

Rekomendacje doboru testów do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki 2009

Oznaczanie wrażliwości pałeczek Gram-ujemnych

Marek Gniadkowski¹, Dorota Żabicka², Waleria Hryniewicz^{2,3}

1. Zakład Mikrobiologii Molekularnej, Narodowy Instytut Leków

2. Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej, Narodowy Instytut Leków

3. Centralny Ośrodek Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej

1. Oznaczanie wrażliwości pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae*.

1. 1. Metody

Podłoże MHA, zawiesina bakteryjna o gęstości 0,5 McFarlanda, inkubacja 16-18h w temp. 35°C± 2 °C, w atmosferze tlenowej [41, 42].

W przypadku „pełzających” szczepów *Proteus* spp. należy ignorować wtórny wzrost w strefach zahamowania wzrostu, jeżeli nie przekracza on 20% wzrostu zasadniczego.

1. 2. Najważniejsze mechanizmy oporności

1. 2. 1. β-Laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL)

Jednym z najistotniejszych klinicznie i epidemiologicznie mechanizmów oporności na leki u pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* jest wytwarzanie tzw. β-laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL). **Są to enzymy zdolne do hydrolizy penicylin, cefalosporyn (z wyjątkiem cefamycyn, np. cefoksytiny) i monobaktamów (aztreonamu)** [7], przy czym „najważniejsza” jest ich aktywność względem cefalosporyn III i IV generacji. Pomimo pojawienia się w ostatnich latach innych mechanizmów, ESBL pozostają nadal najczęstszym źródłem oporności pałeczek jelitowych na te leki [6, 8, 11, 29], w tym także w Polsce [16]. Pomimo, że **ESBL są hamowane przez inhibitory β-laktamaz** (kwas klawulanowy, sulbaktam i tazobaktam), szczepy ESBL⁺ nierzadko okazują się odporne *in vitro*

na połączenia β -laktamów z inhibitorami [29]. Co jednak ważniejsze, **szczyepy ESBL⁺ mogą wykazywać wrażliwość *in vitro* na leki należące do substratów ESBL**, zwłaszcza na przynajmniej niektóre cefalosporyny III/IV generacji i/lub aztreonam. Niemniej, poważne ryzyko niepowodzenia terapeutycznego przy zastosowaniu takiego leku powoduje, że przyjęto zalecenie, by **szczyepy wytwarzające ESBL traktować jako szczepy odporne na wszystkie penicyliny (bez połączeń z inhibitorami), cefalosporyny (z wyjątkiem cefamycyn) i aztreonam** [22, 29, 38, 42]. W przypadku ciężkich zakażeń oraz w przypadku chorych z czynnikami ryzyka, szczepy ESBL⁺ bywają traktowane jako z definicji odporne również na połączenia antybiotyków β -laktamowych z inhibitorami β -laktamaz, chociaż zagadnienie to pozostaje przedmiotem kontrowersji i wymaga więcej danych klinicznych. Podane zalecenia należy stosować mniej restrykcyjnie w przypadku szczepów ESBL⁺ izolowanych z miejsc ciała, w których leki ulegają zagęszczeniu [19, 29].

Do niedawna szczepy ESBL⁺ były typowymi patogenami szpitalnymi. W ciągu ostatnich lat stały się one jednak także rutynowo identyfikowanymi czynnikami etiologicznymi zakażeń pozaszpitalnych (zwłaszcza dróg moczowych) i stwierdza się je również w nosicielstwie u ludzi zdrowych, zwierząt hodowlanych i domowych oraz w produktach żywnościowych pochodzenia zwierzęcego. Najczęściej są to szczepy *Escherichia coli* wytwarzające ESBL z rodziny CTX-M, ale spotyka się też szczepy innych gatunków, np. *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, oraz inne rodzaje ESBL [8, 9, 43]. To powoduje, że **obecnie istnieje potrzeba wykrywania ESBL w ramach antybiogramu podstawowego u wszystkich badanych szczepów z rodziny *Enterobacteriaceae*, pochodzących zarówno z zakażeń szpitalnych, jak i pozaszpitalnych**. Należy nadmienić, że wykrywanie różnych mechanizmów oporności bakterii na leki ma dwa cele: oprócz celu klinicznego istnieje też bardzo ważny cel epidemiologiczny, wiążący się ściśle z zagadnieniami kontroli zakażeń i potrzebą monitorowania sytuacji epidemiologicznej.

Wykrywanie ESBL, bez względu na zastosowaną metodę, polega na stwierdzeniu obniżonej wrażliwości na którykolwiek z użytych leków wskaźnikowych (cefotaksym, ceftazydym, ceftriakson, cefpodoksym, cefepim, aztreonam) i wykazanie wpływu inhibitora β -laktamowego na ten efekt [15, 22, 24]. Najczulszym, ale jednocześnie najmniej specyficznym związkiem wydaje się cefpodoksym [12].

1. 2. 2. Cefalosporynazy AmpC

Drugim ważnym mechanizmem oporności pałeczek *Enterobacteriaceae* na antybiotyki β -laktamowe jest wytwarzanie tzw. cefalosporynaz AmpC, które **hydrolizują penicyliny**,

cefalosporyny (z wyjątkiem leków IV generacji) i aztreonam. Z reguły nie są one też podatne na działanie inhibitorów β -laktamowych, zwłaszcza kwasu klawulanowego [4, 7, 29]. Oporność pałeczek jelitowych na β -laktamy nowych generacji (cefalosporyny III generacji i aztreonam) związana z tymi enzymami przejawia się w trzech sytuacjach. Pierwszą z nich jest tzw. „derepresja” AmpC u szczepów tych gatunków pałeczek, u których β -laktamazy te występują naturalnie, czyli *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii* i *Serratia marcescens* (a także *Morganella morganii*, *Providencia* spp. i *Hafnia alvei*). Dzikie szczepy tych gatunków, o indukowanej ekspresji AmpC, wykazują naturalną oporność na aminopenicyliny i ich połączenia z inhibitorami oraz na cefalosporyny I i II generacji. **Szczepy z derepresją AmpC wykazują natomiast także oporność (*Enterobacter* spp., *C. freundii*), a w przypadku innych gatunków oporność lub obniżoną wrażliwość na pozostałe substraty AmpC i połączenia β -laktamów z inhibitorami [4, 29].** Wysoka częstość spontanicznego pojawiania się szczepów z derepresją AmpC oraz ich selekcji w toku terapii cefalosporynami III generacji spowodowały, że powszechnie mówi się o konieczności przynajmniej ostrożnego stosowania tych leków w przypadku zakażeń wywołanych przez dzikie szczepy wymienionych gatunków. Istnieją poglądy, aby **wskazywać na wyniku możliwość nabycia oporności na cefalosporyny III generacji w trakcie leczenia, prowadzić monitorowanie mikrobiologiczne jego przebiegu, lub też, aby wręcz raportować wszystkie szczepy tych gatunków jako z definicji odporne na cefalosporyny III generacji i aztreonam [19, 29].** Zdaniem autorów niniejszego opracowania wybór podejścia powinien być podyktowany konkretną sytuacją kliniczną (np. rodzaj zakażenia, typ pacjenta, uprzednio podawane antybiotyki) oraz doświadczeniem klinicznym i epidemiologicznym konkretnego ośrodka.

Druga sytuacja dotyczy *E. coli*, która także posiada naturalny enzym AmpC, ale dzikie szczepy, wytwarzając go na śladowym poziomie, pozostają wrażliwe na wszystkie β -laktamy skuteczne wobec pałeczek *Enterobacteriaceae*. Pojawiają się jednak szczepy, u których dochodzi do podwyższenia poziomu ekspresji AmpC i których fenotyp przypomina oporność szczepów z derepresją AmpC wyżej wymienionych drobnoustrojów. Stopień oporności jest jednak zróżnicowany i z reguły niższy niż u *Enterobacter* spp. i *C. freundii* z derepresją AmpC [29]. Trzecia sytuacja ma miejsce w przypadku szczepów pałeczek jelitowych, wytwarzających nabyte β -laktamazy AmpC [40]. Należą one do różnych gatunków, głównie *K. pneumoniae*, *E. coli*, a w Polsce – szczególnie często *Proteus mirabilis* [16, 27]. W środowisku pozaszpitalnym można zetknąć się ze szczepami *S. enterica* AmpC⁺. **Poziom**

oporności szczepów z nabytymi AmpC jest zróżnicowany; obok szczepów bardzo przypominających *Enterobacter* spp. i *C. freundii* z derepresją AmpC, można też obserwować zaledwie obniżoną wrażliwość *in vitro* na część leków (cefalosporyny III generacji, a zwłaszcza na piperacylinę z tazobaktamem i aztreonam) [27, 40]. Wobec szczupłości danych naukowych, ewentualną skuteczność tych leków zaleca się traktować jako przynajmniej wątpliwą.

1. 2. 3. Współwystępowanie ESBL i AmpC – implikacje diagnostyczne

Jak zaznaczono wyżej, wykrywanie ESBL powinno się wykonywać dla wszystkich szczepów pałeczek *Enterobacteriaceae*. Obecność wytwarzanej na wysokim poziomie cefalosporynazy AmpC (derepresja lub nadekspresja naturalnej albo wytwarzanie nabytej AmpC) z reguły maskuje fenotyp ESBL⁺ z powodu podobnego spektrum substratowego i niepodatności AmpC na działanie kwasu klawulanowego [15]. Pomimo często ewidentnej oporności takich szczepów na wszystkie substraty obu enzymów, należy przeprowadzić wykrywanie ESBL z powodów epidemiologicznych. Ponadto, jeszcze częściej występują sytuacje, w których badany szczep o fenotypie oporności wskazującym na wytwarzanie AmpC pozostaje wrażliwy *in vitro* na cefalosporyny IV generacji (niehydrolizowane przez AmpC) i wówczas należy wykluczyć obecność ESBL, zanim uzna się je za opcję terapeutyczną. W takim przypadku procedura wykrywania ESBL ma również znaczenie kliniczne. **Istnieją dwie możliwości wykrycia ESBL w obecności AmpC, z rozbudowaniem podstawowego testu na ESBL o kombinację cefepim – kwas klawulanowy lub z przeprowadzeniem testu podstawowego na podłożu uzupełnionym kloksacyliną, która jest inhibitorem AmpC** [15]. Obie procedury, prowadząc do wykrycia ESBL, jednocześnie potwierdzają (lub wykluczają) obecność AmpC i z tego powodu, zdaniem autorów niniejszego opracowania, nie ma istotnej potrzeby ukierunkowanego wykrywania cefalosporynaz AmpC w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej. Niemniej, takie metody istnieją i najwygodniejsze z nich opierają się na stosowaniu substratów wskaźnikowych, takich jak cefotetan (lub cefotaksym, ceftriakson) oraz inhibitorów AmpC, takich jak kloksacylina lub kwas boronowy [13, 19].

W przypadku stwierdzenia fenotypu niezależnej od kwasu klawulanowego oporności na penicyliny, cefalosporyny i monobaktamy oraz wykluczenia obecności AmpC, nadal nie można odrzucić możliwości wytwarzania ESBL przez taki szczep, maskowanej przez silne obniżenie przepuszczalności osłon komórkowych bakterii. W takiej sytuacji wykrycie ESBL staje się praktycznie niemożliwe w rutynowym laboratorium mikrobiologicznym, a jedynie w

laboratorium referencyjnym. Wykrycie ESBL jest też utrudnione w przypadku współwystępowania ESBL i niektórych β -laktamaz zdolnych do hydrolizy karbapenemów.

1. 2. 4. Oporność *Enterobacteriaceae* na karbapenemy

W ostatnich latach z coraz większym niepokojem odnotowywane jest pojawianie się i w niektórych krajach szybkie rozprzestrzenianie szczepów pałeczek *Enterobacteriaceae* posiadających mechanizmy oporności na karbapenemy. Przez pewien czas oporność ta związana była przede wszystkim z wytwarzaniem AmpC lub ESBL na wysokim poziomie i jednocześnie obniżeniem przepuszczalności osłon komórkowych. Szczepy takie z reguły charakteryzują się opornością na wszystkie β -laktamy *in vitro* i brakiem jej podatności na działanie jakiegokolwiek inhibitora β -laktamaz. Nie przypadkiem, stosunkowo częściej pojawiają się one w populacjach *Enterobacter cloacae*, ze względu na mechanizm derepresji AmpC [30, 34]. W Polsce obserwuje się niekiedy odporne na karbapenemy (i wszystkie β -laktamy) szczepy *P. mirabilis*, u których wysokiej ekspresji nabytej AmpC może towarzyszyć zmniejszenie przepuszczalności błony zewnętrznej [27]. Spotyka się też szczepy *K. pneumoniae* ESBL⁺ lub AmpC⁺ odporne na karbapenemy ze względu na zapewne obniżenie przepuszczalności dla tych antybiotyków [dane niepublikowane].

Jednak znacznie większy problem wynika z pojawienia się w populacjach pałeczek jelitowych β -laktamaz hydrolizujących karbapenemy (tzw. karbapenemaz), kodowanych przez geny plazmidowe, czyli mogące rozprzestrzeniać się pomiędzy szczepami bakterii. Należą one głównie do dwóch rodzajów, tzw. metalo- β -laktamaz klasy B (MBL) i β -laktamaz klasy A [1, 7, 44, 46, 51]. Enzymy MBL omówiono szerzej w niniejszym opracowaniu w części poświęconej pałeczkom niefermentującym (pkt 2. 2. 3), u których pojawiły się one wcześniej i które są nadal ich głównymi producentami (zwłaszcza *Pseudomonas aeruginosa*). Obecność MBL u *Enterobacteriaceae*, zwłaszcza *K. pneumoniae* i *E. coli*, w niektórych krajach (Grecja) przybiera zastraszające rozmiary [49], a w ostatnich latach stwierdzono ją też w Polsce. **Cechą niezwykle utrudniającą wykrywanie MBL u pałeczek jelitowych jest to, że obok szczepów przejawiających ewidentną oporność *in vitro* na wszystkie substraty MBL, czyli penicyliny, cefalosporyny i karbapenemy (a także połączenia β -laktamów z inhibitorami), częściej izoluje się szczepy wykazujące średnią wrażliwość lub wrażliwość na część z nich, zwłaszcza karbapenemy [10, 47, 49].** Dane naukowe o skuteczności klinicznej różnych leków w terapii zakażeń wywoływanych przez szczepy *Enterobacteriaceae* MBL⁺ są jak na razie niezwykle ograniczone, przez co nie można obecnie

podać jednoznacznych zaleceń do interpretacji wyników oznaczeń lekowrażliwości *in vitro* (omówione w punkcie 1. 2. 5). Niemniej, wydaje się pewnym, że **szczyepy MBL⁺ powinno się wykrywać i bez względu na antybiogram kwalifikować jako jedne z potencjalnie najgroźniejszych patogenów bakteryjnych** [10, 47].

Jeszcze większe zaniepokojenie wywołują obecnie szczepy pałeczek jelitowych wytwarzające specyficzny typ karbapenemaz klasy A, tzw. enzymy KPC. Od momentu pierwszej izolacji w 1996r. w USA, w ciągu zaledwie kilku lat rozprzestrzeniły się one w szpitalach wschodniego wybrzeża tego kraju, wywołując w nich liczne epidemie. Z pewnym opóźnieniem do identycznego zjawiska doszło w Izraelu i obecnie, zarówno na wschodnim wybrzeżu USA, jak i w Izraelu wytworzyła się sytuacja endemiczna związana z występowaniem szczepów KPC⁺ [33, 44, 46]. Lista krajów, w których zidentyfikowano takie szczepy stale się wydłuża i w 2008r. objęła także Polskę. Głównym producentem KPC pozostaje *K. pneumoniae*, ale obecność tych enzymów stwierdzono już także u innych gatunków *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella oxytoca*, *E. coli*, *Enterobacter* spp., *C. freundii*, *S. marcescens*, *S. enterica*) oraz *P. aeruginosa* [46, 50]. Podobnie jak wśród szczepów wytwarzających inne β-laktamazy, tak i tutaj obserwuje się zróżnicowanie poziomów oporności. Stosunkowo częste są doniesienia o **szczepach ewidentnie opornych *in vitro* na wszystkie β-laktamy, ponieważ KPC są zdolne do hydrolizy praktycznie wszystkich leków z tej grupy.** Znane są też raporty o **szczepach wrażliwych *in vitro* na karbapenemy,** które spowodowały, że w niektórych szpitalach zbyt późno zorientowano się o postępującym rozprzestrzenianiu się tych drobnoustrojów [46]. Często obserwuje się **szczyepy, które charakteryzują się obecnością licznych kolonii rosnących w strefach zahamowania wzrostu wokół krążków lub pasków Etest z antybiotykami β-laktamowymi,** w tym karbapenemami, kwalifikujących te szczepy do kategorii opornych. Pomimo podatności enzymów KPC na inhibitory β-laktamaz, szczepy KPC⁺ okazują się odporne na ich połączenia z β-laktamami, co więcej, kwas klawulanowy nie nadaje się też do wykrywania KPC (omówione niżej). Podobnie jak w przypadku szczepów MBL⁺, skuteczność β-laktamów w leczeniu zakażeń wywoływanych przez szczepy KPC⁺ wrażliwe *in vitro* na te leki nie jest obecnie określona, przy czym bierze się pod uwagę ryzyko niepowodzenia terapeutycznego i formułuje pełne ostrożności zalecenia interpretacji wyników oznaczeń lekowrażliwości (pkt 1. 2. 5) [42].

Szczyepy pałeczek *Enterobacteriaceae* wytwarzające MBL lub KPC są, podobnie jak szczepy ESBL⁺ i AmpC⁺, z reguły **wielooporne** (notabene często posiadają jednocześnie ESBL) [46].

W przypadku pojawiających się w Polsce szczepów KPC⁺, podobnie jak w innych krajach, obserwuje się *in vitro* wrażliwość jedynie na gentamicynę (i niekiedy amikacynę), kolistynę i tigecyklinę. **Cecha ta, obok niezwyklej łatwości ich utrzymywania się i rozprzestrzeniania w środowiskach szpitalnych powoduje, że szczepy KPC⁺ należy traktować jako jedno z obecnie największych zagrożeń w dziedzinie zakażeń bakteryjnych człowieka [33, 44, 46].**

1. 2. 5. Proponowany schemat postępowania ze szczepami podejrzanymi o wytwarzanie karbapenemaz.

Ostatnio podejmowane są coraz liczniejsze działania mające na celu walkę z rozprzestrzenianiem się szczepów pałeczek Gram-ujemnych wytwarzających nabyte karbapenemazy. Chodzi w nich m. in. o ustalenie kryteriów kwalifikujących szczep jako potencjalnego producenta tych enzymów oraz metod czułego i specyficznego ich wykrywania. Kilka lat temu zaproponowano na przykład, aby do wykrywania MBL kierować takie szczepy *Enterobacteriaceae*, które wykażą obniżenie wrażliwości na którykolwiek karbapenem lub oporność na amoksycylinę z kwasem klawulanowym, cefoksytynę i niewrażliwość na ceftazydim (z wyjątkiem naturalnych producentów AmpC) [10]. Obecnie przeważa pogląd, aby **spośród pałeczek jelitowych do ukierunkowanego wykrywania karbapenemaz kierować szczepy przede wszystkim na podstawie wyników wnikliwego badania ich wrażliwości na karbapenemy, przy czym zaleca się rutynowe stosowanie w diagnostyce trzech karbapenemów, imipenemu, meropenemu i ertapenemu [21, 42].** Ertapenem jest dzisiaj uważany za najczulszy (ale też najmniej specyficzny) wskaźnik obecności KPC [2, 14, 48]. Różnie definiowane są kryteria interpretacyjne wyników tych oznaczeń wskazujące na potrzebę badania w stronę karbapenemaz (omówione niżej – pkt 1. 5. 1). Jako test potwierdzający wytwarzanie karbapenemaz proponowany jest tzw. zmodyfikowany test Hodge'a („liścia koniczyny”) [21, 26, 42], przy czym nie rozróżnia on MBL od KPC. Drugą możliwością jest wykonanie specyficznych testów na MBL i KPC, opartych na działaniu inhibitorów. W przypadku MBL najczęściej stosowanym inhibitorem jest EDTA (test omówiony szczegółowo w części poświęconej pałeczkom niefermentującym – pkt 2. 5. 1) [21, 26, 35, 53], a w przypadku KPC – kwas boronowy (metodę tę opisano szczegółowo w dalszej części niniejszego rozdziału – pkt 1. 5. 2. 2) [14, 21, 36, 48]. Pomimo że, jak wspomniano wyżej, brakuje mocnych danych naukowych na temat skuteczności terapeutycznej leków β -laktamowych wobec szczepów *Enterobacteriaceae* MBL⁺ i KPC⁺ wykazujących na nie wrażliwość *in vitro*, wydaje się, że **wykrywanie tych enzymów**

posiada ważny aspekt kliniczny. Jest też ono niezbędne z epidemiologicznego punktu widzenia. W najnowszych zaleceniach CLSI proponuje się, aby w przypadku stwierdzenia obecności karbapenemazy w szczepie pałeczki jelitowej, oznaczyć wartości MIC karbapenemów. Wartości te powinny być podane na wyniku bez interpretacji, natomiast lekarz i zespół ds. kontroli zakażeń powinni być natychmiast poinformowani o możliwym zagrożeniu oraz powinna być wskazana terapia alternatywna do β -laktamów [42]. W zaleceniach EUCAST odnajdujemy z kolei pogląd, aby szczepy MBL⁺ interpretować z definicji jako niewrażliwe na karbapenemy i inne β -laktamy, z wyjątkiem aztreonamu, który powinno się raportować zgodnie z faktycznym wynikiem oznaczenia [19]. Choć podobne zastrzeżenie nie znalazło się w tych zaleceniach odnośnie szczepów KPC⁺ należy sądzić, że w świetle zasad, którymi posługują się ich autorzy, powinny być one traktowane tak samo, bez wyjątku dla aztreonamu. W każdym przypadku szczep ze wskazaniem możliwości wytwarzania karbapenemazy MBL lub KPC powinien być przesłany do laboratorium referencyjnego w celu jednoznacznego potwierdzenia obecności takiej β -laktamazy za pomocą metod niedostępnych lub trudno dostępnych w laboratorium rutynowym.

1. 3. Antybiogramy pałeczek *Enterobacteriaceae* (tabele 1. 1 – 1. 4)

Tab. 1. 1. ANTYBIOGRAM PODSTAWOWY

Antybiotyk	Krażek [μ g]	Uwagi
Ampicylina	10	Wynik badania reprezentatywny dla ampicyliny i amoksycyliny, nie oznaczać dla <i>Enterobacter</i> spp., <i>Serratia</i> spp., <i>Morganella</i> spp., <i>Providencia</i> spp. i <i>Citrobacter freundii</i> .
Amoksycylina/ kw. klawulanowy lub ampicylina/sulbaktam	20/10 10/10	Nie oznaczać dla <i>Enterobacter</i> spp., <i>Serratia</i> spp., <i>Morganella</i> spp., <i>Providencia</i> spp. i <i>C. freundii</i> .
Cefalotyna	30	Reprezentatywna dla cefaleksyny, cefradyny, cefakloru i cefadroksylu. Nie oznaczać dla <i>Enterobacter</i> spp., <i>Serratia</i> spp., <i>Morganella</i> spp., <i>Providencia</i> spp. i <i>C. freundii</i> .
Cefazolina	30	Nie oznaczać dla <i>Enterobacter</i> spp., <i>Serratia</i> spp., <i>Morganella</i> spp., <i>Providencia</i> spp. i <i>C. freundii</i> .
Cefuroksym lub cefamandol	30 30	<i>Enterobacter</i> spp., <i>Serratia</i> spp., <i>Morganella</i> spp. i <i>C. freundii</i> wykazują naturalnie obniżoną wrażliwość.
Gentamicyna	10	

Tab. 1. 2. ANTYBIOGRAM PODSTAWOWY DLA SZCZEPÓW IZOLOWANYCH Z MOCZU

Antybiotyk	Krażek [µg]	Uwagi
Ampicylina	10	Wynik badania reprezentatywny dla ampicyliny i amoksycyliny. Nie oznaczać dla <i>Enterobacter</i> spp., <i>Serratia</i> spp., <i>Morganella</i> spp., <i>Providencia</i> spp. i <i>C. freundii</i> .
Amoksycylina/ kw. klawulanowy lub ampicylina/sulbaktam	20/10 10/10	Nie oznaczać dla <i>Enterobacter</i> spp., <i>Serratia</i> spp., <i>Morganella</i> spp., <i>Providencia</i> spp. i <i>C. freundii</i> .
Cefalotylna	30	Reprezentatywna dla cefaleksyny, cefradyny, cefakloru i cefadroksylu. Nie oznaczać dla <i>Enterobacter</i> spp., <i>Serratia</i> spp., <i>Morganella</i> spp., <i>Providencia</i> spp. i <i>C. freundii</i> .
Cefuroksym lub cefamandol	30 30	<i>Enterobacter</i> spp., <i>Serratia</i> spp., <i>Morganella</i> spp. i <i>C. freundii</i> wykazują naturalną oporność lub średnią wrażliwość.
Tetracyklina	30	Szczepy wrażliwe na tetracyklinę można uważać za wrażliwe na doksycyklinę. Szczepy średniowrażliwe lub odporne na tetracyklinę mogą być wrażliwe na doksycyklinę.
Norfloksacyna lub ofloksacyna	10 5	
Nitrofurantoina	300	Szczepy <i>Proteus</i> spp., <i>Serratia</i> spp., <i>Providencia</i> spp. i <i>Morganella</i> spp. są zwykle odporne.
Trimetoprim/sulfametoksazol	1,25/23,75	
Fosfomicyna (trometamol)	200	Stosować tylko wobec <i>E. coli</i> izolowanych z ostrych zakażeń dolnych dróg moczowych (cystitis).

Tab. 1. 3. ANTYBIOGRAM ROZSZERZONY

Antybiotyk	Krażek [µg]	Uwagi
Piperacylina	100	
Tikarcylina	75	
Piperacylina/tazobaktam	100/10	
Tikarcylina/ kw. klawulanowy	75/10	
Cefoksytyna	30	Nie oznaczać u <i>Enterobacter</i> spp., <i>Serratia</i> spp., <i>Morganella</i> spp., <i>Providencia</i> spp. i <i>C. freundii</i> .
Cefotaksym lub ceftriakson	30 30	Szcepki <i>Enterobacter</i> spp., <i>Serratia</i> spp., <i>Morganella</i> spp., <i>Providencia</i> spp. i <i>C. freundii</i> mogą wytworzyć oporność w ciągu pierwszych dni po rozpoczęciu terapii. Zaleca się monitorowanie wrażliwości w czasie leczenia.
Ceftazydym	30	Szcepki <i>Enterobacter</i> spp., <i>Serratia</i> spp., <i>Morganella</i> spp., <i>Providencia</i> spp. i <i>C. freundii</i> mogą wytworzyć oporność w ciągu pierwszych dni po rozpoczęciu terapii. Zaleca się monitorowanie wrażliwości w czasie leczenia.
Cefepim	30	
Aztreonam	30	Szcepki <i>Enterobacter</i> spp., <i>Serratia</i> spp., <i>Morganella</i> spp., <i>Providencia</i> spp. i <i>C. freundii</i> mogą wytworzyć oporność w ciągu pierwszych dni po rozpoczęciu terapii. Zaleca się monitorowanie wrażliwości w czasie leczenia.
Imipenem Meropenem Ertapenem Doripenem	10 10 10 10	Oznaczać w przypadku ciężkich zakażeń. Wynik oznaczania dla jednego z karbapenemów nie może być odnoszony do pozostałych karbapenemów. Wykonanie oznaczenia patrz 8.5 „Wykrywanie karbapenemaz”. Interpretacja dla doripenemu: szczep wrażliwy MIC ≤ 1 µg/mL strefa zahamowania wzrostu ≥24 mm, szczep oporny strefa <19 mm, MIC >4 µg/mL. [45].
Ciprofloksacyna	5	
Amikacyna	30	
Netilmicyna	30	
Tobramycyna	10	
Chloramfenikol	30	Oznaczać w wyjątkowych sytuacjach, tylko wobec szczepów wieloopornych.
Tetracyklina	30	Szcepki wrażliwe na tetracyklinę można uważać za wrażliwe na doksycyklinę. Szcepki średniowrażliwe lub odporne na tetracyklinę mogą być wrażliwe na doksycyklinę.
Tigecyklina	15	Aktywna wobec szczepów wytwarzających ESBL. Tigecyklina wykazuje obniżoną aktywność <i>in vitro</i> wobec <i>Morganella</i> spp., <i>Proteus</i> spp. oraz <i>Providencia</i> spp. Interpretacja: szczepki wrażliwe: MIC ≤ 2 µg/mL, strefa zahamowania wzrostu ≥19 mm, szczepki odporne strefa zahamowania wzrostu ≤14 mm, MIC ≥8 µg/mL [45].
Trimetoprim/sulfametoksazol	1,25/23,75	

Tab. 1. 4. Oznaczanie wrażliwości pałeczek *Salmonella* spp.

Antybiotyk	Krażek [µg]	Uwagi
Ampicylina	10	
Kwas nalidyksowy	30	Testowanie kwasu nalidyksowego jest istotne do oceny możliwości zastosowania fluorochinolonów w terapii. Istnieje niebezpieczeństwo niepowodzenia terapeutycznego przy zastosowaniu fluorochinolonów wobec szczepów wrażliwych na fluorochinolony a opornych na kwas nalidyksowy.
Ciprofloksacyna lub inne fluorochinolony	5	
Trimetoprim/sulfametoksazol	1,25/23,75	

Uwaga: W przypadku zakażeń uogólnionych wywołanych przez *Salmonella* spp. należy oznaczać wrażliwość na cefalosporyny III-ej generacji i chloramfenikol. Nie oznaczać wrażliwości na cefalosporyny I i II generacji, na cefamycyny oraz na aminoglikozydy, ponieważ mimo wrażliwości *in vitro* leki te nie wykazują skuteczności klinicznej [42].

1. 4. Wykrywanie β-laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL)

1. 4. 1. Oznaczanie ESBL metodą dwóch krążków

Do wykrywania ESBL może być stosowany tzw. test dwóch krążków (DDST) [15, 24]. Za jego pomocą ESBL można oznaczać u wszystkich gatunków *Enterobacteriaceae* (a także pałeczek niefermentujących – pkt 2. 2. 2). W wariacie podstawowym tej metody stosuje się krążki z ceftazydymem 30 µg i cefotaksymem 30 µg ułożone w odległości 2 cm (pomiędzy środkami) od krążka z amoksycyliną z kwasem klawulanowym 20/10 µg. W celu zwiększenia czułości testu można dodawać krążki z cefpodoksymem 10 µg lub aztreonamem 30 µg.

Wynik pozytywny testu polega na wyraźnym powiększeniu strefy zahamowania wzrostu wokół krążka z ceftazydymem lub cefotaksymem (cefpodoksymem, aztreonamem) od strony krążka zawierającego kwas klawulanowy. Powiększenie to może przybierać bardzo różne kształty.

Jak wspomniano wyżej, w niektórych szczepach bakteryjnych, obecność ESBL może być maskowana przez inne mechanizmy oporności na β-laktamy, niepodatne na działanie kwasu klawulanowego (konstytutywna, wysoka ekspresja β-laktamazy AmpC, obniżona przepuszczalność osłon dla antybiotyków β-laktamowych itd.). Wykazują one z reguły oporność na ceftazydym i cefotaksym i są negatywne w klasycznych testach na obecność ESBL. Wykrywanie ESBL w takich szczepach można prowadzić za pomocą testu DDS, w

którym dodaje się krążek z cefepimem 30 µg. Podstawą tego podejścia jest fakt, że cefepim jest bardzo słabym substratem AmpC, przez co zmniejszenie wrażliwości lub oporność na ten antybiotyk jest częściej wynikiem działania ESBL. Alternatywą jest test DDS w swojej podstawowej wersji, wykonywany na podłożu MHA z kloksacyliną w stężeniu 250 µg/ml (lub 100 µg/ml w przypadku szczepów nierosnących na podłożu z 250 µg/ml kloksacyliny). Kloksacylina jest dobrym inhibitorem enzymów AmpC, przez co na uzupełnionym nią podłożu „odslaniane” są fenotypy oporności maskowane przez AmpC. Należy podkreślić, że **omawiane modyfikacje testu DDS (cefepim, kloksacylina) służą wyłącznie wykrywaniu ESBL w kontekście AmpC**, a nie innych mechanizmów oporności niezależnych od kwasu klawulanowego.

1. 4. 2. Oznaczanie ESBL wg CLSI

Oznaczać wyłącznie u szczepów *E. coli* i *Klebsiella* spp. (oraz *P. mirabilis*, przy czym w przypadku tego gatunku CLSI zaleca oznaczanie ESBL jedynie u izolatów pochodzących z poważnych zakażeń oraz wykonywanie testu przeglądowego wyłącznie z cefpodoksymem, ceftazydymem i cefotaksymem) – tabela 1.5.

Tab. 1. 5. Oznaczanie ESBL wg CLSI.

Wskaźnik	Krażek [µg]	Test przeglądowy wstępny ¹	Test potwierdzający
Cefpodoksym lub	10	gdy strefa ≤ 17 mm wykonać test potwierdzający (≤ 22 dla <i>P. mirabilis</i>)	Ceftazydym 30 µg i ceftazydym/kwas klawulanowy 30/10 µg oraz cefotaksym 30 µg i cefotaksym/kwas klawulanowy 30/10 µg
Ceftazydym lub	30	gdy strefa ≤ 22 mm wykonać test potwierdzający (≤ 22 dla <i>P. mirabilis</i>)	
Aztreonam lub	30	gdy strefa ≤ 27 mm wykonać test potwierdzający	
Cefotaksym lub	30	gdy strefa ≤ 27 mm wykonać test potwierdzający (≤ 27 dla <i>P. mirabilis</i>)	
Ceftriakson	30	gdy strefa ≤ 25 mm wykonać test potwierdzający	

¹ - Dla zwiększenia czułości testu powinno się oznaczać wrażliwość dla kilku antybiotyków.

Jeśli szczep wytwarza ESBL to średnica strefy wokół krążka zawierającego ceftazydym z kwasem klawulanowym lub cefotaksym z kwasem klawulanowym, jest większa o 5 mm lub

więcej od średnicy strefy wokół krążka, odpowiednio z samym ceftazydymem lub cefotaksymem.

W przypadku testów potwierdzających wykonanych ze szczepem wzorcowym *K. pneumoniae* ATCC 700603 różnica średnic stref wokół krążków z ceftazydymem/kw. klawulanowym i ceftazydymem powinna być nie mniejsza niż 5 mm oraz nie mniejsza niż 3 mm dla krążków z cefotaksymem/kw. klawulanowym i cefotaksymem. Dla szczepu *E. coli* ATCC 25922 analogiczne różnice średnic stref nie powinny być większe niż 2 mm.

Tab. 1. 6. Zakresy stref zahamowania wzrostu w milimetrach dla wybranych antybiotyków dla szczepów wzorcowych ATCC.

Wskaźnik	Krażek [µg]	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603 strefa [mm]	<i>E. coli</i> ATCC 25922 strefa [mm]
Cefpodoksym	10	9-16	23-28
Ceftazydym	30	10-18	25-32
Aztreonam	30	9-17	28-36
Cefotaksym	30	17-25	29-35
Ceftriakson	30	16-24	29-35

1. 4. 3. Oznaczanie ESBL za pomocą Etestu

Od dłuższego czasu dostępne są Etesty pozwalające wykrywać ESBL, zawierające ceftazydym i ceftazydym z kwasem klawulanowym oraz cefotaksym i cefotaksym z kwasem klawulanowym. Są także obecnie Etesty zawierające cefepim i cefepim z kwasem klawulanowym. Wykonanie i interpretacja wyników testu powinny być prowadzone zgodnie z zaleceniami producenta [18].

1. 5. Wykrywanie karbapenemaz

Jak zaznaczono wyżej, obecnie coraz powszechniej uważa się, że każdy izolowany w szpitalu szczep pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae* powinien być poddany wstępnemu badaniu na możliwość wytwarzania karbapenemazy typu MBL lub KPC („screening”).

1. 5. 1. Testy wstępne na obecność karbapenemaz

Informacji o możliwości wytwarzania karbapenemazy przez szczep pałeczki jelitowej dostarcza **staranne oznaczenie jego wrażliwości na karbapenemy** [21, 42]. **Znaczące**

obniżenie wrażliwości *in vitro* na którykolwiek z karbapenemów jest sygnałem do wykonania testów potwierdzających. Na podstawie dotychczasowych doświadczeń sądzi się, że **najczulszym wskaźnikiem obecności karbapenemaz KPC (ale niekoniecznie MBL) jest ertapenem** [2, 14, 48]. Kryteria obniżenia wrażliwości na karbapenemy są różne w zależności od zespołu opracowującego rekomendacje (tabela 1.7). Warto przypomnieć podaną wcześniej informację, że szczepy wytwarzające KPC (ale też MBL) często posiadają liczne, izolowane kolonie rosnące w strefach wzrostu wokół krążków z karbapenemami (i innymi β -laktamami). **Cecha ta może okazać się przydatna w diagnostyce, ale nie można jej uważać za prawdziwie specyficzną.**

Tab. 1.7. Wyniki testów wstępnych na obecność karbapenemaz w szczepach *Enterobacteriaceae* – kryteria kwalifikowania szczepów do testów potwierdzających

Wskaźnik	CLSI [42]			Giske i wsp. [21]
	metoda dyfuzyjno-krążkowa		MIC	MIC
	krążek [µg]	punkt odcięcia [mm]	punkt odcięcia [µg/ml]	punkt odcięcia [µg/ml]
ertapenem	10	≤ 19-21 lub	≥ 2 lub	≥ 0,5 lub
imipenem	uważany za słaby wskaźnik		≥ 2-4 lub	≥ 1 lub
meropenem	10	≤ 16-21	≥ 2-4	≥ 0,5
	dodatkowo oporność na jedną lub więcej cefalosporyn III generacji (np. ceftazydym, cefotaksym, ceftriakson)			

1. 5. 2. Testy potwierdzające wytwarzanie karbapenemaz

Wg autorów niniejszego opracowania praktyczniejszym (łatwiejszym i bardziej informatywnym) podejściem w przypadku szczepu *Enterobacteriaceae* podejrzanego o wytwarzanie karbapenemazy jest jednoczesne wykonywanie testu na MBL i testu na KPC.

1. 5. 2. 1. Testy na MBL

Testy na MBL można wykonywać tak, jak jest to opisane w części poświęconej pałeczkom niefermentującym (pkt 2.5), z zastrzeżeniem, że w przypadku pałeczek jelitowych niewskazane jest stosowanie Etestu (ze względu na wspomnianą wyżej, częstą wrażliwość *in vitro* takich szczepów na imipenem, powodującą „zlewanie” się stref zahamowania wzrostu wokół obu połówek paska). Podstawowym inhibitorem jest EDTA [26,

35, 53]; stosowanie kwasu 2-merkaptopropionowego (MPA) [3] lub mieszaniny EDTA i soli sodowej kwasu merkaptooctowego (SMA) [26] nie wydaje się konieczne. Antybiotykami wskaźnikowymi są imipenem i/lub meropenem, a wiele laboratoriów dokłada też ceftazydim; w schemacie Giske'go i wsp. zaproponowano tylko meropenem [21]. Alternatywnie do opisaney niżej szczegółowo wersji „zbliżeniowej” testu (pkt 2. 5. 1), może on być też wykonywany w wersji „kombinowanej”, w której EDTA podawany jest wprost na krążek z karbapenemem i mierzy się różnicę stref wokół krążka z karbapenemem i EDTA oraz krążka z samym karbapenemem [21, 35, 53].

1. 5. 2. 2. Testy na KPC

Jak wspomniano wyżej, **zaproponowane ostatnio testy fenotypowe na obecność KPC wykorzystują kwas boronowy jako inhibitor tych β -laktamaz** [14, 21, 36, 37, 48]. Jednocześnie, jako związki wskaźnikowe proponowane są często imipenem i meropenem, ponieważ ertapenem może być źródłem wyników mniej specyficznych (np. w przypadku producentów cefalosporynaz AmpC). Można spotkać się z poglądem, że w teście z kwasem boronowym najlepsze wyniki (pod względem czułości i specyficzności jednocześnie) uzyskuje się stosując meropenem [14, 21, 48].

Test z kwasem boronowym na obecność KPC częściej wykonuje się w wersji „kombinowanej”, w której na krążki z imipenemem (10 μ g) i meropenemem (10 μ g), lub tylko z meropenemem podaje się kwas boronowy i bada różnicę stref wokół krążka z karbapenemem i inhibitorem oraz krążka z samym karbapenemem [14, 21, 36, 48]. W literaturze można spotkać różne ilości kwasu boronowego uznane za optymalne (300, 400 lub 600 μ g); autorzy niniejszego opracowania, w ślad za Doi i wsp. zalecają 300 μ g [14]. Używanym preparatem chemicznym może być kwas fenyloboronowy. Wygodnie jest przygotować roztwór wodny kwasu fenyloboronowego o stężeniu 15 mg/ml (przy obliczaniu dawki kwasu należy uwzględnić zawartość czystego związku w preparacie, np. 95%). Na krążek z karbapenemem należy następnie nakropić 20 μ l tego roztworu i odczekać ok. 30 min. do wyschnięcia krążka. Podanie większych ilości kwasu wymaga przygotowania bardziej stężonego roztworu, co można osiągnąć rozpuszczając odczynnik w mieszaninie wody i dwumetylosulfotlenku, DMSO (1:1) [48]. Ponieważ kwas fenyloboronowy jest odczynnikiem stosunkowo kosztownym, można przygotowywać jednorazowo niewielkie ilości roztworu (np. 1 ml; należy też pamiętać o czułości wagi laboratoryjnej); roztwór można też przechowywać dłuższy czas w lodówce. Wynik odczytujemy jako pozytywny, jeśli

różnica stref zahamowania wzrostu wokół krążka z którymkolwiek z karbapenemów i inhibitorem oraz krążka z samym karbapenem wyniesie 5 mm lub więcej (300 µg kwasu) [14], 7 mm lub więcej (400 µg kwasu) [48] lub 4 mm lub więcej (600 µg kwasu) [21]. Z reguły, w przypadku „prawdziwych” szczepów KPC⁺ różnice te są wyraźne. Jednak, ponieważ kwas boronowy jest również dobrym inhibitorem cefalosporynaz AmpC, omawiany test może dać fałszywie pozytywne wyniki w przypadku wspomnianych wyżej szczepów *Enterobacteriaceae*, których oporność na karbapenemy jest uwarunkowana wysoką ekspresją AmpC przy jednocześnie obniżonej przepuszczalności osłon komórkowych (pkt 1. 2. 4) [21, 36]. **Ze względu na stosunkowo niewielkie jeszcze doświadczenie z omówionymi metodami, szczepy zachowujące się jak pozytywne należy przysyłać do laboratorium referencyjnego w celu jednoznacznego potwierdzenia. Od momentu uzyskania własnego wyniku należy jednak traktować je jako szczepy najwyższego zagrożenia i uruchamiać najostrożniejsze procedury kontroli zakażeń.**

1. 5. 2. 3. Zmodyfikowany test Hodge'a

Jako test potwierdzający wytwarzanie karbapenemaz można też stosować tzw. zmodyfikowany test Hodge'a („liścia koniczyny”) [21, 26, 36, 42], w zaleceniach CLSI jest to jedyny obecnie proponowany test na obecność karbapenemaz u *Enterobacteriaceae* [42]. **Test ten nie rozróżnia między MBL i KPC, wynik pozytywny oznacza więc wyłącznie stwierdzenie prawdopodobnej obecności „karbapenemazy” w szczepie bakteryjnym.** Szczegóły techniczne wykonania tego testu różnią poszczególne ośrodki [21, 26, 42]. Wykorzystuje się w nim wrażliwy na karbapenemy, niewytwarzający karbapenemaz szczep *E. coli* ATCC 25922. Zasadniczo, w teście tym wysiewa się na powierzchnię całej płytki *E. coli* ATCC 25922 (rozcieńczenie 1:10 zawiesiny 0,5 McFarlanda) i układa na niej krążek z ertapenemem lub meropenemem [42] lub imipenemem [21]. Następnie wykonuje się tzw. „posiew promienisty” szczepów badanych, poprzez pociągnięcie eżą od krawędzi krążka z karbapenemem do krawędzi płytki (3-5 kolonii zebranych z podłoża z krwią). Wynik pozytywny polega na odkształceniu strefy zahamowania wzrostu *E. coli* ATCC 25922 wokół krążka z karbapenemem wzdłuż linii posiewu szczepu badanego (podrastanie *E. coli* ATCC 25922 w stronę krążka).

1. 6. Szczepy wzorcowe:

Escherichia coli ATCC 25922 – służy do kontroli jakości lekowrażliwości oraz do kontroli jakości oznaczenia ESBL jako kontrola negatywna

Escherichia coli ATCC 35218 - służy do kontroli jakości krążków antybiogramowych z antybiotykami β -laktamowymi w połączeniu z inhibitorami β -laktamaz (kwas klawulanowy, sulbaktam, tazobaktam)

Klebsiella pneumoniae ATCC 700603 - służy do kontroli jakości oznaczenia ESBL jako kontrola pozytywna

Klebsiella pneumoniae ATCC BAA-1705 – służy do kontroli jakości oznaczenia karbapenemazy w teście Hodge'a (kontrola pozytywna; ponieważ wytwarza KPC, może służyć też jako kontrola pozytywna w teście na KPC)

Klebsiella pneumoniae ATCC BAA-1706 – szczep odporny na karbapenemy, niewytwarzający karbapenemaz – służy do kontroli jakości oznaczenia karbapenemazy (kontrola negatywna)

Klebsiella pneumoniae MIKROBANK 10.021 - służy do kontroli jakości oznaczania ESBL testem dwóch krążków - DDST (kontrola pozytywna)

Citrobacter freundii MIKROBANK 10.001 - służy do kontroli jakości oznaczania ESBL wyłącznie testem dwóch krążków - DDST (kontrola pozytywna)

Enterobacter cloacae MIKROBANK 10.011 - służy do kontroli jakości oznaczania ESBL wyłącznie testem dwóch krążków - DDST (kontrola pozytywna, szczep ESBL⁺, derepresja AmpC)

2. Oznaczanie wrażliwości pałeczek niefermentujących.

2. 1. Metody

Podłoże MHA, zawiesina bakteryjna o gęstości 0,5 McFarlanda, inkubacja 16-18h (20-24h dla *Acinetobacter* spp., *Stenotrophomonas maltophilia* i *Burkholderia cepacia*; 24h dla *Pseudomonas aeruginosa* izolowanych od pacjentów z mukowiscydozą) w temp. 35°C±2 °C, w atmosferze tlenowej [41, 42].

Spośród pałeczek niefermentujących, metoda dyfuzyjno-krążkowa może być stosowana szeroko jedynie wobec *P. aeruginosa* i *Acinetobacter* spp. (tabele 2. 1 – 2. 3). W przypadku *S. maltophilia* i *B. cepacia* można tę metodę wykorzystywać dla wybranych antybiotyków (tabele 2. 4 i 2. 5). W oznaczeniach wrażliwości *S. maltophilia* i *B. cepacia* na inne niż

wymienione w tabelach 2. 4 i 2. 5 antybiotyki oraz w przypadku innych gatunków pałeczek niefermentujących należy oznaczać MIC [31, 42].

2. 2. Ważne mechanizmy oporności

2. 2. 1. Oporność naturalna

Gram-ujemne pałeczki niefermentujące dysponują większym „arsenałem” naturalnych mechanizmów oporności na leki niż rodzina *Enterobacteriaceae*, często też pojawiają się u nich mechanizmy nabyte. *P. aeruginosa* i *Acinetobacter* spp. posiadają gatunkowo-specyficzne cefalosporyny AmpC. Podobnie do *Enterobacter* spp., *C. freundii*, *S. marcescens* itp., u *P. aeruginosa* AmpC jest wytwarzana w sposób indukowany i dochodzi do jej derepresji, zjawisko to jednak jest rzadsze i ma charakter stopniowy [25, 29]. U *Acinetobacter baumannii* z kolei, podobnie do *E. coli*, AmpC jest ekspresjonowana konstytutywnie na śladowym poziomie, ale też wskutek zmian genetycznych u części szczepów obserwuje się jej bardzo podwyższone wytwarzanie [5, 23]. *S. maltophilia* posiada przynajmniej dwie naturalne β -laktamazy, L1 i L2, z których pierwsza jest metalo- β -laktamazą (MBL), a druga przypomina aktywnością β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL) [29]. U *P. aeruginosa* najlepiej poznano też naturalne zjawisko tzw. „oporności własnej” (ang. *intrinsic resistance*), które polega na tym, że z powodu większej liczby i aktywności enzymów o charakterze pomp błonowych, komórki tego drobnoustroju są z definicji w mniejszym stopniu wrażliwe, a niekiedy wręcz odporne na różne leki przeciwbakteryjne [28]. Oporność ta może się „podnosić” wskutek nabywania rozmaitych mutacji i stanowi przez to istotne „tło” podwyższające poziom oporności wynikający z obecności mechanizmów oporności nabytej.

2. 2. 2. β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL)

Zdarzają się szczepy *P. aeruginosa* lub *A. baumannii* wytwarzające ESBL (omówione szczegółowo w punkcie 1. 2. 1). Są one jednak znacznie rzadsze niż szczepy pałeczek *Enterobacteriaceae* ESBL⁺, choć w niektórych krajach lub ośrodkach mogą stanowić istotny odsetek szczepów wymienionych gatunków, co wiąże się ze specyfiką lokalnej sytuacji epidemiologicznej. Co ciekawe, *P. aeruginosa*, obok typowych rodzajów ESBL, może też wytwarzać sporadycznie występujące, a niekiedy wręcz unikatowe bądź niemal specyficzne dla siebie typy tych enzymów [32, 52]. Niektóre z nich są bardzo trudne do wykrycia fenotypowego, inne mogą wymagać specyficznych zestawów krążków z antybiotykami w

testach typu DDS (pkt 1. 4. 1). Jednak zastosowanie podstawowego wariantu takiego testu pozwala wykryć wiele przypadków szczepów *P. aeruginosa* ESBL⁺. Ponieważ w Polsce takie szczepy pojawiają się, a nawet wywołały duże, szpitalne ognisko epidemiczne [17, 52] wydaje się wskazanym, aby szczepy tego gatunku odporne na ceftazydym badać w kierunku ESBL, zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 1. 4. 1., przynajmniej w tych ośrodkach, w których wcześniej je izolowano.

2. 2. 3. Metallo-β-laktamazy (MBL) i inne mechanizmy oporności na karbapenemy

W środowiskach szpitalnych izolowane są szczepy niefermentujących pałeczek Gram-ujemnych, zwłaszcza *P. aeruginosa*, dysponujących nabytą opornością na karbapenemy. Oporność ta jest uwarunkowana wieloma różnymi mechanizmami (np. karbapenemazy, ograniczenie przepuszczalności osłon komórkowych, wypompowywanie leku z komórki) [28, 30, 34], które mogą także dotyczyć innych antybiotyków (zwłaszcza fluorochinolonów). Typ i wariant mechanizmu, poziom jego ekspresji oraz nagminne współwystępowanie kilku mechanizmów oporności na β-laktamy decydują o dużej różnorodności fenotypów takich szczepów.

Wśród znanych obecnie mechanizmów oporności *P. aeruginosa* na karbapenemy szczególne zagrożenie stanowią metallo-β-laktamazy klasy B (MBL), zwane tak ze względu na wykorzystywanie jonów Zn²⁺ jako kofaktorów reakcji hydrolizy β-laktamów [7, 10, 30, 34, 44, 46, 51]. Geny kodujące MBL mogą być przekazywane pomiędzy szczepami *P. aeruginosa*, a także innych gatunków pałeczek niefermentujących (np. *Pseudomonas putida*, *A. baumannii*), a od kilku lat obserwuje się je również u gatunków z rodziny *Enterobacteriaceae* (omówione wyżej – pkt 1. 2. 4). Od przełomu lat 1990. i 2000. wytwarzające MBL szczepy pałeczek niefermentujących (głównie *P. aeruginosa*) obecne są w Polsce i ulegają szybkiemu rozprzestrzenianiu [20, 39]. **Szczepy MBL⁺ są odporne lub wykazują obniżoną wrażliwość na penicyliny, cefalosporyny i karbapenemy oraz na połączenia z inhibitorami β-laktamaz (brak wpływu inhibitorów).** W porównaniu z pałeczkami *Enterobacteriaceae*, ale też *A. baumannii*, szczepy *P. aeruginosa* MBL⁺ **znacznie częściej wykazują oporność na leki ze spektrum substratowego MBL, a ze względu na współwystępowanie innych mechanizmów, obserwuje się też szczepy ewidentnie odporne na wszystkie dostępne dzisiaj β-laktamy.** Stosunkowo niewielki zasób danych naukowych na temat ewentualnej skuteczności β-laktamów, na które szczepy MBL⁺ *P. aeruginosa* i innych pałeczek wykazują jednak wrażliwość *in vitro* (włącznie z

aztreonamem, który nie jest substratem MBL) powoduje, że interpretacja takich antybiogramów jest trudna [10]. Rozpowszechniany jest obecnie pogląd, aby **szczepy MBL⁺ interpretować z definicji jako niewrażliwe na karbapenemy i inne β -laktamy, z wyjątkiem aztreonamu, który powinno się raportować zgodnie z faktycznym wynikiem oznaczenia** [10, 19]. Wydaje się jednak, że w sytuacji poważnego zakażenia szczepem o wybitnej wielooporności i niezwykle zawężonych opcjach terapeutycznych, może okazać się wskazanym poinformowanie lekarza o stwierdzonej wrażliwości *in vitro* na określony β -laktam z podaniem jego wartości MIC i uświadomieniem możliwości niepowodzenia terapeutycznego. Należy nadmienić również, że wyrażany jest dzisiaj pogląd, aby w przypadku ciężkich zakażeń wywoływanych przez szczepy MBL⁺ rozważyć przede wszystkim możliwości leczenia skojarzonego [10, 47].

Jak wspomniano wyżej, ukierunkowane testy fenotypowe na obecność MBL opierają się na wykorzystywaniu inhibitorów tych β -laktamaz (głównie EDTA) oraz karbapenemów i ceftazydymu jako antybiotyków wskaźnikowych. Ze względu na działanie EDTA na wiele struktur i procesów komórkowych bakterii, **szczepy podejrzewane o wytwarzanie MBL powinny być przesyłane do laboratorium referencyjnego w celu potwierdzenia oznaczenia za pomocą metod biochemicznych i molekularnych.**

Podobnie do *P. aeruginosa*, szczepy *A. baumannii* również mogą nabywać oporności na karbapenemy za pośrednictwem różnorodnych mechanizmów, włączając mechanizmy związane z osłonami komórkowymi. Mogą one też wytwarzać karbapenemazy, w tym MBL. Głównym jednak rodzajem karbapenemazy u *Acinetobacter* spp. są obecnie tzw. karbapenemazy klasy D (CHDL). Choć ich aktywność względem cefalosporyn III generacji jest znikoma, to współwystępowanie innych mechanizmów (w tym innych β -laktamaz) często nadaje szczepom *A. baumannii* CHDL⁺ oporność na wszystkie β -laktamy, bez wpływu inhibitorów β -laktamaz. Jeden rodzaj CHDL występuje naturalnie u *A. baumannii*, przy czym oporność na karbapenemy pojawia się dopiero wskutek znaczącego podniesienia poziomu ekspresji takiej β -laktamazy dzięki określonym zmianom genetycznym. Kilka innych rodzajów CHDL, to z kolei enzymy typowo nabyte, kodowane przez geny plazmidowe lub chromosomalne. Nie ma obecnie metod fenotypowego wykrywania CHDL; można je identyfikować jedynie metodami biochemicznymi lub molekularnymi [34, 44, 46].

Oporne na karbapenemy szczepy *Acinetobacter* spp., zarówno o fenotypie MBL⁺, jak i MBL⁻, powinny być przesyłane do laboratorium referencyjnego.

2. 3. Antybiogramy *P. aeruginosa* i *Acinetobacter* spp. (tabele 2. 1 do 2. 3)

Tab. 2. 1. ANTYBIOGRAM PODSTAWOWY

Antybiotyk	Krażek [µg]	Uwagi
Tikarcylina	75	
Piperacylina	100	
Ceftazydym	30	
Gentamicyna	10	
Tobramycyna	10	

Tab. 2. 2. ANTYBIOGRAM PODSTAWOWY DLA SZCZEPÓW IZOLOWANYCH Z MOCZU

Antybiotyk	Krażek [µg]	Uwagi
Piperacylina	100	
Karbenicylina	100	
Ceftazydym	30	
Gentamicyna	10	
Tetracyklina	30	Oznaczać tylko dla <i>Acinetobacter</i> spp. Szczepy wrażliwe na tetracyklinę można uważać za wrażliwe na doksycyklinę. Szczepy średniowrażliwe lub odporne na tetracyklinę mogą być wrażliwe na doksycyklinę.
Norfloksacyna lub ofloksacyna	10 5	
Trimetoprim/sulfametoksazol	1,25/23,75	Oznaczać tylko dla <i>Acinetobacter</i> spp.

Tab. 2. 3. ANTYBIOGRAM ROZSZERZONY

Antybiotyk	Krażek [µg]	Uwagi
Tikarcylina/kw.klawulanowy	75/10	
Ampicylina/sulbaktam	10/10	Oznaczać tylko dla <i>Acinetobacter</i> spp. ze względu na dobrą aktywność sulbaktamu wobec tego rodzaju.
Piperacylina/tazobaktam	100/10	
Cefepim	30	
Cefotaksym lub ceftriakson	30	
Aztreonam	30	
Imipenem	10	
Meropenem	10	
Doripenem	10	Interpretacja: szczep wrażliwy strefa zahamowania wzrostu ≥24mm, MIC ≤1 µg/mL, szczep oporny strefa <19 mm, MIC>4 µg/mL [45]
Amikacyna	30	
Netilmicyna	30	
Ciprofloksacyna	5	Dla <i>Acinetobacter</i> spp. lek może być włączony do antybiogramu podstawowego
Lewofloksacyna	5	Dla <i>Acinetobacter</i> spp. lek może być włączony do antybiogramu podstawowego
Trimetoprim/sulfametoksazol	1,25/23,75	Oznaczać tylko dla <i>Acinetobacter</i> spp. – lek może być włączony do antybiogramu podstawowego
Chloramfenikol	30	Oznaczać tylko dla <i>Acinetobacter</i> spp.
Kolistyna	50	W ciężkich zakażeniach, niepowodzeniach terapeutycznych oraz w przypadku szczepów wieloopornych zawsze oznaczać MIC. W przypadku <i>P.aeruginosa</i> oznaczać wyłącznie MIC ze względu na brak korelacji pomiędzy wielkością strefy zahamowania wzrostu i wartościami MIC. Interpretacja dla kolistyny i polimyksyny B: szczep wrażliwy strefa zahamowania wzrostu ≥15mm, MIC ≤2 µg/mL oporny strefa <15 mm, MIC>2 µg/mL [45]

2. 4. Antybiogramy *S. maltophilia*, *B. cepacia* metodą dyfuzyjno-krażkową (tabele 2. 4 i 2. 5)

Tab. 2. 4. Oznaczanie wrażliwości *S. maltophilia* metodą dyfuzyjno-krażkową

Antybiotyk	Krażek [µg]	Uwagi
Ceftazydym	nie stosować	Oznaczać wyłącznie MIC; szczep wrażliwy ≤8 µg/mL, szczep oporny ≥32 µg/mL
Lewofloksacyna	5	wrażliwy - ≥17mm, średniowrażliwy – 14-16 mm, oporny - ≤13 mm
Trimetoprim/sulfametoksazol	1,25/23,75	wrażliwy - ≥16 mm, średniowrażliwy – 11-15 mm, oporny - ≤10 mm

Tab. 2. 5. Oznaczanie wrażliwości *B. cepacia* metodą dyfuzyjno-krażkową

Antybiotyk	Krażek [µg]	Uwagi
Ceftazydym	30	wrażliwy - ≥21 mm, średniowrażliwy – 18-20 mm, oporny - ≤17 mm
Meropenem	10	wrażliwy - ≥20 mm, średniowrażliwy – 16-19 mm, oporny - ≤15 mm
Trimetoprim/sulfametoksazol	1,25/23,75	wrażliwy - ≥16 mm, średniowrażliwy – 11-15 mm, oporny - ≤10 mm
Lewofloksacyna	nie stosować	Oznaczać wyłącznie MIC; szczep wrażliwy ≤2 µg/mL, szczep oporny ≥8 µg/mL

2. 5. Oznaczanie wytwarzania metalo-β-laktamaz (MBL)

2. 5. 1. Testy dyfuzyjno-krażkowe na MBL

W przypadku pałeczek niefermentujących (*P. aeruginosa*, inne *Pseudomonas* spp. i *Acinetobacter* spp.) wykrywaniu MBL powinno się poddawać szczepy odporne lub o obniżonej wrażliwości na karbapenemy (imipenem i/lub meropenem) i jednocześnie odporne na tikarcylinę i tikarcylinę z kwasem klawulanowym [10]. (Kryteria wyboru szczepów *Enterobacteriaceae* zostały przedstawione w rozdziale poświęconym pałeczkom jelitowym – pkt 1. 5. 1). Wykrycie szczepu wytwarzającego MBL, choćby w nosicielstwie, powinno stanowić przesłankę do wszczęcia energicznych działań w zakresie kontroli zakażeń [10].

Test wykonuje się metodą dyfuzyjno-krażkową, a płytki MHA z posianym szczepem bakterii przygotowuje się jak w rutynowych badaniach wrażliwości na leki wg zaleceń CLSI. Na

płytkę układa się zestaw krążków, przypominający test dwóch krążków (DDST) do wykrywania ESBL (wersja „zblizeniowa” testu). Zestaw zawiera krążek z EDTA (10 µl 0,5M EDTA, pH 7,3-7,5) i po jego obu stronach krążki z ceftazydymem 30 µg i imipenemem 10 µg, odległe od krążka z EDTA o 2 cm (między środkami krążków) [26]. Można też dokładać krążek z meropenemem 10 µg po trzeciej stronie krążka z EDTA. Dodatkowo, można też wykonać oznaczenie z drugim zestawem krążków, w którym krążek środkowy zawiera kwas 2-merkaptopropionowy zamiast EDTA (2-MPA; 2-3 µl nierozcieńczonej substancji) [3]. Krążki z EDTA (i 2-MPA) należy przygotować samodzielnie na kilka minut przed ułożeniem na płytce. EDTA (i 2-MPA) jest inhibitorem MBL, w związku z czym, o wytwarzaniu tych enzymów świadczy pojawienie się i wyraźne powiększenie strefy wokół krążka z ceftazydymem i/lub karbapenemem od strony krążka zawierającego inhibitor (obraz bardzo podobny do dodatniego wyniku oznaczania ESBL metodą dwóch krążków, DDST).

Test fenotypowy na obecność MBL można też wykonywać w wersji „kombinowanej”. Zaproponowano wariant oznaczania dla *P. aeruginosa*, w którym na krążek z imipenemem 10 µg podaje się 5 µl 0,5M EDTA (750 µg), a wynik pozytywny ma miejsce w sytuacji wyraźnej różnicy między strefami zahamowania wzrostu wokół krążka z imipenemem i EDTA oraz krążka z samym imipenemem (ponad 5 mm) [53]. Podobny test, tyle że z meropenemem Giske i wsp. zaproponowali dla *Enterobacteriaceae* [21].

2. 5. 2. Oznaczanie MBL za pomocą Etestu

Należy również dodać, że do oznaczania MBL można też stosować Etest, w którym wykorzystywane są imipenem i EDTA. Wykonanie i interpretacja wyników testu powinny być prowadzone zgodnie z zaleceniami producenta [18]. W żadnym przypadku **paska Etest MBL nie należy stosować do oznaczania faktycznej wartości MIC imipenemu**; takie oznaczenie można wykonywać tylko przy użyciu paska Etest z samym imipenemem. (Jak zaznaczono wyżej, Etestu MBL nie zaleca się dla pałeczek *Enterobacteriaceae* – pkt 1.5.2.1).

2. 6. Szczepy wzorcowe:

Escherichia coli ATCC 25922 - służy do kontroli jakości lekowrażliwości oraz do kontroli jakości oznaczenia ESBL jako kontrola negatywna

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 - służy także do kontroli jakości prawidłowej zawartości Ca²⁺ i Mg²⁺ w podłożu MHA

Escherichia coli ATCC 35218 - służy do kontroli jakości krążków antybiogramowych z antybiotykami β -laktamowymi w połączeniu z inhibitorami β -laktamaz (kwas klawulanowy, sulbaktam, tazobaktam)

Pseudomonas aeruginosa MIKROBANK 13.001 - służy do kontroli jakości oznaczania MBL (kontrola pozytywna, szczep MBL⁺)

Piśmiennictwo

1. Ambler RP. The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc London. Series B: Biological Sciences* 1980; 289: 321-31.
2. Anderson K. F., D. R. Lonsway, J. K. Rasheed, J. Biddle, B. Jensen, L. K. McDougal, R. B. Carey, A. Thompson, S. Stocker, B. Limbago, J. B. Patel. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.*, 45, 2723-2725
3. Arakawa Y., N. Shibata, K. Shibayama, H. Kurokawa, T. Yagi, H. Fujiwara, M. Goto. Convent test for screening metallo- β - lactamase-producing Gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 40-43 (2000)
4. Beceiro A., G. Bou. Class C β -lactamases: an increasing problem worldwide. *Rev. Med. Microbiol.*, 15, 141-152 (2004)
5. Bou G., J. Martínez-Beltrán. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44, 428-432 (2000)
6. Bradford P. A. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.*, 14, 933-951 (2001)
7. Bush K., G. A. Jacoby, A. A. Medeiros. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39,1211-1233 (1995)
8. Canton R., A. Novais, A. Valverde, E. Machado, L. Peixe, F. Baquero, T. M. Coque. Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.*, 14 (supl. 1), 144-153 (2008)
9. Carattoli A. Animal reservoirs for extended-spectrum β -lactamase producers. *Clin. Microbiol. Infect.*, 14 (supl. 1), 117-123 (2008)

10. Cornaglia G., M. Akova, G. Amicosante, R. Cantón, R. Cauda, J. D. Docquier, M. Edelstein, J. M. Frère, M. Fuzi, M. Galleni, H. Giamarellou, M. Gniadkowski, R. Koncan, B. Libisch, F. Luzzaro, V. Miriagou, F. Navarro, P. Nordmann, L. Pagani, L. Peixe, L. Poirel, M. Souli, E. Tacconelli, A. Vatopoulos, G. M. Rossolini, ESCMID Study Group for Antimicrobial Resistance Surveillance (ESGARS). Metallo- β -lactamases as emerging resistance determinants in Gram-negative pathogens: open issues. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 29, 380-388 (2007)
11. Cornaglia G., J. Garau, D. M. Livermore. Living with ESBLs. *Clin. Microbiol. Infect.*, 14 (supl. 1), 1-2 (2008)
12. Coudron P. E. , E. S. Moland, C. C. Sanders. Occurrence and detection of extended-spectrum β -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae* at a veterans medical center: seek and you may find. *J. Clin. Microbiol.*, 35, 2593-2597 (1997)
13. Doi Y., D. L. Paterson. Detection of plasmid-mediated class C β -lactamases. *Int. J. Infect. Dis.*, 11, 191-197 (2007)
14. Doi Y., B.A. Potoski, J.M. Adams-Haduch, H. E. Sidjabat, A. W. Pasculle, D. L. Paterson. Simple disk-based method for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-type β -lactamase by use of a boronic acid compound. *J. Clin. Microbiol.*; 46, 4083-4086 (2008)
15. Drioux L., F. Brossier, W. Sougakoff, V. Jarlier. Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in *Enterobacteriaceae*: review and bench guide. *Clin. Microbiol. Infect.*, 14 (supl. 1), 90-103 (2008)
16. Empel J., A. Baraniak, E. Literacka, A. Mrówka, J. Fiett, E. Sadowy, W. Hryniewicz, M. Gniadkowski, Beta-PL Study Group. Molecular survey of β -lactamases conferring resistance to newer β -lactams in *Enterobacteriaceae* isolates from Polish hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 52, 2449-2454 (2008)
17. Empel J., K. Filczak, A. Mrówka, W. Hryniewicz, D. M. Livermore, M. Gniadkowski M. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections with PER-1 extended-spectrum β -lactamase in Warsaw, Poland: further evidence for an international clonal complex. *J. Clin. Microbiol.*, 45, 2829-2834 (2007)
18. ETM, Etest Technical Manual www.abbiotest.com
19. EUCAST documents www.escmid.org/research_projects/eucast/
20. Fiett J., A. Baraniak, A. Mrówka, M. Fleischer, Z. Drulis-Kawa, Ł. Naumiuk, A. Samet, W. Hryniewicz, M. Gniadkowski. Molecular epidemiology of acquired-

- metallo- β -lactamase-producing bacteria in Poland. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50: 880-886 (2006)
21. Giske C. i wsp. Manuskrypt w przygotowaniu (2009)
 22. Gniadkowski M., A. Mrówka A., A. Baraniak, J. Fiett, W. Hryniewicz. Wykrywanie β -laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL) w laboratoriach mikrobiologicznych: ocena testu Vitek ESBL. *Diagn. Lab.*, 37, 197-206 (2001).
 23. Héritier C., L. Poirel, P. Nordmann. Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of *ISAbal* in *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Microbiol. Infect.*, 12, 123-130 (2006)
 24. Jarlier V., Nicolas M., 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.*, 10, 867-878(1988)
 25. Juan C., B. Moyá, J. L. Pérez, A. Oliver. Stepwise upregulation of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal cephalosporinase conferring high-level β -lactam resistance involves three AmpD homologues. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50, 1780-1787 (2006)
 26. Lee K., Y. S. Lim, D. Yong, J. H. Yum, Y. Chong. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- β -lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J. Clin. Microbiol.*, 41, 4623-4629 (2003)
 27. Literacka E., J. Empel, A. Baraniak, E. Sadowy, W. Hryniewicz, M. Gniadkowski. Four variants of the *Citrobacter freundii* AmpC-type cephalosporinases, including novel enzymes CMY-14 and CMY-15, in a *Proteus mirabilis* clone widespread in Poland. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48, 4136-4143 (2004)
 28. Livermore D. M. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *J. Antimicrob. Chemother.*, 47, 247-250 (2001)
 29. Livermore D. M. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 8, 557-584 (1995)
 30. Livermore D. M., N. Woodford. Carbapenemases; a problem in waiting? *Curr. Opin. Microbiol.*, 3, 489-495 (2000)
 31. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard – eighth edition. M07-A8, Vol. 29, No. 2 (2009)

32. Naas T., L. Poirel, P. Nordmann. Minor extended-spectrum β -lactamases. Clin. Microbiol. Infect., 14 (supl. 1), 42-52 (2008)
33. Navon-Venezia S., A. Leavitt, M. J. Schwaber, J. K. Rasheed, A. Srinivasan, J. B. Patel, Y. Carmeli, the Israeli KPC Kpn Study Group. First report on a hyperepidemic clone of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Israel genetically related to a strain causing outbreaks in the United States. Antimicrob. Agents Chemother., 53, 818-820 (2009)
34. Nordmann P., L. Poirel. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. Clin. Microbiol. Infect., 8, 321-331 (2002)
35. Oh E.-J., S. Lee, Y.-J. Park, J. J. Park, K. Park, S.-I. Kim, M. W. Kang, B. K. Kim. Prevalence of metallo- β -lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean university hospital and comparison of screening methods for detecting metallo- β -lactamase. J. Microbiol. Methods, 54, 411-418 (2003)
36. Pasteran F., T. Mendez, L. Guerriero, M. Rapoport, A. Corso. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in *Enterobacteriaceae*. J. Clin. Microbiol. (2009) Apr 22.
37. Pasteran F. G., L. Otaegui, L. Guerriero, G. Radice, R. Maggiora, M. Rapoport, D. Faccone, A. Di Martino, M. Galas. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina. Emerg. Infect. Dis. 14, 1178-1180 (2008)
38. Paterson D. L., R. A. Bonomo. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. Clin. Microbiol. Rev., 18, 657-686 (2005)
39. Patzer J. A., T. R. Walsh, J. Weeks, D. Dzierżanowska, M. A. Toleman. Emergence and persistence of integron structures harbouring VIM genes in the Children's Memorial Health Institute, Warsaw, Poland, 1998-2006. J. Antimicrob. Chemother., 63, 269-273 (2009)
40. Philippon A., G. Arlet, G. A. Jacoby. Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. Antimicrob. Agents Chemother., 46, 1-11 (2002)
41. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard – tenth edition. CLSI M02-A10, Vol. 29, No. 1 (2009)
42. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement. CLSI M100-S19, Vol. 29, No.3 (2009)

43. Pitout J. D. D., P. Nordmann, K. B. Laupland, P. Nordmann. Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the community. *J. Antimicrob. Chemother.*, 56, 52-59 (2005)
44. Poirel L., J. D. Pitout, P. Nordmann. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiol.*, 2, 501-512 (2007)
45. Rekomendacje Francuskiego Towarzystwa Mikrobiologii. www.sfm.asso.fr
46. Queenan A. M., K. Bush. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.*, 20, 440-458 (2007)
47. Souli M., F. V. Kontopidou, E. Papadomichelakis, I. Galani, A. Armaganidis, H. Giamarellou. Clinical experience of serious infections caused by *Enterobacteriaceae* producing VIM-1 metallo- β -lactamase in a Greek University Hospital. *Clin. Infect. Dis.*, 15, 847-854 (2008)
48. Tsakris A., I. Kristo, A. Poulou, K. Themeli-Digalaki, A. Ikonomidis, D. Petropoulou, S. Pournaras, D. Sofianou. Evaluation of boronic acid disk tests for differentiating KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.*, 47, 362-367 (2009)
49. Vatopoulos A. High rates of metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece-a review of the current evidence. *Euro Surveill.*, 3(4), pii: 8023 (2008)
50. Villegas N. V., K. Lolans, A. Correa, J. N. Kattan, J. A. Lopez, J. P. Quinn, the Colombian Nosocomial Resistance Study Group. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51, 1553-1555 (2007)
51. Walsh T. R., M. A. Toleman, L. Poirel, P. Nordmann. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clin. Microbiol. Rev.*, 18, 306-325 (2005)
52. Weldhagen G. F., L. Poirel, P. Nordmann. Ambler class A extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47, 2385-2392 (2003)
53. Yong D., K. Lee, J. H. Yum, H. B. Shin, G. M. Rossolini, Y. Chong. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo- β -lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J. Clin. Microbiol.*, 40, 3798-3801 (2002)