

INFORME BREVE

Diseminación de *bla*_{IMP-8} en enterobacterias aisladas en un hospital de Buenos Aires

Ana M. Togneri^{a,*}, Sonia A. Gómez^b, Laura B. Podestá^a, Marcela P. Pérez^a,
Diego F. Faccone^b, Lidia E. Ríos^a, Marcelo A. Gañete^a, María S. Anchordoqui^b,
Fernando G. Pasterán^b y Alejandra C. Corso^b

^aLaboratorio de Bacteriología, Hospital Interzonal General de Agudos «Evita», Lanús, Provincia de Buenos Aires, Argentina

^bServicio Antimicrobianos, Bacteriología, INEI-ANLIS «Dr. Carlos G. Malbrán», Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

Recibido el 28 de enero de 2013; aceptado el 24 de mayo de 2013

PALABRAS CLAVE

Metallo-β-lactamasas;
Enterobacterias;
*bla*_{IMP-8}

KEYWORDS

Metallo-β-lactamasas;
Enterobacteria;
*bla*_{IMP-8}

Resumen

Entre agosto de 2008 y diciembre de 2011 se detectaron en el Hospital Interzonal General de Agudos «Evita» de Lanús 6 aislamientos de enterobacterias productoras de metalo-β-lactamasas, distribuidos en tres especies: *Enterobacter cloacae* (4), *Klebsiella oxytoca* (1) y *Citrobacter freundii* (1). Los seis aislamientos presentaron un perfil de multirresistencia y se confirmó la presencia del gen *bla*_{IMP-8}. Cinco aislamientos además expresaron la β-lactamasa de espectro extendido PER-2. El gen *bla*_{IMP-8} fue hallado como primer cassette de un integrón de clase 1. Sin embargo, la secuencia 3' conservada no pudo detectarse en tres aislamientos. En todos los casos, el gen *bla*_{IMP-8} fue transferido por conjugación a *Escherichia coli* resistente a azida. Mediante PFGE se observó que los cuatro aislamientos de *E. cloacae* no estuvieron genéticamente relacionados. Estos son los primeros hallazgos de metalo-β-lactamasas en la institución, que sugieren una posible diseminación horizontal del gen *bla*_{IMP-8} intra e interespecies.

© 2013 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Dissemination of *bla*_{IMP-8} among *Enterobacteriaceae* isolates from a Buenos Aires Hospital

Abstract

From August 2008 to December 2011, six metallo-β-lactamase-producing isolates, four *Enterobacter cloacae*, one *Klebsiella oxytoca* and one *Citrobacter freundii*, were detected at Hospital Interzonal General de Agudos «Evita» in Lanús. All six isolates showed multiresistant profiles and the presence of the *bla*_{IMP-8} gene. Five isolates also

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: anatogneri66@hotmail.com (A.M. Togneri).

expressed PER-2 extended spectrum β -lactamase. The *bla*_{IMP-8} gene was found as the first cassette in a class 1 integron. However, the 3' conserved sequence could not be detected in three isolates. In all cases, *bla*_{IMP-8} was transferred by conjugation to azide-resistant *Escherichia coli* J53. PFGE analysis revealed that the four *E. cloacae* isolates were not genetically related. These are the first metallo- β -lactamases detected in this institution and our results suggest a possible intra- and inter-species horizontal dissemination of *bla*_{IMP-8}.

© 2013 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Las metalo- β -lactamasas (MBL) son la clase más diversa de carbapenemasas que representan una importante amenaza clínica³. Las MBL pertenecen a la clase B según la clasificación de Ambler y presentan actividad hidrolítica frente a los antibióticos β -lactámicos (excepto frente a los monobactámicos); son inhibibles por quelantes de cationes divalentes como EDTA y mercaptoacetato de sodio (MAS), y escapan de la acción de todos los inhibidores de β -lactamasas de uso clínico, como el ácido clavulánico y la sulbactama¹⁵. Las infecciones causadas por enterobacterias productoras de MBL (EB-MBL) reducen significativamente la disponibilidad de antibióticos útiles y tienen asociada una mortalidad que oscila entre 19 % y 67 %, por lo que la emergencia de este mecanismo se convierte en un problema para el sistema de salud^{3,15}.

Los genes que codifican MBL pueden hallarse en el cromosoma bacteriano o en elementos genéticos móviles. En este último caso, los genes de MBL suelen localizarse en integrones asociados a plásmidos conjugativos³. Las MBL adquiridas de mayor relevancia clínica son las de tipo IMP, VIM y NDM³. En particular, las enzimas de tipo IMP poseen especificidad para un amplio espectro de sustratos, con alta afinidad por las cefalosporinas y los carbapenems^{3,15}. Los genes *bla*_{IMP} se encuentran con mayor frecuencia alojados en integrones de clase 1, los que suelen poseer además otros genes de resistencia a antibióticos no β -lactámicos¹⁵.

A la fecha, los aislamientos portadores de MBL han sido hallados casi exclusivamente en instituciones de salud, en pacientes con hospitalización prolongada y expuestos a múltiples terapias antimicrobianas¹³. En Argentina, en 2008 documentamos los primeros hallazgos clínicos de EB-MBL: un aislamiento de *Enterobacter cloacae* productor de IMP-8 y un aislamiento de *Providencia rettgeri* productor de VIM-2⁵. Luego, en 2012, se dio a conocer la existencia de un brote de *Serratia marcescens* productora de VIM-16 en pacientes pediátricos⁸. Los escasos informes clínicos de EB-MBL en Argentina presuponen que su aparición es un evento emergente.

El objetivo de esta comunicación es presentar las características clínicas y epidemiológicas de los pacientes, y las características microbiológicas y moleculares de las seis enterobacterias portadoras del gen *bla*_{IMP-8} detectadas en el Hospital Interzonal General de Agudos «Evita» (HIGA «Evita») de Lanús, Argentina.

Se estudiaron seis aislamientos de enterobacterias (EB) sospechosas de producir MBL: cuatro de ellos correspondían a *Enterobacter cloacae* (ECL-M9921, ECL-M13280, ECL-M13624 y ECL-M13795), uno a *Klebsiella oxytoca* (KOX-

M13063) y el restante a *Citrobacter freundii* (CFR-M13281). La identificación a nivel de especie de los aislamientos se realizó por pruebas bioquímicas manuales y por paneles del Sistema Phoenix Versión 5.83 A (Becton Dickinson, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los perfiles de sensibilidad se determinaron por difusión en agar con discos según las normas del *Clinical and Laboratory Standards Institute*² (CLSI). Los resultados obtenidos con fosfomicina y tigeciclina fueron interpretados de acuerdo a las recomendaciones del INEI-ANLIS «Dr. Carlos G. Malbrán»¹¹.

La concentración inhibitoria mínima (CIM) de los aislamientos se estudió empleando paneles del Sistema Phoenix Versión 5.83 A, interpretados de acuerdo al criterio del CLSI².

Para la búsqueda fenotípica de MBL se utilizó el criterio de sensibilidad intermedia o resistencia a carbapenems y presencia de sinergia entre el disco de EDTA/MAS (Laboratorios Britania, Argentina) y discos de carbapenems⁵. La detección de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) se realizó buscando la inhibición entre los discos de cefotaxima o ceftacidima, con el agregado de ácido clavulánico o sin este, en placas de agar Mueller Hinton, en presencia y en ausencia de 0,4 mM EDTA².

Se realizó PCR y secuenciación para detectar los genes *bla*_{PER-2}, *bla*_{CTX-M3}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{SPM}, *qnrB* y *aac(6')-Ib-cr*⁵. La cartografía de los integrones se realizó por PCR combinando cebadores específicos para *bla*_{IMP} con cebadores 5'CS (*int1*), 3'CS (*qacE Δ 1/sul1*) o *sul1*, o para el módulo *tniC* del Tn402.

La conjugación se realizó utilizando *Escherichia coli* J53 resistente a azida como cepa receptora y se seleccionó con 50 μ g/ml de ampicilina y 200 μ g/ml de azida⁵. La actividad enzimática frente a carbapenems se determinó por el método de Masuda, en ausencia y en presencia de EDTA⁶.

La relación genética entre los cuatro aislamientos de *E. cloacae* se investigó por electroforesis en campo pulsado (PFGE) digiriendo el ADN genómico con la enzima *Xba*I, y el análisis se realizó utilizando el criterio de Tenover^{7,14}.

De los pacientes en quienes se documentó la presencia de EB-MBL se registró la información clínico-epidemiológica disponible: edad, sexo, motivo de internación, enfermedad de base, servicio de procedencia, antibióticos recibidos con anterioridad, tiempo de permanencia en el hospital y evolución clínica. Se realizaron hisopados de pliegue inguinal, axilar y región perineal para detectar la portación de EB-MBL.

El trabajo contó con la aprobación del Comité de Ética de la Institución.

Tabla 1 Información clínico-epidemiológica de los casos de EB-MBL detectados en el Hospital Interzonal General de Agudos «Evita» de Lanús

Caso N.º de aislamiento	Edad (sexo)	Muestra	Sala	Motivo de ingreso	Duración de la estadía	Días de internación (días hasta el aislamiento)	Comorbilida- des	Evolu- ción
(1) ECL-M9921	81 (f)	Sangre	Ortopedia Clínica Médica	Fractura de cadera	11/08/08- 4/10/08	54 (5)	HTA/Chagas Diabetes	A
(2) KOX-M13063	80 (f)	Sangre	UTI	Abdomen agudo perforado	4/10/10- 16/10/10	12 (9)	HTA/IAM Divertículos	O
(3) CFR-M13281	56 (f)	Sangre	Cardiología- UCO	ICD descompensado	10/01/11- 14/02/11	35 (13)	Chagas MCP-HTA Hipotiroidismo Obesidad Tabaquismo	A
(4) ECL-13280	78 (f)	Sangre	Ortopedia	Fractura de cadera	04/01/11- 18/01/11	14 (10)	-	O
(5) ECL-M13624	53 (m)	Orina	UTI	IRA	15/07/11- 14/09/11	60 (23)	EPOC Etilismo Tabaquismo	A
(6) ECL-M13795	62 (f)	Sangre	Cirugía	Abdomen agudo	11/12/11- 13/02/12	60 (4)	-	A

EB-MBL: enterobacterias productoras de metalo- β -lactamasas; UTI: unidad de terapia intensiva; UCO: unidad coronaria; ICD: insuficiencia cardíaca derecha; IRA: insuficiencia respiratoria aguda; HTA: hipertensión arterial; IAM: infarto agudo de miocardio; MCP: miocardiopatía dilatada; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; A: alta; O: óbito.

Entre agosto de 2008 y diciembre de 2011 se detectaron seis casos de EB-MBL en el HIGA «Evita» de Lanús: el primero fue detectado en 2008, el segundo en 2010 y los cuatro casos restantes fueron aislados durante 2011 (tabla 1). Las EB-MBL se rescataron de cinco cultivos de sangre y uno de orina, de cinco mujeres y un varón, respectivamente, con una media de edad (rango) de 68 (53-81) años (tabla 1).

Los pacientes fueron internados por procesos agudos no infecciosos. Ningún paciente refirió internaciones durante los 12 meses previos, tampoco haber recibido antibioterapia antes de la hospitalización, con excepción de un paciente que recibió ampicilina-sulbactam. Cuatro pacientes padecían comorbilidades. Solo una mujer tenía una enfermedad condicionante de la respuesta inmune (diabetes). La media (rango) del tiempo de internación fue de 39 (12-60) días. En todos los pacientes los cultivos se tomaron luego del cuarto día del ingreso al hospital (tabla 1). Desde el punto de vista clínico, un caso se interpretó como un cuadro séptico con foco pulmonar, con buena evolución; otro caso como infección urinaria asociada a sonda vesical, y los restantes cuatro como bacteriemias

transitorias sin foco evidente. En todos los pacientes se aplicó aislamiento de contacto desde el momento de la sospecha de producción de carbapenemasa; en cinco casos se pudieron realizar cultivos de portación, y no se detectaron EB-MBL en las muestras estudiadas. En los dos casos de óbito, no se pudo asociar la presencia de MBL con la evolución del paciente.

En todos los aislamientos, se evidenció la actividad de carbapenemasa inhibible por EDTA y además todos fueron multirresistentes. La presencia de BLEE fue detectada fenotípicamente en cinco aislamientos y se correlacionó con la resistencia a aztreonam (tabla 2).

Los estudios moleculares confirmaron la presencia del gen *bla*_{IMP-8} en los seis aislamientos (tabla 2). El gen *bla*_{IMP-8} fue hallado como primer casete de un integrón de clase 1 en todos los casos. En tres aislamientos (ECL-M9921, ECL-M13795 y CFR-M13281), no se pudo detectar el extremo 3' del integrón utilizando los cebadores 3'CS, *sul1* y *tniC*. Estos elementos genéticos fueron transferibles por conjugación en los seis casos. Todos los transconjugantes exhibieron sensibilidad disminuida a los carbapenems al compararlos

Tabla 2 Resultados de las pruebas de sensibilidad, amplificación génica por PCR y secuenciación de las seis EB-MBL y sus transconjugantes													
N.º de aislamiento	Aislamientos clínicos						Transconjugantes (<i>E. coli</i>)						
	ECL- M9921	KOX- M13063	CFR- M13281	ECL- M13280	ECL- M13624	ECL- M13795	TC- M9921	TC- M13063	TC- M13281	TC- M13280	TC- M13624	TC- M13795	<i>E. coli</i> J53
Zona de inhibición (mm)													
Antibióticos													
Imipenem	17	21	21	19	17	20	18	20	22	18	26	24	31
Meropenem	15	22	21	20	19	23	19	23	22	22	28	29	40
Aztreonam	12	8	7	13	10	34	ND	38	35	40	12	40	36
Imipenem	8	8	4	4	8	4	≤1	≤1	≤1	2	≤1	4	≤1
Meropenem	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1
Ertapenem	>1	>1	1	>1	>1	>1	≤0,25	0,5	≤0,25	0,5	≤0,25	0,5	≤0,25
Ceftacídima	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	4	>16	>16	>16	>16	≤2
Ceftriaxona	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>4	≤1
Trimetoprima/ Sulfametoxazol	>2/38	>2/38	>2/38	>2/38	>2/38	>2/38	≤0,5/9,5	≤0,5/9,5	≤0,5/9,5	≤0,5/9,5	≤0,5/9,5	≤0,5/9,5	≤0,5/9,5
Ácido nalidíxico	≤8	>32	>32	≤8	≤8	>32	≤8	≤8	≤8	≤8	≤8	≤8	≤8
Ciprofloxacina	1	>2	2	1	1	1	≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125
Levofloxacina	≤1	4	≤1	≤1	≤1	2	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1
Colistina	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1
Fosfomicina c/g6P	>64	32	≤16	≤16	≤16	>64	≤16	≤16	≤16	≤16	≤16	≤16	≤16
Gentamicina	>8	>8	>8	>8	>8	8	≤2	≤2	8	≤2	>8	≤2	≤2
Amicacina	16	16	>32	≤8	8	32	≤8	≤8	≤8	≤8	≤8	≤8	≤8
Resultados de PCR													
Gen detectado													
<i>bla</i> _{IMP-8}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND
<i>bla</i> _{PER-2}	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	ND
EB-MBL: enterobacterias productoras de metalo-β-lactamasas; CIM: concentración inhibitoria mínima por sistema Phoenix; ND: no determinado.													

con la cepa dadora. El gen bla_{IMP-8} fue transferido independientemente de la BLEE en cuatro de los cinco casos estudiados (tabla 2).

En relación con la investigación de la resistencia plasmídica a fluoroquinolonas, los aislamientos CFR-M13281 y ECL-M13624 fueron positivos por PCR para el gen $qnrB$, mientras que ECL-M9921 y ECL-M13280 fueron positivos para $qnrB$ y $aac(6')-Ib-cr$. Los perfiles de restricción por PFGE de los cuatro aislamientos de *E. cloacae* portadores del gen bla_{IMP-8} demostraron que no estaban relacionados genéticamente (fig. 1).

En Argentina, a mediados de 2008 se documentó el primero de los seis aislamientos presentados en esta comunicación⁵. El hallazgo de ECL-M9921 en el HIGA «Evita» de Lanús constituyó el primer evento de detección de EB-MBL en la institución. Sin embargo, en el país existen antecedentes de carbapenemasas en *Pseudomonas* spp. y *Acinetobacter* spp.^{1,4,9,10,12}. La investigación epidemiológica reveló que ni los pacientes estudiados ni sus contactos viajaron a regiones donde se comunicó IMP-8^{3,15}. Ningún paciente refirió internaciones en instituciones con antecedentes de infecciones por bacilos gram negativos productores de MBL. Por todos estos antecedentes clínicos y epidemiológicos, el origen de los aislamientos permanece desconocido. Las medidas de aislamiento mostraron su efectividad, pues no se registraron nuevos casos de infección hasta la fecha.

Considerando las distintas especies de EB halladas, la ausencia de relación genética entre los aislamientos de *E. cloacae*, la capacidad conjugativa de los plásmidos portadores de MBL y la cronología de los aislamientos, se sospecha la diseminación horizontal intra e interespecie del gen bla_{IMP-8} .

La mayoría de los genes bla_{IMP} se encuentran codificados dentro de integrones de clase 1, que se localizan en transposones, y estos, en plásmidos¹⁵. Esto constituye un aparato genético de alta capacidad de movilización, que facilita la diseminación horizontal. Generalmente los genes bla_{IMP} coexisten con otros genes de resistencia^{3,15}. En este trabajo, cinco de los seis aislamientos fueron productores de PER-2, que fue transferible por conjugación, pero independientemente del gen bla_{IMP-8} , con excepción del caso de TC-M13624 (datos no mostrados). Esto indicaría que el gen bla_{PER-2} se encuentra en un plásmido distinto del que porta bla_{IMP-8} . Otras resistencias acompañantes halladas en elementos genéticos independientes de bla_{IMP} fueron determinantes de resistencia plasmídica a fluoroquinolonas (tabla 2).

Destacamos que la modificación de los puntos de corte recomendados por el CLSI para carbapenems en EB² permitió categorizar a estos aislamientos clínicos como no sensibles al menos a un carbapenem. La epidemia de KPC en Argentina ha inducido su búsqueda sistemática ante la sospecha de esta resistencia; pero en vistas a los hallazgos aquí documentados, se insiste en que no se debe omitir el ensayo de sinergia con discos de EDTA/MAS frente a toda EB con sensibilidad disminuida a carbapenems. La detección temprana de estos microorganismos multiresistentes, junto con la aplicación de medidas de control y la intensificación en la higiene de manos, fueron determinantes para contener su diseminación.

En este trabajo se documentan los primeros hallazgos de EB productoras de IMP-8 en Argentina.

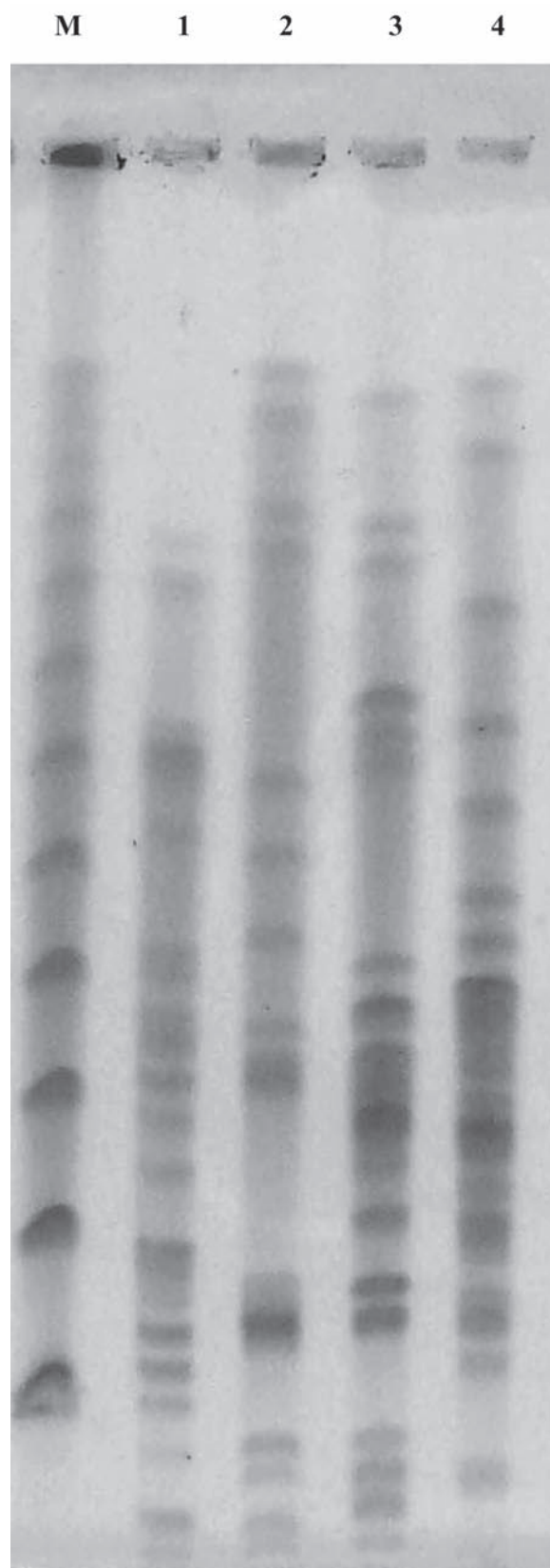


Figura 1 PFGE de ADN genómico digerido con *Xba*I de aislamientos clínicos de *Enterobacter cloacae* portadores del gen bla_{IMP-8} . M: Marcador de peso molecular PFG-Marker; calle 1: ECL-M9921; calle 2: ECL-M13280; calle 3: ECL-M13624; y calle 4: ECL-M13795.

Parte de este trabajo fue comunicado como póster en el VII Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas, SADEBAC, Buenos Aires, junio de 2012.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

A la Dra. Daniela Korbenfeld por su colaboración en este trabajo.

Bibliografía

- Andres P, Petroni A, Fernández A, Tokumoto M, Galas M, Pasterán F. Primer aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* (PAE) productor de metalo-β-lactamasa (MBL) en un centro médico de Buenos Aires: emergencia de IMP-16 en Argentina. Congreso SADEBAC 25 Aniversario, 2006, Resumen 16612, p. 191, Buenos Aires, Argentina.
- Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance Standards for Antimicrobial Testing; Twenty-Two Informational Supplement 2012. M100-S22 Wayne, Pa, USA.
- Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo-β-lactamases: a last frontier for β-lactams? *Lancet Infect Dis*. 2011;11:381-93.
- Fiorilli G, Faccione D, Lopardo H, Callejo R, Rapoport M, Prieto M, Galas M, Pasterán F. Emergence of metallo-β-lactamases in *Acinetobacter* spp. clinical isolates from Argentina. *Rev Esp Quimioter*. 2010;23:100-2.
- Gomez S, Rapoport M, Togneri A, Viegas-Caetano J, Faccione D, Corso A, Petroni A, Pasterán F. Emergence of metallo-β-lactamases in *Enterobacteriaceae* from Argentina. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;69:94-7.
- Marchiaro P, Mussi MA, Ballerini V, Pasterán 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.
- Melano R, Corso A, Petroni A, Centron D, Orman B, Pereyra A, Moreno N, Galas M. Multiple antibiotic-resistance mechanisms including a novel combination of extended-spectrum beta-lactamases in a *Klebsiella pneumoniae* clinical strain isolated in Argentina. *J Antimicrob Chemother*. 2003;52:36-42.
- Nastro M, Monge R, Zintgraff J, Vaulet LG, Boutureira M, Famiglietti A, Rodríguez CH. First nosocomial outbreak of VIM-16-producing *Serratia marcescens* in Argentina. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Jul 5. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03978.x.
- Pagniez G, Radice M, Cuirolo A, Rodríguez O, Rodríguez H, Vay C, Famiglietti A, Gutkind G. Prevalencia de metalo-β-lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenemes en un Hospital Universitario de Buenos Aires. *Rev Argent Microbiol*. 2006; 38:33-7.
- Pasterán F, Faccione D, Petroni A, Rapoport M, Vázquez M, Procopio A, Galas M. Novel variant (*bla*_{VIM-11}) of the 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.
- Pasterán F, Lucero C, Rapoport M, Guerriero L, Barreiro I, Albornoz E, Veliz O, Corso A. Tigecycline and intravenous fosfomicin zone breakpoints equivalent to the EUCAST MIC criteria for *Enterobacteriaceae*. *J Infect Dev Ctries*. 2012;6:452-6.
- Santella G, Cuirolo A, Almuzara M, Palombarani S, Sly G, Radice M, Gutkind G. Full resistance and decreased susceptibility to carbapenems in IMP-13-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from an outbreak. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54:1381-2.
- Sorlí L, Miró E, Segura C, Navarro F, Grau S, Salvado M, Horcajada J. Intra- and inter-species spread of carbapenemase genes in a non-hospitalized patient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011;30:1551-5.
- Tenover F, Arbeit R, Goering R, Mickelsen P, Murray B, Persing D, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 1995;33:2233-9.
- Zhao WH, Hu ZQ. IMP-type metallo-β-lactamases in Gram-negative bacilli: distribution, phylogeny, and association with integrons. *Crit Rev Microbiol*. 2011;37:214-26.