

Carbapenemasas KPC en *Enterobacteriaceae* aisladas en un Hospital de Maracaibo, Venezuela

KPC Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae isolated in a Maracaibo's Hospital, Venezuela

**Gómez-Gamboa, Liliana^{1*};
Perozo-Mena, Armindo²; Lugo, Judith³;
Bermúdez-González, José⁴; Zabala, Irene⁵
y Morales, Ever⁴**

¹Unidad Curricular Bacteriología y Virología.
Facultad de Medicina. Universidad del Zulia.

²Unidad Curricular Práctica Profesional de Bacteriología.
Facultad de Medicina. Universidad del Zulia.

³Centro Clínico María Auxiliadora, Coro, Estado Falcón.

⁴Laboratorio de Bioquímica y Microorganismos Fotosintéticos.
Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia.

⁵Laboratorio de Genética y Biología Molecular.
Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia.

*liliana_gomezgamboa@yahoo.com

Resumen

Los antibióticos carbapenemes representan generalmente los últimos recursos para el tratamiento de infecciones asociadas a los servicios de salud producidas por bacterias Gram negativas multiresistentes. Es preocupante que esta situación esté siendo amenazada en todo el mundo por la aparición de cepas con resistencia a estos antibióticos debido a la producción de Carbapenemasas. Observando este panorama, se caracterizaron tanto fenotípica como genotípicamente las cepas de *Enterobacteriaceae* productoras de Carbapenemasas tipo KPC aisladas en un Hospital de la región Zuliana, durante 2009 a 2013. Fueron detectadas 423 cepas de *Enterobacteriaceae* resistentes a los carbapenemes debido a la producción de estas enzimas (36,29%). Los pacientes más afectados fueron adultos de sexo masculino procedentes de la Unidad de Terapia Intensiva. El sitio de colonización más frecuente fue el tracto respiratorio, mientras que el estado de portador rectal fue poco frecuente. Las KPC fueron detectadas principalmente en *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E.*

Recibido: 03-07-14 / Aceptado: 19-07-14

coli y *E. cloacae*, siendo multidrogo-resistentes y extensamente drogo-resistentes. La mayoría de los métodos fenotípicos utilizados permitieron confirmar la presencia de Carbapenemasas y la detección del gen *bla*_{KPC} confirmó que las carbapenemasas que circulan en cepas de *Enterobacteriaceae* de nuestra región son del tipo KPC.

Palabras clave: *Enterobacteriaceae*, carbapenemasas KPC, susceptibilidad, antibióticos.

Abstract

Carbapenems have generally been considered the pharmacotherapy of last resort for managing infections associated with health services caused by multidrug-resistant gram-negative bacteria. However, it is worrisome that this situation is being threatened worldwide with the appearance of bacterial strains that resist these antibiotics due to the production of novel β -lactamases with direct carbapenem-hydrolyzing activity (carbapenemases). This study was performed to characterize KPC carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* isolated from a hospital in the Zulia region during 2009-2013 in terms of their geno- and phenotypes. KPC carbapenemase production was detected in 423 strains of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (36.29%). The most affected patients were male adults from the intensive care unit. The most common site of colonization was the respiratory tract, while rectal carrier status was rare. These KPC carbapenemases were detected mainly in *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E.coli* and *E. cloacae*. Most isolates showed multidrug-resistance and an extensively drug-resistant phenotype. The majority of the phenotypic methods were effective for the detection of KPC producers in *Enterobacteriaceae* isolates and the presence of *bla*_{KPC} gene confirmed that the Carbapenemase circulating in *Enterobacteriaceae* strains in this region are the KPC type.

Key words: *Enterobacteriaceae*, KPC carbapenemase, antibiotic susceptibility.

Introducción

Los antibióticos carbapenemes representan generalmente, los últimos recursos para el tratamiento de infecciones asociadas a los servicios de salud producidas por bacterias Gram negativas multiresistentes, debido a su amplio espectro de actividad y estabilidad frente a la mayoría de las β -lactamasas. Es preocupante que esta situación esté siendo amenazada en todo el mundo por la aparición de cepas con resistencia a estos antibióticos (1).

La resistencia a los carbapenemes puede involucrar varios mecanismos combinados, siendo la producción de β -lactamasas con capacidad de hidrolizar específicamente a los carbapenemes el más prevalente (2).

Las Carbapenemasas representan la familia más versátil de β -lactamasas (4), dentro de las cuales las KPC tienen el mayor potencial para diseminación debido a su localización en plásmidos (5). Adicionalmente, los patógenos productores de carbapenemasas ocasionan infecciones difíciles de tratar y con altas tasas de mortalidad debido a la resistencia a múltiples antibióticos (1), por lo que el conocimiento epidemiológico local y la caracterización de la resistencia se han convertido en una necesidad imperiosa para seleccionar las medidas adecuadas y definir terapias empíricas en hospitales (5). Observando este panorama, se decidió caracterizar fenotípicamente y genotípicamente las cepas de *Enterobacteriaceae* productoras de Carbapenemasas

(EPC) tipo KPC aisladas de pacientes de una institución hospitalaria de la región Zuliana, Venezuela.

Material y Método

Se realizó una investigación descriptiva, transversal, no experimental (6). Por tratarse de un estudio cualitativo con una población infinita, se aplicó la fórmula descrita por Daniel (7) para calcular el tamaño de la muestra, por lo que se seleccionaron para su caracterización fenotípica y genotípica 126 cepas de *Enterobacteriaceae* resistentes a los Carbapenemes aisladas de diferentes cultivos en un Hospital de Maracaibo, durante el período comprendido entre enero de 2009 hasta diciembre de 2013.

Aislamiento e identificación de cepas de Enterobacteriaceae: las muestras de los pacientes fueron procesadas de acuerdo a los procedimientos de microbiología clínica descritos por la Sociedad Americana de Microbiología (8). La identificación a nivel de especies de los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* se confirmó siguiendo el esquema diagnóstico propuesto por Farmer y col. (9), Nataro y col. (10) y Abbott (11).

Caracterización fenotípica de la resistencia a Carbapenemes: la determinación de la resistencia a los antibióticos se realizó por el método de difusión con discos en agar descrito por Bauer-Kirby (12), siguiendo las recomendaciones del Instituto para la Estandarización de los Laboratorios Clínicos, según sus siglas en inglés CLSI (13). Para la detección de producción de carbapenemasas se han propuesto una serie de ensayos no moleculares, dentro de los cuales se encuentra la sinergia de doble disco entre ácido clavulánico o tazobactam y cualquier carbapenem (14). Además, para mejorar la confirmación de carbapenemasas, se han estandarizado

varias estrategias con la adición de inhibidores reversibles de enzimas clase C, como cloxacilina, oxacilina y ácido borónico. Los derivados del ácido borónico, pero no de oxacilina, inhiben enzimas KPC y al resto de los miembros de la familia de carbapenemasas clase A. El uso de métodos basados en estos inhibidores resulta en reducciones significativas de los resultados falsos positivos, además de la distinción de cepas productoras de carbapenemasas clase A de aquellas cepas productoras de otras clases de carbapenemasas (15). En la presente investigación, la detección fenotípica de la producción de Carbapenemasas tipo KPC se realizó a través del Método de discos combinados, utilizando discos de amoxicilina/ácido clavulánico (10 µg) y ácido borónico (300 µg) a una distancia máxima de 15 mm entre los discos de meropenem, imipenem o ertapenem, de tal forma que el sinergismo sugirió la presencia de enzimas carbapenemasas tipo KPC (14,16). Por otra parte, en el presente estudio se realizó el ensayo de Hodge modificado (MHT) para la detección de producción de Carbapenemasas (13), el cual puede ayudar en la confirmación de la presencia de estas enzimas, pero no detecta exclusivamente el tipo KPC (14). La producción de la enzima es detectada cuando la cepa problema permite el crecimiento de una cepa susceptible a los carbapenemes (*E. coli* ATCC 25922) hacia un disco de carbapenem (incremento del crecimiento), resultando una hoja de trébol característica.

Detección de colonización de EPC en personal de salud y ambiente: la detección de colonización rectal y respiratoria de EPC en el personal de salud y en muestras ambientales se realizó impregnando el hisopo con la muestra en 5 mL de caldo soya triptica-sa conteniendo un disco de 10 µg de un carbapeneme. Además, se inoculó un caldo soya triptica-sa con 0,5 mL de una suspensión de

1×10^5 ufc/mL de un aislamiento conocido productor de carbapenemasa como control de calidad (CRB-1549-09). Después de incubación en aerobiosis durante toda la noche a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, se mezcló y subcultivaron $100 \mu\text{L}$ en agar MacConkey, buscando después de 18-24 h de incubación a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, colonias fermentadoras o no de la lactosa (17).

Detección genotípica de la producción de Carbapenemasas tipo KPC: las técnicas moleculares continúan siendo el “gold standard” para la identificación precisa de los genes de carbapenemasas. Las principales desventajas de la tecnología molecular son el costo, el requerimiento de microbiólogos entrenados y la incapacidad de detectar genes nuevos no identificados (18). En la presente investigación se utilizó un método de lisis alcalina de extracción rápida, para lo cual se sembró el microorganismo en estudio en una placa de agar sangre y se incubó de 18 a 24 horas a $35^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ en aerobiosis. Posteriormente, se tomaron con ayuda de un asa estéril 10 colonias que fueron resuspendidas en un tubo eppendorf de 1,5 ml conteniendo $400 \mu\text{l}$ de buffer de lisis (10mM Tris HCl [pH 8,0]; 1mM EDTA [pH 8,0]). Luego se agregaron $40 \mu\text{l}$ de SDS al 10% y $10 \mu\text{l}$ de proteinasa K (250ng/ μl) y se incubó por 1 hora a 50°C ; transcurrido el tiempo de incubación, se agregaron $400 \mu\text{l}$ de una mezcla 1:1 de fenol/cloroformo, se mezcló bien en vortex y se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 minutos, se separaron la fase acuosa y se trasvasaron a un nuevo tubo eppendorf. Posteriormente, se agregó 1 ml de etanol absoluto y se precipitó toda la noche a -20°C ; al día siguiente se centrifugó durante 20 minutos a 14.000 rpm y se descartó el sobrenadante por inversión para luego agregar $400 \mu\text{l}$ de etanol al 70%, centrifugar durante 5 minutos a 14.000 rpm, decantar el etanol por inversión, dejar secar al aire el tubo abierto sobre una servilleta por

30 minutos; luego, el sedimento fue resuspendido con $50 \mu\text{l}$ de buffer TE (10mM Tris HCl pH 8; 1mM EDTA pH 8) y se guardó en congelación a -20°C hasta el momento de la amplificación (19).

Se utilizó la técnica de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar las secuencias completas del gen *bla_{KPC}F* y *bla_{KPC}R*, con los primers oligonucleótidos F 5'-TGT CAC TGT ATC GCC GTC-3' y R 5'-CTC AGT GCT CTA CAG AAA ACC-3'. Para la amplificación se utilizaron $100 \mu\text{l}$ de un volumen total de mezcla de reacción que contiene: $0,5 \mu\text{M}$ de cada primer; $200 \mu\text{M}$ de cada dNTP; 2mM de MgCl_2 y 2,5 U de ADN Taq Polimerasa en buffer de reacción 1X proporcionado por el fabricante (PROMEGA®). Las mezclas de PCR fueron sometidas a un ciclo térmico (5 minutos a 95°C y 35 ciclos de 1 minuto a 95°C ; 30 segundos a 58°C y extensión a 72°C por 1 minuto y 30 segundos). A continuación, un ciclo de extensión final en el termociclador a 72°C por 10 minutos. Después del último ciclo los productos fueron conservados a 4°C (19).

La detección de amplificados se realizó mediante una electroforesis con gel de agarosa al 1% en TBE 0,5x. En el gel, se cargó un control de peso molecular con bandas desde 100 bp hasta 1Kb y en el resto de los pocillos, entre 10 y $20 \mu\text{l}$ del producto de PCR. Cuando el frente de avance de las muestras llegó al final del gel, se apagó la fuente de poder, se extrajo el gel y se tiñó con bromuro de etidio ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) durante 30 minutos. El gel para la detección de amplificados se visualizó sobre un transiluminador de luz ultravioleta. La reacción de amplificación para *bla_{KPC}* se consideró positiva si se observó una banda única de 1000bp (19).

Adicionalmente para validar las corridas de PCR, se corrieron controles, los cuales contenían todos los componentes del PCR con el ADN de una cepa control negativa

CRB-1769-09 y un control positivo CRB-1549-09, esto con la finalidad de demostrar tanto la ausencia de la banda en el gel de agarosa (control negativo) como la presencia de la misma (control positivo).

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete SPSS para Windows®, versión 19. Se determinó la prevalencia de cepas de *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenemes; además, se realizó el análisis descriptivo de las variables en estudio. Para las variables cualitativas, se utilizó el Chi cuadrado para determinar la independencia entre el género, la edad y los tipos de cultivos de muestras de pacientes con la KPC. El nivel de significación estadística se estableció para una $p < 0,05$ con intervalos de confianza del 95%.

Resultados

Durante un período de cinco (5) años, se procesaron un total de 24.589 cultivos para análisis bacteriológico, de los cuales 24.251 (98,63%) correspondieron a muestras clínicas de pacientes, 55 (0,22%) a hisopados de superficies ambientales, 73 (0,30%) a hisopados de manos del personal de salud y 210 (0,85%) a cultivos para detección de portadores respiratorios y fecales en el personal de salud (Tabla 1). En el período de estudio fueron aisladas 423 cepas de EPC tipo KPC a partir de las muestras procesadas, obteniendo una prevalencia de 1,72% (423/24589).

Los más altos porcentajes de EPC tipo KPC se registraron principalmente en pacientes del sexo masculino (55,83%; 225/403), adultos entre 31 y 59 años (31,76%; 128/403) y menores de 3 meses de edad (30,02%; 121/403). Sin embargo, el 72,46% (292/403) de las EPC tipo KPC se aislaron de pacientes adultos entre 18a y 90a. Al analizar por chi cuadrado el estado de por-

tador y compararlo con el género de los participantes, se obtuvo que las diferencias encontradas no son estadísticamente significativas ($p < 0,05$), por lo que la única asociación existente entre estas dos circunstancias es el azar. Por otra parte, al analizar por chi cuadrado el estado de portador y compararlo con la edad de los pacientes, no se obtuvo diferencias significativas ($p < 0,05$), por lo que el hecho de tener una u otra edad no es favorecedor del estado de portador de cepas de KPC.

De los 423 cultivos positivos para KPC, la mayoría fueron secreciones traqueales (183/423, 42,26%), seguidos de hemocultivos (62/423, 14,66%) y 11,11% (47/423) de secreciones de heridas. Es importante resaltar que en el presente estudio el 48,17% de los pacientes fueron portadores respiratorios (197/409), mientras que el 4,16% fueron portadores fecales (17/409). Además, estas cepas KPC también fueron aisladas de hisopados de superficies ambientales del hospital (14/423; 0,06%) (pisos, mesones, colchones, conexiones del ventilador y oxígeno, incubadoras, teclado de computadora y dispensador de jabón), hisopados de uñas y manos del personal de salud (3/423; 0,01%) y a partir de exudado faríngeo del personal de salud que labora en la institución (3/423; 0,01%) (Tabla 1).

Por otra parte, las carbapenemasas KPC fueron detectadas principalmente en *Klebsiella pneumoniae* (75,41%), *Klebsiella oxytoca* (8,51%), *Escherichia coli* (6,15%) y *Enterobacter cloacae* (5,67%) (Tabla 2). Con respecto a la distribución de las *Enterobacteriaceae* KPC aisladas según servicios del Hospital, el 70,69% (299/423) de las cepas fueron aisladas de la Unidad de Terapia Intensiva (UTI), mientras que el 8,04% (34/423) fueron aisladas de Hospitalización de Medicina Interna, el 6,62% (28/423) de Pediatría; el 4,73% (20/423) de

Tabla 1. Distribución de cultivos procesados en el Laboratorio de Bacteriología de un Hospital de Maracaibo, Venezuela. Período 2009-2013.

Tipos de cultivo	Año					Total	Cultivos KPC positivos
	2009	2010	2011	2012	2013		
Muestras clínicas de pacientes	1132	5637	7538	6099	3845	24251 (98,63%)	403 (1,64%)
Hisopados de Superficies Ambientales	0	41	1	11	2	55 (0,22%)	14 (0,06%)
Hisopados de Manos del Personal de Salud	0	70	0	2	1	73 (0,30%)	3 (0,01%)
Exudado Faríngeo Personal de Salud	59	87	0	0	0	146 (0,59%)	3 (0,01%)
Coprocultivo Personal de Salud	14	50	0	0	0	64 (0,26%)	0
Total	1205	5885	7539	6112	3848	24589	423 (1,72%)

Tabla 2. Distribución de especies de *Enterobacteriaceae* productoras de Carbapenemasas KPC aisladas de un Hospital de Maracaibo, Venezuela. Período 2009-2013.

Especies de <i>Enterobacteriaceae</i> KPC	2009	2010	2011	2012	2013	Total	
						Nº	%
<i>K. pneumoniae</i>	44	119	32	79	45	319	75,41
<i>K. oxytoca</i>		2	9	18	7	36	8,51
<i>E. coli</i>		1	8	4	13	26	6,15
<i>E. cloacae</i>		3	11	6	4	24	5,67
<i>E. aerogenes</i>				1	8	9	2,13
<i>P. agglomerans</i>			1		2	3	0,71
<i>C. freundii</i>			1	2		3	0,71
<i>M. morgani</i>			1		1	2	0,47
<i>S. marcescens</i>				1		1	0,24
Total	44	125	63	111	80	423	100

Neonatología, 3,78% (16/423) de Observación adultos, 2,36% (10/423) tanto de Cirugía como de Obstetricia y 1,42% (6/423) de Trauma/Shock.

Es importante destacar que el 71,43% (10/14) de las EPC tipo KPC que fueron aisladas en hisopados ambientales, eran provenientes

de la UTI y el 21,43% (3/14) de Neonatología. Asimismo, éstas también fueron detectadas en las manos del personal de salud de UTI y neonatología con 66,7% y 33,3% respectivamente. Mientras que el personal de salud portador respiratorio de EPC fue sólo de UTI.

Tabla 3. Resistencia a los antibióticos en especies de *Enterobacteriaceae* productoras de Carbapenemasas tipo KPC aisladas de un Hospital de Maracaibo. Período 2009-2013.

Antibióticos	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>E. coli</i>	<i>E cloacae</i>
Ampicilina	100	100	96,15	100
Amp/sulbactam	100	100	100	100
Amox/ácido clav	99,26	96,55	94,74	100
Carbenicilina	100	100	100	100
Ticarcilina	100	100	100	100
Piperacilina	100	100	100	100
Pip/Tazobactam	100	100	100	100
Aztreonam	100	100	100	100
Imipenem	97,72	88,89	87,5	93,75
Meropenem	97,80	96,66	93,75	92,31
Ertapenem	97,56	100	100	100
Cefazolin	100	100	100	100
Cefamandol	100	100	100	100
Cefuroxime	100	100	100	100
Cefoxitin	93,46	85,71	84,62	94,12
Cefoperazona	99,09	90,57	93,10	100,00
Cefotaxime	100,00	100	100	93,75
Ceftazidima	97,65	100	94,44	100
Ceftriaxone	100	100	100	100
Cefepime	90,57	100	100	94,74
Cefpodoxime	100	100	100	100
Cloranfenicol	76,69	14,29	63,64	53,33
Amikacina	66,44	4,76	23,08	71,43
Gentamicina	70,09	19,05	100	100
Netilmicina	50,93	23,8	81,82	78,57
Tobramicina	97,15	45,45	100	100
Tetraciclina	81,05	11,11	85,71	91,66
Tigeciclina	33,18	16,66	36,36	55,55
Trimeto/sulfamet	86,82	21,05	88,24	75
Colistin	3,19	0	0	0
Polimixina B	3,19	0	0	0
Nitrofurantoína	100	100	100	50
Ácido Nalidíxico	96,88	94,12	75	100
Ciprofloxacina	83,55	72,73	85,71	77,78
Levofloxacina	81,43	61,54	81,25	81,25

La resistencia a los agentes antimicrobianos en las cepas de EPC tipo KPC aisladas se puede observar en la Tabla 3. Las cepas de *K. pneumoniae* productoras de KPC fueron altamente resistentes a todos los antibióticos β -lactámicos (>90%). Igualmente se observó alta resistencia (>70%) frente al cloranfenicol (C), tetraciclina (Te), trimetoprim/sulfametoxazole (Sxt) y fluoroquinolonas; la resistencia a los aminoglucósidos fue superior al 50%; el menor porcentaje de resistencia se observó frente a tigeciclina (Tgc) y sólo dos de las cepas aisladas mostraron resistencia a colistin (Cl), tanto por el método del disco como por E-test (48 μ g/mL), resultados que fueron confirmados en un Centro de Referencia de la región. Por el contrario, las cepas de *K. oxytoca* mostraron baja resistencia al C, Te, Sxt y a los aminoglucósidos. La resistencia a los antibióticos observada en *E. coli* y *E. cloacae* fue similar a la de *K. pneumoniae*. Las cepas de *E. aerogenes* mostraron alta resistencia a todos los antibióticos β -lactámicos, baja resistencia al C (25%),

Te (25%) y a algunos aminoglucósidos (Ak 50%, Gm 25%, Net 28,57%, Nn 42,86%) y fueron susceptibles a las fluoroquinolonas. Las cepas de *P. agglomerans* mostraron alta resistencia a todos los antibióticos β -lactámicos, C, Sxt y fluoroquinolonas pero fueron susceptibles a los aminoglucósidos, Te y Tgc. Los aislamientos de *C. freundii* sólo mostraron baja resistencia a Net (33,33%) y susceptibilidad a Tgc y fluoroquinolonas, mientras que *M. organii* mostró susceptibilidad sólo a C, aminoglucósidos y fluoroquinolonas y *S. marcescens* sólo fue susceptible a C, Sxt y a las fluoroquinolonas.

La resistencia a los antibióticos debido a producción de Carbapenemasas tipo KPC en las cepas de *Enterobacteriaceae* aisladas durante 5 años en el Centro de Salud estudiado fue de 36,29% (Figura 1).

En la presente investigación, el gen *bla*_{KPC} fue detectado en todas las cepas de *Enterobacteriaceae* productoras de Carbapenemasas KPC correspondientes al tamaño de la muestra (Figura 2).

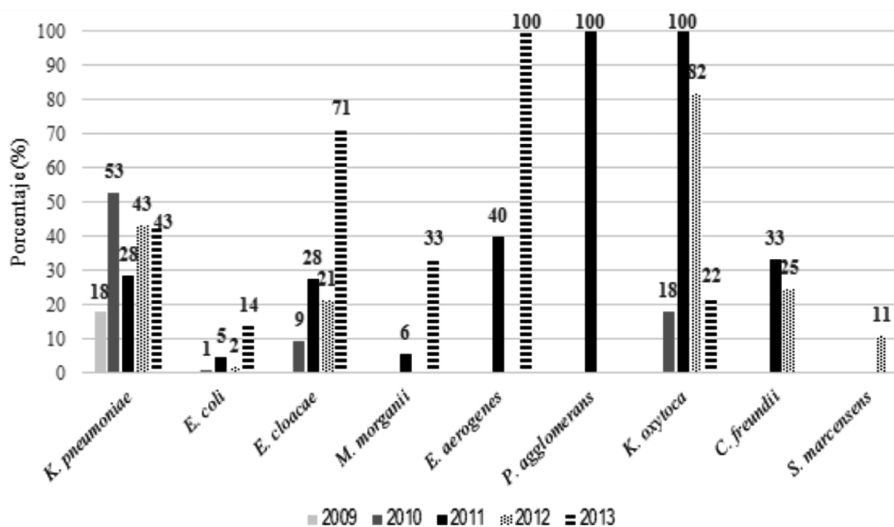


Figura 1. Resistencia a los antibióticos debido a la producción de Carbapenemasas KPC en *Enterobacteriaceae* aisladas de un Hospital de Maracaibo, Venezuela. 2009-2013.

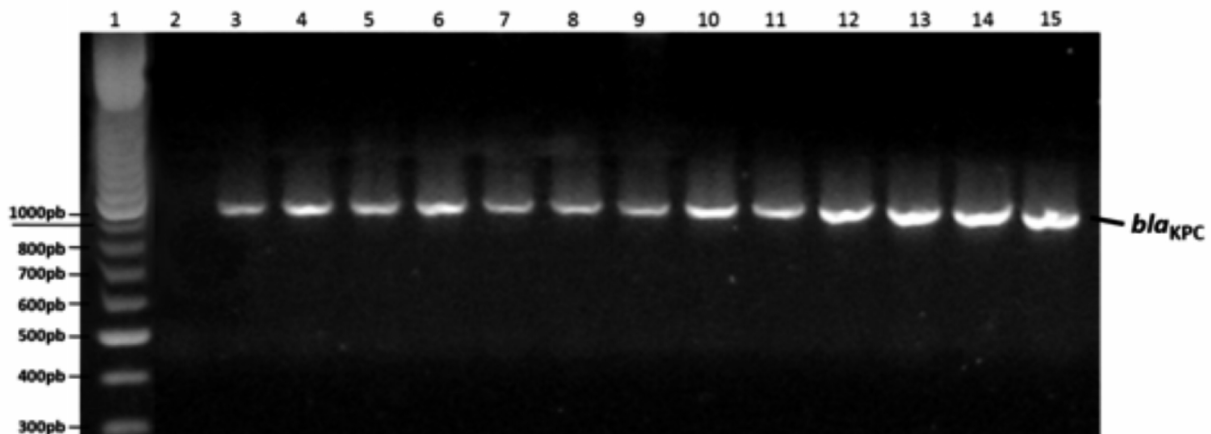


Figura 2. Electroforesis para detección del gen *bla*_{KPC} mediante PCR en cepas de *Enterobacteriaceae* productoras de carbapenemasas aisladas de un Hospital de Maracaibo, Venezuela. 2009-2013; en el carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 control negativo, carril 3 control positivo y carriles 4-15 muestras aisladas de pacientes.

Discusión

La primera *K. pneumoniae* productora de KPC fue aislada en Carolina del Norte en 1996 y hasta el año 2004 estas enzimas sólo se encontraron en Estados Unidos, siendo descrito el primer brote fuera de América en Tel Aviv, Israel en 2006. En Colombia, China, Grecia, Brasil y Argentina solo recientemente se han reportado casos aislados de carbapenemasas tipo KPC (20).

En Venezuela, la resistencia conferida por serino carbapenemasas en años anteriores fue nula, ya que todos los estudios reflejaron 100% de sensibilidad a los carbapenemes (21). No obstante, en el presente estudio se encontró una prevalencia de EPC tipo KPC de 1,72%, similar a la reportada por otras investigaciones que refieren entre 1,2% y 3,3% en diferentes ciudades de EEUU y en Francia la prevalencia estimada por un estudio estuvo entre 3 y 5%. Sin embargo, otros estudios en ambos países han obtenido prevalencias inferiores, desde 0,03% hasta 0,16% (20,22).

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran, tal como señala Marcano y col. (23), 2011 en un estudio realizado en Caracas, Venezuela, en el cual detectaron 1,9% de carbapenemasas tipo KPC en *E. cloacae* y *K. pneumoniae*, cuán variante puede ser la situación en diferentes períodos de tiempo, en relación con el uso de antibióticos y la aparición de nuevos mecanismos de resistencia. En Maracaibo, un estudio previo, realizado en 2009, mostró una prevalencia de 3,65% (24) y diversos Boletines en el Centro de Referencia Bacteriológica del Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo (CRB-SAHUM), también a partir de 2009, han reportado resistencias debido a KPC desde 1,79% hasta 42,25% (25-28). Por lo tanto, el problema ha comenzado a tener resultados alarmantes tanto en Venezuela como en otros países. En China un estudio reportó 32,6% de EPC (29); mientras que el país Europeo en el cual se han reportado más casos hasta el momento es Grecia, donde la situación ha sido descrita como endémica, con una resistencia a los carbapenémicos en enterobacterias de

46% (20,30). Es preocupante que los resultados obtenidos en la presente investigación sean superiores, ya que en *K. pneumoniae* el más alto porcentaje de resistencia debido a producción de estas enzimas por año fue 53%, mientras que en los aislamientos de *E. cloacae* fue 71% y en *K. oxytoca* fue de 100% (Figura 1).

En el presente estudio, las EPC fueron principalmente aisladas a partir de secreciones traqueales, resultados que pueden atribuirse a que en las UTI, generalmente los pacientes están conectados a respiradores artificiales, por lo que pueden presentar mayor riesgo de adquirir infecciones respiratorias (31).

Es importante resaltar que en el presente estudio casi un 50% de los participantes fueron portadores respiratorios y el 4,16% fueron portadores fecales; por lo que se hace importante e imprescindible el control de estos portadores, debido a que constituyen una fuente importante de transmisión a otros pacientes que ingresan a la unidad y al personal que labora en la misma. También cabe destacar que las EPC tipo KPC fueron aisladas del personal de salud que labora y atiende a los pacientes de la UTI y también a partir de muestras ambientales, los cuales constituyen otras fuentes de diseminación y transmisión de las KPC. Los pacientes con una colonización con KPC no reconocida serán reservorios para la transmisión y brotes de la misma. Por lo tanto, además de las prácticas de control de infecciones, deben realizarse cultivos de vigilancia a todos los pacientes internados en la misma unidad donde se confirma la KPC. Adicionalmente, todos los pacientes positivos deben ser colocados en precauciones de contacto y el control de los brotes puede ser difícil si no hay una estricta adherencia a las prácticas de control de infecciones (32).

Por otra parte, a nivel mundial se han detectado carbapenemasas tipo KPC además de en *K. pneumoniae*, en *K. oxytoca*, *Serratia spp.*, *Enterobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *C. freundii*, *E. coli*, *S. marcescens* y *P. aeruginosa* (33), similar a lo obtenido en la presente investigación, donde estas enzimas fueron detectadas en diversas especies de *Enterobacteriaceae*.

La alta resistencia a los carbapenemes obtenida en el presente estudio es similar a la descrita por otras investigaciones (34, 35). Aunque el Etp no es el mejor sustrato hidrolizado, parece ser la mejor molécula para la detección de producción de carbapenemasas en la práctica rutinaria. Sin embargo, la resistencia a Etp por sí misma no es un marcador de expresión de KPC, debido a que su resistencia puede incrementarse por otros factores, como la producción de BLEE y AmpC asociada con defecto de la membrana externa. Similar a lo obtenido en la presente investigación, en otros estudios (36, 37) los aislamientos productores de KPC mostraron los más altos porcentajes de susceptibilidad (100%) frente a Polimixina B (Pb) y Tgc y alta resistencia a Ipm, Fep, Etp, Cro, Atm, Caz, Fox y Cip; mientras que a diferencia de los resultados del presente estudio, estas investigaciones obtuvieron alta sensibilidad frente a An y Mem. En otras investigaciones (33, 38) los aislamientos fueron resistentes a todos los antibióticos β -lactámicos ensayados, incluyendo las combinaciones con ácido clavulánico y cloxacilina (inhibidores de β -lactamasas clase A y C respectivamente); excepto algunas cepas que permanecieron susceptibles a aminoglucósidos, fluoroquinolonas y tetraciclinas, mientras que otras cepas fueron resistentes a Nn, An y Cip, mostrando susceptibilidad a Tgc, Gm y CL. En Argentina fueron reportados aislamientos de

K. pneumoniae y *C. freundii* productores de KPC-2 con resistencia variable a los antibióticos (39). Igualmente, las cepas de KPC aisladas en la presente investigación mostraron resistencia a los diferentes antimicrobianos similares a los obtenidos por las contrapartes aisladas en el CRB-SAHUM (25-28). Es importante resaltar que desde su aparición en el 2009, se han evidenciado cambios en la susceptibilidad a los antibióticos de las cepas KPC aisladas en el Centro de Salud estudiado; aumentando la resistencia a los aminoglucósidos (Gm, An y Net) y tigeciclina, mientras que por el contrario ha disminuido la resistencia a Sxt, Te, Na, fluoroquinolonas y C y se detectó por primera vez resistencia a colistin en *K. pneumoniae* después de tres años de la aparición de las EPC en el centro de salud estudiado.

Magiorakos y col. (40) elaboraron una propuesta internacional de definiciones provisionales para la resistencia bacteriana adquirida, en la cual se describieron 16 categorías de antimicrobianos significativos epidemiológicamente en *Enterobacteriaceae*, clasificando a las bacterias en multidrogo-resistentes (MDR), extensamente drogo-resistentes (XDR) y pan-drogo-resistentes (PDR). El patrón MDR fue definido como la no susceptibilidad al menos a un agente en tres o más categorías de antimicrobianos; el XDR como no susceptible al menos a un agente en todas las categorías pero permanece susceptible a una o dos categorías de antimicrobianos y el PDR fue definido como no susceptibilidad a todos los agentes en todas las categorías de antimicrobianos. Es importante resaltar que de las 423 cepas de *Enterobacteriaceae* KPC aisladas en la presente investigación, el 53,43% (226/423) fueron catalogadas como extensamente drogo-resistentes, mientras que el 46,57% (197/423) fueron clasificadas como multi-drogo resistentes, lo que consti-

tuye un grave problema de salud pública en esta institución hospitalaria.

En la presente investigación, todos los aislamientos de EPC tipo KPC correspondientes al número de muestras mostraron resultados positivos con el MHT. Sin embargo, por este método, se han reportado tasas de falsos positivos superiores al 25% entre no productores de carbapenemasas. Estos hallazgos inesperados fueron observados entre bacterias productoras de CTX-M (CTX-M-2, CTX-M-15 y CTX-M-59) con susceptibilidad uniformemente disminuida a ETP o hiperproductores de AmpC, por lo que Nordmann y col.(18) consideran que esta técnica consume mucho tiempo y debe ser descartada, así como también puede carecer de sensibilidad para detectar actividad de carbapenemasa en *Enterobacter* spp. En la presente investigación, ninguna de las cepas KPC mostró resultados positivos con el método del disco combinado utilizando AmC entre los carbapenemes, posiblemente debido a que las carbapenemasas KPC son débilmente inhibidas por el ácido clavulánico y el tazobactam (41). Por el contrario, en el presente estudio todos los aislamientos de *Enterobacteriaceae* KPC fueron inhibidos por 300 µg de ácido borónico frente a imipenem y meropenem. Una serie de ensayos no moleculares han sido propuestos para la detección de actividad carbapenemasa, dentro de los cuales están el Ensayo Indirecto de Carbapenemasa, la detección de actividad de carbapenemasa utilizando un espectrofotómetro UV, la utilización del espectrofotómetro de masa y el Ensayo Carba NP, un ensayo bioquímico basado en la hidrólisis *in vitro* de Ipm que detecta todas las carbapenemasas conocidas en *Enterobacteriaceae* (pertenecientes a las clases A, B y D de Ambler), así como también cualquier nueva carbapenemasa emergente, a diferencia de las técnicas moleculares (18).

Los tipos de carbapenemasas varían de acuerdo a los diferentes países. En India el tipo de carbapenemasa que predomina es NDM-1, mientras que en Estados Unidos, Grecia, Israel, Europa, China, América central y del Sur y el Reino Unido predomina notablemente el tipo KPC, al igual que en Venezuela; por otra parte el tipo OXA-48 predomina en Turkia, Tunes y Marruecos (23, 33, 42).

K. pneumoniae productora de KPC-1 fue detectada por primera vez en 2001 y desde esa época, se han hecho varios reportes alrededor del mundo, incluyendo América del Sur (38). En Argentina las carbapenemasas han producido brotes de grandes magnitudes al punto que han generado alarmas epidemiológicas. Las carbapenemasas de Clase A de tipo KPC son las que mayormente se han propagado y aislado en este país, al igual que en muchos países de Latinoamérica (15). En Brasil, la primera detección de KPC-2 fue en 2006. Debido a que las cepas productoras de KPC-2 se han establecido en América Latina, es necesario enfatizar la necesidad de programas de vigilancia local para prevenir la amplia diseminación de estas cepas (43). Igualmente, debido a las opciones terapéuticas limitadas acoplado con la diseminación en escala de *K. pneumoniae* resistente a carbapenemes, es imperativa la vigilancia y detección temprana e implementación de medidas de control de infecciones efectivas en hospitales (44). Aunque en Venezuela son escasos los datos que demuestran resistencia a los carbapenemes en *Enterobacteriaceae*, la presente investigación sugiere que las EPC tipo KPC están emergiendo en los centros hospitalarios de nuestro país desde el año 2009, lo que representa un impacto importante en la organización de la atención en salud venezolana. Los resultados obtenidos en esta investigación deben alertar a las autoridades médi-

cas para establecer métodos rigurosos de detección, control y propagación de nuevas carbapenemasas en entornos hospitalarios. La identificación de mecanismos de resistencia ayudará en la determinación de la epidemiología, factores de riesgo y estrategias terapéuticas apropiadas para los aislamientos resistentes a carbapenemes (36). La aparición de EPC en todo el mundo es hoy en día un importante problema de salud médica y pública, ya que puede conducir a callejones terapéuticos sin salida (42). Afortunadamente, Tzouvelekisy col. (45) mostraron la contención exitosa de las EPC mediante la aplicación de medidas como los cultivos de vigilancia activa, la separación de los portadores y la asignación de personal de enfermería especializado. El tratamiento de las infecciones ocasionadas por KPC es difícil debido a que la mayoría de los aislamientos son resistentes a todos los antibióticos β -lactámicos, fluoroquinolonas y aminoglucósidos. Basados en los datos de susceptibilidad, colistin y tigeciclina se utilizan comúnmente para el tratamiento de éstas infecciones. Sin embargo, además del incremento de informes de cepas KPC resistentes a éstos antibióticos (20), un estudio reveló altos porcentajes de falla en los casos de monoterapia con estos fármacos, mientras que la monoterapia con un carbapenem o un aminoglucósido pareció ser más eficaz, logrando mayores tasas de éxito con combinaciones que contienen carbapenem (45). Por otra parte, otra investigación (46) utilizó como tratamiento frente a las EPC, ertapenem con doripenem o meropenem, obteniendo una respuesta exitosa sin recaída durante el seguimiento. Igualmente la fosfomicina ha sido utilizada exitosamente para el tratamiento de organismos productores de KPC susceptibles *in vitro* a este antibiótico y varios investigadores (20,47), han demostra-

do un efecto sinérgico con la utilización de fosfomicina en combinación con otros agentes, como los aminoglucósidos.

En la presente investigación, las cepas de *Enterobacteriaceae* presentaron altos porcentajes de resistencia debido a la producción de Carbapenemasas tipo KPC, siendo los pacientes más afectados por estas cepas los adultos de sexo masculino ingresados en la UTI. El sitio de colonización más frecuente por las KPC en estos pacientes fue el tracto respiratorio, mientras que el estado de portador rectal fue poco frecuente. Las cepas de EPC tipo KPC aisladas del ambiente y de pacientes del Hospital estudiado fueron multi-drogo resistentes y extensamente drogo-resistentes, detectando por primera vez en cinco años en esta institución una cepa de *K. pneumoniae* resistente a colistin. La mayoría de los métodos fenotípicos empleados en el presente estudio permitieron confirmar la presencia de Carbapenemasas en todas las cepas de *Enterobacteriaceae* aisladas y la presencia del gen *bla_{KPC}* confirmó que las carbapenemasas que circulan en cepas de *Enterobacteriaceae* de nuestra región son del tipo KPC.

Referencias Bibliográficas

- (1) Marchiaro P, Ballerini V, Spalding T, Cera G, Mussi M, Morán-Barrio J et al. A convenient microbiological assay employing cell-free extracts for the rapid characterization of Gram-negative carbapenemase producers. *J Antimicrob-Chem* 2008; 62: 336-344.
- (2) Suárez C, Kattan J, Guzman A, Villegas M. Mecanismos de resistencia a carbapenemes en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae* y estrategias para su prevención y control. *Infectio* 2006; 10 (2): 85-93.
- (3) Tafur J, Torres J, Villegas M. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infectio* 2008; 12 (3): 217-226.
- (4) Queenan A, Bush K. Carbapenemasas: the versatile β -lactamase. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20 (3): 440-458.
- (5) De la Lastra V, Ulloa MT, Pinto M, Vidal M, Silva F. Serinocarbapenemasas de clase A en enterobacterias. *Rev. Hosp. Clin, Univ, Chile* 2010; 21: 232-237.
- (6) Hernández-Sampieri R, Fernández-Collado C, Baptista-Lucio P. Metodología de la Investigación. Cuarta Edición. Mc-Graw-Hill Interamericana; 2006. p. 882.
- (7) Daniel Wayne. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. Cuarta edición. Limusa Wiley. 2008. p. 752.
- (8) García L, Isenberg H. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Volume 1. Second edition updated. Washington D.C. ASM Press; 2007. p. 2516.
- (9) Farmer J, Boatwright K, Janda M. *Enterobacteriaceae*: Introduction and Identification. In: Murray P, Baron E, Jorgensen J, Landry ML, Pfaller MA. *Manual of Clinical Microbiology*. Volume 1. 9th edition. Washington D.C.: ASM Press; 2007. pp 649-652.
- (10) Nataro J, Bopp C, Fields P, Kaper J and Strockbine N. *Escherichia, Shigella and Salmonella*. In: Versalovic J, editor in chief, Carroll K, Funke G, Jorgensen J, Landry M, Warnock D, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 10th edition. Volume 1. Washington, DC: ASM PRESS; 2011. pp 603-626.
- (11) Abbott Sharon L. *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas, and other Enterobacteriaceae*. In: Versalovic J, editor in chief, Carroll K,

- Funke G, Jorgensen J, Landry M, Warnock D, editors. Manual of Clinical Microbiology. 10th edition. Volume 1. Washington, DC: ASM PRESS; 2011. pp. 639-657.
- (12) Bäuer A, Kirby W, Sherris J, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Amer J Clin Pathol.* 1966; 45 (32): 493-496.
- (13) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Nineteenth Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, editor. M100 S23. 2013.
- (14) Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 2009; 9 (4):228-236.
- (15) Pasteran F, Mendez T, Rapoport M, Guerriero L, Corso A. Controlling false-positive results obtained with the Hodge and Masuda assays for detection of class A carbapenemase in species of *Enterobacteriaceae* by incorporating Boronic Acid. *J Clin Microbiol* 2010; 48 (4):1323-1332.
- (16) Livermore D, Brown D. Detection of β -lactamase-mediated resistance. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48: 59-64.
- (17) CDC. Laboratory Protocol for Detection of Carbapenem-Resistant or Carbapenemase-Producing, *Klebsiella* spp. and *E. coli* from Rectal Swabs. Disponible en: http://www.cdc.gov/hai/pdfs/labsettings/klebsiella_or_ecoli.pdf.
- (18) Nordmann P and Poirel L. Strategies for identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother.* 2013. 68:487-489.
- (19) Woodford N, Tierno P, Young K, Tysall L, Palepou E, Ward R et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase, KPC3, in a New York medical center. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:4793-4799.
- (20) Chen L, Anderson D, Paterson D. Review Overview of the epidemiology and the threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) resistance. *Inf Drug resistance* 2012; 5:133-141.
- (21) Perozo A, Castellano M. Caracterización molecular y detección de Betalactamasas de espectro extendido en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* aisladas en las unidades de cuidados intensivos de un Hospital Universitario. *Kasmera* 2007; 35(2):91-106.
- (22) Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 2011; 17 (10): 1791-1797.
- (23) Marcano D, De Jesús A, Hernández L, Torres L. Frecuencia de enzimas asociadas a sensibilidad disminuida a betalactámicos en aislados de enterobacterias Caracas, Venezuela. *Rev Panam Salud Pub* 2011; 30 (6): 529-534.
- (24) Gómez-Gamboa L. Caracterización fenotípica y genotípica de Carbapenemasas tipo KPC en *Klebsiella pneumoniae* aisladas de pacientes de la Unidad de Cuidados Intensivos de un Centro de Salud de Maracaibo. Trabajo de Ascenso para optar a la Categoría de Profesor Agregado de la Universidad del Zulia. Facultad de Medicina, Escuela de Medicina. LUZ. Maracaibo-Venezuela; Marzo 2013. p. 104.
- (25) Pineda M, Bonilla X, Perozo-Mena A. Boletín de Resistencia Bacteriana CRB-SAHUM 2009. Décima Edición. Maracaibo-Venezuela; 2011. p. 81.
- (26) Bonilla Lucartt X, Pineda Sánchez M, Perozo Mena A. Boletín sobre Resistencia Bacteriana 2011. Centro de Referencia Bacteriológica. Servicio Autónomo

- Hospital Universitario de Maracaibo. Décima Primera Edición. Maracaibo, Venezuela; Agosto 2012.
- (27) Bonilla Lucartt X, Pineda Sánchez M, Perozo Mena A. Boletín sobre Resistencia Bacteriana 2012. Centro de Referencia Bacteriológica. Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo. Décima Segunda Edición. Maracaibo-Venezuela; Junio 2013.
- (28) Bonilla Lucartt X, Pineda Sánchez M, Perozo Mena A. Boletín sobre Resistencia Bacteriana 2013. Centro de Referencia Bacteriológica. Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo. Décima Tercera Edición. Maracaibo-Venezuela; Julio 2014.
- (29) Yang Q, Wang H, Sun H, Chen H, Xu Y. Phenotypic and Genotypic Characterization of *Enterobacteriaceae* with decreased susceptibility to carbapenems: Results from Large Hospital- Based Surveillances in China. *Antimicrob Agents Chemother* 2009 [Epub ahead of print].
- (30) Souli M, Galani I, Giamarellou H. Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. *Euro Surveill* 2008; 13:pii:19045.
- (31) Albarado L, García J, Rodríguez E, Carpio C, Salazar E, Flores E et al. Frecuencia de enterobacterias nosocomiales productoras de β -lactamasas de espectro extendido, Cumana-Venezuela. NOVA publicación Científica en Ciencias Biomédicas 2009. 7: 110.
- (32) Calfee D, Jenkins SG. Use of active surveillance cultures to detect asymptomatic colonization with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in intensive care unit patients. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008; 29:966-968.
- (33) Woodford N, Zhang J, Warner M, Kaufmann M, Matos J, MacDonald A et al. Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62:1261-1264.
- (34) Tenover F, Kalsi R, Williams P, Carey R, Stocker S, Lonsway D et al. Carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* not detected by automated susceptibility testing. *Emerg Infect Dis* 2006; 12(8): 1209-1213.
- (35) Anderson K, Lonsway D, Rasheed J, Biddle J, Jensen B, McDougal LK et al. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2007; 45 (8): 2723-2725.
- (36) Peirano G, Seki L, Val Passos V, Pinto M, Guerra L, Asensi M. Carbapenem hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63:265-8
- (37) Fehlberg L, Carvalhob A, Campanaa E, Gontijo-Filhoc P, Galesa A. Brief communication Emergence of *Klebsiella pneumoniae*-producing KPC-2 carbapenemase in Paraíba, Northeastern. Brazil *Braz J Infect Dis* 2012; 16 (6):577-580.
- (38) Monteiro J, Santos A, Asensi M, Peirano G, Gales A. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 333-334.
- (39) Pasteran F, Otaegui L, Guerriero L, Radice G, Maggiora R, Rapoport M. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina. *Emerg Infect J Home Dis* 2008; 14 (7): 1178-1180.
- (40) Magiorakos A, Srinivasan A, Carey R, Carmeli Y, Falagas M, Giske C et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pan drug-resistant bacteria: an international expert proposal for

- interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18: 268–281.
- (41) Yigit H, Queenan A, Anderson G, Domenech-Sanchez A, Biddle J, Steward CD et al. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:1151– 1161.
- (42) Vaux S, Carbonne A, Thiolet J, Jarlier V, Coignard B, RAISIN and Expert Laboratories Groups. Emergence of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in France, 2004 to 2011. *Euro Surveill.* 2011; 16 (22): Available online:<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19880>.
- (43) Pavez M, Mamizuka E, Lincopan N. Early Dissemination of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chem* 2009; 53(6): 2702.
- (44) Le J, Castanheira M, Burgess D, McKee B, Iqbal R, Jones R. Clonal Dissemination of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase KPC-3 in Long Beach, California. *J Clin-Microbiol* 2010; 48 (2): 623-625.
- (45) Tzouvelekis L, Markogiannakis A, Psichogiou M, Tassios P, Daikos G. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev* 2012; 25 (4):682-707.
- (46) Giamarellou H, Galani L, Baziaka F, Karaiskos I. Effectiveness of a Double-Carbapenem Regimen for Infections in Humans Due to Carbapenemase-Producing Pan drug-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57 (5): 2388-2390.
- (47) Cai Y, Fan Y, Wang R, An M, Liang B. Synergistic effects of aminoglycosides and fosfomycin on *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and biofilm infections in a rat model. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64 (3):563-566.