

Detección del gen codificante de la metalo- β -lactamasa VIM-2 en un integrón de clase 1 asociado con el gen $bla_{\text{CTX-M-2}}$ en un aislamiento clínico de *Pseudomonas aeruginosa* en el Uruguay: primera comunicación

ANA J. INGOLD¹, MERCEDES CASTRO², ADRIANA NABÓN², GRACIELA BORTHAGARAY^{1,2}, CAROLINA MÁRQUEZ^{1,3*}

¹Cátedra de Microbiología, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Química, Universidad de la República. Avda. Gral. Flores 2124; ²Servicio de Bacteriología, Hospital Central de las Fuerzas Armadas. Avda. 8 de Octubre 3050;

³Cátedra de Microbiología, Departamento de Biociencias, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Iguá 4225, Montevideo, Uruguay

*Correspondencia. E-mail: cmarquez@fq.edu.uy

RESUMEN

Con el fin de analizar la presencia de metalo- β -lactamasas en nuestro medio, se incluyeron en este estudio aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* causantes de infecciones nosocomiales en un centro hospitalario del Uruguay, en el período comprendido entre abril y setiembre de 2008. En un aislamiento se detectó la presencia del gen codificante de la metalo- β -lactamasa VIM-2 asociado a un integrón de clase 1 y del gen codificante de una β -lactamasa de espectro extendido CTX-M-2. Esta es la primera comunicación de la presencia de los genes $bla_{\text{CTX-M-2}}$ y $bla_{\text{VIM-2}}$ en un mismo aislamiento de *P. aeruginosa*. A pesar de que las carbapenemasas ya han sido ampliamente documentadas en varias partes del mundo, esta es la primera comunicación de una metalo- β -lactamasa adquirida con actividad carbapenemasa en bacterias patógenas encontradas en el Uruguay.

Palabras clave: integrón, carbapenemasas, *Pseudomonas*, VIM-2, metalo- β -lactamasa, CTX-M-2

ABSTRACT

VIM-2 metallo- β -lactamase gen detection in a class 1 integron associated to $bla_{\text{CTX-M-2}}$ in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Uruguay: first communication. In order to analyze the presence of metallo- β -lactamase in our country, we included in this study *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing nosocomial infections in a hospital from Uruguay. The presence of a metallo- β -lactamase VIM-2 in a class 1 integron and of an extended spectrum -lactamase CTX-M-2 was detected in one isolate. This is the first report of both genes, $bla_{\text{CTX-M-2}}$ and $bla_{\text{VIM-2}}$, in the same *P. aeruginosa* isolate. Although carbapenemases have been extensively documented in the world, this is the first report of an acquired metallo- β -lactamase with carbapenemase activity in pathogenic bacteria in Uruguay.

Key words: integron, carbapenemase, *Pseudomonas*, VIM-2, metallo- β -lactamase, CTX-M-2

Pseudomonas aeruginosa es uno de los principales patógenos oportunistas recuperados en infecciones hospitalarias y se encuentra asociado a una alta tasa de mortalidad. Es capaz de adquirir resistencia a la mayoría de las drogas de utilización clínica; los carbapenems son la opción terapéutica más utilizada en los cuadros graves.

La resistencia a carbapenems en *P. aeruginosa* puede ser el resultado de la sobre-expresión de sistemas de eflujo, de la impermeabilidad de la membrana externa, de la expresión de β -lactamasas o de una combinación de estos mecanismos. Las β -lactamasas descritas en la especie e involucradas en la resistencia a carbapenems son, por un lado las metalo- β -lactamasas (MBL) pertenecientes a las familias IMP y VIM, y las enzimas SPM-1, GIM-1, SIM-1 y AIM, y por el otro las serino- β -lactamasas de clase A de Ambler GES-2 y KPC-2. Cabe mencionar, asimismo,

la sobreexpresión de la cefalosporinasa intrínseca de la especie de tipo AmpC (9, 12).

La adquisición de genes codificantes de MBL constituye un mecanismo de resistencia con alta implicancia epidemiológica debido a su capacidad de diseminación horizontal. Estas enzimas presentan un perfil de hidrólisis de sustrato amplio y son capaces de hidrolizar cefalosporinas de espectro extendido (cefotaxima, ceftacidima y cefepime) y carbapenems (imipenem y meropenem); no hidrolizan aztreonam y su actividad no es afectada por inhibidores de β -lactamasas de uso clínico, mientras que es inhibida por quelantes de cationes divalentes como el EDTA. Las carbapenemasas pertenecientes a las familias VIM e IMP son las más diseminadas en la especie; de ellas, la variante VIM-2 es la descrita con mayor frecuencia en todo el mundo. Los genes codificantes se encuentran

como elementos móviles (genes en casetes) insertados en integrones de clase 1 o clase 3, los cuales, a su vez, están a menudo asociados a transposones y a plásmidos conjugativos. Esto contribuye a una amplia dispersión en bacterias muy distantes en términos de filogenia (15).

Otras carbapenemasas están todavía restringidas a zonas geográficas determinadas. En particular, en América del Sur se han informado aislamientos que contienen *bla*_{SPM-1} en Brasil; *bla*_{VIM-11} y *bla*_{IMP-13} en Argentina; y *bla*_{VIM-8} en Colombia (4, 5, 10, 14).

A pesar de los porcentajes de aislamientos de *P. aeruginosa* resistentes a imipenem (24 %) y a meropenem (31 %) informados por el Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Intrahospitalarias del Ministerio de Salud Pública del Uruguay, al presente no hay información sobre la presencia de carbapenemasas en este país (8).

También se han descrito en *P. aeruginosa* β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) pertenecientes a las familias SHV, TEM, PER, VEB, BEL, GES, y más recientemente, CTX-M-2 (11).

En este trabajo se comunica la presencia de carbapenemasas en aislamientos de *P. aeruginosa* provenientes de un centro de asistencia médica de Montevideo, Uruguay, y el hallazgo del gen codificante de la MBL VIM-2, así como la descripción de su contexto genético.

Se estudiaron siete aislamientos consecutivos de *P. aeruginosa* recuperados de siete pacientes internados en el Hospital Central de las Fuerzas Armadas de Montevideo, en el período de abril a setiembre de 2008. Los aislamientos fueron identificados mediante el método automatizado VITEK 2 utilizando tarjetas GN (bioMérieux, EE.UU.). El resultado se obtuvo tras 5 a 7 horas de incubación, con probabilidades de identidad del 97

al 99 % para *P. aeruginosa*, y se expresó con un código numérico o bionúmero.

Cada aislamiento se subcultivó en medio TSA, se incubó a 35 °C durante 24 horas y se conservó a -20 °C en medio infusión cerebro corazón con glicerol al 20 %.

Se realizó el antibiograma por difusión en agar según la metodología indicada por el CLSI (3). Los antibióticos ensayados fueron los siguientes: piperacilina/tazobactama (TZP), 100 y 10 µg; ceftacídima (CAZ), 30 µg; cefepima (FEP), 30 µg; aztreonam (ATM), 30 µg; imipenem (IMP), 10 µg; meropenem (MEM), 10 µg; y ampicacina (AMK), 30 µg (Oxoid, Reino Unido) (3), y se determinó la CIM a IMP utilizando el E-test (AB biodisk, Suecia). Se agregó el ensayo de sinergia con doble disco para tazobactama, CAZ, FEP e IMP, y para ácido borónico 300 µg (Britania, Argentina), CAZ e IMP.

El origen de los aislamientos y los resultados de la identificación y de los ensayos de sensibilidad se muestran en la Tabla 1.

Los aislamientos U-011, U-004 y U-057 presentaron sensibilidad disminuida o resistencia a la CAZ, con un halo de inhibición menor de 18 mm, lo que ameritó la detección fenotípica de carbapenemasa. Se colocó un disco que contenía EDTA 372 µg y mercaptoacetato de sodio 900 µg (Britania, Argentina) a 15 mm de borde a borde de un disco de IMP y de un disco de MEM, según el ensayo de sinergia previamente descrito (1). Solo el aislamiento U-011 presentó un agrandamiento en el halo de inhibición del disco de carbapenem en la zona adyacente al disco de EDTA, que se interpretó como un ensayo de sinergia positivo y que sugirió la presencia de una MBL.

También se estudió la expresión fenotípica de carbapenemasas por un ensayo microbiológico, el de

Tabla 1. Origen y características fenotípicas de los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*

Datos de los aislamientos					Categorización (diámetro de los halos de inhibición en mm) ⁽¹⁾							CIM (ug/ml)	Detección fenotípica de carbapenemasas	
Aislamiento ⁽²⁾	Fecha	Servicio ⁽³⁾	Tipo de muestra	Bionúmero ⁽⁴⁾	TZP	CAZ	FEP	ATM	IMP	MEM	AMK	IMP	Sinergia con EDTA	MIEm ⁽⁶⁾
U-011	08/05/08	CCI	orina, sonda vesical	0043053203500040	R	R (6)	R	S (25)	R (9)	R	S	>32	+	+
U-004 ⁽⁵⁾	29/04/08	SM	orina	0043051103500352	S	R (12)	S	S (26)	R (9)	R	R	16	-	+
U-057 ⁽⁵⁾	28/07/08	CCI	orina, sonda vesical	0003453203500240	R	I (17)	S	I (16)	S (17)	I	S	2	-	-
PC-009	03/05/08	CCI	punta de catéter	0033453303500240	S	S (26)	S	I (21)	S (16)	S	R	4	sd ⁽⁷⁾	sd
U-025	27/05/08	SM	orina	0043051043500250	S	S (32)	S	S (26)	S (31)	S	S	0,38	sd	sd
U-061	31/07/08	CCIN	orina	0003451203500240	S	S (34)	S	S (23)	S (31)	S	R	0,38	sd	sd
H-029	09/09/08	SC	sangre	0043451203500252	S	S (24)	S	I (16)	S (28)	S	S	0,75	sd	sd

⁽¹⁾TZP: piperacilina/tazobactama. CAZ: ceftacídima. FEP: cefepima. IMP: imipenem. MEM: meropenem. ATM: aztreonam. AMK: ampicacina., R: resistente, I: intermedio, S: sensible, según criterios determinados por la norma CLSI 2010 (3); ⁽²⁾U: urocultivo, PC: punta de catéter, H: hemocultivo; ⁽³⁾CCI: centro de cuidados intensivos; SM: sala de medicina; CCIN: centro de cuidados intensivos de niños; SC: sala de cirugía; ⁽⁴⁾Bionúmero: código numérico de sistema de VITEK 2; ⁽⁵⁾coaislado con *Klebsiella pneumoniae*; ⁽⁶⁾MIEm: ensayo microbiológico imipenem-EDTA modificado; ⁽⁷⁾sd: sin dato.

imipenem-EDTA (MIEm), utilizando perforaciones en el agar en lugar de discos (Figura 1), y el extracto enzimático crudo obtenido mediante ruptura por congelamiento/descongelamiento (6). Se colocó un disco de IMP en el centro de una placa con agar Müller-Hinton previamente hisopada con una suspensión de *Escherichia coli* ATCC 25922, y se realizaron cuatro perforaciones a 8 mm del disco. En las perforaciones se depositaron 40 µl de: extracto enzimático solo (S); extracto enzimático con sulfato de zinc 0,1 mM (S/Zn); extracto enzimático con EDTA 20 mM (S/E); y buffer Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0, como control negativo (B).

Se observó crecimiento de *E. coli* alrededor de S y S/Zn con los aislamientos U-011 y U-004, y sólo en este último se observó crecimiento alrededor de S/E. Este resultado sugiere la producción de una carbapenemasa inhibible por EDTA (carbapenemasa MBL) en el aislamiento U-011, de una carbapenemasa no inhibible por EDTA (carbapenemasa no MBL) en el aislamiento U-004 y la ausencia de actividad detectable con el aislamiento U-057 (Figura 1).

Los aislamientos U-011 y U-004 fueron resistentes a IMP y MEM; las CIM del IMP fueron > 32 µg/ml y 16 µg/ml, respectivamente, y se observó una correlación entre el resultado del método por difusión en agar a partir de discos y la determinación de la CIM por el E-test para este antibiótico. El aislamiento U-011 fue resistente a cefalosporinas de espectro extendido y a TZP, y sensible a ATM y AMK. El otro aislamiento resistente a carbapenems fue únicamente resistente a CAZ y AMK.

Dada la ubicuidad de los genes codificantes de MBL de tipo IMP y VIM en casetes génicos asociados a integrones de clase 1, se realizó la búsqueda de estos últimos como herramienta para su detección en el aislamiento U-011. La amplificación del gen *int1*, codificante de la integrasa Int1, la amplificación de la región variable comprendida entre los extremos conservados 5' y 3', y la detección de la región *ISCR1* como marcador de integrón inusual se realizaron por PCR con el uso de tres pares

de oligonucleótidos, HS463A/HS464, HS458/HS459 y HS819/HS820, respectivamente, a partir del ADN total (7). La extracción del ADN se realizó mediante la lisis de una suspensión bacteriana con proteinasa K y SDS, seguida de la precipitación de proteínas con cloruro de sodio y del ADN con isopropanol (2). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 94 °C durante 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94 °C 30 segundos, 60 °C 30 segundos y 72 °C 2 minutos, y un período de extensión final a 72 °C durante 10 minutos, utilizando un termociclador Labnet Multigene II.

La amplificación de la región variable comprendida entre la región *ISCR1* y el segundo extremo conservado 3'(3'-SC2), habitualmente presente en los integrones inusuales, se realizó con los oligonucleótidos HS821/HS822, aplicando un tiempo de extensión de 5 min a 72 °C (8). Los productos amplificados fueron purificados con el uso de resinas (Quiaquick Gel Extraction Kit, Quiagen) y enviados a secuenciar (MacroGen Inc., Korea). Las secuencias fueron analizadas utilizando la herramienta Basic Local Alignment Search Tool.

La amplificación del gen *int1* fue positiva, se obtuvo un producto de 490 pb, resultado compatible con la presencia de un integrón de clase 1. La amplificación de la región variable generó un producto de 1200 pb cuya secuencia reveló la presencia de un solo casete génico que contenía el gen *bla_{VIM-2}*, codificante de una MBL de la familia VIM (Figura 2).

Estos resultados determinan la presencia del gen *bla_{VIM-2}*, en forma de casete génico, en un integrón de clase 1. Esta localización en un elemento genético móvil, en un integrón de clase 1 que habitualmente se asocia a otros elementos genéticos móviles, como transposones y plásmidos conjugativos, hace que esta carbapenemasa tenga el potencial de diseminarse por transferencia horizontal a otras cepas de la especie, así como a otras especies patógenas de relevancia clínica, distantes filogenéticamente, como *K. pneumoniae* y *E. coli*. Cabe destacar que en dos de las cinco muestras de

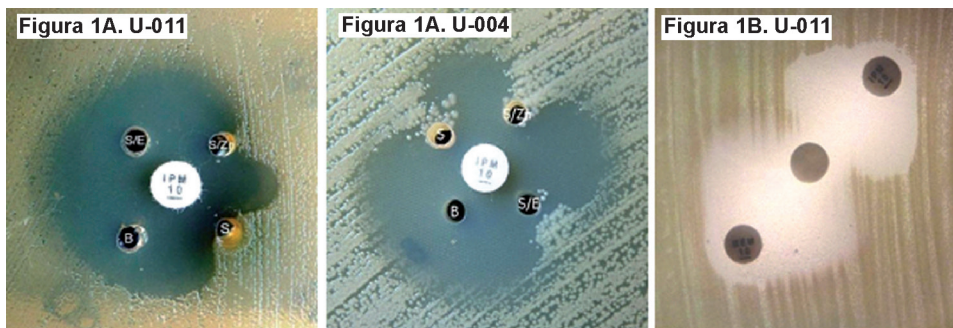


Figura 1. (A) Detección fenotípica de MBL correspondientes a los aislamientos U-011 (izquierda) y U-004 (centro) por el ensayo microbiológico de EDTA/imipenem. S: extracto enzimático; S/Zn: extracto enzimático con sulfato de zinc 0,1 mM; S/E: extracto enzimático con EDTA 20 mM; B: buffer Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0, control negativo. (B) Ensayo de sinergia empleando discos con EDTA 372 µg-mercaptoacetato de sodio 900 µg, imipenem 10 µg y meropenem 10 µg.

orina analizadas se aislaron a su vez *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, lo que agrega un nicho ecológico en el cual puede ocurrir la transferencia.

En el mismo aislamiento se detectó la región *ISCR1* mediante la obtención de un producto del tamaño esperado, de 500 pb, aproximadamente. La amplificación y posterior secuenciación de una región variable de 3000 pb, comprendida entre *ISCR1* y 3'-SC2, reveló la presencia del gen *bla*_{CTX-M-2} (Figura 2).

Este es el primer informe en el Uruguay donde se detectan genes codificantes de una BLEE y de una MBL en *P. aeruginosa*.

Algunos estudios previos demostraron una alta frecuencia de detección del complejo *ISCR1-bla*_{CTX-M-2} asociado a integrones de clase 1 inusuales en aislamientos clínicos obtenidos de pacientes con infecciones urinarias intrahospitalarias locales de *K. pneumoniae* (13). La detección del gen *bla*_{CTX-M-2} en *P. aeruginosa* constituye una evidencia del probable intercambio de genes de resistencia localizados en integrones entre enterobacterias y *P. aeruginosa*, especie que probablemente constituya un reservorio subestimado de tales genes.

En el aislamiento U-004, además de la actividad de carbapenemasa no inhibida por EDTA, se obtuvieron ensayos de sinergia positivos con tazobactama-CAZ y con tazobactama-FEP, y una débil sinergia con tazobactama-IMP, lo que sugiere la producción de una serino-carbapenemasa de clase A. Se estudió la presencia de genes codificantes de carbapenemasas de la familia KPC por amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos KPCfw y KPCrv ya descritos, con las

siguientes condiciones de amplificación: 94 °C 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94 °C 30 segundos, 60 °C 30 segundos, 72 °C 1 minuto, y un período de extensión final a 72 °C durante 5 minutos, utilizando como control positivo un aislamiento clínico de *K. pneumoniae* productor de KPC-2. No se obtuvo un producto de amplificación y se descartó la presencia del gen *bla*_{KPC-1}, por lo que la resistencia a carbapenems en esta cepa podría deberse a la producción de otro tipo de carbapenemasa de clase A.

En el aislamiento U-057 no se detectó actividad de carbapenemasa, tampoco se demostró sinergia con tazobactama y CAZ o FEP; sin embargo, se observó sinergia entre el ácido borónico y CAZ e IMP y presentó resistencia a TZP, lo que sugiere que la sensibilidad disminuida a betalactámicos podría deberse a mecanismos distintos de carbapenemasas o de BLEE adquiridas.

El aislamiento PC-009, sensible a los β-talactámicos y solo con sensibilidad disminuida al ATM y al IMP, demostró sinergia en los ensayos con tazobactama y CAZ o FEP, circunstancia que sugiere la producción de una BLEE en un aislamiento sensible a CAZ, que deberá ser confirmada en estudios posteriores. Asimismo, el resto de los aislamientos (U-025, U-061 y H-029) presentaron sensibilidad a los β-talactámicos y no demostraron sinergia entre tazobactama o ácido borónico y CAZ o FEP.

Se comprobó la presencia de un gen codificante de una MBL con expresión fenotípica de resistencia a carbapenems y del gen codificante de la BLEE CTX-M-2 en *P. aeruginosa* aislada de un urocultivo de un paciente con sonda vesical, internado en el área de cuidados intensivos. Es de destacar que, a pesar de ser

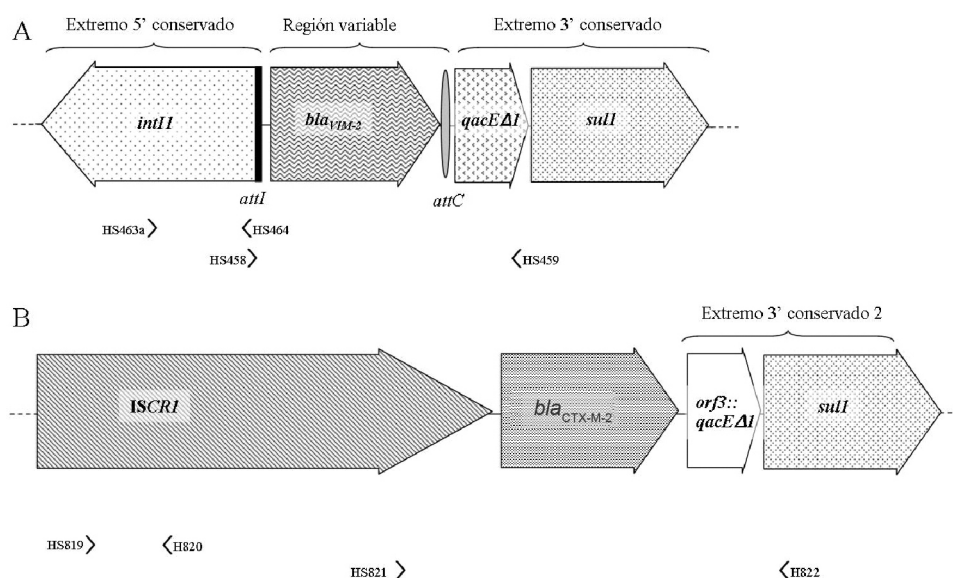


Figura 2. Entornos genéticos de los genes *bla*_{VIM-2} (A) y *bla*_{CTX-M-2} (B). *IntI1*: gen codificante de la integrasa; *attI* y *attC*: sitios de recombinación específica de la integrasa; *bla*_{VIM-2}: gen codificante de la metalo-β-lactamasa VIM-2; *qacEΔ1*: gen de resistencia a compuestos de amonio cuaternario; *sulI*: gen de resistencia a sulfamidaz; *ISCR1*: gen codificante de una recombinasa hipotética; *bla*_{CTX-M-2}: gen codificante de la BLEE CTX-M-2.

un hallazgo ampliamente documentado en otras partes del mundo, esta es la primera comunicación de una actividad de carbapenemasa y, en particular, de una metalo- β -lactamasa adquirida, en bacterias patógenas en el Uruguay.

Dada la ubicuidad de las metalo- β -lactamasas del tipo IMP y VIM en casetes génicos asociados a integrones de clase 1, destacamos la utilidad de la búsqueda de estos últimos como herramienta valiosa para su detección. Asimismo, la detección del gen *bla*_{CTX-M-2} fue posible únicamente gracias al análisis de la segunda región variable asociada a un integrón de clase 1 inusual.

Agradecimientos: Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas (PEDECIBA) del Uruguay, Programa de Desarrollo Tecnológico (PDT) del Ministerio de Educación y Cultura, Uruguay. Personal del Servicio de Bacteriología, H C. FF.AA., Uruguay. A Analía Sanabria por su colaboración con la toma de fotografías.

BIBLIOGRAFÍA

1. Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, Goto M. Convenient test for screening metallo- β -lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 40-3.
2. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. Current protocols in molecular biology. New York John Wiley & Sons, Inc., 1991.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Disk diffusion. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 20th Informational Supplement, 2010; M100-S20. Wayne, PA, EEUU.
4. Crespo MP, Woodford N, Sinclair A, Kaufmann ME, Turton J, Glover J, Velez JD, Castañeda CR, Recalde M, Livermore DM. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo- β -lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5094-101.
5. Franco MR, Caiaffa-Filho HH, Burattini MN, Rossi F. Metallo- β -lactamasas among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian university hospital. *Clinics (Sao Paulo)* 2010; 65: 825-9.
6. Marchiaro P, Mussi MA, Ballerini V, Pasteran F, Viale AM, Vila AJ, Limansky AS. Sensitive EDTA-based microbiological assays for detection of metallo- β -lactamases in nonfermentative gram-negative bacteria. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5648-52.
7. Márquez C, Labbate M, Raymondo C, Fernández J, Gestal AM, Holley M, Borthagaray G, Stokes HW. Urinary tract infections in a South American population: dynamic spread of class 1 integrons and multidrug resistance by homologous and site-specific recombination. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 3417-25.
8. Ministerio de Salud Pública del Uruguay. Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Hospitalarias. Resultados de la vigilancia de infecciones hospitalarias en Uruguay 2007-2009. [Online] http://www.msp.gub.uy/ucepidemiologia_4195_1.html.
9. Nordmann P. Gram-negative bacteria with resistance to carbapenems. *Med Sci (Paris)* 2010; 26: 950-9.
10. Pasteran P, Faccione D, Petroni A, Rapaport M, Galas M, Vazquez M, Procopio A. Novel variant (*bla*_{VIM-11}) of metallo- β -lactamase *bla*_{VIM} family in a Ges-1 extended-spectrum- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 474-5.
11. Picao CR, Poirel L, Gales A, Nordmann P. Diversity of β -Lactamase produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing bloodstream infections in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 3908-13.
12. Rodríguez-Martínez JM, Poirel L, Nordmann P. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 4783-8.
13. Roy Chowdhury P, Ingold A, Vanegas N, Martínez E, Merlino J, Merkier AK, Castro M, González Rocha G, Borthagaray G, Centrón D, Bello Toledo H, Márquez CM, Stokes HW. Dissemination of multiple drug resistance genes by class 1 integrons in *Klebsiella pneumoniae* isolates from four countries: a comparative study. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 3140-9.
14. Santella G, Cuirolo A, Almuzara M, Palombarini S, Sly G, Radice M, Gutkind G. Full resistance and decreased susceptibility to carbapenems in IMP-13 producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from an outbreak. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 1381-2.
15. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- β -lactamasas: The quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 306-25.