

Bioquímia

Volumen
Volume **30**

Número
Number **2**

Abril-Junio
April-June **2005**

Artículo:

Emergencia de la resistencia a carbapenemes en *Pseudomonas aeruginosa* productora de metalo- β -lactamasas

Derechos reservados, Copyright © 2005:
Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica, AC

Otras secciones de este sitio:

- ☞ Índice de este número
- ☞ Más revistas
- ☞ Búsqueda

Others sections in this web site:

- ☞ *Contents of this number*
- ☞ *More journals*
- ☞ *Search*



medigraphic.com

Emergencia de la resistencia a carbapenemes en *Pseudomonas aeruginosa* productora de metalo- β -lactamasas

Verónica Andrade*

RESUMEN

Los carbapenemes son agentes antimicrobianos usualmente activos contra agentes bacterianos multirresistentes; sin embargo, la resistencia a estos compuestos ha sido descrita en diversas regiones del mundo, considerado a este evento un problema global emergente. *Pseudomonas aeruginosa* es uno de los agentes etiológicos que con frecuencia es causante de infecciones nosocomiales, capaces de expresar mecanismos que generan la resistencia a diversos antimicrobianos, incluyendo carbapenemes. El principal mecanismo de resistencia a los carbapenemes en bacilos gram-negativos es la producción de β -lactamasas de la clase B, denominadas también metalo- β -lactamasas (M- β Ls), por requerir de iones zinc para su actividad enzimática. Se ha reportado que la distribución de las M- β Ls y el perfil de sustratos que hidroliza es diferente en cada región del mundo, considerando que la divergencia evolutiva de estas enzimas es el reflejo de la administración en la práctica clínica de los diferentes esquemas antimicrobianos y/o debido a la diseminación de clones endémicas multirresistentes. Hasta el momento se han descrito cuatro familias de M- β Ls: IMP, VIM, SPM y GIM, las cuales han originado diversas variantes con características catalíticas distintas, lo que complica la selección terapéutica. En esta revisión se describen las M- β Ls causantes de la resistencia a carbapenemes y la expresión de otras familias de β -lactamasas de espectro extendido que podrían contribuir a la resistencia de estos antimicrobianos.

Palabras clave: β -lactamasas de espectro extendido, carbapenemes, metalo- β -lactamasas.

INTRODUCCIÓN

Pseudomonas aeruginosa es considerado un organismo oportunista, relacionado con procesos infecciosos en plantas y animales. Se ha descrito que la altera-

ABSTRACT

Carbapenems are commonly active anti-microbial agents used against multiresistant bacterial agents. However, carbapenem resistance has been described in many regions of the world as an emergent global issue. *Pseudomonas aeruginosa* is one of the etiologic agents causing nosocomial infections and capable to express mechanisms that generate resistance to different anti-microbial agents, including carbapenems. The primary carbapenem-resistance mechanism in Gram-negative bacillus is the production of B-type lactamases, also called metallo- β -lactamases (M- β Ls), that require zinc ions for enzyme activity. It has been reported that the distribution of M- β Ls and the substrate profile they hydrolyze are different in each region of the world, considering that the evolutive divergence of these enzymes is a reflection of the clinical practice management of the various anti-microbial outlines and/or the dissemination of multi-resistant endemic clones. To this date, four families of M- β Ls have been described: IMP, VIM, SPM and GIM, which have caused different variables with distinct catalytic features, making the therapy choice even more difficult. In this review, we will describe the M- β Ls causing carbapenem-resistance and the expression of other extended-spectrum β -lactamase families that may contribute to the resistance of these anti-microbial agents.

Key words: metallo- β -lactamase, extended-spectrum betalactamase (ESBL), carbapenem.

ción de las barreras físicas debida a factores externos (líneas intravenosas, catéteres urinarios o tubos endotraqueales), son la causa principal de estos eventos; sin embargo, existen otras condiciones que promueven eventos infecciosos, tales como desórdenes en los

* Hospital del Niño Morelense. Cuernavaca, Mor.

Correspondencia:
M. en C. Verónica Andrade
Laboratorio Clínico, Hospital del Niño Morelense. Gómez Azcárate No 205, Col. Lomas de la Selva. C.P. 62270, Cuernavaca, Mor. Fax: 7773-11-38-02, e-mail: veroandrade@prodigy.net.mx.

Recibido: 07-02-2005
Aceptado: 13-05-2005

mecanismos de respuesta celular (neutropenia o iatrogénicos).^{1,2}

P. aeruginosa es uno de los principales organismos causantes de infecciones nosocomiales. En Estados Unidos, se reporta como el segundo agente relacionado con neumonías nosocomiales, además, el programa global para la vigilancia de la resistencia antimicrobiana “SENRY”, describe que la mayor prevalencia mundial es reportada en América Latina y la región del Pacífico de Asia con el 11.4% de aislamientos de *P. aeruginosa*, siendo Canadá y Estados Unidos los países con la prevalencia más baja (8.6%).³ En México diversos estudios reportan a este patógeno oportunista como la segunda causa de infecciones nosocomiales.^{4,5}

La disminución en los niveles de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos con frecuencia es observado en este organismo; particularmente, la emergencia de la resistencia a carbapenemes ha sido reportada en diversas regiones del mundo, considerando a este evento como un problema terapéutico creciente.^{6,7}

Los carbapenemes son antimicrobianos considerados dentro de la práctica clínica como la opción terapéutica en infecciones bacterianas severas, causadas por organismos multirresistentes. Estos compuestos son una clase de antibióticos β -lactámicos, derivados de diferentes especies de *Streptomyces*, presentan una cadena *trans*-hidroxietil en la posición 6 del anillo estructural β -lactámico que le confiere gran estabilidad frente a las β -lactamasas bacterianas. A diferencia de los β -lactámicos de primera, segunda y tercera generación, los carbapenemes carecen de la molécula de azufre, la cual ha sido sustituida por un carbono en la posición 4 de su núcleo bicíclico. El primer carbapenem empleado en la clínica fue el derivado de la tienamicina, denominado imipenem, que se formuló asociado a la cilastatina para impedir su hidrólisis por la deshidropeptidasa-I renal humana (DHP-I). El segundo carbapenem de uso terapéutico fue meropenem, estable a la DHP-I y el ertapenem diseñado para la administración parenteral.^{8,9}

Hasta el momento se conocen tres mecanismos por los cuales las bacterias impiden la actividad de los carbapenemes: la pérdida o reducción de la expresión de la porina OprD, expresión de bombas de expulsión y la producción de β -lactamasas.¹⁰⁻¹² Estudios basados en la estructura molecular de las β -lactamasas, describen dos clases de enzimas que hidrolizan carbapenemes: serin- β -lactamasas y metalo- β -lactamasas.¹³ En esta revisión se describirá las β -lactamasas responsables de la resistencia a carbapenemes identificadas en *P. aeruginosa*.

Resistencia a carbapenemes mediada por la producción de β -lactamasas

Las β -lactamasas son enzimas capaces de catalizar la hidrólisis del enlace amida del anillo penicilánico o cefalosporánico de los antibióticos β -lactámicos, produciendo derivados ácidos sin propiedades bactericidas. Las bacterias gram-negativas transportan las β -lactamasas al espacio periplásмico (límite de la pared celular y la membrana interna), estructura en la cual las enzimas reconocen a los antibióticos β -lactámicos para hidrolizarlos.^{14,15} Hasta el momento se reconocen cerca de 200 variantes diferentes, pero sólo algunas serin- β -lactamasas y metalo- β -lactamasas se distinguen por generar la resistencia a los carbapenemes.^{16,17}

El abuso de los antimicrobianos ha propiciado la selección de cepas productoras de β -lactamasas, las cuales se distinguen por presentar en la secuencia de aminoácidos la sustitución de uno o más aminoácidos cercanos al sitio activo enzimático, que favorecen un cambio en la conformación de la enzima, generando nuevas mutantes capaces de reconocer substratos que antes no hidrolizaban; a estas enzimas se les ha denominado β -lactamasas de espectro extendido (BLEE's).¹⁸ Las BLEE's se caracterizan por presentar en el sitio activo un residuo de serina, de ahí el nombre de serin- β -lactamasas, lo que les permite hidrolizar antibióticos β -lactámicos de amplio espectro. Las serin- β -lactamasas incluyen a las β -lactamasas de las clases A y D; las β -lactamasas de la clase A son expresadas con frecuencia en enterobacterias, quedando clasificadas dentro de las familias SHV, TEM, y CTX-M¹³ y las β -lactamasas SHV, PER, VEB y GES se expresan en bacilos gram-negativos no fermentadores de glucosa.¹⁹⁻²¹ Las serin- β -lactamasas, a diferencia de las M- β Ls, revelan una baja actividad catalítica y una disminución en la afinidad por los carbapenemes.²²

Serin- β -lactamasas

Las serin- β -lactamasas capaces de hidrolizar carbapenemes pertenecen a las familias VEB, GES y OXA. La familia VEB se caracteriza por presentar una alta afinidad para hidrolizar cefalosporinas de amplio espectro, en particular ceftazidima; hidrolizan carbapenemes aunque con poca afinidad, puede presentar una inhibición parcial con ácido clavulánico incluso en presencia de imipenem, mientras que en presencia de cefoxitina la enzima es inhibida totalmente.²³

Con relación a la familia GES, la primera variante mostraba una actividad catalítica pobre hacia los

β -lactámicos de amplio espectro, susceptibilidad intermedia a imipenem y, a diferencia de las β -lactamasas VEB, hidrolizaba cefoxitina. La emergencia de una nueva mutante denominada GES-2, se caracterizaba por presentar la sustitución de un aminoácido, modificando el sitio activo de la enzima y reconociendo un motivo específico de la estructura de imipenem, lo que reflejaba un aumento considerable en la hidrólisis de β -lactámicos de amplio espectro y de este carbapenem. A diferencia de GES-1, la actividad hidrolítica de GES-2 es más específica en presencia de cefotaxima que ceftazidima. A pesar de la mutación descrita en la secuencia de aminoácidos de GES-2, la hidrólisis hacia imipenem es parcial comparable con la actividad catalítica de las M- β Ls que generan altos niveles de resistencia.^{22,24,25}

La producción de serin- β -lactamasas de la familia OXA (pertenecientes a la clase D), son expresadas con mayor frecuencia en el cromosoma de bacilos gram-negativos no fermentadores. Estas enzimas se distinguen por reconocer un amplio perfil de sustratos, presentan actividad oxacilinasa y carbenicilinasa, son inhibidas débilmente con ácido clavulánico y tazobactam, la actividad de la enzima no es afectada en presencia de EDTA pero sí en presencia de cloruro de sodio. Por ensayos *in vitro* se ha determinado la concentración mínima inhibitoria (CMI) en aislamientos productores de OXA, revelando un rango de CMI para imipenem de 4 – 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y para meropenem de 8 \geq 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las variantes que expresan estos aislamientos son OXA-2, OXA-10, OXA-18, OXA-23 y OXA-24; sin embargo, ensayos sobre catálisis enzimática demuestran una actividad débil de las OXA en presencia de carbapenemes; por lo que la resistencia observada en aislamientos productores de β -lactamasas tipo OXA se relaciona con otros mecanismos, tales como la impermeabilidad celular y cambios en la estructura de porinas.²⁶⁻²⁸

Metalo- β -lactamasas (M- β Ls)

Las β -lactamasas de la clase B, denominadas también metalo- β -lactamasas (M- β L's) se caracterizan por presentar uno o dos iones de zinc cercanos al sitio activo, facilitando el reconocimiento y especificidad para la hidrólisis de los carbapenemes.²⁹ Los genes que codifican para estas enzimas con frecuencia se encuentran en el cromosoma bacteriano; sin embargo, estudios recientes describen la diseminación de M- β L's a través de elementos genéticos móviles, tales como integrones y plásmidos conjugativos que promueven la transferencia horizontal de M- β L's entre

diferentes especies bacterianas, lo que facilitará la divergencia evolutiva de estas enzimas.^{30,31}

En la última década la expresión de M- β L's se ha descrito en bacilos Gram negativos causantes de infecciones nosocomiales, considerando a estos agentes un factor de riesgo en el fracaso terapéutico y originando un incremento en los niveles de morbilidad y mortalidad.^{2,15,16} El problema de la resistencia a los carbapenemes se agudiza aún más, debido a que hasta el momento no existen inhibidores útiles para usarse en la terapia y que puedan ser recomendados ante la presencia de organismos productores de estas enzimas.^{32,33}

Las M- β Ls se distinguen de las serin- β -lactamasas por hidrolizar notablemente a los carbapenemes, además, no presentan actividad hidrolítica contra monobactams (aztreonam). Las M- β Ls se clasifican en tres grupos funcionales 3a, 3b y 3c. El grupo 3a hidroliza penicilinas y cefalosporinas de tercera generación, la actividad es más específica y rápida contra los β -lactámicos que contra el imipenem; este grupo de enzimas requiere de un suplemento adicional de iones divalentes de zinc para maximizar su actividad catalítica. Las del grupo 3b son denominadas "carbapenemasas verdaderas", por presentar una alta afinidad para hidrolizar carbapenemes y no pudiendo ser detectadas en presencia de la cefalosporina cromógena "nitrocefina". El grupo 3c, incluye sólo las M- β Ls de *Legionella* spp, siendo enzimas con alta actividad hidrolítica contra cefalosporinas.³⁴⁻³⁶

Clasificación de M- β L's

Con base en la secuencia de aminoácidos las M- β L's se clasifican en cuatro familias: IMP, VIM, SPM y GIM. La familia IMP fue encontrada por primera vez en Japón en un aislamiento de *S. maltophilia* y hasta la fecha se han descrito 18 variantes. Habitualmente son reportadas en *Pseudomonas* spp y *Serratia* spp. Las M- β L's pertenecientes a la familia IMP se distinguen por presentar altos niveles de resistencia a imipenem ($> 32 \mu\text{g}/\text{mL}$) y la hidrólisis para meropenem es mayor en presencia de la actividad de IMP.^{37,38}

La M- β L VIM fue descrita por primera vez en 1999 en Europa, esta familia de carbapenemasas se ha identificado en aislamientos de *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* spp; posteriormente, la variante VIM-2 fue descrita en Corea en aislamientos de *Serratia marcescens* y *Acinetobacter* spp, a partir de ese momento se han descrito cinco variantes más: VIM-3 que se describe por primera vez en Taiwán en aislamientos identificados como *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas stutzeri*; VIM-4 en *P. aeruginosa*, VIM-5 identificada en Grecia

en *K. pneumoniae*; y recientemente, VIM-6 fue encontrada en *E. coli* y VIM-7 en *P. aeruginosa*, reportada en Estados Unidos. La diseminación de esta familia en América Latina fue posterior a los hallazgos encontrados en Europa y Este de Asia.³⁹⁻⁴¹

El grupo SPM demuestra un perfil de hidrólisis único, ya que mantiene una cinética constante ante la presencia de β -lactámicos e inhibidores de β -lactamasas. Hasta el momento se describen dos variantes SPM-1 y SPM-2, éstas difieren de los grupos IMP y VIM por presentar un intervalo de hidrólisis mayor ante la presencia de penicilina y ampicilina, además de exhibir una catálisis disminuida para carbencilinas; así mismo, el grupo SPM es capaz de hidrolizar ticarcilina.⁴²

Por su parte, GIM-1 es la última familia de M- β L's descrita hasta el momento. Fue encontrada por primera vez en un brote intrahospitalario causado por *P. aeruginosa* en un hospital de Alemania. Esta familia presenta una relación estrecha con la variante IMP-1, mostrando un 40% de identidad con la secuencia de aminoácidos de IMP-1. GIM-1 al igual que IMP-1, hidroliza preferentemente ampicilina y penicilina, comparado con carbencilinas y ticarcilina; sin embargo, a diferencia de IMP-1, GIM-1 presenta una actividad enzimática mayor en presencia de los sustratos cefoxitina y cefalotina, además de mostrar una elevada afinidad catalítica para imipenem y meropenem, una diferencia más del resto de las familias de M- β L's, las cuales presentan mayor afinidad para imipenem que meropenem.⁴³

Epidemiología

Las M- β L's se expresan preferentemente en especies de bacilos Gram negativos no fermentadores de glucosa, siendo las pertenecientes al género *Pseudomonas* las encontradas con mayor frecuencias en aislamientos clínicos.^{40,44} El hallazgo reciente de aislamientos clínicos identificados como *K. pneumoniae*, reservorios de plásmidos conjugativos que codifican para los genes *bla*_{M- β L's} describen a este agente bacteriano como una fuente potencial de la diseminación de la resistencia a carbapenemes en enterobacterias.⁴⁵

En la década de los 80 se describió el primer hallazgo de la expresión de una M- β Ls que generaba resistencia a los carbapenemes, identificada en un aislamiento clínico de *Aeromonas hydrophila* en Japón, la enzima se encontraba codificada en el cromosoma bacteriano.⁴⁶ En 1991, en el mismo país se reportó la primera M- β Ls codificada en un plásmido móvil, por varios años la detección de aislamientos clínicos productores de M- β Ls se li-

mitó en Japón, encontrando con mayor frecuencia la familia IMP-1. Recientes estudios reportan la diseminación de esta enzima en el Sureste de Asia, Hong Kong y Singapur. La primera variante IMP-2 fue detectada en un aislamiento clínico de *Acinetobacter baumannii* en Europa; y en América Latina, los reportes de organismos productores de M- β Ls se describen en Canadá, Estados Unidos y Brasil, siendo la familia IMP la que prevalece en el continente.⁴⁷⁻⁴⁹

La segunda familia de M- β Ls descrita fue la denominada VIM, con siete variantes hasta el momento.⁴⁷ VIM-1 fue descrita por primera vez en un aislamiento de *P. aeruginosa* y simultáneamente en *Acinetobacter* spp en Italia.³⁹ La tercera familia de M- β Ls fue identificada en un aislamiento de *P. aeruginosa* en un paciente pediátrico oncológico atendido en un hospital de Brasil, esta β -lactamasa fue denominada SPM-1.⁴² Posterior a este hallazgo, un estudio multicéntrico realizado en ese país describió la diseminación de SPM-1 en cuatro hospitales ubicados en diferentes regiones de Brasil, encontrando que el 91% de las cepas expresaban esta enzima. En este estudio se describe la asociación de la diseminación de SPM-1 con una clona endémica de *P. aeruginosa*, considerando la persistencia de esta clona como un factor de riesgo en el aumento significativo de la resistencia a los carbapenemes en Brasil.⁸

La prevalencia de la expresión de M- β Ls en aislamientos clínicos hasta el momento se ha mantenido en niveles no comparables con la expresión de β -lactamasas de espectro extendido de la clase A. Es probable que la limitada diseminación de las M- β Ls expresadas en diferentes especies bacterianas se deba a que los genes que codifican para estas enzimas se encuentren en elementos genéticos que carecen de la maquinaria necesaria para promover la transferencia horizontal de *bla*_{M- β L's} a la mayor parte de los patógenos bacterianos. Hasta hace algunos años la vía de diseminación de M- β L's a miembros de la familia Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa* y otros bacilos gram-negativos no fermentadores de glucosa se desconocía,⁹ sin embargo, en los últimos cinco años un gran número de reportes describen que la mayor parte de *bla*_{M- β L's} se encuentran incluidos en plásmidos conjugativos.^{30,31} Los genes M- β L's codificados en plásmidos conjugativos le confieren a las bacterias un gran potencial para la diseminación de estos genes a otros patógenos nosocomiales. El extenso perfil de sustratos que hidrolizan las M- β L's y la participación de elementos genéticos móviles contribuirá sin duda a la rápida diseminación de la multirresistencia entre las diferentes especies bacterianas.²³

Estudios recientes han demostrado que la hidrólisis de carbapenemes y β -lactámicos de amplio espectro pueden incrementarse significativamente debido a la expresión simultánea de más de una β -lactamasa de espectro extendido perteneciente a la clase A y una β -lactamasa de la clase B. Estos hallazgos se reportaron por primera vez en Italia, en una cepa de *P. aeruginosa*, las β -lactamasas identificadas fueron las de las familias PER-1 y VIM-1.^{5,51}

Por otra parte, se ha demostrado la expresión dual de M- β L's y β -lactamasas de la clase A o D en bacilos gram-negativos, lo que sugiere que es el producto de la acumulación de determinantes de resistencia impuestos en una cepa bacteriana, la cual persiste en un ambiente en donde se ejerce una presión debido a la presencia de carbapenemes y β -lactámicos que origina la selección de cepas con la expresión simultánea de estas enzimas. La selección del fenotipo de resistencia a carbapenemes y β -lactámicos de amplio espectro, probablemente se vea favorecido debido a la elección de un esquema terapéutico con estos antimicrobianos administrados en infecciones causadas por estos organismos.^{6,20}

Finalmente, la prevalencia y la detección de β -lactamasas responsables de la resistencia a carbapenemes en bacilos gram-negativos es diferente en cada región del mundo. El abuso de la administración de β -lactámicos y carbapenemes es un factor importante en la generación y selección de organismos multirresistentes, que en el futuro limitará la elección de esquemas terapéuticos para el tratamiento de infecciones agudas, amenazando la vida del paciente. La epidemiología y monitoreo de cepas productoras de M- β L's ayudará a la predicción de fenotipos de resistencia relacionados con este mecanismo de resistencia y contribuirá al conocimiento sobre la evolución de estas β -lactamasas.

REFERENCIAS

- Lee SC, Fung CP, Liu PY, Wang TC, See LC, Lee N, et al. Nosocomial infections with ceftazidime resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and outcome. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999; 20: 205-207.
- Ramphal R, Small PM, Shands JWJ, Fischlschweiger W, Small PAJ. Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to tracheal cells injured by influenza infection or by endotracheal intubation. *Infect Immun* 1980; 27: 614-619.
- Andrade S, Jones R, Gales A, Sader H. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin American medical centers: 5 year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 140-141.
- Vilar-Compte D, Mohar A, Sandoval S, de la Rosa M, Gordillo P, Volkow P. Surgical site infections at the National Cancer Institute in Mexico: a case-control study. *Am J Infect Control* 2000; 28: 14-20.
- Sifuentes J, Guerrero MC, Ponce de León G, Guerrero ML. Trends for bacteremia and risk factors for death in a tertiary hospital in Mexico City. 1981-1982. *Gac Med Mex* 2001; 137: 191-202.
- Docquier JD, Luzzaro F, Amicosante G, Toniolo A, Rossolini GM. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing PER-1 extended-spectrum serine- β -lactamase and VIM-2 metallo- β -lactamase. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 910-911.
- Galleni M, Lamotte-Brasseur J, Rossolini GM, Spencer J, Didieberg O, Fre're JM. The Metallo- β -lactamase Working Group. Standard numbering scheme for class B β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 660-663.
- Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader SH. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenemes-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 699-702.
- Hirakata Y, Izumikawa K, Yamaguchi T, Takemura H, Tanaka H, Yoshida R, et al. Rapid detection and evaluation of clinical characteristics of emerging multiple-drug-resistant gram-negative rods carrying the metallo- β -lactamase gene blaIMP. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 2006-2011.
- Li Y, Mima T, Komori Y, Morita Y, Kuroda T, Mizushima T, et al. A new member of the tripartite multidrug efflux pumps, Mex VW-OprM, in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 572-575.
- Livermore DM. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenemes. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47: 247-250.
- Koh TH, Babini GS, Woodford N, Sng LH, Hall LM, Livermore DM. Carbapenem-hydrolysing IMP-1 β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* from Singapore. *Lancet* 1999; 353: 2162.
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1211-1233.
- Ambler RP. The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1980; 289: 321-331.
- Bush K. Metallo- β -lactamases: a class apart. *Clin Infect Dis* 1998; 27 (Suppl 1): 48-53.
- Shannon K, King A, Phillips I. β -Lactamases with high activity against imipenem and Sch 34343 from *Aeromonas hydrophila*. *J Antimicrob Chemother* 1986; 17: 45-50.
- Bratu S, Landaman D, Alam M, Tolentino E, Quale J. Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Enterobacter* spp. from Brooklyn, New York. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 776-778.
- Levesque C, Pyche L, Larose C, Roy PH. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 185-191.
- Poirel L, Rotimi VO, Mokaddas EM, Karim A, Nordmann P. VEB-1-like extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*, Kuwait. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 468-470.
- Poirel L, Weldhagen GF, De Champs C, Nordmann P. A nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the extended-spectrum beta-lactamase GES-2 in South Africa. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 561-565.
- Vahaboglu H, Coskunkan F, Tansel O, Ozturk R, Sahin N, Koksal I, et al. Clinical importance of extended-spectrum beta-lactamase (PER-1-type)-producing *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J Med Microbiol* 2001; 50: 642-645.
- Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, De Champs C, Dove MG, Nordmann P. GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2598-2603.

23. Poirel L, Nordmann P. Acquired carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases and their genetic support. *Curr Pharm Biotechnol* 2002; 3: 117-127.
24. Dubois V, Poirel L, Marie C, Arpin C, Nordmann P, Quentin C. Molecular characterization of a novel class 1 integron containing bla(GES-1) and a fused product of aac3-Ib/aac6'-Ib' gene cassettes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 638-645.
25. Girlich D, Naas T, Leelaporn A, Poirel L, Fennewald M, Nordmann P. Nosocomial spread of the integron-located veb-1-like cassette encoding an extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Thailand. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 603-611.
26. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 15-22.
27. Poirel L, Girlich D, Naas T, Nordmann P. OXA-28, an extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and its plasmid- and integron-located gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 447-453.
28. Philippon LN, Naas T, Bouthors AT, Barakett V, Nordmann P. OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2188-2195.
29. Madgwick P, Waley SG. Beta-lactamase I from *Bacillus cereus*. Structure and site-directed mutagenesis. *J Biochem* 1987; 15: 657-662.
30. Ito H, Arakawa Y, Ohsuka S, Wacharotayankun R, Kato N, Ohta M. Plasmid-mediated dissemination of the metallo- β -lactamase gene *bla*_{IMP} among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 824-829.
31. Iyobe S, Yamada H, Minami S. Insertion of a carbapenemase gene cassette into an integron of a *Pseudomonas aeruginosa* plasmid. *J Antimicrob Chemother* 1996; 38: 1114-1115.
32. Gibb AP, Tribuddharat C, Moore RA, Louie TJ, Krulicki W, Livermore DM, et al. Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new *bla*(IMP) allele, *bla*(IMP-7). *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 255-258.
33. Chu YW, Afzal-Shah M, Houang ET, Palepou MI, Lyon DJ, Wodford N, et al. IMP-4, a novel metallo- β -lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 710-714.
34. Wang ZW, Fast W, Valentine AM, Benkovic SJ. Metallo- β -lactamases: structure and mechanism. *Curr Opin Chem Biol* 1999; 3: 614-622.
35. Rossolini GM, Condemi MA, Pantanella F, Docquier JD, Amicosante G, Thaller MC. Metallo- β -lactamase producers in environmental microbiota: new molecular class B enzyme in *Janthinobacterium lividum*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 837-844.
36. Docquier JD, Pantanella F, Giuliani F, Thaller MC, Amicosante G, Galleni M, et al. CAU-1, a subclass B3 metallo- β -lactamase of low substrate affinity encoded by an ortholog present in the *Caulobacter crescentus* chromosome. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1823-1830.
37. Franceschini N, Caravelli B, Docquier JD, Galleni M, Frere JM, Amicosante G, et al. Purification and biochemical characterization of the VIM-1 metallo- β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 3003-3007.
38. Hanson ND, Hossain A, Buck I, Moland ES, Thomson KS. IMP-18 in *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. Program and abstracts of the 44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, D.C; abstr. C1-291; 2004.
39. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, et al. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1584-1590.
40. Toleman MA, Rolston K, Jones R, Walsh T. blaVIM-7, an evolutionarily distinct metallo- β -lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 329-332.
41. Yan JJ, Hsueh PR, Ko WC, Luh KT, Tsai SH, Wu HM, et al. Metallo- β -lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2224-2228.
42. Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50: 673-679.
43. Castanheria M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a β -lactamase gene, *bla*_{GIM-1}, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 4654-4661.
44. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis* 2002; 34: 634-640.
45. Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H, et al. Molecular characterization of an enterobacterial metallo- β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 71-78.
46. Massidda OG, Rossolini M, Satta G. The *Aeromonas hydrophila* *cphA* gene: molecular heterogeneity among metallo- β -lactamases. *J Bacteriol* 1991; 173: 4611-4617.
47. Oh EJ, Lee S, Park YJ, Park JJ, Park K, Kim SI. Prevalence of metallo-beta-lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean university hospital and comparison of screening methods for detecting metallo-beta-lactamase. *J Microbiol Methods* 2003; 54: 411-418.
48. Riccio MA, Franceschini N, Boschi L, Caravelli B, Cornaglia G, Fontana R, et al. Characterization of the metallo- β -lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of *bla*IMP allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1229-1235.
49. Costa F, Teixeira L, Siquiera G, Nouer A, Pinto de Oliveira M, Mello JL, et al. Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2420-2424.
50. Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2385-2392.
51. Pournaras S, Tsakris A, Maniatis M, Tzouvelekis LS, Maniatis AN. Novel variant (*bla*VIM-4) of the metallo- β -lactamase gene *bla*VIM-1 in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 4026-4028.