

УДК 579.84.017.7:577.152.3

## Выявление $\beta$ -лактамаз расширенного спектра у грамотрицательных бактерий с помощью фенотипических методов

Методические рекомендации\*

Продукция  $\beta$ -лактамаз расширенного спектра (БЛРС) – один из наиболее распространенных и клинически значимых механизмов резистентности энтеробактерий к современным  $\beta$ -лактамным антибиотикам. Однако эффективность выявления устойчивос-

ти, связанной с продукцией БЛРС, с помощью традиционных методов оценки чувствительности остается крайне низкой. В связи с этим ниже представлены рекомендации по использованию специальных фенотипических методов выявления БЛРС, описаны их

преимущества и ограничения.

Для врачей-микробиологов, эпидемиологов, лаборантов.

**Ключевые слова:**  $\beta$ -лактамазы, БЛРС, грамотрицательные бактерии, микробиологическая диагностика, антибиотикорезистентность.

## Detection of Extended Spectrum $\beta$ -lactamases by Phenotypic Methods in Gram-negative Bacteria

Production of *extended-spectrum  $\beta$ -lactamases* (ESBL) is the one of most widespread and clinically significant mechanism of resistance to modern  $\beta$ -lactams in members of the family *Enterobacteriaceae*. But the effectiveness of routine methods

of antimicrobial susceptibility testing for detection of ESBL production remains extremely low. In connection with this the recommendations for use of special phenotypic methods with their advantages and limitations for detection of ESBL are described.

This guidelines are designed for microbiologists, epidemiologists, and laboratory assistants.

**Key words:**  $\beta$ -lactamases, ESBL, Gram-negative bacteria, microbiological diagnostics, antimicrobial resistance.

### 1. Введение

#### Что такое $\beta$ -лактамазы расширенного спектра?

Термин « $\beta$ -лактамазы расширенного спектра» (от англ. *extended-spectrum  $\beta$ -lactamases* – ESBL) объединяет большое число бактериальных ферментов, которые отличаются способностью

расщеплять оксимино- $\beta$ -лактамы (цефалоспорины III–IV поколений и азтреонам) наряду с пенициллинами и ранними цефалоспоридами и проявляют чувствительность к ингибиторам (клавулановой кислоте, сульбактаму и тазобактаму).

Большинство БЛРС являются производными широко рас-

пространенных плазмидно кодируемых пенициллиназ TEM-1, TEM-2 и SHV-1 и отличаются от них единичными аминокислотными заменами, расширяющими спектр ферментативной активности. Согласно классификации K. Bush, G. Jacoby и A. Medeiros, ферменты этого типа относятся к функциональной группе 2be.

\*Подготовлены **М.В. Эйдельштейном** (НИИ антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии). Рекомендованы *Межрегиональной ассоциацией по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ)*, *Научно-исследовательским институтом антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии*, *Научно-методическим центром Министерства здравоохранения РФ по мониторингу антибиотикорезистентности*.

Характерную для БЛРС активность могут проявлять и некоторые другие плазмидные  $\beta$ -лактамазы, например ферменты СТХ-М- и ОХА-типа (последние в меньшей степени подавляются клавулановой кислотой), а также видоспецифические хромосомные  $\beta$ -лактамазы *Klebsiella oxytoca*, *Proteus vulgaris* и *Citrobacter diversus*. Вопрос о возможности включения видоспецифических  $\beta$ -лактамаз в группу БЛРС пока остается спорным.

### Распространенность БЛРС

БЛРС, впервые обнаруженные в Англии, Германии и Франции в середине 80-х годов, в настоящее время широко распространены в большинстве стран мира. Наиболее частыми продуцентами БЛРС являются нозокомиальные штаммы *Klebsiella* spp., в меньшей степени – *Escherichia coli* и *Proteus mirabilis*. Реже продукция БЛРС отмечается у других представителей семейства *Enterobacteriaceae*, а также у некоторых неферментирующих грамотрицательных палочек, включая *Pseudomonas aeruginosa*.

Встречаемость БЛРС у нозокомиальных штаммов *Klebsiella pneumoniae* составляет в различных странах от 7 до 75%. В отдельных стационарах лечебно-профилактических учреждений России частота выявления этих ферментов у клебсиелл достигает 90%.

### Почему необходимо выявлять продукцию БЛРС?

Данные многочисленных исследований показывают, что продукция БЛРС приводит к формированию устойчивости ко всем пенициллинам, цефалоспорином и монобактамам и часто является причиной их клинической неэффективности. Вместе с тем стандартные методы определения чувствительности не все-

гда позволяют выявить истинную резистентность БЛРС-продуцирующих штаммов, поскольку такие штаммы могут проявлять *in vitro* уровень устойчивости к современным цефалоспорином ниже установленных пограничных значений (чувствительность – умеренная резистентность).

Своевременная и регулярная диагностика БЛРС способствует таким образом проведению рациональной и эффективной антибиотикотерапии.

### Какие штаммы нужно тестировать на наличие БЛРС?

В настоящее время не существует общепринятых рекомендаций относительно выбора штаммов, которые необходимо тестировать на наличие БЛРС. Однако, учитывая распространенность ферментов этой группы, представляется целесообразным использовать специальные методы их диагностики у следующих микроорганизмов:

– всех нозокомиальных штаммов *Klebsiella* spp. и *E. coli*;

– любых штаммов энтеробактерий, которые по данным предварительного тестирования проявляют пониженную чувствительность (МПК  $\geq 1$  мг/л) к одному из цефалоспоринов III поколения.

### 2. Методы выявления БЛРС

Различные фенотипические методы, применяемые в настоящее время для обнаружения продукции БЛРС, основаны на эффекте подавления их активности в отношении оксимино- $\beta$ -лактамов в присутствии клавулановой кислоты. Выбор конкретного метода определяется целями и возможностями лаборатории.

### 2.1. Метод «двойных дисков»

#### Принцип

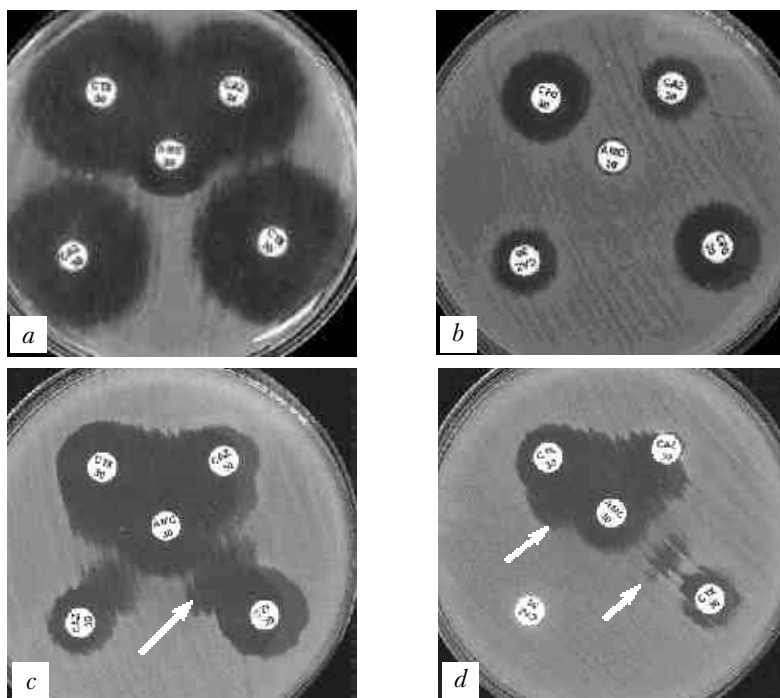
Метод «двойных дисков» представляет собой вариант классического дискодиффузионного метода определения чувствительности, который позволяет обнаружить продукцию БЛРС по наличию расширенной зоны подавления роста вокруг диска с цефалоспорином III поколения напротив диска, содержащего клавулановую кислоту (синергизм отмечается в участке пересечения зон диффузии двух дисков, расположенных на небольшом расстоянии друг от друга).

#### Материалы

1. Стерильный физиологический раствор.
2. Стерильные пробирки, пипетки, чашки Петри.
3. Стандарт мутности 0,5 по МакФарланду (эквивалент  $\approx 1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл).
4. Агар Мюллера–Хинтона.
5. Диски с антибиотиками: азтреонам (30 мкг), цефотаксим (30 мкг), цефтазидим (30 мкг), цефтриаксон (30 мкг), цефепим (30 мкг), цефпиром (30 мкг), амоксициллин/клавуланат (20/10 мкг).
6. Термостат.
7. Контрольные штаммы:
  - *E. coli* ATCC® 25922 – отрицательный контроль (БЛРС–);
  - *K. pneumoniae* ATCC® 700603 – положительный контроль (БЛРС+).
8. Суточные культуры исследуемых микроорганизмов.

#### Постановка теста

Для приготовления инокулюма используют чистую суточную культуру исследуемого микроорганизма, выращенную на агаризованной среде. Несколько колоний стерильным тампоном или петлей переносят в пробирку с



**Рис. 1.** Выявление продукции БЛРС с помощью метода «двойных дисков». Отрицательные результаты (БЛРС-): *a* – *E. coli* (TEM-1), *b* – *E. cloacae* (гиперпродукция AmpC). Положительные результаты (БЛРС+): *c* – *K. pneumoniae* (SHV-2); *d* – *K. pneumoniae* (SHV-5). Обозначения дисков: AMC – амоксициллин/клавулановая кислота (20/10 мкг), CAZ – цефтазидим (30 мкг), CTX – цефотаксим (30 мкг), CPO – цефпиром (30 мкг)

3 мл стерильного физиологического раствора. Взвесь бактериальных клеток доводят до мутности 0,5 по МакФарланду и наносят стерильным ватным тампоном на поверхность агар Мюллера–Хинтона в трех различных направлениях.

Через 5–10 мин после инокулирования на подсыхшую поверхность агар накладывают диски с антибиотиками: в центр – диск, содержащий клавулановую кислоту, обычно в виде комбинации амоксициллин/клавуланат (20/10 мкг), по бокам от него на расстоянии 20 и 30 мм между центрами дисков – диски с цефтазидимом (30 мкг) и цефотаксимом (30 мкг).

Использование двух дисков каждого антибиотика, расположенных на разном расстоянии от диска с клавулановой кислотой, позволяет повысить эффектив-

ность обнаружения БЛРС (рис. 1).

Чашки инкубируют в термостате при температуре 35°C в течение 18–20 ч.

Параллельно с анализом испытуемых культур исследуют контрольные штаммы.

#### **Учет и интерпретация результатов**

Расширение зоны подавления роста между одним или несколькими дисками с оксимино- $\beta$ -лактамами и диском, содержащим клавулановую кислоту, указывает на наличие БЛРС (рис. 1, *c* и *d*).

Независимо от абсолютных значений диаметров зон подавления роста штаммы, продуцирующие БЛРС, рассматриваются как устойчивые ко всем пенициллинам, цефалоспорином (за исключением цефамицинов) и монобактамам.

#### **Примечание**

1. Использование дисков с разными оксимино- $\beta$ -лактамами позволяет повысить чувствительность обнаружения БЛРС, поскольку ферменты этой группы могут проявлять различную субстратную специфичность. Помимо рекомендуемых дисков с цефтазидимом и цефотаксимом в исследование могут быть включены диски с цефподоксимом, цефтриаксоном, цефепимом, цефпиромом, азтреонамом.

2. Для выявления БЛРС у штаммов *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Serratia* spp., *Morganella morganii*, *Providencia stuartii*, *P. rettgeri* предпочтительно использовать диски с цефалоспорином IV поколения (цефепимом и/или цефпиромом), которые в меньшей степени расщепляются хромосомными цефалоспориноазами этих видов бактерий.

3. У штаммов *K. oxytoca* положительный результат тестирования с дисками, содержащими цефотаксим, цефтриаксон и азтреонам, может быть вызван гиперпродукцией хромосомных  $\beta$ -лактамаз (K1, OXY). Для дифференциации плазмидных БЛРС у *K. oxytoca* рекомендуется использовать диски с цефтазидимом.

4. При использовании дисков с цефотаксимом и цефтриаксоном для тестирования *Proteus vulgaris*, *P. penneri* и *Citrobacter diversus* возможен ложноположительный результат вследствие гиперпродукции хромосомных  $\beta$ -лактамаз. Для выявления плазмидных БЛРС у этих видов рекомендуется использовать диски с цефтазидимом и азтреонамом.

5. При наличии предварительных данных о чувствительности исследуемых штаммов расстояние между дисками может быть изменено для облегчения обнаружения БЛРС. Например, при тестировании высокорезистентных штаммов *E. cloacae* расстоя-

ние между дисками с цефалоспоридами и клавулановой кислотой может быть сокращено до 15 мм, а при анализе «чувствительных» штаммов *P. mirabilis* увеличено до 35 мм.

6. Благодаря возможности использования разных субстратов метод «двойных дисков» является наиболее чувствительным. Однако его недостатком является субъективность интерпретации результатов.

## 2.2. Метод Е-тестов

### Принцип

Е-тесты, выпускаемые компанией АВ BIODISK (Швеция), представляют собой пластиковые полоски, на внутренней (обращенной к агару) стороне которых нанесен антибиотик в заданном градиенте концентрации, а на внешней стороне – шкала соответствующих значений МПК.

Е-тесты, используемые для выявления БЛРС, содержат на противоположных концах полоски два убывающих по направлению к центру градиента концентрации: цефтазида (диапазон МПК – 0,5–32 мг/л) и комбинации цефтазида (диапазон МПК – 0,125–8 мг/л) с клавулановой кислотой, нанесенной в фиксированной концентрации (4 мг/л) вдоль градиента (рис. 2).

Определение продукции БЛРС с помощью Е-тестов основано на количественном сравнении МПК цефтазида и цефтазида/клавулановой кислоты.

### Материалы

1. Стерильный физиологический раствор.
2. Стерильные пробирки, пипетки, чашки Петри.
3. Стандарт мутности 0,5 по МакФарланду.
4. Агар Мюллера–Хинтона.
5. Комбинированные полоски Е-тестов – TZ/TZL (кат.

№ 5100–2820, 5100–2828).

6. Термостат.

7. Контрольные штаммы:

– *E. coli* ATCC® 25922 – отрицательный контроль (БЛРС–);

– *K. pneumoniae* ATCC® 700603 – положительный контроль (БЛРС+).

8. Суточные культуры исследуемых микроорганизмов.

### Постановка теста

Приготовление суспензии бактериальных клеток и инокулирование чашек с агаром проводят в соответствии с методикой, описанной в разделе 2.1. На поверхность агара накладывают полоски Е-тестов. Чашки инкубируют в термостате при температуре 35°C в течение 18–20 ч. Значения МПК считывают по шкале цифровых значений в участке ее пересечения контуром зоны подавления роста.

### Интерпретация результатов

Соотношение МПК цефтазида (TZ) и цефтазида/клавулановой кислоты (TZL) большее либо равное 8 ( $\text{МПК}_{\text{TZ}}/\text{МПК}_{\text{TZL}} \geq 8$ ) указывает на наличие БЛРС.

### Примечание

Отдельные  $\beta$ -лактамазы расширенного спектра, проявляющие невысокую активность в отношении цефтазида, не могут быть обнаружены с помощью данного метода. Соотношение  $\text{МПК}_{\text{TZ}}/\text{МПК}_{\text{TZL}}$  для штаммов, продуцирующих такие ферменты, может быть меньше 8.

## 2.3. Тест OXOID

### Принцип

Метод основан на количественном сравнении диаметров зон подавления роста вокруг дисков, содержащих цефподоксим и комбинацию цефподоксима с клавулановой кислотой.

### Материалы

1. Стерильный физиологический раствор.
2. Стерильные пробирки, пипетки, чашки Петри.
3. Стандарт мутности 0,5 по МакФарланду.
4. Агар Мюллера–Хинтона.
5. Диски с цефподоксимом (CPD – 10 мкг) и цефподоксимом/клавулановой кислотой (CD01 – 10/1 мкг).
6. Термостат.
7. Контрольные штаммы:

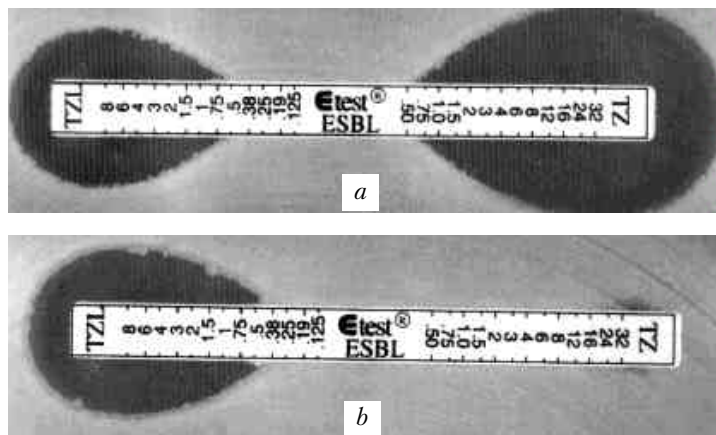


Рис. 2. Выявление продукции БЛРС с помощью Е-тестов: а – *E. coli* (TEM-1), отрицательный результат –  $\text{МПК}_{\text{TZ}} = \text{МПК}_{\text{TZL}} = 1$ ,  $\text{МПК}_{\text{TZ}}/\text{МПК}_{\text{TZL}} \leq 8$ ; б – *E. coli* (TEM-3), положительный результат –  $\text{МПК}_{\text{TZ}} = 32$ ,  $\text{МПК}_{\text{TZL}} = 0,5$ ,  $\text{МПК}_{\text{TZ}}/\text{МПК}_{\text{TZL}} = 64$

– *E. coli* ATCC® 25922 – отрицательный контроль (БЛРС–),

– *K. pneumoniae* ATCC® 700603 – положительный контроль (БЛРС+).

8. Суточные культуры исследуемых микроорганизмов.

### Постановка теста

Приготовление суспензии бактериальных клеток и инокулирование чашек с агаром проводят в соответствии с методикой, описанной в разделе 2.1. На поверхность агара накладывают диски с цефподоксимом и цефподоксимом/клавулановой кислотой. Чашки инкубируют в термостате при температуре 35°C в течение 18–20 ч.

### Интерпретация результатов

Различие в диаметрах зон подавления роста для дисков с цефподоксимом/клавулановой кислотой и цефподоксимом на 6 мм и более (CD01 – CPD ≥ 6 мм) свидетельствует о наличии БЛРС.

### Примечание

Данный метод является высокочувствительным и экономичным, однако допускает возможность получения ложноположительных результатов.

### 2.2. Метод, рекомендуемый Национальным комитетом по клиническим лабораторным стандартам США (NCCLS)

#### Принцип

Процедура выявления БЛРС у штаммов *E. coli*, *K. pneumoniae* и *K. oxytoca*, рекомендуемая NCCLS, включает два последовательных этапа:

1) скрининг БЛРС на основании определения чувствительности с помощью дискодиффузионного метода или роста в бульоне,

содержащем оксиимино-β-лактамы;

2) подтверждающий тест с использованием комбинаций оксиимино-β-лактамов с клавулановой кислотой.

### Материалы

1. Стерильный физиологический раствор.

2. Стерильные пробирки, пипетки, чашки Петри.

3. Стандарт мутности 0,5 по МакФарланду.

4. Термостат.

5. Контрольные штаммы:

– *E. coli* ATCC® 25922 – отрицательный контроль (БЛРС–);

– *K. pneumoniae* ATCC® 700603 – положительный контроль (БЛРС+).

6. Суточные культуры исследуемых микроорганизмов.

7. Для дискодиффузионного метода:

– агар Мюллера–Хинтона;

– диски с антибиотиками – азтреонам (30 мкг), цефотаксим (30 мкг), цефподоксим (10 мкг), цефтазидим (30 мкг), цефтриаксон (30 мкг), цефтазидим/клавуланат (30/10 мкг), цефотаксим/клавуланат (30/10 мкг).

8. Для метода разведений в бульоне:

– бульон Мюллера–Хинтона со стандартизированным содержанием катионов;

– субстанции антибиотиков с известной активностью – азтреонам, цефотаксим, цефподоксим, цефтазидим, цефтриаксон, клавулановая кислота.

### Постановка теста

Поскольку БЛРС-продуцирующие штаммы могут проявлять *in vitro* уровень устойчивости к цефалоспорином III поколения и монобактамам ниже установленных пограничных значений (чувствительность – умеренная резистентность), в 1999 г. NCCLS были предложены

менее строгие критерии выявления штаммов, предположительно экспрессирующих БЛРС (табл. 1).

1-й этап. Скрининг возможных продуцентов БЛРС. Поскольку БЛРС-продуцирующие штаммы могут проявлять *in vitro* уровень устойчивости к цефалоспорином III поколения и монобактамам ниже установленных пограничных значений (чувствительность – умеренная резистентность), в 1999 г. NCCLS были предложены менее строгие критерии выявления штаммов, предположительно экспрессирующих БЛРС (табл. 1).

Тест проводится в стандартных условиях, рекомендуемых NCCLS для определения чувствительности аэробных грамотрицательных бактерий:

– инокулюм – суспензия бактериальных клеток в физиологическом растворе, эквивалентная стандарту мутности 0,5 по МакФарланду;

– инкубирование на агаре Мюллера–Хинтона (для скрининга с использованием дисков) или в бульоне Мюллера–Хинтона, содержащем антибиотики, перечисленные в табл. 1, в концентрации 1 мг/л, в течение 18–20 ч при температуре 35°C.

### Интерпретация результатов

Штаммы, устойчивые хотя бы к одному из цефалоспоринов III поколения или азтреонаму в концентрации 1 мг/л рассматриваются как потенциальные продуценты БЛРС. Окончательная интерпретация чувствительности таких штаммов осуществляется на основании результатов теста, подтверждающих наличие БЛРС (2-й этап).

2-й этап. Подтверждающий тест. При использовании дискодиффузионного метода дополнительно определяются диаметры

Таблица 1. Сравнение стандартных пограничных значений и критериев выявления продукции БЛРС на основании оценки МПК и диаметров зон подавления роста\*

Антибиотик, доза	Дискодиффузионный метод		Рост в бульоне с антибиотиком	
	Диаметр зоны подавления роста для чувствительных штаммов, мм**	Диаметр зоны подавления роста для возможных продуцентов БЛРС, мм	МПК для чувствительных штаммов, мг/л**	МПК для возможных продуцентов БЛРС, мг/л
Азтреонам, 30 мкг	≥22	≤27	≤8	≥2
Цефотаксим, 30 мкг	≥23	≤27	≤8	≥2
Цефподоксим, 10 мкг	≥21	≤22	≤8	≥2
Цефтазидим, 30 мкг	≥18	≤22	≤8	≥2
Цефтриаксон, 30 мкг	≥21	≤25	≤8	≥2

\*Адаптировано из рекомендаций NCCLS (документы M100-S8, M100-S9).

\*\*Стандартные пограничные значения.

зон подавления роста вокруг дисков, содержащих цефтазидим/клавулановую кислоту (30/10 мкг) и цефотаксим/клавулановую кислоту (30/10 мкг). Для любой из двух перечисленных комбинаций увеличение зоны подавления роста не менее чем на 5 мм по сравнению с таковой при использовании дисков без ингибитора свидетельствует о наличии БЛРС.

При использовании метода разведений в бульоне для штаммов, устойчивых к оксимино-β-лактамам в концентрации 1 мг/л, определяются точные значения МПК цефтазидима, цефотаксима, а также их комбинаций с клавулановой кислотой в

фиксированной концентрации (4 мг/л). Снижение МПК цефтазидима или цефотаксима не менее чем в 8 раз (на 3 последовательных двукратных разведения) в присутствии ингибитора свидетельствует о наличии БЛРС.

#### Интерпретация результатов

Штаммы с подтвержденным наличием БЛРС рассматриваются как устойчивые ко всем пенициллинам, цефалоспорином (за исключением цефамицинов) и монобактамам независимо от абсолютных значений МПК и диаметров зон подавления роста вокруг дисков с цефалоспорином III поколения.

#### Контроль качества

Анализ испытуемых культур проводят при обязательном параллельном тестировании контрольных штаммов (табл. 2).

#### Примечание

1. Процедура, рекомендуемая NCCLS, может быть использована для обнаружения БЛРС только у штаммов *E. coli*, *K. pneumoniae* и *K. oxytoca*. Критерии оценки МПК и диаметров зон подавления роста, используемые для выявления БЛРС у этих видов, не являются оптимальными для других представителей семейства *Enterobacteriaceae*.

2. Эффективность обнаружения БЛРС у штаммов *E. coli* и

Таблица 2. Допустимые значения МПК и зон подавления роста для контрольных штаммов *E. coli* ATCC® 25922 и *K. pneumoniae* ATCC® 700603

Этап, антибиотик и его доза	<i>E. coli</i> ATCC® 25922 (БЛРС-)	<i>K. pneumoniae</i> ATCC® 700603 (БЛРС+)	<i>E. coli</i> ATCC® 25922 (БЛРС-)	<i>K. pneumoniae</i> ATCC® 700603 (БЛРС+)
<b>1-й этап:</b> <i>скрининговый тест</i>	Диаметр зоны подавления роста, мм		Рост в присутствии 1 мг/л антибиотика	
Цефтазидим, 30 мкг	25–32	10–18	–	+
Цефотаксим, 30 мкг	29–35	17–25	–	+
Цефтриаксон, 30 мкг	29–35	16–24	–	+
Цефподоксим, 10 мкг	23–28	9–16	–	+
Азтреонам, 30 мкг	28–36	9–17	–	+
<b>2-й этап:</b> <i>подтверждающий тест</i>	Увеличение зоны подавления роста: разница ЦС/клав и ЦС, мм*		Снижение МПК: частное ЦС и ЦС/клав*	
Цефотаксим, цефотаксим/клавуланат	≤3	≥5	–	≥8
Цефтазидим, цефтазидим/клавуланат	≤3	≥5	–	≥8

\*ЦС – цефалоспорин (цефотаксим или цефтазидим), клав – клавулановая кислота.

*K. pneumoniae* с помощью данного метода составляет  $\approx 80\%$ .

3. Для наиболее эффективного выявления БЛРС на этапе скрининга необходимо исполь-

зование всех оксимино- $\beta$ -лактамов, перечисленных в табл. 1.

## Л и т е р а т у р а

1. Appleton A. Evaluation of a Novel Diagnostic Disc Method for Detection of Extended Spectrum  $\beta$ -lactamases. Proceedings of 3rd ECC. Madrid; 2000. Abstract T304.
2. Bush K. Is It Important to Identify Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamase-Producing Isolates? Eur J Clin Microbiol Inf Dis 1996;15:361-4.
3. Cormican M.G., Marshall S.A., Jones R.N. Detection of Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing strains by the E-test ESBL Screen. J Clin Microbiol 1996;34:1880-4.
4. Coudron P.E., Moland E.S., Sanders C.C. Occurrence and Detection of Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases in Members of the Family *Enterobacteriaceae* at a Veterans Medical Center: Seek and You May Find. J Clin Microbiol 1997;35:2593-7.
5. Jacoby G.A., Han P. Detection of Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 1996;34:908-11.
6. Jarlier V., Nicolas M.-H., Fournier G., Philippon A. Extended broad-spectrum  $\beta$ -lactamases conferring transferable to newer  $\beta$ -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev Infect Dis 1988;10:867-78.
7. Katsanis G.P., Spargo J., Ferraro J., Sutton L., Jacoby G.A. Detection of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* Strains Producing Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases. J Clin Microbiol 1994;32:691-6.
8. Livermore D.M.  $\beta$ -Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. Clin Microbiol Rev 1995;8:557-84.
9. NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighth Informational Supplement. NCCLS document M100-S9. NCCLS, Wayne, PA 1999.
10. NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighth Informational Supplement. NCCLS document M100-S8. NCCLS, Wayne, PA 1998.