosporines. *Drugs.* 1987, **34** suppl.2, 15-22.
- Helfand M.S., Bonomo R.A.: Beta-lactamases: a survey of protein diversity. *Curr. Drug. Targets Infect. Disord.* 2003, **3**, 9-23.
- Ambler R.P., Coulson A.F., Frère J.M., Ghysen J.M., Joris B., Forsman M., Levesque R.C., Tiraby G., Waley S.G.: A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem. J.* 1991, **276**, 269-270.
- Bush K., Jacoby G. A., Medeiros A.A.: A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995, **39**, 1211-1233.
- Livemore D.M.: Clinical significance of beta-lactamase induction and stable derepression in Gram-negative rods. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 1987, **6**, 439-445.

- Quale J., Bratu S., Landman D., Heddurshetti R.: Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* endemic in New York City. *Clin. Infect. Dis.* 2003, **37**, 214-220.
- Fernández-Cuenca F., Rodríguez-Martínez J.M., Martínez-Martínez L., Pascual A.: In vivo selection of Enterobacter aerogenes with reduced susceptibility to cefepime and carbapenems associated with decreased expression of a 40 kDa outer membrane protein and hyperproduction of AmpC beta-lactamase. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2006, **27**, 549-552.
- Vila J., Martí S., Sánchez-Céspedes J.: Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2007, **59**, 1210-1215.
- Lytsy B., Sandegren L., Tano E., Torell E., Andersson D.I., Melhus A.: The first major extended-spectrum beta-lactamase outbreak in Scandinavia was caused by clonal spread of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* producing CTX-M-15. *APMIS* 2008, **116**, 302-308.
- Knothe H., Shah P., Kremery V., Antal M., Mitsuhashi S.: Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 1983, **11**, 315-317.
- Grover S.S., Sharma M., Chattopadhyay D., Kapoor H., Pasha S.T., Singh G.: Phenotypic and genotypic detection of ESBL mediated cephalosporin resistance in *Klebsiella pneumoniae*: emergence of high resistance against cefepime, the fourth generation cephalosporin. *J. Infect.* 2006, **53**, 279-288.
- Kristóf K., Szabó D., Marsh J.W., Cser V., Janik L., Rozgonyi F., Nobilis A., Nagy K., Paterson D.L.: Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella* spp. in a neonatal intensive care unit: risk factors for the infection and the dynamics of the molecular epidemiology. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2007, **26**, 563-570.
- Lewis J.S. 2nd, Herrera M., Wickes B., Patterson J.E., Jorgensen J.H.: First report of the emergence of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) as the predominant ESBL isolated in a U.S. health care system. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007, **51**, 4015-4021.
- Paterson D.L., Bonomo R.A.: Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005, **18**, 657-686.
- Bonnet R.: Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, **48**, 1-14.
- Naas T., Poirel L., Nordmann P.: Minor extended-spectrum beta-lactamases. *Clin. Microbiol. Infect.* 2008, **14** suppl. 1, 42-52.
- Yan J.J., Tsai S.H., Chuang C.L., Wu J.J.: OXA-type beta-lactamases among extended-spectrum cephalosporin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a university hospital in southern Taiwan. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2006, **39**, 130-134.
- Biendo M., Canarelli B., Thomas D., Rousseau F., Hamdad F., Adjide C., Laurans G., Eb F.: Successive emergence of extended-spectrum beta-lactamase-producing and carbapenemase-producing Enterobacter aerogenes isolates in a university hospital. *J. Clin. Microbiol.* 2008, **46**, 1037-1044.
- Empel J., Filczak K., Mrówka A., Hryniewicz W., Livermore D.M., Gniadkowski M.: Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections with PER-1 extended-spectrum beta-lactamase in Warsaw, Poland: further evidence for an international clonal complex. *J. Clin. Microbiol.* 2007, **45**, 2829-2834.
- Bush K.: Extended-spectrum beta-lactamases in North America, 1987-2006. *Clin. Microbiol. Infect.* 2008, **14** suppl. 1, 134-143.
- Cantón R., Novais A., Valverde A., Machado E., Peixe L., Baquero F., Coque T.M.: Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 2008, **14** suppl. 1, 144-153.
- Hawkey P.M.: Prevalence and clonality of extended-spectrum beta-lactamases in Asia. *Clin. Microbiol. Infect.* 2008, **14** suppl. 1, 159-165.
- Walsh T.R.: The emergence and implications of metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* 2005, **11** suppl. 6, 2-9.
- Fiett J., Baraniak A., Mrówka A., Fleischer M., Drużkiewicz Z., Naumiuk L., Samet A., Hryniewicz W., Gniadkowski M.: Molecular epidemiology of acquired-metallo-beta-lactamase-producing bacteria in Poland. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006, **50**, 880-886.
- Queenan A.M., Bush K.: Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 2007, **20**, 440-458.
- Bratu S., Tolaney P., Karumudi U., Quale J., Mooty M., Nichani S., Landman D.: Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B and other agents. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005, **56**, 128-132.
- Yigit H., Queenan A.M., Anderson G.J., Domenech-Sanchez A., Biddle J.W., Steward C.D., Alberti S., Bush K., Tenover F.C.: Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001, **45**, 1151-1161.

29. Cai J.C., Zhou H.W., Zhang R., Chen G.X.: Emergence of *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli* Isolates possessing the plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 in intensive care units of a Chinese hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008, **52**, 2014-2018.
30. Yang K., Guglielmo B.J.: Diagnosis and treatment of extended-spectrum and AmpC beta-lactamase-producing organisms. *Ann. Pharmacother.* 2007, **41**, 1427-1435.
31. Luzzaro F., Brigante G., D'Andrea MM., Pini B., Giani T., Mantengoli E., Rossolini GM., Toniolo A.: Spread of multidrug-resistant *Proteus mirabilis* isolates producing an AmpC-type beta-lactamase: epidemiology and clinical management. *Int J Antimicrob Agents.* 2008, doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.09.007.
32. Arpin C., Dubois V., Coulangue L., André C., Fischer I., Noury P., Grobost F., Brochet J.P., Jullin J., Dutilh B., Larribet G., Lagrange I., Quentin C.: Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in community and private health care centers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003, **47**, 3506-3514.
33. Weill F.X., Demartin M., Fabre L., Grimont P.A.: Extended-spectrum-beta-lactamase (TEM-52)-producing strains of *Salmonella enterica* of various serotypes isolated in France. *J. Clin. Microbiol.* 2004, **42**, 3359-3362.
34. Pitout J.D., Nordmann P., Laupland K.B., Poirer L.: Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005, **56**, 52-59.
35. Li X.Z., Mehrotra M., Ghimire S., Adewoye L.: Beta-Lactam resistance and beta-lactamases in bacteria of animal origin. *Vet. Microbiol.* 2007, **121**, 197-214.
36. Vo A.T., van Duijkeren E., Fluit A.C., Gastra W.: Characteristics of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from horses. *Vet. Microbiol.* 2007, **124**, 248-255.
37. Shiraki Y., Shibata N., Doi Y., Arakawa Y.: *Escherichia coli* producing CTX-M-2 beta-lactamase in cattle, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 2004, **10**, 69-75.
38. Frye J.G., Fedorka-Cray P.J., Jackson C.R., Rose M.: Analysis of *Salmonella enterica* with reduced susceptibility to the third-generation cephalosporin ceftriaxone isolated from U.S. cattle during 2000-2004. *Microb. Drug Resist.* 2008, **4**, 251-258.
39. Cavaco L.M., Abatih E., Aarestrup F.M., Guardabassi L.: Selection and persistence of CTX-M-producing *Escherichia coli* in the intestinal flora of pigs treated with amoxicillin, ceftiofur, or ceftquinome. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008, **52**, 3612-3616.
40. Carattoli A., Lovari S., Franco A., Cordero G., Di Matteo P., Battisti A.: Extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Rome, Italy, from 2001 to 2003. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005, **49**, 833-835.
41. Moreno A., Bello H., Guggiana D., Dominguez M., González G.: Extended-spectrum beta-lactamases belonging to CTX-M group produced by *Escherichia coli* strains isolated from companion animals treated with enrofloxacin. *Vet. Microbiol.* 2008, **129**, 203-208.
42. Rzewuska M., Turkowska M., Kizerwetter-Świdła M., Binek M.: Występowanie β-laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL) u szczepów *Escherichia coli* wyizolowanych od psów i kotów. *Materiały konferencyjne XXVI Zjazdu PTM, Szczecin* 2008, 76.
43. Costa D., Poeta P., Sáenz Y., Vinué L., Rojo-Bezares B., Jouini A., Zarazaga M., Rodrigues J., Torres C.: Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum beta-lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006, **58**, 1311-1312.
44. Poeta P., Radhouani H., Igrejas G., Gonçalves A., Carvalho C., Rodrigues J., Vinué L., Somalo S., Torres C.: Seagulls of the Berlengas natural reserve of Portugal as carriers of fecal *Escherichia coli* harboring CTX-M and TEM extended-spectrum beta-lactamases. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008, **74**, 7439-7441.
45. Hasman H., Mevius D., Veldman K., Olesen L., Aarestrup F.M.: Beta-Lactamases among extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005, **56**, 115-121.
46. Bertrand S., Weill F.X., Clockaert A., Vrints M., Maeriaux E., Praud K., Dierick K., Wildemaue C., Godard C., Butaye P., Imberechts H., Grimont P.A., Collard J.M.: Clonal emergence of extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-2)-producing *Salmonella enterica* serovar Virchow isolates with reduced susceptibilities to ciprofloxacin among poultry and humans in Belgium and France (2000 to 2003). *J. Clin. Microbiol.* 2006, **44**, 2897-2903.
47. Jouini A., Vinué L., Slama K.B., Sáenz Y., Klibi N., Hammami S., Boudabous A., Torres C.: Characterization of CTX-M and SHV extended-spectrum beta-lactamases and associated resistance genes in *Escherichia coli* strains of food samples in Tunisia. *J. Antimicrob. Chemother.* 2007, **60**, 1137-1141.
48. Hamud A.M., Ahmed A.M., Ishida Y., Shimamoto T.: First characterization and emergence of SHV-60 in raw milk of a healthy cow in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 2008, **70**, 1269-1272.
49. Bakker-Woudenberg I.A.J.M., ten Kate M.T., Goessens W.H.F., Mouton J.W.: Effect of treatment duration on pharmacokinetic/pharmacodynamic indices correlating with therapeutic efficacy of ceftazidime in experimental *Klebsiella pneumoniae* lung infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006, **50**, 2919-2925.
50. Craig W.A.: Basic pharmacodynamics of antibacterials with clinical applications to the use of β-lactams, glycopeptides, and linezolid. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 2003, **17**, 479-501.
51. Higgins P.G., Wisplinghoff H., Stefank D., Seifert H.: In vitro activities of the beta-lactamase inhibitors clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam alone or in combination with beta-lactams against epidemiologically characterized multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, **48**, 1586-1592.
52. Helfand M.S., Bonomo R.A.: Current challenges in antimicrobial chemotherapy: the impact of extended-spectrum beta-lactamases and metallo-beta-lactamases on the treatment of resistant Gram-negative pathogens. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2005, **5**, 452-458.
53. Bassetti M., Repetto E., Righi E., Boni S., Diverio M., Molinari M.P., Mussap M., Artioli S., Ansaldi F., Durando P., Orengo G., Bobbio Pallavicini F., Viscoli C.: Colistin and rifampicin in the treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 2008, **61**, 417-420.
54. Song J.Y., Lee J., Heo J.Y., Noh J.Y., Kim W.J., Cheong H.J., Hwang I.S.: Colistin and rifampicin combination in the treatment of ventilator-associated pneumonia caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2008, **32**, 281-284.
55. Rahal J.J.: Novel antibiotic combinations against infections with almost completely resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clin. Infect. Dis.* 2006, **43** suppl. 2, S95-99.
56. Drago L., De Vecchi E., Nicola L., Colombo A., Guerra A., Gismondo M.R.: Activity of levofloxacin and ciprofloxacin in combination with cefepime, ceftazidime, imipenem, piperacillin-tazobactam and amikacin against different *Pseudomonas aeruginosa* phenotypes and *Acinetobacter* spp. *Chemother.* 2004, **50**, 202-210.