



Kasmera

ISSN: 0075-5222

ISSN: 2477-9628

Universidad del Zulia

Perozo-Mena, Armindo; Castellano-González, Maribel; Ling, Eliana; Gómez, Liliana; Ginestre, Messaria; Rincón, Gresleida
Presencia de carbapenemasa tipo KCP en aislados clínicos de *K. pneumoniae* de pacientes de unidades de cuidados intensivos
Kasmera, vol. 44, núm. 1, 2016, Enero-Julio, pp. 44-52
Universidad del Zulia

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=373061519007>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en redalyc.org

LUZMA redalyc.org

Sistema de Información Científica Redalyc
Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Presencia de carbapenemasa tipo KPC en aislados clínicos de *K. pneumoniae* de pacientes de unidades de cuidados intensivos

Presence of KPC type carbapenemase in *K. pneumoniae* clinical isolates from intensive care unit patients

**Perozo-Mena Armindo¹, Castellanos-González Maribel²,
Ling Eliana², Gómez Liliana³, Ginestre Messaria², Rincón
Gresleida²**

¹ Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. La Universidad del Zulia. Centro de Referencia Bacteriológica. Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo.

² Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. La Universidad del Zulia.

³ Escuela de Medicina. Facultad de Medicina. La Universidad del Zulia.
Autor de correspondencia, correo electrónico: aperozomena@gmail.com

Resumen

Klebsiella pneumoniae es un importante patógeno oportunista que produce principalmente brotes en instituciones de salud; cuando adquiere la capacidad de producir carbapenemasas, se hace resistente a los betalactámicos, así como a otros grupos de antimicrobianos como quinolonas y aminoglicósidos. El objetivo de este trabajo es determinar la presencia de cepas de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasa del tipo KPC, en aislados clínicos de pacientes internados en tres unidades de cuidados intensivos de una institución de salud. Se estudiaron todas las cepas de *K. pneumoniae* aisladas de los cultivos de rutina realizados a los pacientes reclusos en las tres unidades a estudiar, la identificación se realizó mediante el equipo automatizado Vitek 2C, las pruebas de susceptibilidad se realizaron por el método de Bauer-Kirby y la detección de carbapenemasas tipo KPC se hizo mediante el test de Hodge modificado, CIM a imipenem y meropenem y amplificación del gen *blaKPC*. Los resultados obtenidos indican una elevada prevalencia de carbapenemasas tipo KPC en la institución estudiada, se observó un marcado patrón de multiresistencia en las cepas productoras de carbapenemasa tipo KPC; se recomienda realizar estudios que permitan conocer la epidemiología y transmisión de este mecanismo de resistencia dentro de la institución.

Palabras clave: *Klebsiella pneumoniae*; carbapenemasa KPC; UCI

Abstract

Klebsiella pneumoniae is an important opportunist pathogen that mainly cause outbreaks in health institutions, when it acquires the ability to produce carbapenemase, becomes resistant to betalactamics and other groups of antimicrobials as quinolones and aminoglycosides. The aim of this study was to determine the presence of *K. pneumoniae* strains producing KPC type carbapenemase in clinical isolates of hospitalized patients from three intensive care units of a health institution. All *K. pneumoniae* strains isolated from routine cultures performed to patients held in the three units were studied, identification was performed by automated equipment Vitek 2C, susceptibility tests were made by Bauer -Kirby method and detection of KPC carbapenemase was done by the modified Hodge test, imipenem and meropenem MIC and *blaKPC* gene amplification. The results indicate a high prevalence of KPC carbapenemase in the institution, a marked pattern of multidrug resistance was observed in the KPC carbapenemase producing strains, it is recommended to carry out studies to understand the epidemiology and transmission of this resistance mechanism within the institution.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*; KPC carbapenemase; ICU.

Introducción

Klebsiella pneumoniae, se encuentra como microorganismo saprofito en el hombre y otros mamíferos, coloniza el tracto gastrointestinal, la piel y la nasofaringe; así como también puede encontrarse en el ambiente (agua y suelos). En el pasado fue considerado un agente importante de neumonía adquirida en la comunidad. A principio de los años 70, el espectro y epidemiología de las infecciones causadas por *K. pneumoniae* cambio drásticamente, cuando el microorganismo se estableció en el ambiente hospitalario y se convirtió en la principal causa de infecciones nosocomiales (1). Desde entonces hasta la actualidad *K. pneumoniae*, ha sido considerado un importante patógeno nosocomial que causa epidemias y brotes en todo el mundo (2-6). Las infecciones causadas por este microorganismo son severas y tienen una tasa de letalidad de aproximadamente 35%, por lo que se le considera una amenaza clínica y de salud pública (5,7-10).

Las carbapenemasas tipo KPC en *Klebsiella pneumoniae*, son betalactamasas capaces de hidrolizar todos los antibióticos betalactámicos conocidos (11). Estas cepas se asocian generalmente a brotes nosocomiales (12-15) y presentan multiresistencia a los antibióticos más utilizados en la terapéutica (16,17). Los pacientes más afectados son los

debilitados o inmunocomprometidos con larga estancia hospitalaria, estos factores incrementan la mortalidad, que va de 24-70% dependiendo del estudio (18-21).

El objetivo de este trabajo es determinar la presencia y distribución de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasa tipo KPC en las unidades de cuidados intensivos de una institución de salud.

Materiales y Métodos

Se estudiaron los cultivos bacteriológicos realizados de rutina a los pacientes internados en las unidades de cuidados intensivos de una institución de salud, siendo los servicios estudiados: unidad de cuidados intensivos de adultos (UCIA), unidad de cuidados intensivos de pediatría (UCIP) y el servicio de neonatología (NEO).

Para la toma de muestras se siguieron las recomendaciones estandarizadas por la Sociedad Americana de Microbiología (22). Se aceptaron para el estudio todos los cultivos de pacientes hospitalizados en los servicios anteriormente mencionados, sin importar el tipo de muestra, edad o sexo del paciente. Toda cepa de *K. pneumoniae* aislada de los cultivos bacteriológicos realizados a estos pacientes fue considerada para el estudio. El aislamiento, identificación, pruebas de susceptibilidad, así

como las pruebas moleculares se realizaron en el Centro de Referencia Bacteriológica del Hospital Universitario de Maracaibo.

Para la identificación de las cepas de *K. pneumoniae* se utilizó el equipo automatizado Vitek 2C (Biomérieux, Francia); las pruebas de susceptibilidad se realizaron mediante el método de Bauer y Kirby (23) y para la interpretación de las mismas se utilizaron los criterios del Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) (24).

Una vez identificada la cepa como *K. pneumoniae*, se realizaron las pruebas de susceptibilidad mediante el método del disco, siguiendo los lineamientos del CLSI (24), se probaron los siguientes antimicrobianos; ampicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, piperacilina/tazobactam, ceftazidima, ceftriaxona, cefotaxima, cefepime, ceftoxitina, aztreonam, ertapenem, imipenem, meropenem, amikacina, gentamicina, ciprofloxacina, levofloxacina, trimetoprim/sulfametoxazol, minociclina y tigeciclina.

Las cepas que resultaron resistentes a alguno de los carbapenemas o las que mostraban un halo de inhibición para imipenem o meropenem ≤ 21 mm se consideraron sospechosas de la producción de carbapenemasa tipo KPC. A estas cepas sospechosas se les confirmó la producción de la enzima mediante el test de Hodge Modificado, determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) a imipenem y meropenem por E-Test; sinergia con ácido fenilborónico y amplificación del gen *bla*_{KPC} mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Test de Hodge Modificado: se preparó una suspensión estandarizada al 0,5 de la escala de McFarland de una cepa de *E. coli* ATCC 25922 (cepa testigo). Con una dilución 1:10 de esta suspensión, se inoculó una placa de agar Müeller-Hinton (MH) y se colocó en el centro de la placa un disco de ertapenem de 10 μ g, luego se realizó una estría de la cepa sospechosa desde el borde del disco hacia la periferia de la placa. Posteriormente, se incubó a 35-37°C de 18 a 24 horas en aerobiosis. La lectura de la prueba se realizó observando el sitio donde se cruza el halo de inhibición de la cepa testigo con la cepa sospechosa, si se observa un crecimiento favorecido hacia el disco se considera la prueba positiva (25).

CIM a imipenem y meropenem: se realizó mediante el método de E-Test (Biomérieux, Francia), para ello se preparó una suspensión equivalente al estándar 0,5 de la escala de McFarland a partir de un cultivo joven de la cepa sospechosa. Luego se inoculó con esta cepa, una placa de agar MH y se colocaron las tiras de imipenem y meropenem, se incubó a 35-37°C por 18-24 horas en aerobiosis. Para la lectura se tomó el valor de la CIM en el punto donde la elipse de crecimiento corta la escala numérica de la tira de E-Test.

Test de Sinergia con Ácido Fenilborónico (APB): para esta prueba se preparó un inóculo estandarizado de la cepa en estudio como en los casos anteriores, se inoculó una placa de agar MH y se colocó en el centro un disco con 300 μ g de APB, luego se colocó de un lado un disco de meropenem y del otro uno de ertapenem, a una distancia de 10 mm; se incubó a 35-37°C de 18-24 en aerobiosis, la presencia de un efecto sinérgico entre los discos de carbapenemas con el disco central de APB indica la presencia de una carbapenemasa.

Detección del gen *bla*_{KPC}: para la extracción del ADN bacteriano se utilizó el método de ebullición (26), se tomaron con ayuda de un asa estéril unas colonias de un cultivo joven de 18-24 horas dispuestas en agar tripticasa soya y se introdujeron a un tubo Eppendorf estéril con 100 μ l de agua molecular esterilizada en el autoclave con el fin de obtener una suspensión homogénea, esta suspensión se calentó a 100 °C por 15 minutos y después se añadieron 900 μ l de agua molecular estéril y se centrifugó por 15 minutos a 12.000 rpm. El sobrenadante, conteniendo la suspensión de ADN, se recolectó en otro tubo Eppendorf estéril y se almacenó a -20°C hasta el momento de la amplificación.

El gen *bla*_{KPC} fue amplificado, mediante el uso de los siguientes cebadores o primers F "5'-TGT CAC TGT ATC GCC GTC- 3'" y R "5'-CTC AGT GCT CTA CAG AAA ACC- 3'" (6). Para la amplificación se utilizó un volumen final de 100 μ l de mezcla de reacción, la cual contiene 0,5 μ M de cada primer; 250 μ M de cada desoxiribonucleotido trifosfato; 2mM de MgCl₂ y 2,5 U de ADN Taq polimerasa en buffer de reacción 1x proporcionado por el fabricante (PROMEGA®). La reacción se amplificó en un termociclador PTC-100 MJ-Reserch®. Los parámetros de los ciclos fueron: 5 minutos a

95°C, seguidos por 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 minuto, anillamiento a 58°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto y 30 segundos. La amplificación del PCR fue finalizada por un ciclo de extensión final a 72°C por 10 minutos

Para la visualización del gel se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X, con un voltaje de 80 V. Luego se coloreó el gel con bromuro de etidio 10µg/ml, y se visualizó en un transiluminador de luz UV. La presencia del gen *bla_{KPC}* se evidenció mediante un amplificado de aproximadamente 1000pb. 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 bandas en el gel de agarosa (control negativo) como la presencia de las mismas (control positivo). Para determinar la asociación o independencia entre las diferentes variables estudiadas se utilizó como estadístico de prueba el Chi cuadrado.

Resultados

Se estudió un total de 298 cepas de *K. pneumoniae*, 160 aisladas de pacientes de UCIA, 44 de NEO y 94 de UCIP. Cuando se realizó el antibiograma por difusión del disco, 175 cepas tuvieron un halo de inhibición a imipenem y meropenem por debajo de 21 mm, con un rango de 6mm a 20 mm y un promedio de 14mm. De estas 175 cepas positivas solo 148 cepas fueron positivas al test de Hodge modificado y la CIM a imipenem y meropenem fue $\geq 32\mu\text{g/mL}$, el resto (27 aislados) fueron negativos para el test de Hodge y tuvieron un valor de CIM entre 0,5-2µg/mL. Los resultados de estas pruebas fueron confirmados posteriormente mediante la amplificación del gen *bla_{KPC}* por reacción en cadena de la polimerasa. De las 175 cepas sospechosas por el método del disco, 148 dieron positivos el test de Hodge y presentaron una CIM $\geq 32\mu\text{g/mL}$, estas resultaron positivas para el gen *bla_{KPC}*, mientras que las 27 que fueron test de Hodge positivo y la CIM se ubicó entre 0,2 y 2g/mL, fueron negativas para la presencia del gen *bla_{KPC}*. Por otra parte, las 27 cepas negativas para el Test de Hodge no amplificaron para el gen *bla_{KPC}*.

La Figura 1 muestra la distribución de cepas productoras de carbapenemasa tipo

KPC en cada servicio estudiado. NEO fue el servicio con el más elevado porcentaje de aislamiento (63,64%), seguido de UCIP (51,06%) y UCIA (45,00%); sin embargo, no se comprobó asociación entre la producción de carbapenemasa tipo KPC y un servicio en particular ($p \geq 0,05$).

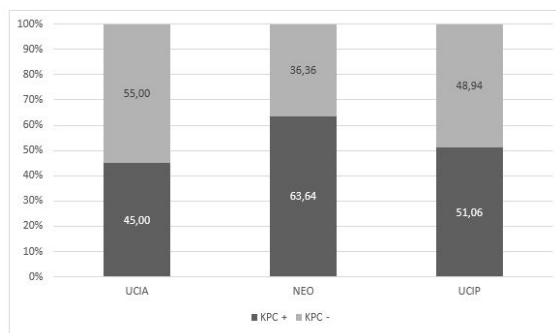


Figura 1 Distribución de la Producción de Carbapenemasa tipo KPC en los Aislados de *K. pneumoniae* de los Diferentes Servicios Estudiados

La Tabla 1 muestra la distribución de la producción de carbapenemasa tipo KPC de acuerdo al sexo del paciente y se observa un predominio de cepas KPC positivas en aislados del sexo femenino en los servicios estudiados, sin embargo, al realizar la prueba de asociación

Tabla 1. Distribución de la producción de carbapenemasas tipo KPC según sexo y servicio del paciente.

Servicio	Masculino				Femenino			
	KPC +		KPC -		KPC +		KPC -	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
UCIA	45	42,45	61	57,55	27	50,00	27	50,00
NEO	12	52,17	11	47,83	16	76,19	5	23,81
UCIP	14	42,42	19	57,58	34	55,74	27	44,26

esta fue no significativa ($p \geq 0,05$).

Al analizar los patrones de resistencia a los agentes antimicrobianos, en las cepas productoras de carbapenemasa tipo KPC

(Tabla 2), se observa un marcado patrón de multiresistencia, no solo a los agentes betalactámicos, sino también a otros grupos de antimicrobianos como aminoglicósidos y quinolonas. También se observa que antimicrobianos pertenecientes al grupo de las tetraciclinas como minociclina y tigeciclina presenta un porcentaje bastante bajo de resistencia. Es importante destacar la disociación presente entre los dos aminoglicósidos probados, Gentamicina y Amikacina, esto sugiere la presencia de un mecanismo enzimático de resistencia, probablemente una acetilasa del tipo AAC-6' (27).

Tabla 2. Porcentajes de resistencia a los antimicrobianos probados de las cepas productoras de carbapenemasa tipo KPC

Antimicrobiano	Servicios		
	UCIA	NEO	UCIP
Ampicilina	100,00	100,00	100,00
Amoxicilina/Ácido clavulánico	100,00	100,00	97,67
Piperacilina/Tazobactam	100,00	100,00	100,00
Ceftazidima	100,00	100,00	100,00
Ceftriaxona	100,00	100,00	100,00
Cefotaxima	100,00	100,00	100,00
Cefepima	100,00	100,00	100,00
Cefoxitina	100,00	100,00	100,00
Aztreonam	100,00	100,00	100,00
Ertapenem	97,06	100,00	100,00
Imipenem	89,23	92,31	100,00
Meropenem	88,89	96,15	97,73
Amicacina	50,70	88,89	86,96
Gentamicina	42,25	51,85	54,35
Ciprofloxacina	87,50	70,37	66,67
Levofloxacina	100,00	18,18	45,45
Minociclina	16,07	9,09	8,82
Tigeciclina	10,77	0,00	5,26

Discusión

Esta investigación no está diseñada para evaluar la efectividad de los diferentes métodos fenotípicos utilizados para determinar la producción de carbapenemasa

tipo KPC, sin embargo, se puede observar una alta concordancia entre los diferentes métodos fenotípicos empleados con el método considerado como referencia (PCR). Se ha demostrado que, la utilización de varios métodos o combinación de estos, mejora significativamente la sensibilidad y especificidad en la detección de este mecanismo de resistencia (28).

Al comparar los resultados de los métodos fenotípicos con los resultados del PCR, podemos establecer que el método del disco no es el más adecuado para la detección de este mecanismo de resistencia cuando se utilizan discos de imipenem o meropenem, diferentes investigaciones sugieren el uso de discos de ertapenem, ya que han demostrado ser más sensibles en la detección de este mecanismo de resistencia, con el inconveniente de disminuir la especificidad, ya que pueden dar falsos positivos en presencia de otros mecanismos como son la producción betalactamasas de espectro extendido y betalactamasas del tipo Amp-C (28,29). En este estudio no fue posible probar el disco de ertapenem por no estar disponible en el mercado para el momento de la realización del trabajo. Por otra parte, el test de Hodge modificado y la determinación de la CIM a imipenem y meropenem si fueron muy buenos predictores de la presencia de una carbapenemasa del tipo KPC en los aislados clínicos estudiados, diferentes estudios demuestran esta afirmación, por lo que se recomienda su utilización cuando se sospeche de la presencia de este mecanismo de resistencia (28,30).

En cuanto a la distribución de las cepas productoras de carbapenemasa tipo KPC en los diferentes servicios estudiados, el servicio de neonatología presentó la incidencia más elevada (63,64%), seguido de UCIP (51,06%) y UCIA (45,00%); esto podría indicar una aparente predisposición del mecanismo de resistencia hacia la población pediátrica; sin embargo, no se comprobó asociación entre la producción de carbapenemasa tipo KPC y un servicio en particular ($p \geq 0,05$). Una posible explicación de la mayor incidencia de los servicios pediátricos podría ser la inmadurez del sistema inmune, la carencia de una microbiota normal bien establecida (especialmente de los neonatos), así como otros factores predisponentes que

facilitan la adquisición de microorganismos con este mecanismo de resistencia en esta población susceptible.

En cuanto a la distribución del mecanismo de resistencia de acuerdo al sexo del paciente, no se encontró una asociación estadística ($p \geq 0,05$) entre el sexo del paciente y la producción de carbapenemasa tipo KPC.

Al analizar los patrones de susceptibilidad y resistencia a los agentes antimicrobianos, se observa una marcada multiresistencia en todos los aislados estudiados, no observándose una diferencia significativa ($p \geq 0,05$) entre los diferentes servicios analizados. En general, las cepas fueron resistentes a todos los agentes betalactámicos, incluyendo además otros antimicrobianos no relacionados químicamente con este grupo como son aminoglicósidos y quinolonas. Diferentes estudios demuestran que las cepas de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasa del tipo KPC muestra multiresistencia a las drogas, hallazgos que concuerdan con los resultados obtenidos por este estudio (6,14,31). Se observó una baja resistencia a antimicrobianos del grupo de las tetraciclinas como son tigeiciclina y minociclina, lo que concuerda con diferentes estudios donde se indica el uso de tigeiciclina como opción terapéutica en el tratamiento de pacientes con infecciones por microorganismos productores de carbapenemasa tipo KPC (32-38).

Se observó una disociación entre los dos aminoglicósidos probados, Gentamicina y Amikacina, detectándose un mayor porcentaje de resistencia a Amikacina que a Gentamicina, lo que sugiere la presencia de un mecanismo enzimático de resistencia, probablemente por la presencia de una acetilasa del tipo AAC-6' (27). En cuanto a la resistencia a quinolonas, esta se asocia altamente con la presencia de carbapenemasa KPC. Ambos mecanismos son transferidos en el mismo plásmido; sin embargo, la presencia de la enzima AAC-6', recientemente se ha implicado en la resistencia a quinolonas, específicamente resistencia a ciprofloxacina, esto podría explicar la disociación que se observa entre la resistencia a ciprofloxacina y levofloxacina, principalmente en los servicios de pediatría (UCIP y NEO), ya que esta enzima es capaz de afectar la actividad de ciprofloxacina principalmente (39-42)

Mediante este estudio se puede concluir que la ocurrencia de la producción de

carbapenemasa KPC en la institución estudiada es alta y se deben implementar las medidas de control para disminuir la prevalencia de este mecanismo de resistencia, como son la aplicación de las medidas primarias de contención, así como el uso racional de antibióticos. Por otra parte, se deben implementar investigaciones que permitan conocer la epidemiología de este mecanismo de resistencia dentro de la institución, incluyendo estudios de epidemiología molecular que permitan determinar o no la relación clonal entre los diferentes aislados, y de esta manera diseñar medidas específicas de control. Los resultados de las pruebas de susceptibilidad sugieren la presencia de una enzima inactivadora de aminoglicósidos (AAC-6'), teniendo este mecanismo de resistencia una gran importancia desde el punto de vista epidemiológico y de salud pública, ya que es un mecanismo de resistencia importante y que se transmite fácilmente mediante plásmidos especialmente en instituciones de salud, por lo que se deberían desarrollar investigaciones para determinar o no su presencia, así como su epidemiología en la institución.

Referencias Bibliográficas

- 1 Tzouveleki LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev* 2012;25(4):682-707.
- 2 Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 2009;9(4):228-36.
- 3 Agodi A, Voulgari E, Barchitta M, Politi L, Koumaki V, Spanakis N, et al. Containment of an outbreak of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy. *J Clin Microbiol* 2011;49(11):3986-9.
- 4 Chen S, Hu F, Xu X, Liu Y, Wu W, Zhu D, et al. High Prevalence of KPC-2-Type carbapenemase coupled with CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in carbapenem-resistant

- Klebsiella pneumoniae* in a teaching hospital in china. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55(5):2493-4.
- 5 Schwaber MJ, Carmeli Y. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: a potential threat. *JAMA* 2008;300(24):2911-3.
 - 6 Woodford N, Tierno PM, Jr., Young K, Tysall L, Palepou MF, Ward E, et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A beta-Lactamase, KPC-3, in a New York medical center. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(12):4793-9.
 - 7 Delfino E, Giacobbe DR, Del Bono V, Coppo E, Marchese A, Manno G, et al. First report of chronic pulmonary infection by KPC-3-producing and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 (ST258) in an adult patient with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2015;53(4):1442-4.
 - 8 Lat A, Clock SA, Wu F, Whittier S, Della-Latta P, Fauntleroy K, et al. comparison of polymyxin b, tigecycline, cefepime, and meropenem MICs for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* by broth microdilution, Vitek 2, and Etest. *J Clin Microbiol* 2011;49(5):1795-8.
 - 9 Tascini C, Tagliaferri E, Giani T, Leonildi A, Flammini S, Casini B, et al. Synergistic activity of colistin plus rifampin against colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57(8):3990-3.
 - 10 Center for Diseases Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. Atlanta, Georgia: CDC; 2013.
 - 11 Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007;20(3):440-58.
 - 12 Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Leavitt A, Schwaber MJ, Schwartz D, Carmeli Y. Plasmid-mediated imipenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 among multiple carbapenem-resistant *Escherichia coli* clones in Israel. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50(9):3098-101.
 - 13 Virginia Villegas M, Lolans K, Correa A, Jose Suarez C, Lopez JA, Vallejo M, et al. First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50(8):2880-2.
 - 14 Woodford N, Zhang J, Warner M, Kaufmann ME, Matos J, MacDonald A, et al. Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother* 2008;62(6):1261-4.
 - 15 Zacharczuk K, Piekarska K, Szych J, Zawidzka E, Sulikowska A, Wardak S, et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* coproducing KPC-2 and 16S rRNA methylase ArmA in Poland. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55(1):443-6.
 - 16 Kitchel B, Rasheed JK, Endimiani A, Hujer AM, Anderson KF, Bonomo RA, et al. Genetic factors associated with elevated carbapenem resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54(10):4201-7.
 - 17 Marchaim D, Navon-Venezia S, Schwaber MJ, Carmeli Y. Isolation of imipenem-resistant enterobacter species: emergence of KPC-2 carbapenemase, molecular characterization, epidemiology, and outcomes. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52(4):1413-8.
 - 18 Ben-David D, Kordevani R, Keller N, Tal I, Marzel A, Gal-Mor O, et al. Outcome of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. *Clinical Microbiology and Infection* 18(1):54-60.
 - 19 Borer A, Saidel-Odes L, Riesenberk K, Eskira S, Peled N, Nativ R, et al. Attributable mortality rate for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Infection Control & Hospital Epidemiology* 2009;30(10):972-6.
 - 20 Bratu S, Landman D, Haag R. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: A new threat to our antibiotic armamentarium. *Archives of Internal Medicine* 2005;165(12):1430-5.

- 21 Neuner EA, Yeh JY, Hall GS, Sekeres J, Endimiani A, Bonomo RA, et al. Treatment and outcomes in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2011;69(4):357-62.
- 22 Baron E. Specimen Collection, Transport, and Processing: Bacteriology. In: Jorgensen J, Pfaller M, Carroll K, Landry M, Funke G, Richter S, et al., editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 11 ed. Washinton, DC.: American Society for Microbiology; 2015. p. 270-315.
- 23 Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966;45(4):493-6.
- 24 Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100-S26[36]. 2016. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- 25 Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twentieth Informational Supplement. M100-S20[30]. 2010. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- 26 De Medici D, Croci L, Delibato E, Di Pasquale S, Filetici E, Toti L. Evaluation of DNA extraction methods for use in combination with SYBR Green I real-time PCR to detect *Salmonella enterica* Serotype *Enteritidis* in poultry. *Applied and Environmental Microbiology* 2003;69(6):3456-61.
- 27 Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat* 2010;13(6):151-71.
- 28 Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK, 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):2723-5.
- 29 Doern CD, Dunne WM, Jr., Burnham CA. Detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) production in non-*Klebsiella pneumoniae* *Enterobacteriaceae* isolates by use of the Phoenix, Vitek 2, and disk diffusion methods. *J Clin Microbiol* 2011;49(3):1143-7.
- 30 Bratu S, Mooty M, Nichani S, Landman D, Gullans C, Pettinato B, et al. Emergence of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: Epidemiology and recommendations for detection. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(7):3018-20.
- 31 Perez F, Pultz MJ, Endimiani A, Bonomo RA, Donskey CJ. Effect of antibiotic treatment on establishment and elimination of intestinal colonization by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55(6):2585-9.
- 32 Du X, Fu Y, Yu Y. Tigecycline treatment of infection caused by KPC-producing *Escherichia coli* in a pediatric patient. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2013;12(1):1-4.
- 33 Cai Y, Wang R, Liang B, Bai N, Liu Y. Systematic review and meta-analysis of the effectiveness and safety of tigecycline for treatment of infectious disease. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55(3):1162-72.
- 34 Kelesidis T, Karageorgopoulos DE, Kelesidis I, Falagas ME. Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*: a systematic review of the evidence from microbiological and clinical studies. *J Antimicrob Chemother* 2008;62(5):895-904.
- 35 Poulakou G, Kontopidou FV, Paramythiotou E, Kompoti M, Katsiari M, Mainas E, et al. Tigecycline in the treatment of infections from multi-drug resistant gram-negative pathogens. *Journal of Infection* 2009;58(4):273-84.
- 36 Qureshi ZA, Paterson DL, Potoski BA, Kilayko MC, Sandovsky G, Sordillo E, et al. Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: superiority of combination antimicrobial regimens. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56(4):2108-13.
- 37 Daly MW, Riddle DJ, Ledeboer NA, Dunne WM, Ritchie DJ. Tigecycline

- for treatment of pneumonia and empyema caused by carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. Pharmacotherapy. The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy 2007;27(7):1052-7.
- 38 Livermore DM. Tigecycline: what is it, and where should it be used? J Antimicrob Chemother 2005;56(4):611-4.
- 39 Jones GL, Warren RE, Skidmore SJ, Davies VA, Gibreel T, Upton M. Prevalence and distribution of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of *Escherichia coli* lacking extended-spectrum beta-lactamases. J Antimicrob Chemother 2008;62(6):1245-51.
- 40 Wachino Ji, Yamane K, Arakawa Y. Practical disk-based method for detection of *Escherichia coli* clinical isolates producing the fluoroquinolone-modifying enzyme AAC(6')-Ib-cr. Journal of Clinical Microbiology 2011;49(6):2378-9.
- 41 Yang H, Chen H, Yang Q, Chen M, Wang H. High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes qnr and aac(6')-Ib-cr in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from nine teaching hospitals in China. Antimicrob Agents Chemother 2008;52(12):4268-73.
- 42 Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC. Prevalence in the United States of aac(6')-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. Antimicrob Agents Chemother 2006;50(11):3953-5.