

Mutasi Gen *bla*_{CTX-M} sebagai Faktor Risiko Penyebab Resistensi Antibiotik

Devinna Kang¹, Rano K. Sinuraya¹, Tina Rostinawati², Rizky Abdulah¹

¹Departemen Farmakologi dan Farmasi Klinik, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Sumedang, Indonesia, ²Departemen Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Sumedang, Indonesia

Abstrak

Saat ini, lebih dari setengah antibiotik yang digunakan di dunia merupakan kelompok β -laktam namun efektivitas klinis antibiotik tersebut kini terbatas karena resistensi antibiotik terhadap mikroorganisme penyebab penyakit infeksius. Beberapa mekanisme resistensi terhadap *Enterobacteriaceae* terutama disebabkan hidrolisis antibiotik oleh enzim spesifik, yang disebut dengan β -laktamase. Enzim β -laktamase menunjukkan kelompok besar enzim yang berbeda secara genetik dan fungsional yaitu *extended-spectrum β -lactamase* (ESBL) yang diketahui menimbulkan ancaman resistensi yang serius. Lokalisasi plasmid dari gen yang disandi terhadap distribusi enzim pada patogen meningkat setiap tahunnya. ESBL yang memiliki penyebaran yang luas dan relevan secara klinis adalah ESBL kelas A yaitu jenis *Temoniera* (TEM), *Sulphydryl variable* (SHV) dan *Cefotaxime* (CTX-M). Tujuan penulisan review ini adalah untuk mengkaji varian gen *bla*_{CTX-M} yang banyak menyebabkan peningkatan resistensi antibiotik. Metode yang digunakan pada review ini yaitu penelusuran data berbasis Pubmed, Scopus dan Google Scholar tanpa pembatasan indeks faktor dengan kata kunci “*bla*_{CTX-M}”, “*Extended-spectrum β -lactamase*”, dan “*antibiotic resistance*”. Ssimpulan dari review ini yaitu ESBL jenis CTX-M telah menggantikan jenis TEM dan SHV secara dominan pada dekade terakhir. ESBL yang dihasilkan oleh *Klebsiella pneumoniae* diketahui muncul sebagai salah satu patogen nosokomial utama. Infeksi nosokomial yang disebabkan oleh CTX-M-15 pada *Klebsiella pneumoniae* mengalami peningkatan dalam beberapa tahun terakhir ini.

Kata kunci: CTX-M, ESBL, *extended-spectrum β -lactamase*, *Klebsiella pneumoniae*

Gene *bla*_{CTX-M} Mutation as Risk Factor of Antibiotic Resistance

Abstract

Currently there are more than half from all antibiotics used in the world which is belong to β lactam group, but clinical effectiveness of the antibiotics are limited by antibiotic resistance of microorganisms as causative agents from infectious diseases. Several resistance mechanisms for *Enterobacteriaceae* are mostly caused by enzymatic hydrolysis of antibiotics specific enzymes, called β lactamases. β lactamases represent a large group of enzyme which is genetically and functionally different as extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and known as greatest threat of resistance. Plasmid localization from the encoded gene and enzyme distribution among the pathogen increases every year. Most widespread and clinically relevant ESBL are class A ESBL of *Temoniera* (TEM), *Sulphydryl variable* (SHV) and *Cefotaxime* (CTX-M) types. The purpose of this review was to analyze variant of *bla*_{CTX-M} gene which cause the most increase incidence of antibiotic resistance. The methods of this review were data-based searching based on Pubmed, Scopus and Google Scholar, without limitation of index factor by using the keyword “*bla*_{CTX-M}”, “*Extended-spectrum β -lactamase*”, and “*antibiotic resistance*”. The conclusion of the review is CTX-M type ESBL have replaced TEM and SHV type as dominant enzyme in last decade. ESBL produced by *Klebsiella pneumoniae* have emerged as one of major nosocomial pathogens. Nosocomial infection caused by CTX-M-15 in *Klebsiella pneumoniae* dramatically increased in recent years.

Keywords: CTX-M, ESBL, *extended-spectrum β -lactamase*, *Klebsiella pneumoniae*

Korespondensi: Devinna Kang, M.Farm., Apt., Departemen Farmakologi dan Farmasi Klinik, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Sumedang, Jawa Barat 45363, Indonesia, email: devinnaapt@gmail.com

Naskah diterima: 1 Maret 2017, **Diterima untuk diterbitkan:** 2 Mei 2017, **Diterbitkan:** 1 Juni 2017

Pendahuluan

Penggunaan antibakteri telah menyebar secara luas selama beberapa dekade. Penggunaan antibakteri yang tidak tepat banyak terjadi pada manusia dan hewan. Hal ini mendukung terjadinya penyebaran resistensi bakteri sehingga antibakteri menjadi kurang efektif bahkan tidak efisien, yang menyebabkan meningkatnya keadaan darurat mengenai keamanan kesehatan global secara cepat dan dianggap telah melampaui pilihan obat yang ada. Mekanisme utama munculnya resistensi pada keluarga *Enterobacteriaceae* terhadap antibiotik β -laktam yaitu munculnya perubahan mutasi pada gen yang dapat mengubah spektrum dari aktivitas enzim bakteri. Enzim bakteri dapat memecah antibiotik β -laktam, dikenal dengan β -laktamase. β -laktamase terdiri dari *superfamily* enzim yang berbeda secara genetik dan fungsional, yang terlibat dan mampu menghancurkan cincin β -laktam sehingga mengakibatkan hilangnya aktivitas antimikroba dari antibiotik. Bakteri gram negatif dari *family Enterobacteriaceae* diketahui mengalami resistensi terhadap sefalosporin generasi ketiga, yang saat ini menjadi masalah utama dalam praktik klinis. Bakteri tersebut menghasilkan *extended-spectrum β -lactamase* (ESBL).¹

Metode

Metode yang digunakan pada *review* ini yaitu penelusuran pustaka data penelitian-penelitian yang berkaitan dengan mutasi gen *bla_{CTX-M}* terhadap kejadian resistensi antibiotik berbasis Pubmed, Scopus dan Google Scholar dengan kata kunci “*bla_{CTX-M}*”, “*Extended-spectrum β -lactamase*”, dan “*antibiotic resistance*”.

Hasil dan Pembahasan

Resistensi antibiotik oleh β -laktamase

Resistensi antibiotik yaitu resistensi bakteri patogen terhadap antibiotik yang digunakan untuk mengobati infeksi penyakit, atau resistensi patogen dari infeksi (bakteri, virus, protozoa) terhadap sediaan obat. Salah satu kelas antibiotik yang paling banyak digunakan yaitu antibiotik β -laktam (β -laktam). β -laktam merupakan komponen hidrofilik yang dapat menembus ke dalam sel bakteri melalui saluran porin dari membran terluar. β -laktam dibagi menjadi beberapa kelompok berdasarkan struktur kimia dengan komponen umum berupa cincin β -laktam (Tabel 1). Sefalosporin merupakan antibiotik yang paling sering digunakan untuk pengobatan infeksi yang disebabkan oleh bakteri gram-positif dan gram-negatif. Sedangkan antibiotik dari

Tabel 1 Struktur Kelompok Antibiotik β -laktam (Cincin β -laktam Ditunjukkan oleh Kotak)⁴

Kelompok	Struktur	Kelompok	Struktur
Penisilin		Monobaktam	
Sefalosporin		Karbopenem	

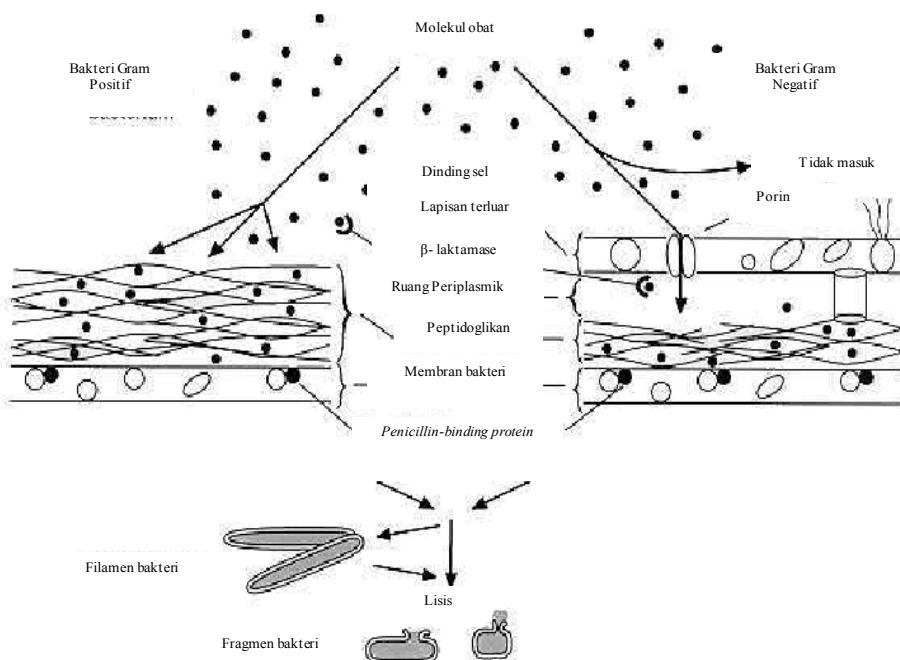
kelompok penisilin paling sering digunakan untuk pengobatan infeksi yang disebabkan oleh bakteri gram-positif.²

Mekanisme aksi dari β -laktam yaitu berikatan dengan *penicillin-binding protein* (PBP)-trans-karboksipeptidase yang terlibat dalam pembentukan rantai peptidoglikan dari membran bagian dalam bakteri. Interaksi PBP dengan antibiotik β -laktam menghasilkan penghambatan dalam sintesis peptidoglikan, penghentian pembelahan sel, dan kematian sel. Pengikatan antibiotik pada PBP yaitu berdasarkan afinitas struktur β -laktam pada sisi aktif PBP. Oleh karena itu, kehadiran cincin β -laktam penting dalam aktivitas antibakteri dari antibiotik. Pada interaksi β -laktam dengan PBP, terbentuk kompleks enzim-asil dan ikatan C-N pada keempat cincin β -laktam menjadi rusak. Titik mutasi muncul selama evolusi PBP, sehingga menghasilkan β -laktamase yang dapat menghidrolisis cincin laktam dari antibiotik.³

Mekanisme munculnya resistensi bakteri terhadap antibiotik β -laktam diuraikan sebagai berikut: (i) Sintesis dari β -laktamase

merusak antibiotik;^{3,5,6} (ii) Penurunan permeabilitas membran luar dari bakteri menyebabkan terjadinya penurunan terhadap ekspresi porin;⁷ (iii) Perubahan struktur PBP;⁸ (iv) Pelepasan antibiotik keluar secara aktif dari sel bakteri (sistem efluks).^{9,10} Sintesis β -laktamase dianggap sebagai sebuah mekanisme utama yang memfasilitasi terjadinya resistensi yang penting secara klinis terhadap bakteri-bakteri gram-negatif pada antibiotik β -laktam.^{9,11,12} Mutasi genetik menyebabkan adanya penggantian beberapa asam amino pada urutan protein yang memengaruhi struktur enzim dalam menghasilkan perluasan spektrum antibiotik yang mengalami hidrolisis.^{13,14} Mutasi dapat muncul secara cepat, karena mikroorganisme menjadi resisten terhadap antibiotik selama masa pengobatan.

Resistensi dapat diperoleh dimulai sejak lahir atau dapat. Resistensi alamiah dapat dikarakterisasi melalui tidak adanya kehadiran mikroorganisme target yang dapat memproduksi kromosom yang menyandi β -laktamase, seperti contohnya *Klebsiella*



Gambar 1 Mekanisme Aksi Antibiotik β -laktam¹⁵

pneumoniae yang memproduksi SHV-1 dan *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Serratia* spp., dan *Pseudomonas aeruginosa* yang memproduksi β-laktamase kelas C. Kemampuan strain bakteri secara individu dalam mempertahankan viabilitas pada konsentrasi antibiotik yang menghambat sebagian besar populasi mikroba, dianggap sebagai resistensi dapatan atau sekunder. Pembentukan resistensi dapatan sering disebabkan karena diperolehnya informasi genetik yang baru atau terjadinya perubahan tingkat ekspresi gen *wild type*. Faktor penentu resistensi sekunder adalah elemen genetik *mobile* yang diperoleh secara bersamaan. Resistensi pada family *Enterobacteriaceae* terhadap antibiotik β-laktam merupakan resistensi dapatan. Gen ESBL ditransferkan melalui elemen genetik *mobile* yang berbeda seperti plasmid, transposon, elemen *insertion sequence* (IS), integron kelas 1, dan elemen

ISCR1 yang mengandung integron.^{16,17} Variasi dari mekanisme transfer genetik berkontribusi terhadap penyebaran gen secara cepat.

Extended-spectrum β-lactamase (ESBL)

ESBL adalah enzim β-laktamase yang secara umum terletak di dalam plasmid dan mampu menyebabkan resistensi bakteri terhadap penisilin, sefalosporin spektrum luas dengan rantai samping oksimino (sefotaksim, seftriakson dan seftasidim) dan oksimino-monobaktam aztreonam (tetapi tidak terhadap sefamisin atau karbapenem) melalui hidrolisis ikatan amida dari antibiotik tersebut, tetapi dapat dihambat oleh inhibitor β-laktamase jenis serin yaitu sulbaktam, klavulanat dan tazobaktam.^{18,19,20}

Pada tahun 1982, ESBL pertama kali diidentifikasi selama wabah infeksi *Klebsiella pneumoniae* di Rumah Sakit Jerman.²¹ Sejak itu lebih dari 200 varian ESBL telah

Tabel 2 Nomenklatur β-laktamase³¹

β-Laktamase	Alasan Nomenklatur
CARB	Substrat yang dihidrolisis (<i>carbenicillin</i>)
OXA	Substrat yang dihidrolisis (<i>oxacillin</i>)
IMP	Substrat yang dihidrolisis (<i>imipenem</i>)
CTX-M	Substrat yang dihidrolisis (<i>cefotaxime</i>)
IMI	Imipenemase dari <i>Enterobacter cloacae</i>
TEM	Tiga huruf pertama dari nama pasien pertama (Temoniera)
SHV	Sifat biokimia (<i>sulphydryl variable</i>)
NMC-A	Singkatan dari <i>nonmetallo carbapenemase of class A</i>
IBC	Singkatan dari <i>integron-borne cephalosporinase</i>
OKP	Singkatan dari <i>other Klebsiella pneumoniae β-Lactamase</i>
ACT	Singkatan dari <i>AmpC type</i>
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae carbapenemase</i>
PSE	Mengacu pada enzim spesifik <i>Pseudomonas</i>
SME	Mengacu pada enzim <i>Serratia marcescens</i>
SFO	Mengacu pada enzim <i>Serratia fonticola</i>
MIR	Mengacu pada nama rumah sakit (Miriam Hospital)
OHIO	Mengacu pada negara tertentu di AS (ditemukan di Cleveland, Ohio)
VEB	Singkatan dari <i>Vietnam extended-spectrum β-lactamase</i>
BES	Singkatan dari <i>Brazilian extended-spectrum β-lactamase</i>
GES	Singkatan dari <i>(French) Guiana extended-spectrum β-lactamase</i>
VIM	Singkatan dari <i>Verona integron-encoded metallo-β-lactamase</i>
FPM	Mengacu ke perusahaan farmasi (<i>Fujisawa's Proteus mirabilis</i>)
HMS	Mengacu ke peneliti yang menemukannya (Harris, Matthew, Sykes)

diidentifikasi, beberapa telah menyebar secara cepat di seluruh dunia. Bahkan, banyak varian ESBL mulanya diidentifikasi dalam *K. pneumoniae* yang kemudian ditransfer ke *Escherichia coli*. Strain yang ESBL positif akan resisten terhadap semua antibakteri β -laktam seperti sefalosporin, sehingga pada strain ini karbapenem merupakan pilihan pengobatan utama yang tersisa.¹

Resistensi *K. pneumoniae* terhadap sefalosporin generasi ketiga dan karbapenem, merupakan resistensi yang disebabkan oleh ESBL. Resistensi *K. pneumoniae* terhadap berbagai obat antibakteri, diperoleh melalui transfer elemen genetik seperti transposon atau plasmid. *K. pneumoniae* membawa gen resistensi (terletak di kromosom β -laktamase-gen *bla*) membuat penisilin

secara alami menjadi tidak efektif pada spektrum antibakteri yang diperluas, seperti jenis ampicilin dan amoksisilin. Resistensi terhadap obat antibakteri oral lainnya yang digunakan secara luas yaitu kotrimoksazole dan fluorokuinolon (siprofloksasin) telah muncul dan menyebar secara global. Hal ini menunjukkan bahwa hanya terdapat sedikit pilihan pengobatan peroral yang tersedia untuk infeksi *K. pneumoniae* di dunia.¹

Enzim β -laktamase secara umum diklasifikasikan menurut dua skema umum yaitu, klasifikasi molekular Ambler dan sistem klasifikasi fungsional Bush-Jacob-Medieros.²²⁻²⁴ Skema Ambler membagi β -laktam ke dalam empat kelas utama (A hingga D). Dasar klasifikasi skema ini berdasarkan pada homologi protein (kesamaan

Tabel 3 Klasifikasi β -laktamase⁴

Kelompok Fungsional	Sub Kelompok	Kelas Molekular	Substrat Utama	Kekhasan Kelompok β -laktamase
1	1	C	Seluruh kelompok antibiotik β -laktam kecuali karbapenem	Kromosom yang disandi oleh AmpC β -laktamase, tidak dihambat oleh asam klavulanat
2	2a	A	Penisilin	Penisilinase dari bakteri gram positif, yang dihambat oleh asam klavulanat
	2b	A	Penisilin, sefalosporin	β -laktamase spectrum luas (TEM-1, TEM-2, SHV-1), dihambat oleh asam klavulanat
	2be	A	Penisilin, sefalosporin, monobaktam	<i>Extended-spectrum β-lactamase</i> (ESBL), dihambat oleh asam klavulanat
	2br	A	Penisilin	Inhibitor penghambat β -laktamase jenis TEM dan SHV
	2c	A	Penisilin, karbenisilin	Karbenisilin yang menghidrolisis PSE jenis β -laktamase
	2e	A	Sefalosporin	Sefalosporin <i>inducible</i> yang dihambat oleh asam klavulanat
	2f	A	Penisilin, sefalosporin, karbapenem	Serin karbapenemase yang dihambat oleh asam klavulanat
	2d	D	Penisilin, oxasilin	OXA jenis β -laktamase yang menghidrolisis oxasilin, yang sebagian besar dihambat oleh asam klavulanat
3	3a, 3b, 3c	B	β -laktam, termasuk karbapenem	Metalo- β -laktamase, yang tidak dihambat oleh asam klavulanat tetapi dihambat oleh EDTA
4	Tidak ditentukan		Penisilin	Penisilin yang tidak termasuk dalam kelompok lain

asam amino), dan tidak berdasarkan karakteristik fenotip. Pada skema klasifikasi Ambler, kelas β -laktamase dibedakan menjadi dua kelas yaitu serin dan metallo β -laktamase yang memiliki perbedaan struktural. Kelas A, C dan D merupakan serin β -laktamase yang memiliki serin pada struktur bagian tengahnya sehingga akan membentuk ikatan kovalen selama hidrolisis antara enzim dan cincin β -laktam. Sedangkan enzim kelas B merupakan metallo β -laktamase, yang membutuhkan kation bivalen (biasanya zink) untuk dapat menghidrolisis cincin β -laktam.^{18,25} Sedangkan skema klasifikasi Bush-Jacoby-Medeiros dari kelompok β -laktamase yaitu berdasarkan kesamaan fungsional (profil substrat dan inhibitor). Terdapat empat kelompok utama dan banyak subgrup dalam sistem ini. Enzim yang menunjukkan fenotip ESBL dijelaskan dalam famili Temoniera (TEM), Sulphydryl variable (SHV), Cefotaxime (CTX-M), Guiana extended-spectrum β -lactamase (GES) dan Vietnam extended-spectrum β -lactamase (WEB) dalam β -laktamase kelas A serta Oxacillin-ESBL (OXA-ESBL) dalam β -laktamase kelas D.²⁵

ESBL mengandung sejumlah mutasi yang menyebabkan hidrolisis antibiotik β -laktam spektrum luas. ESBL jenis TEM dan SHV mempertahankan kemampuannya dalam menghidrolisis penisilin, keduanya tidak dikatalisis secara efisien seperti enzim induknya.²⁶ Selain itu, perluasan sisi aktif yang menyebabkan peningkatan aktivitas dalam melawan sefaloспорin spektrum luas dapat menghasilkan peningkatan kerentanan ESBL terhadap inhibitor β -laktamase.²⁷ ESBL tidak aktif dalam melawan sefamisin dan kebanyakan strain menunjukkan bahwa ESBL rentan terhadap sefoksitin dan sefotetan. Namun, dilaporkan bahwa ESBL telah menghasilkan strain yang semakin resisten terhadap sefamisin, hal ini disebabkan karena hilangnya membran protein porin terluar.²⁸⁻³⁰

CTX-M β -laktamase

Dalam dekade terakhir, ESBL jenis CTX-M telah menggantikan jenis TEM dan SHV,³² menjadi yang dominan pada isolat *Enterobacteriaceae* secara klinis. Hal ini diperkuat oleh penelitian di Lebanon (2014) yaitu dari 68 isolat ESBL *K. pneumoniae* ditemukan sebanyak 86,7% mengandung *bla*_{CTX-M}.³³ Penelitian di United States pada tahun 1990 menunjukkan prevalensi *bla*_{CTX-M} masih langka namun terjadi peningkatan pada tahun 2000 sebesar 25% dan pada tahun 2005 menjadi 90%.³⁴ Penelitian di New York juga menunjukkan keselarasan mengenai peningkatan terhadap prevalensi *bla*_{CTX-M} *K. pneumoniae*, yaitu terjadi peningkatan yang signifikan pada tahun 2005 hingga 2009 sebesar 1,7% dan pada tahun 2010 hingga 2012 meningkat menjadi 26,4% ($p<0,0001$).³⁵

Infeksi nosokomial yang disebabkan oleh CTX-M-15 yang telah resisten terhadap lebih dari satu macam obat (*multidrug resistant*) menghasilkan *K. pneumoniae* (CTX-M-15 KP), yang diketahui mengalami peningkatan secara dramatis dalam beberapa tahun.³⁶⁻³⁹ Jenis enzim CTX-M tertentu dalam produksi ESBL pada *K. pneumoniae* dan *E. coli* bervariasi berdasarkan geografis. CTX-M-15 yang termasuk dalam kelompok CTX-M-1, merupakan kelompok CTX-M yang paling prevalen dan terdistribusi di seluruh dunia.⁴⁰⁻⁴² Dari berbagai penelitian, diketahui bahwa prevalensi gen *bla*_{CTX-M-15} dominan di China.⁴³ Oleh karena itu, pada review ini akan difokuskan pada kelompok CTX-M khususnya CTX-M-15.

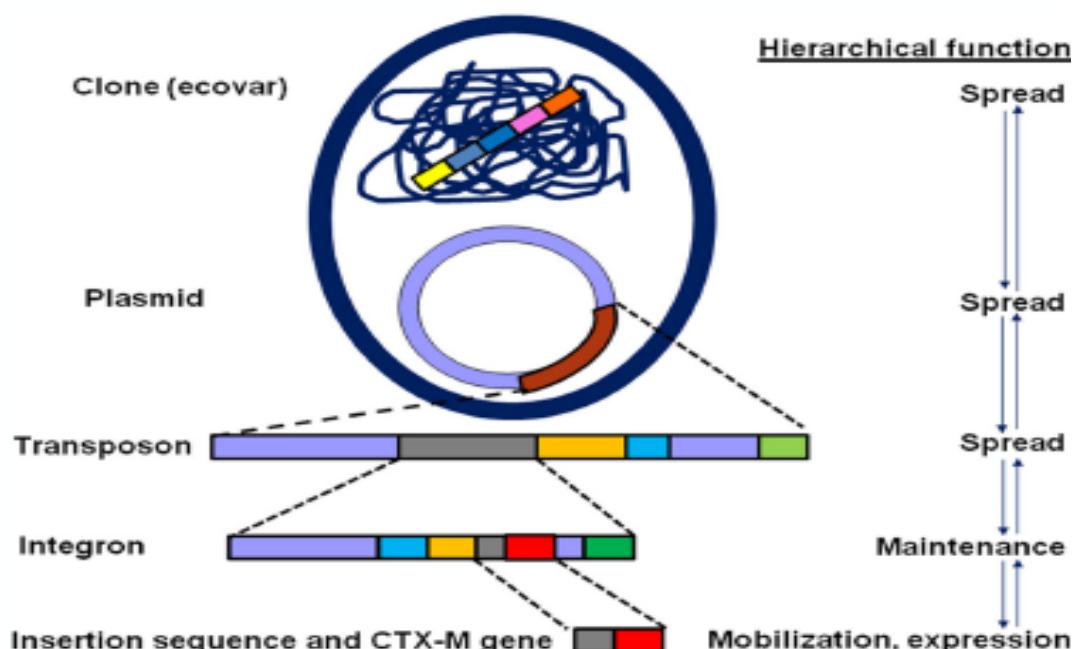
Plasmid konjugatif dianggap sebagai salah satu faktor utama penyebab suksesnya penyebaran ESBL jenis CTX-M pada *K. pneumoniae*.^{38,44} Gen *bla*_{CTX-M-15} sering dikaitkan dengan *specific insertion sequence* (ISs) (misalnya IS*Ecp1*) dan plasmid dari kelompok inkompatibilitas F.⁴⁵ Pada studi sebelumnya dijelaskan bahwa *bla*_{CTX-M-3} diduga sebagai leluhur dari *bla*_{CTX-M-15} yang

diperoleh dari kromosom *Kluyvera* spp. melalui ISEcp1. Elemen *mobile* lainnya kemudian terlibat dalam perpindahan dari ISEcp1 *bla*_{CTX-M-15} dari antara plasmid ke dalam kromosom dari anggota (lain) dari *Enterobacteriaceae*.³⁸

Analisis filogenetik menyatakan bahwa CTX-M tidak berasal dari plasmid sebelumnya yang dimediasi enzim tetapi melalui gen *bla* pada kromosom dari *Kluyvera* spp., ketika CTX-M bergabung ke dalam elemen genetik.⁴⁷ Gen *bla*_{CTX-M} yang mengalami mobilisasi ini memengaruhi sefotaksim ke tingkat yang lebih tinggi dibanding seftasidim. Meskipun demikian, dari sudut pandang evolusi, CTX-M sebagai ESBL lain mengalami penyimpangan mutasi sebagai akibat dari tekanan selektif antibiotik terhadap *Kluyvera* spp. Gen *bla*_{CTX-M} dimobilisasi dan tergabung dalam elemen genetik yang *mobile*. Hal ini memberikan kesempatan pada enzim CTX-M untuk meningkatkan aktivitas hidrofilik melawan ceftazidime.^{41,48}

Penamaan CTX-M β -laktamase didasarkan karena efisiensinya dalam menghidrolisis sefotaksim dibandingkan dengan seftasidim. Enzim ini pertama kali diisolasi pada tahun 1989 melalui strain *E. coli*.⁴⁹ Kemudian dinamakan dengan CTX-M-1. Gen dari kelompok ini memiliki lokalisasi di plasmid. Sekitar 90 enzim dari jenis ini telah diketahui. Di antara ESBL kelas A, kelompok CTX-M β -laktamase memiliki urutan asam aminonya yang paling heterogen dan masing-masing menyandi struktur gen. CTX-M β -laktamase saat ini dibagi ke dalam lima subkluster.⁴¹ Setiap subkluster terdiri dari enzim utama (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, dan CTX-M-25) dan mutannya berbeda satu sama lainnya melalui beberapa mutasi.

Kelompok CTX-M-1 mencakup enam enzim yang dimediasi oleh plasmid (CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-10, CTX-M-12, CTX-M-15 dan FEC-1)⁵⁰⁻⁵⁵ dan enzim yang belum dipublikasi (CTX-M-22, CTX-M-23 dan CTX-M-28).⁴¹ Kelompok CTX-M-2 mencakup delapan enzim CTX-M



Gambar 2 Hierarki Kompleksitas Gen *bla*_{CTX-M} dengan Struktur Genetik dan Klon Bakteri yang Berpartisipasi dalam Mobilisasi, Penyebaran dan Pemeliharaan Gen Tersebut⁴⁶

yang dimediasi oleh plasmid (CTX-M-2, CTX-M-4, CTX-M-4L, CTX-M-5, CTX-M-6, CTX-M-7, CTX-M-20 dan Toho-1).⁵⁶⁻⁶² Kelompok CTX-M-8 mencakup satu anggota enzim.⁶³ Kelompok CTX-M-9 mencakup sembilan enzim yang dimediasi oleh plasmid (CTX-M-9, CTX-M-13, CTX-M-14, CTX-M-16, CTX-M-17, CTX-M-19, CTX-M-21, CTX-M-27 dan Toho-2)⁶⁴⁻⁷³ dan dua enzim yang belum dipublikasi (CTX-M-24 dan CTX-M dengan nomor akses JP0074). Kelompok CTX-M-25 mencakup enzim CTX-M-25 dan CTX-M-26.⁴¹

Homologi antara CTX-M β -laktamase dan enzim kelas A yaitu hanya sedikit (di bawah 40%).⁷⁴ Homologi lebih tinggi (sekitar 70%) diamati pada enzim yang disandi kromosom dari *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter diversus*, *Proteus vulgaris*, dan *Serratia fonticola*.⁷⁵ Hal ini menunjukkan bahwa enzim yang disandi oleh plasmid jenis CTX-M berasal dari enzim yang gennya tergabung dalam kromosom. Perbedaan antara CTX-M β -laktamase dan enzim tipe SHV dan TEM adalah spesifitas substrat, di mana CTX-M β -laktamase menghidrolisis sefalosporin. Perbedaan lain enzim tipe CTX-M yaitu perubahan aktivitas katalitik terhadap sefalosporin lainnya seperti sefotaksim, seftasidim dan sefepim. Hal ini menunjukkan bahwa adanya mutasi pada enzim tersebut, khususnya pada posisi 167 dan 240 yang menyebabkan perubahan profil spesifitas substrat.¹¹

Molekular CTX-M

Studi kristalografi menyatakan bahwa volume rongga sisi aktif pada enzim CTX-M tidak diperbesar dan menyerupai TEM-1 dan SHV-1, hal ini berlawanan dengan ESBL tipe TEM dan SHV.^{76,77} Aktivitas melawan substrat oksimino- β -laktam mungkin bergantung pada interaksi spesifik dengan sisi aktif dari senyawa, terutama melalui Ser237 dan Asn104.⁷⁸⁻⁸⁰ Fitur yang paling berbeda

pada CTX-M β -laktamase yang dikenali sejak awal deskripsinya yaitu preferensi substrat pada sefotaksim dan seftasidim serta aktivitas melawan seftasidim yang tidak dapat diabaikan. Namun aspek yang paling penting dalam mikroevolusi enzim CTX-M yaitu peningkatan yang signifikan pada aktivitas hidrolisis melawan seftasidim. Mutasi pada posisi dua asam amino ditemukan bertanggung jawab terhadap efek ini pada studi evolusi.⁸¹

Pengaruh posisi (diprediksi dari seleksi positif) dalam kelompok enzim CTX-M-1 menjadi CTX-M-3 terhadap peningkatan ketahanan bakteri pada lingkungan yang mengandung seftasidim, diperoleh melalui mutasi spesifik berdasarkan *site-directed mutagenesis* pada tempat yang diprediksi yaitu A77V, N114D, P167S, D240G dan D288N. Studi evolusi dari strain yang mengandung CTX-M-3, bertanggung jawab terhadap peningkatan konsentrasi penghambatan terhadap seftasidim yaitu mutasi pada posisi 167 (P167S/T, keduanya menghasilkan fenotip yang tidak dapat dibedakan) dan 240 (D240G, perubahan asam amino yang unik terjadi pada posisi ini).^{82,83} Varian CTX-M-15 berbeda dari CTX-M-3 melalui mutasi pada D240G. Mutasi ini menyebabkan terjadinya peningkatan efisiensi katalitik melawan seftasidim. Mutasi pada kedua posisi tersebut meningkatkan aktivitas melawan penisilin, seperti mutasi ESBL pada famili TEM dan SHV. Novais *et al.* (2010) menyatakan bahwa pada tahap mutagenesis kedua, terjadi perubahan satu asam amino pada CTX-M-15 (CTX-M-3 + D240G) sehingga posisi mutasi pada CTX-M-15 terdiri dari A77V, N114D, A140D, D240G dan D288N yang menghasilkan varian dengan aktivitas hidrolitik yang lebih tinggi terhadap seftasidim.⁸¹ Namun terdapat perbedaan pendapat mengenai posisi substitusi asam amino pada CTX-M-15, Rubstsova *et al.* (2010) menyatakan bahwa titik mutasi pada

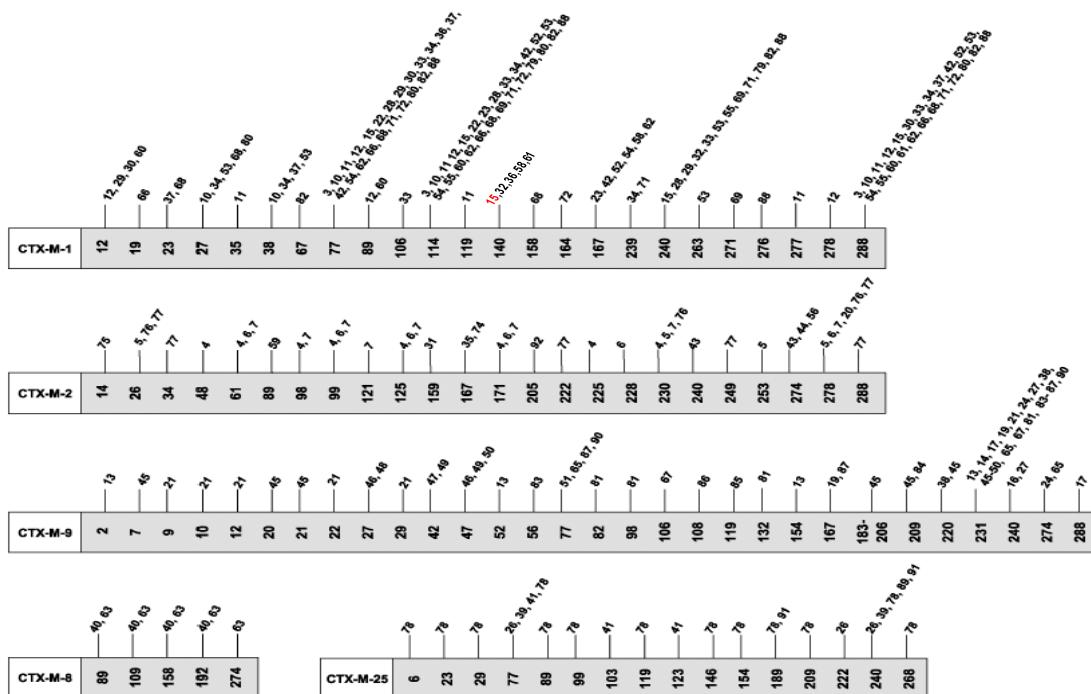
CTX-M-15 terdiri dari perubahan asam amino pada posisi A77V, N114D, D288N dan D240G.⁴

Evolusi dari enzim CTX-M: residu Ser167 dan Gly240. Mutan dengan titik mutasi umum pada enzim CTX-M menunjukkan peningkatan yang baru saja diamati yaitu berupa efisiensi katalitik melawan seftasidim. Mutasi sebelumnya tidak diamati pada TEM atau ESBL secara alami. Enzim CTX-M-15, CTX-M-16, dan CTX-M-27 mengalami substitusi Asp240Gly. Kehadiran residu lisin dan arginin pada posisi 240 diketahui meningkatkan aktivitas enzimatik dari TEM dan SHV ESBL dalam melawan seftasidim.⁸⁴ Residu lisin dan arginin bermuatan positif dan dapat membentuk ikatan elektrostatik dengan kelompok asam karboksilat pada substituen oksimino pada seftasidim.^{85,86} Residu netral Gly240 tidak dapat membentuk interaksi elektrostatik dengan β -laktam tetapi dapat menyediakan akomodasi dari rantai samping untuk oksimino-seftasidim.^{87,88}

Epidemiologi CTX-M β -laktamase

Studi penelitian selama sepuluh tahun terakhir telah mengungkapkan bahwa enzim CTX-M hampir menggantikan enzim ESBL lainnya pada *Enterobacteriaceae*, termasuk varian TEM dan SHV.^{46,88-92} Penggantian ini terjadi tidak hanya sebagai akibat dari penyebaran dari gen *bla*_{CTX-M} pada mobilisasi transfer materi genetik secara luar biasa termasuk plasmid dan transposon, tetapi juga karena keberhasilannya dalam kloning.⁹⁴⁻⁹⁶ Peningkatan fenomena resistensi yang terjadi pada organisme penghasil CTX-M terhadap aminoglikosida dan fluorokuinolon juga turut memfasilitasi proses seleksi dalam resistensi.^{97,98}

Pada enzim CTX-M, CTX-M-14 dan CTX-M-15 merupakan yang terpenting karena menyerang manusia, hewan serta lingkungan di seluruh dunia.⁹⁹⁻¹⁰² Meskipun demikian, kemunculan sementara dan penetrasi enzim ini dalam epidemiologi yang berbeda dapat menjelaskan kondisi epidemiologi enzim



Gambar 3 Pembagian β -laktamase Jenis CTX-M dalam Sub-kluster dan Posisi Substitusi Asam Amino^{4,81}

CTX-M saat ini. Konsumsi antibiotik dan faktor resiko yang berbeda dari letak geografis, kelompok pasien dan kekhasan kompartemen mungkin dapat berkontribusi dalam enzim CTX-M saat ini.^{76,77,103–105}

Dalam hal ini, terdapat tiga periode berbeda dari CTX-M. Periode pertama terjadi pada pertengahan tahun 1990-an sampai dengan abad terakhir, mencakup munculnya CTX-M β-laktamase yang berbeda dan letak geografis yang jauh. Periode kedua terjadi pada tahun 1994 sampai 2000 dikarakterisasi dengan munculnya penyebaran enzim CTX-M yang paling luas, termasuk enzim CTX-M-3, CTX-M-9, CTX-M-14 dan CTX-M-15. Beberapa enzim ini, namun tidak secara eksklusif merupakan varian dari CTX-M β-laktamase yang sebelumnya telah dideskripsikan. Periode ketiga sampai pada tahun 2000 ditandai oleh dispersi universal dan globalisasi dari β-laktamase ini.⁷⁸

Simpulan

CTX-M β-laktamase menjadi pertimbangan dalam paradigma evolusi dari mekanisme resistensi pada antibiotik. Penetrasi dan penyebaran organisme penghasil CTX-M secara global menyebabkan terjadinya epidemik resistensi plasmid yang menimbulkan resistensi terhadap lebih dari satu macam obat (*multi-drug resistant*) dan kloning virulen yang memiliki resiko tinggi. Oleh karena itu, diharapkan agar dilakukan pengkajian lebih jauh dari setiap titik mutasi pada masing-masing gen CTX-M melalui teknik *sequencing* sehingga memungkinkan diketahuinya urutan basa DNA secara keseluruhan untuk perancangan obat baru dalam upaya mengatasi epidemik resistensi antibiotik.

Pendanaan

Penulisan artikel *review* ini tidak menerima

bantuan dana dari pihak manapun.

Konflik Kepentingan

Seluruh penulis menyatakan tidak terdapat konflik kepentingan dalam penulisan artikel ini.

Daftar Pustaka

1. World Health Organization. Antimicrobial resistance global report on surveillance: Global report on surveillance. World Health Organization; 2014.
2. Page MI. The mechanisms of reactions of β-lactam antibiotics. *Advan Phys Org Chem.* 1987;23:165–270.
3. Massova I, Mobashery S. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42(1):1–17.
4. Rubtsova MY, Ulyashova MM, Bachman TT, Schmid RD, Egorov AM. Multiparametric determination of genes and their point mutations for identification of beta-lactamases. *Biochemistry (Mosc).* 2010;75(13):16 28–49.
5. Nukaga M, Haruta S, Tanimoto K, Kogure K, Taniguchi K, Tamaki, M, et al. Molecular evolution of a class C graphic-lactamase extending its substrate specificity. *Biol Chem.* 1995; 270:5729–35. doi: 10.1074/jbc.270.11. 5729
6. Ghysen JM. Molecular structures of penicillin-binding proteins and beta lactamases. *Trends Microbiol.* 1994;2 (10):372–80.
7. James PA, Reeves DS. Bacterial resistance to cephalosporins as a function of outer membrane permeability and access to their target. *J Chemother.* 1996; 8(2):37–47.

8. Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10(4):781–91.
9. Heritier C, Poirel L, Lambert T, Nordmann P. Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacilinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(8):3198–202. doi: 10.1128/AAC.49.8.3198-320.2.2005
10. Heritier C, Poirel L, Fournier PE, Claverie JM, Rauolt D, Nordmann P. Characterization of the naturally occurring oxacilinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(10):4174–9. doi: 10.1128/AAC.49.10.4174-4179.2005
11. Livermore DM, Pearson A. Antibiotic resistance: Location, location, location. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13(s2):7–16. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01724.x
12. Harada S, Yoshikazu I, Keizo Y. Extended-spectrum β -lactamases: Implications for the clinical laboratory and therapy. *Korean J Lab Med.* 2008; 28(6):401–12. doi: 10.3343/kjlm.2008.28.6.401.
13. Woodford N, Ellington MJ. The emergence of antibiotic resistance by mutation. *Clin Microbiol Infect.* 2007; 13(1):5–18. doi: 10.1111/j.1469-0691.2006.01492.x
14. Medeiros AA. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clin Infect Dis.* 1997; 24(1):S19–45.
15. Lakshmi R, Nurin KS, Georgy SA, Sreelakshmi KS. Role of betalactamases in antibiotic resistance. *Int Res J Pharm.* 2014;5(2):37–40. doi: 10.7897/2230-8407.050207
16. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Genetic support of extended beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(1):75–81. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01865.x
17. Weldhagen GF. Integrons and beta-lactamases a novel perspective on resistance. *Int J Antimicrob Agents.* 2004;3(6):556–62. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2004.03.007
18. Livermore DM. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1995;8(4):557–84.
19. Bradford PA. Extended-spectrum- β -lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(4): 933–51. doi: 10.1128/CMR.14.4.933-951.2001
20. Bush K, Fisher JF. Epidemiological expansion structural studies, and clinical challenges of new β -lactamases from gram negative bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2011;65:455–78. doi: 10.1146/annurev-micro-090110-102911.
21. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection.* 1983;11(6):315–7.
22. Ambler RP, Coulson AF, Frere JM, Ghuyzen JM, Joris B, Forsman M, et al. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J.* 1991;276(Pt 1):269–70.
23. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(6):1211–33.
24. Rasmussen BA, Bush K. Carbapenem-

- hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(2):223–32.
25. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum betalactamases: A clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(4):657–86. doi: 10.1128/CMR.18.4.657-686.2005
 26. Bush K, Singer SB. Biochemical characteristics of extended broad spectrum β -lactamases. *Infection.* 1989; 17:429–33.
 27. Jacoby GA, Medeiros AA. More extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991; 35(9):1697–704.
 28. Martinez-Martinez L, Hernández-Alle S, Albertí S, Toma's J, Benedito V, Jacoby G. In vivo selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expandedspectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(2):342–8.
 29. Pangon B, Bizet C, Buret A, Pichon F, Philippon A, Regnier B, et al. In vivo selection of a cephamicin-resistant, porin-deficient mutant of *Klebsiella pneumoniae* producing a TEM-3 β -lactamase. *J Infect Dis.* 1989; 159:1005–6.
 30. Vatopoulos AC, Philippon A, Tzouvelekis LS, Komninou Z, Legakis NJ. Prevalence of a transferable SHV-5 type β -lactamase in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Greece. *J Antimicrob Chemother.* 1990;26(5):635–48. doi: 10.1093/jac/26.5.635
 31. Jacoby G, Munoz-Price L. The new β -lactamases. *N Engl J Med.* 2005; 352(4):380–91. doi: 10.1056/NEJMra041359
 32. Livermore DM, Cantón R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, et al. CTX-M: Changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59(2):165–74. doi: 10.1093/jac/dkl483
 33. Charrouf FO, Hamze M, Mallat H, Achkar H, Daboussi F. Characterization of resistance genes in 68 ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* in Lebanon. *Med Mal Infect.* 2014; 44(11–12):535–8. doi: 10.1016/j.medmal.2014.10.001.
 34. Lewis JS, Herrera M, Wickes B, Patterson JE, Jorgensen JH. First report of the emergence of CTX-M-type extended-spectrum betalactamases (ESBLs) as the predominant ESBL isolated in a U.S. health care system. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51(11):4015–21. doi: 10.1128/AAC.00576-07
 35. Wang G, Huang T, Surendraiah PK, Wang K, Komal R, Zhuge J, et al. CTX-M β -Lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Suburban New York, New York, USA. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(11):1803–10. doi: 10.3201/eid1911.121470
 36. Lee MY, Ko KS, Kang CI, Chung DR, Peck KR, Song JH. High prevalence of CTX-M-15 producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Asian countries: Diverse clones and clonal dissemination. *Int J Antimicrob Agents.* 2011;38(2):160–3. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2011.03.020.
 37. Baraniak A, Izdebski R, Fiett J, Sadowy E, Adler A, Kazma M, et al. Comparative population analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains with extended-spectrum β -lactamases colonizing patients in rehabilitation centers in four countries. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(4):1992–7. doi: 10.1128/AAC.02571-12
 38. D'Andrea MM, Arena F, Pallecchi L, Rossolini GM. CTX-M-type β

- lactamases: A successful story of antibiotic resistance. *Int J Med Microbiol.* 2013;303(6–7):305–17. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.02.008
39. Rodrigues C, Machado E, Ramos H, Peixe L, Novais Â. Expansion of ESBL producing *Klebsiella pneumoniae* in hospitalized patients: A successful story of international clones (ST15, ST147, ST336) and epidemic plasmids (IncR, IncFIIK). *Int J Med Microbiol.* 2014;304(8):1100–8. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.08.003
40. Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C. The spread of CTXM-type extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(1):33–41. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01867.x
41. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: The CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(1):1–14.
42. Rogers BA, Sidjabat HE, Paterson DL. *Escherichia coli* O25b-ST131: A pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(1):1–14. doi: 10.1093/jac/dkq415.
43. Zhang J, Zhou K, Zheng B, Zhao L, Shen P, Ji J, et al. High prevalence of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* causing community-onset infections in China. *Front Microbiol.* 2016;7:1830. doi: 10.3389/fmicb.2016.01830
44. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JD. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(3):565–91. doi: 10.1128/CMR.00116-14.
45. Carattoli A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(6):2227–38. doi: 10.1128/AAC.01707-08
46. Canton R, Gonzalez-Alba JM, Juan CC. CTX-M enzymes: Origin and diffusion. *Front Microbiol.* 2012;3:110. doi: 10.3389/fmicb.2012.00110
47. Cantón R. Epidemiology and evolution of β-lactamase in evolutionary biology of bacterial and fungal pathogens, eds Baquero F, Nombela C, Casslel GH, Gutierrez-Fuentes JA. Washington: ASM Press; 2008.
48. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Genetic support of extended-spectrum β-lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(1):75–81. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01865.x
49. Bauernfield A, Grimm H, Shweighart S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection.* 1990;18(5):294–8.
50. Barthélemy M, Péduzzi J, Bernard H, Tancréde C, Labia R. Close amino acid sequence relationship between the new plasmid-mediated extended-spectrum β-lactamase MEN-1 and chromosomally encoded enzymes of *Klebsiella oxytoca*. *Biochim Biophys Acta.* 1992;1122(1):15–22.
51. Gniadkowski MI, Schneider A, Palucha R, Jungwirth B, Mikiewicz, Bauernfeind A. Cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolates from a hospital in Warsaw, Poland: identification of a new CTX-M-3 cefotaxime-hydrolyzing β-lactamase that is closely related to the CTX-M-1/MEN-1 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(4):827–32.
52. Karim AL, Poirel S, Nagarajan, Nordmann P. Plasmid mediated extended-spectrum β-lactamase (CTX -M-3 like) from India and gene association with insertion sequence IS_{Ecp1}. *FEMS Microbiol Lett.* 2001; 201(2):237–41.
53. Kariuki SJE, Corkill G, Revathi

- R, Musoke, CA Hart. Molecular characterization of a novel plasmid-encoded cefotaximase (CTX-M-12) found in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Kenya. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(7):2141–3. doi: 10.1128/AAC.45.7.2141-2143. 2001
54. Matsumoto Y, Ikeda F, Kamimura T, Yokota Y, Mine Y. Novel plasmid-mediated beta-lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* 1988;32(8):1243–6. doi: 10.1128/AAC.32.8.1243
55. Oliver A, Perez-Diaz JC, Coque TM, Baquero F, Canton R. Nucleotide sequence and characterization of a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase (CTX-M-10) isolated in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(2):616–20. doi: 10.1128/AAC.45.2.616-620.2001
56. Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Ernst S, Casellas JM. Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(2):509–13.
57. Bradford PA, Yang Y, Sahm D, Grope I, Gardovska D, Storch G. CTX-M-5, a novel cefotaxime-hydrolyzing β-lactamase from an outbreak of *Salmonella typhimurium* in Latvia. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42(8):1980–4.
58. Gazouli ME, Tzelepi A, Markogiannakis A, Legakis NJ, Tzouvelekis LS. Two novel plasmid-mediated cefotaxime-hydrolyzing β-lactamases (CTX-M-5 and CTX-M-6) from *Salmonella typhimurium*. *FEMS Microbiol Lett.* 1998;165(2):289–93. doi: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb13159.x
59. Gazouli M, Tzelepi E, Sidorenko SV, Tzouvelekis LS. Sequence of the gene encoding a plasmid-mediated cefotaxime-hydrolyzing class A β-lactamase (CTX-M-4): Involvement of serine 237 in cephalosporin hydrolysis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42(5):1259–62.
60. Ishii Y, Ohno A, Taguchi H, Imajo S, Ishiguro M, Matsuzawa H. Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A β-lactamase isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(10):2269–75. doi: 0.1128/AAC.39.10.2269
61. Saladin M, Cao VTB, Lambert T, Donay JL, Herrmann JL, Ould-Hocine Z, Verdet C, Delisle F, Philippon A, Arlet G. Diversity of CTX-M beta-lactamases and their promoter regions from Enterobacteriaceae isolated in three Parisian hospitals. *FEMS Microbiol Lett.* 2002;209(2):161–8. doi: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11126.x
62. Tassios PT, Gazouli M, Tzelepi E, Milch H, Kozlova N, Sidorenko S, Legakis NJ, Tzouvelekis LS. Spread of *Salmonella typhimurium* clone resistant to expanded-spectrum cephalosporins in three European countries. *J Clin Microbiol.* 1999;37:3774–7.
63. Bonnet R, Sampaio JLM, Labia R, De Champs C, Sirot D, Chanal C, Sirot J. A novel CTX-M β-lactamase (CTX-M-8) in cefotaximeresistant Enterobacteriaceae isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(7):1936–42. doi: 10.1128/AAC.44.7.1936-1942.2000
64. Bonnet R, Dutour C, Sampaio JLM, Chanal C, Sirot D, Labia R, De Champs C, Labia R, Sirot J. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic

- efficiency due to substitution Asp240Gly. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(8):2269–75. doi: 10.1128/AAC.45.8.2269-2275.2001
65. Bonnet R, Recule C, Baraduc R, Chanal C, Sirot D, De Champs C, Sirot J. Effect of D240G substitution in a novel ESBL CTX-M-27. *J Antimicrob Chemother.* 2003;52:29–35. doi: 10.1093/jac/dkg256
66. Cao V, Lambert T, Courvalin P. ColE1-like plasmid pIP843 of *Klebsiella pneumoniae* encoding extended-spectrum beta-lactamase CTXM-17. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(5):1212–7. doi: 10.1128/AAC.46.5.1212-1217.2002
67. Chanawong A, M'Zali FH, Heritage J, Xiong JH, Hawkey PM. Three cefotaximases, CTX-M-9, CTX-M-13, and CTX-M-14, among Enterobacteriaceae in the people's Republic of China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(3):630–7. doi: 10.1128/AAC.46.3.630-637.2002
68. Labia R. Analysis of the blaToho gene coding for Toho-2 β-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43(10):2576–7.
69. Ma L, Ishii Y, Ishiguro M, Matsuzawa H, Yamaguchi K. Cloning and sequencing of the gene encoding Toho-2, a class A β-lactamase preferentially inhibited by tazobactam. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(5):1181–6.
70. Pai H, Choi EH, Lee HJ, Hong JY, Jacoby GA. Identification of CTX-M-14 extended-spectrum beta-lactamase in clinical isolates of *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, and *Klebsiella pneumoniae* in Korea. *J Clin Microbiol.* 2001;39(10):3747–9. doi: 10.1128/JCM.39.10.3747-3749.2001
71. Poirel L, Naas T, Le Thomas I, Karim A, Bingen E, Nordmann P. CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase that hydrolyzes ceftazidime through a single amino acid substitution in the omega loop. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(12):3355–61. doi: 10.1128/AAC.45.12.3355-3361.2001
72. Sabate' M, Tarrago R, Navarro F, Miro E, Verge's C, Barbe' J, Prats G. Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime-hydrolyzing β-lactamase (CTX-M-9) from *Escherichia coli* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(7):1970–3.
73. Saladin M, Cao VT, Lambert T, Donay JL, Herrmann JL, Ould-Hocine Z, et al. Diversity of CTX-M beta-lactamases and their promoter regions from Enterobacteriaceae isolated in three Parisian hospitals. *FEMS Microbiol Lett.* 2002;209(2):161–8. doi: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11126.x
74. Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Tassios PT, Legakis NJ. CTX-M-type beta-lactamases: An emerging group of extended spectrum enzymes. *Int J Antimicrob Agents.* 2000;14(2):137–42.
75. Bonnet R, Champs CD, Sirot D, Chanal C, Labia R, Sirot J. Diversity of TEM mutants in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43(11):2671–7.
76. Oteo J, Pérez-Vázquez M, Campos J. Extended-spectrum β-lactamase producing *Escherichia coli*: Changing epidemiology and clinical impact. *Curr Opin Infect Dis.* 2010;23(4):320–6.
77. Naseer U, Sundsfjord A. CTX-M conundrum: dissemination of plasmids and *Escherichia coli* clones. *Microb Drug Resist.* 2011;17(1):83–97.
78. Shimamura T, Ibuka A, Fushinobu S, Wakagi T, Ishiguro M, Ishii Y, et al. Acyl-intermediate structures of the

- extended-spectrum class A β -lactamase, Toho-1, in complex with cefotaxime, cephalothin, and benzylpenicillin. *J Biol Chem.* 2002;277:46601–8. doi: 10.1074/jbc.M207884200
79. Chen Y, Delmas J, Sirot J, Shoichet B, Bonnet R. Atomic resolution structures of CTX-M β -lactamases: Extended spectrum activities from increased mobility and decreased stability. *J Mol Biol.* 2005;348(2):349–62. doi: 10.1016/j.jmb.2005.02.010
80. Gazouli M, Tzelepi E, Sidorenko SV, Tzouvelekis LS. Sequence of the gene encoding a plasmid-mediated cefotaxime-hydrolyzing class A β -lactamase (CTX-M-4): Involvement of serine 237 in cephalosporin hydrolysis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42(5):1259–62.
81. Novais A, Comas I, Baquero F, Canton R, Coque TM, et al. Evolutionary trajectories of beta-lactamase CTX-M-1 cluster enzymes: Predicting antibiotic resistance. *PLoS Pathog.* 2010;6(1): e1000735. doi: 10.1371/journal.ppat.1000735
82. Poirel L, Gniadkowski M, Nordmann P. Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 and of its structurally related beta-lactamase CTX-M-3. *J Antimicrob Chemother.* 2002;50(6):1031–4. doi: 10.1093/jac/dkf240
83. Novais A, Canton R, Coque TM, Moya A, Baquero F, et al. Mutational events in cefotaximases extended-spectrum β -lactamases of the CTX-M-1 cluster involved in ceftazidime resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52(7):2377–82. doi: 10.1128/AAC.01658-07
84. Knox JR. Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type β -lactamases: Mutations, specificity, and three-dimensional structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39(12):2593–601.
85. Cantu C, Huang W, Palzkill T. Selection and characterization of amino acid substitutions at residues 237–240 of TEM-1 β -lactamase with altered substrate specificity for aztreonam and ceftazidime. *J Biol Chem.* 1996; 271:22538–45. doi: 10.1074/jbc.271.37.22538
86. Huletsky A, Knox JR, Levesque RC. Role of Ser-238 and Lys-240 in the hydrolysis of third-generation cephalosporins by SHV-type β -lactamases probed by site-directed mutagenesis and three-dimensional modeling. *J Biol Chem.* 1993;268(5):3690–7.
87. Bonnet R, Dutour C, Sampaio JLM, Chanal C, Sirot D, Labia R, et al. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp240Gly. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(8):2269–75. doi: 10.1128/AAC.45.8.2269-2275.2001
88. Bonnet R, Recule C, Baraduc R, Chanal C, Sirot D, De Champs C, et al. Effect of D240G substitution in a novel ESBL CTX-M-27. *J Antimicrob Chemother.* 2003;52:29–35. doi: 10.1093/jac/dkg256
89. Coque TM, Baquero F, Cantón R. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveill.* 2008;13(47):19044.
90. Angel DM, Ramón HJ, Martínez ML, Rodríguez BJ, Pascual A, Grupode Estudio de Infección Hospitalaria (GEIH). Extended-spectrum β -lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in Spanish hospitals: 2nd multicenter study (GEIH-BLEE project, 2006). *Enferm*

- Infect Microbiol Clin. 2009;27(9):503–10. doi: 10.1016/j.eimc.2008.09.006
91. Hawkey PM, Jones AM. The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64:i3–i10. doi: 10.1093/jac/dkp256
92. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(3):969–76. doi: 10.1128/AAC.01009-09
93. Rodriguez VH, Bogaerts P, Berhin C, Baurain C, Deplano A, Montesinos I, et al. Trends in production of extended-spectrum β -lactamases among Enterobacteriaceae of clinical interest: results of a nation wide survey in Belgian hospitals. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66(1):37–47. doi: 10.1093/jac/dkq388
94. Cantón R, Coque TM. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol.* 2006;9(5):466–75. doi: 10.1016/j.mib.2006.08.011
95. Rogers BA, Sidjabat HE, Paterson DL. Escherichia coli O25b-ST131: A pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(1):1–14. doi: 10.1093/jac/dkq415
96. Woodford N, Ward ME, Kaufmann ME, Turton J, Fagan EJ, James D, et al. Community and hospital spread of Escherichia coli producing CTX-M extended-spectrum β -lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2004;54(4):735–43. doi: 10.1093/jac/dkh424
97. Morosini MI, García-Castillo M, Coque TM, Valverde A, Novais A, Loza E, et al. Antibiotic coresistance in extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae and in vitro activity of tigecycline. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(8):2695–9. doi: 10.1128/AAC.00155-06
98. Cantón R, Ruiz-Garbajosa P. Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. *Curr Opin Pharmacol.* 2011;11(5):477–85. doi: 10.1016/j.coph.2011.07.007
99. Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, et al. Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(1):144–53. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01850.x
100. Hawkey PM, Jones AM. The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64:i3–i10. doi: 10.1093/jac/dkp256
101. Dolejska M, Frolkova P, Florek M, Jamborova I, Purgertova M, Kutilova I, et al. CTX-M-15 producing Escherichia coli clone B2-O25b-ST131 and Klebsiella spp isolates in municipal wastewater treatment plant effluents. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(12):2784–90. doi: 10.1093/jac/dkr363
102. Hiroi M, Yamazaki F, Harada T, Takahashi N, Iida N, Noda Y, et al. Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in food producing animals. *J Vet Med Sci.* 2012;74(2):189–95. doi: 10.1292/jvms.11-0372
103. Carattoli A. Animal reservoirs for extended spectrum β -lactamase producers. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14(1):117–23. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01851.x
104. Rodríguez-Baño J, Navarro MD. Extended-spectrum β -lactamases in ambulatory care: A clinical perspective. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14: 104–10. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01866.x
105. Rodríguez-Baño J, Pascual A. Clinical significance of extended-

spectrum β -lactamases. Expert Rev Anti Infect Ther. 2008;6(5):671–83.

doi: 10.1586/14787210.6.5.671.