

## Comunicación

# Ausencia de genes carbapenemasas $bla_{KPC}$ , $bla_{NDM}$ y $bla_{IMP}$ en *Escherichia coli* aisladas de cerdos sanos provenientes de granjas tecnificadas

## Absence of carbapenemase genes $bla_{KPC}$ , $bla_{NDM}$ and $bla_{IMP}$ in *Escherichia coli* isolated from healthy pigs from high-tech farms

Lucero Castilla B.<sup>1</sup>, Joel Palomino-Farfán.<sup>1</sup>, André Sedano S.<sup>1</sup>, Sonia Calle E.<sup>1</sup>,  
Juan Siuce M.<sup>1\*</sup>

### RESUMEN

Enterobacteriaceae es la familia de bacterias con más reportes de resistencia antimicrobiana, siendo los de mayor impacto las productoras de carbapenemasas, antibióticos usados en medicina humana para casos críticos. Diversos reportes describen a *Escherichia coli* como una de las portadoras de estos genes debido a su fácil captación de plásmidos o fragmentos de ADN. En el Perú existen reportes de *E. coli* portadoras de carbapenemasas aisladas de humanos, pero ningún trabajo confirmado en animales. Por ello, el objetivo del estudio fue evaluar la presencia de genes asociados a carbapenemasas en *E. coli* aisladas de cerdos sanos provenientes de cuatro granjas tecnificadas. Para ello, 186 aislados de *E. coli* fueron evaluados mediante la técnica de PCR para la detección de genes de carbapenemasas  $bla_{KPC}$ ,  $bla_{NDM}$  y  $bla_{IMP}$ . Estos genes no fueron detectados en los 186 aislados analizados de *E. coli*.

**Palabras clave:** resistencia antimicrobiana, cerdos, *Escherichia coli*, aislados, carbapenemasas

<sup>1</sup> Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

\* Autor para correspondencia: Juan Siuce M; [jsiucem@unmsm.edu.pe](mailto:jsiucem@unmsm.edu.pe)

Recibido: 11 de junio de 2024

Aceptado para publicación: 31 de enero de 2025

Publicado: 30 de abril de 2025

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

## ABSTRACT

Enterobacteriaceae is the family of bacteria with the most reports of antimicrobial resistance, with the greatest impact being those that produce carbapenems, antibiotics used in human medicine for critical cases. Various reports describe *Escherichia coli* as one of the carriers of these genes due to its easy uptake of plasmids or DNA fragments. In Peru, there are reports of *E. coli* carrying carbapenemases isolated from humans, but no confirmed work has been done in animals. Therefore, the aim of this study was to evaluate the presence of genes associated with carbapenemases in *E. coli* isolated from healthy pigs from four technologically advanced farms. To do this, 186 *E. coli* isolates were evaluated using the PCR technique for the detection of  $bla_{KPC}$ ,  $bla_{NDM}$  and  $bla_{IMP}$  carbapenemase genes. These genes were not detected in the 186 *E. coli* isolates analysed.

**Keywords:** antimicrobial resistance, pigs, *Escherichia coli*, isolated, carbapenems

## INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antimicrobianos es considerada un gran problema de salud pública a nivel mundial, por lo que requiere de planes estratégicos para frenarla (OMS, 2020). Es considerada un proceso natural; sin embargo, debido a la administración incorrecta de los antimicrobianos en animales destinados al consumo humano, muchas veces como promotores de crecimiento, ha ocasionado que este proceso se vea acelerado (Barton, 2014; FAO, 2023).

Existen cuatro mecanismos de resistencia antimicrobiana: formación de bombas de flujo, modificación del sitio blanco del antibiótico, formación de porina con sitio de entrada mutado y producción de enzimas (Picazo y Prieto, 2016). Ejemplo de esta última son las bacterias productoras de betalactamasas como las carbapenemasas, reportadas frecuentemente de miembros de la familia de *Enterobacteriaceae*, siendo *Escherichia coli* una de las más importantes debido a su facilidad en la captación de plásmidos y transferencia horizontal de genes (Iovleva y Doi, 2017). Por ello, la Organización Mundial de la Salud (OMS) las ha incluido como primera prioridad en la búsqueda de nuevos antibióticos (OPS/OMS, 2021).

Los carbapenémicos son una clase de antibióticos betalactámicos considerados como fármacos de último recurso contra enfermedades graves (Iovleva y Doi, 2017). Las carbapenemasas tienen la capacidad de hidrolizar los carbapenems y se clasifican según el esquema de Ambler en cuatro clases (del A hasta el D), en donde la gran mayoría de carbapenemasas se encuentra en las clases A, B y D (Martínez y González, 2014). Dentro de las carbapenemasas más conocidas pertenecientes a la clase A se tiene a las KPC, SME y varias enzimas GES. En la clase B, las enzimas más importantes detectadas son las familias NDM, VIM e IMP y dentro de las carbapenemasas de clase D las conocidas como oxacilinasas con actividad carbapenemasa (OXA), que se dividen en diversos grupos según la homología de su secuencia (Martínez y González, 2014; Astocondor, 2018). Según las recomendaciones técnicas para la detección de carbapenemasas, la confirmación definitiva es mediante la detección de genes carbapenemasas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (ISP, 2018).

Reportes como los de Roschanski *et al.* (2015) y Tamta *et al.* (2020) realizados en Alemania e India, respectivamente, confirmaron la presencia de genes carbapenemasas

en *E. coli* aisladas de muestras fecales de cerdos; además relacionan estos hallazgos en animales con el contacto humano o del entorno, recomendando mayores estudios de vigilancia. En el Perú, existen pocos estudios reportados sobre la presencia de carbapenemasas en humanos y no se reportan estudios en animales. Por ello, el objetivo de este estudio fue evaluar la presencia de genes asociados a carbapenemasas en *E. coli* aisladas de cerdos sanos provenientes de granjas tecnificadas, con el fin de poder determinar una posible situación actual en el país y así, buscar opciones para el control y prevención.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Lugar y Periodo del Estudio

El estudio se desarrolló en el Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FMV-UNMSM) durante los meses de noviembre y diciembre de 2022.

### Material Experimental

Se analizaron 186 aislados de *E. coli* criopreservados en el cepario del Laboratorio de Bacteriología de la FMV-UNMSM, obtenidos de un muestreo previo de cerdos clínicamente sanos de cuatro granjas tecnificadas de Lima entre octubre a diciembre de 2019. En dicho estudio se recolectaron muestras individuales de hisopado rectal que luego fueron procesadas e identificadas como *E. coli* mediante pruebas bioquímicas convencionales.

Los controles positivos fueron aislados de casos clínicos humanos provenientes de la Clínica Médica Cayetano Heredia (Lima, Perú), los cuales fueron confirmados con pruebas inmunocromatográficas y moleculares. Los tres controles positivos usados en el estudio fueron:

- A26: *Citrobacter* sp. - positivo al gen  $bla_{KPC}$
- A29: *Enterobacter* sp. - positivo al gen  $bla_{NDM}$
- A24: *Pseudomona* sp. - positivo al gen  $bla_{IMP-1}$  y  $bla_{IMP-2}$

El control negativo usado en el estudio fue la cepa ATCC 25922 - *Escherichia coli*, la cual no posee genes de carbapenemasas.

### Reactivación de los Aislados

Los crioviales que permanecían a -20 °C fueron puestos en calor seco por 10 min. El contenido fue inoculado en un vial con 5 mL de caldo tripticasa de soya (TSB) (Merck, Alemania) e incubados por 24 h a 37 °C. Posteriormente, se extrajo un pequeño volumen con un ansa calibrada y se sembró en Agar MacConkey (Merck, Alemania) mediante la técnica de agotamiento, y se llevó a incubación a 37 °C por 24 h para su crecimiento.

### Extracción de ADN y Amplificación de la Cadena de Polimerasa (PCR)

Los cultivos de *E. coli*, confirmados mediante acción fermentativa de lactosa, producción de indol y motilidad positiva, fueron inoculados en 2 mL de caldo Luria-Bertani (Merck, Alemania) a 37 °C hasta obtener una concentración mayor de 10<sup>6</sup> bacterias/mL (4 a 6 h), para luego realizar la extracción de ADN siguiendo las indicaciones de manufactura del GeneJET Genomic DNA Purification kit (Thermo Scientific, Lituania). El producto obtenido fue congelado a -20 °C hasta su uso.

Se realizó la técnica de PCR convencional para la detección de genes carbapenemasas KPC, NDM e IMP. Para esto, se utilizaron cebadores para los genes  $bla_{KPC}$ ,  $bla_{NDM}$  y  $bla_{IMP}$  indicados en el Cuadro 1, siguiendo el protocolo descrito por Watahiki *et al.* (2020), iniciando con 95 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 60 °C por 90 s, y 72 °C por 60 s. con una extensión

final a 68 °C por 10 min. Para la detección del gen *bla*<sub>IMP</sub>, estos autores recomendaron el uso de dos cebadores debido a las variantes con los que cuenta la carbapenemasa IMP. La solución de amplificación tuvo un volumen de 20 µl, el cual contiene 1 µl de ADN de la muestra, 0.4 µl del cebador a analizar, 0.2 µl de DreamTaq polimerasa, 2 µl de DreamTaq buffer, 0.4 µl de dNTPs y completados con agua ultrapura (Life Technologies, EE. UU.). En el caso del gen *bla*<sub>IMP</sub> debido a que se usaron dos cebadores, la cantidad del cebador total a usar fue de 0.8 µl. Los ADN amplificados fueron identificados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y luego se procedió a la lectura mediante el transiluminador de luz UV.

## RESULTADOS

No se detectaron los genes *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> y *bla*<sub>IMP</sub> (0/186) de aislados de *E. coli* provenientes de cerdos aparentemente sanos de granjas tecnificadas de Lima, criopreservados y almacenados en el cepario del Laboratorio de Bacteriología de la FMV-UNMSM. En la Figura 1 se observa los productos de los tres genes carbapenemasa en estudio.

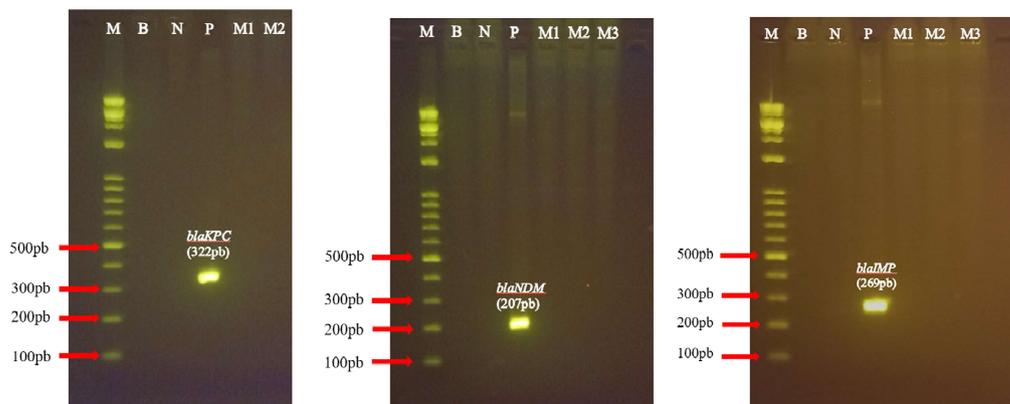


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de la ampliación de los genes *bla*<sub>KPC</sub> (322 pb), *bla*<sub>NDM</sub> (207 pb) y *bla*<sub>IMP</sub> (269 pb). Carril M: marcador de peso molecular de 100 pb; carril B: muestra blanco; carril N: control negativo; carril P: control positivo cepa A26, A29 y A24, respectivamente; carril M1 y M2: muestras del estudio negativas

## DISCUSIÓN

No se hallaron muestras positivas (0/186) de presencia de los genes carbapenemasas *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> y *bla*<sub>IMP</sub> en cerdos sanos. Resultados similares (0/102) fueron reportados por Tamta *et al.* (2020) de aislados de *E. coli* provenientes de muestras fecales de cerdos sin diarreas realizado en cinco granjas porcinas en India el 2016-2017. Esta similitud estaría relacionada a que los antibióticos carbapenémicos no están autorizados para uso como medicamentos veterinarios, siendo considerados como antimicrobianos de importancia crítica para la salud humana, por lo que son reguladas mediante normas sanitarias por la OMS, OMSA y FAO (OPS, 2022).

Resultados negativos para la presencia del gen *bla*<sub>KPC</sub> en *E. coli* de muestras fecales de cerdos fueron reportados en China por Cheng *et al.* (2019) con un 0.3% (2/488) entre el 2009-2014 y por Liu *et al.* (2018) con una frecuencia de 0% (0/270) en cerdos sin diarreas de China entre 2015-2017. Los resultados bajos o ausentes del gen *bla*<sub>KPC</sub> en *E. coli* podrían relacionarse a que esta carbapenemasa se encuentra predominantemente en *K. pneumoniae* por su alta disemi-

Cuadro 1. Secuencia de cebadores para los genes carbapenemasas *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> y *bla*<sub>IMP</sub>. (Referencia: Watahiki *et al.*, 2020)

Gen	Cebador	Secuencia del oligonucleótido	Amplicón (pb)	Temperatura (°C)
<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	mc-imp-f1	TTCRATCTATCCCCACGTATGC	269	65
	mc-imp-f2	TCTCAATCTATTCCAACATATGCATCTG		
	mc-imp-r1	GCGGACTTTGGCCAAGCTTCTA		
	mc-imp-r2	GCMGAATGTGGCCACGCTTCAA		
<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	mc-kpc-f	CGGAACCATTTCGCTAAACTCG	322	63
	mc-kpc-r	AACAAATTGGCGGCGGCGT		
<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	mc-ndm-f	CGGTTTGGCGATCTGGTTTT	207	64
	mc-ndm-r	GACCGGCAGGTTGATCTCC		

nación de transferencia genética (Mathers *et al.*, 2015; Stoesser *et al.*, 2017). Asimismo, *K. pneumoniae* productora de KPC es principalmente de origen humano intrahospitalario (Mayta *et al.*, 2021), mientras que en animales sanos se considera patógeno oportunista del tracto gastrointestinal provocando raras infecciones severas en animales como el pollo y el cerdo (Zhang *et al.*, 2019).

De igual manera, la ausencia del gen carbapenemasa *bla*<sub>NDM</sub> fue similar al estudio retrospectivo de Cheng *et al.* (2019) con una frecuencia del 0% (0/488) en aislados de *E. coli* de muestras fecales de cerdos entre 2009 y 2014. En el estudio de Pruthvishree *et al.* (2017) se halló el gen *bla*<sub>NDM</sub> en 7.8% (8/89) de muestras de *E. coli* de cerdos sin diarreas entre 2014 y 2016 en India; no obstante, este porcentaje fue considerado como bajo debido a que India es endémico de la carbapenemasa NDM. Estos resultados ausentes o bajos detectados en cerdos se podrían relacionar a que el uso de carbapenémicos está prohibido en animales y su uso es exclusivo de personas en estado crítico (Iovleva y Doi, 2017). Por otro lado, estudios que detectan presencia de este gen en cerdos lo relacionan principalmente con una transmisión horizontal proveniente de humanos o el entorno (Martínez y González, 2014).

Existen pocos estudios del análisis del gen *bla*<sub>IMP</sub> de esta carbapenemasa en cerdos. Así, Mollenkopf *et al.* (2017) no detectaron este gen en muestras fecales en una operación porcina en EE. UU. en 2015, aunque observaron la presencia del gen en muestras ambientales de las salas de parto y maternidad; mientras en 2016, Mollenkopf *et al.* (2018) obtuvieron 18% (21/120) de resultados positivos de muestras fecales de lechones. Estos dos estudios relacionan la aparición de este gen al uso del ceftiofur, ya que aparentemente proporciona la expresión de genes de resistencia a los carbapenémicos mediante presión selectiva y al adquirir esta resistencia también se volverían resistentes a todas las cefalosporinas de espectro extendido.

En general, la ausencia o baja presencia de IMP en *E. coli* se relaciona a que este gen se encuentra principalmente en la especie de *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. causantes de infecciones intrahospitalarias especialmente en pacientes debilitados o inmunocomprometidos en humanos (Zhao y Hu, 2011; Martínez y González, 2014). Esto puede observarse en un estudio de prevalencia en humanos en el país realizado por Mayta *et al.* (2021) donde se detectó 14.8% (46/310) de presencia de genes *bla*<sub>IMP</sub>, todas pertenecientes a *P. aeruginosa*.

Si bien, los reportes mencionados anteriormente indican frecuencias bajas o ausencia de genes de carbapenemasas en aislados de cerdos, en el presente estudio se consideró esta evaluación debido a que, en un estudio anterior, estos mismos aislados presentaron resistencia a betalactámicos de tipo BLEE en un 70% (131/186) (Santos, datos no publicados) y existen estudios que demuestran que los genes carbapenemasas pueden estar acompañados de otros genes de resistencia a antibióticos (Chen *et al.*, 2014; Martínez y González, 2014). Entre estos estudios, Cheng *et al.* (2019) obtuvieron dos aislados de *E. coli* positivas al gen  $bla_{KPC}$  que también contenían los genes BLEE  $bla_{CTX}$  y  $bla_{TEM}$ ; en forma similar, en el estudio de Peng *et al.* (2019), de los ocho aislados de *E. coli* resistentes a carbapenémicos  $bla_{NDM-1}$  presentaron resistencia a otros antibióticos como  $bla_{CTX}$  y  $bla_{TEM}$  e incluso a colistina (*mcr-1*), fármaco utilizado para cepas resistentes a carbapenemasa NDM, lo que genera una alerta en la salud pública de que pronto ya no existirán antibióticos disponibles para el control de este tipo de infecciones (Khan *et al.*, 2017; Peng *et al.*, 2019).

## CONCLUSIONES

No se detectaron genes carbapenemasas  $bla_{KPC}$ ,  $bla_{NDM}$  y  $bla_{IMP}$  en 186 aislados de *Escherichia coli* obtenidas de muestras fecales de cerdos sanos de cuatro granjas tecnificadas de Lima.

## LITERATURA CITADA

1. **Astocondor L. 2018.** Betalactamasas: La evolución del problema. *REPIS* 2: 42-49. doi: 10.35839/repis.2.2.224
2. **Barton M. 2014.** Impact of antibiotic use in the swine industry. *Curr Opin Microbiol* 19: 9-15. doi: 10.1016/j.mib.2014.05.017
3. **Chen L, Mathema B, Chavda K, DeLeo F, Bonomo R, Kreiswirth B. 2014.** Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. *Trends Microbiol* 22: 686-96. doi: 10.1016/j.tim.2014.09.003
4. **Cheng P, Li F, Liu R, Yang Y, Xiao T, Ishfaq M, Xu G, Zhang X. 2019.** Prevalence and molecular epidemiology characteristics of carbapenem-resistant *Escherichia coli* in Heilongjiang Province, China. *Infect Drug Resist* 12: 2505-2518. doi: 10.2147/IDR.S208122
5. **[FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2023.** Salud pública veterinaria. [Internet], Disponible en: <https://www.fao.org/animal-health/areas-of-work/veterinary-public-health/es>
6. **Iovleva A, Doi Y. 2017.** Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Clin Lab Med* 37: 303-315. doi: 10.1016/j.cll.2017-01.005
7. **[ISP] Instituto de Salud Pública. 2018.** Recomendaciones para detección carbapenemasas en enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa*. Chile: Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de referencia. 26 p.
8. **Khan A, Maryam L, Zarrilli R. 2017.** Structure, genetics and worldwide spread of new Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM): a threat to public health. *BMC Microbiol* 17: 101. doi: 10.1186/s12866-017-1012-8
9. **Liu X, Liu H, Wang L, Peng Q, Li Y, Zhou H, Li Q. 2018.** Molecular characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing multidrug resistant *Escherichia coli* from swine in Northwest China. *Front Microbiol* 9: 1756. doi: 10.3389/fmicb.2018.01756
10. **Martínez L, González J. 2014.** Carbapenemasas in *Enterobacteriaceae*: types and molecular epidemiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 32: 4-9. doi: 10.1016/S0213-005X(14)70168-5

11. **Mathers A, Stoesser N, Sheppard A, Pankhurst L, Giess A, Yeh A, Didelot X, et al. 2015.** *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae* at a single institution: insights into endemicity from whole-genome sequencing. *Antimicrob Agents Ch* 59: 1656-1663. doi: 10.1128/AAC.04292-14
12. **Mayta M, Ramirez J, Pampa L, Yagui M. 2021.** Caracterización molecular de carbapenemasas en el Perú durante el 2019. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 38: 113-118. doi: 10.17843/rpmesp.2021.-381.5852
13. **Mollenkopf D, Mathys D, Feicht S, Stull J, Bowman A, Daniels J, Wittum T. 2018.** Maintenance of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in a farrow-to-finish swine production system. *Foodborne Pathog Dis* 15: 372-376. doi: 10.1089/fpd.2017.2355
14. **Mollenkopf D, Stull J, Mathys D, Bowman A, Feicht S, Grooters S, Daniels J, Wittum T. 2017.** Carbapenemase producing Enterobacteriaceae recovered from the environment of a swine farrow-to-finish operation in the United States. *Antimicrob Agents Che* 61: e01298-16. doi: 10.1128/AAC.01298-16
15. **[OMS] Organización Mundial de la Salud. 2020.** Resistencia a los antibióticos. [Internet]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/es/>
16. **[OPS/OMS] Organización Panamericana de la Salud. 2021.** Emergencia e incremento de nuevas combinaciones de carbapenemasas en Enterobacterales en Latinoamérica y el Caribe. [Internet]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/alerta-epidemiologica-emergencia-e-incremento-nuevas-combinaciones-carbapenemasas>
17. **[OPS] Organización Panamericana de la Salud. 2022.** Resistencia antimicrobiana en producción animal. [Internet]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/panaftosa/resistencia-antimicrobiana-produccion-animal>
18. **Peng Z, Li X, Hu Z, Li Z, Lv Y, Lei M, Wu B, et al. 2019.** Characteristics of carbapenem-resistant and colistin-resistant *Escherichia coli* co-producing NDM-1 and MCR-1 from pig farms in China. *Microorganisms* 7: 482. doi: 10.3390/microorganisms7110482
19. **Picazo J, Prieto J. 2016.** Compendio de microbiología. 2° ed. España: Elsevier. 736 p.
20. **Pruthvishree B, Kumar V, Sinha D, Malik Y, Dubal Z, Desingu P, Shivakumar M, et al. 2017.** Spatial molecular epidemiology of carbapenem-resistant and New Delhi metallo beta-lactamase (blaNDM)-producing *Escherichia coli* in the piglets of organized farms in India. *J Appl Microbiol* 122: 1537-1546. doi: 10.1111/jam.13455
21. **Roschanski N, Friese A, Von Salviati C, Hering J, Kaesbohrer A, Kreienbrock L, Roesler U. 2015.** Prevalence of carbapenemase producing Enterobacteriaceae isolated from German pig-fattening farms during the years 2011–2013. *Vet Microbiol* 200: 124-129. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.11.030
22. **Stoesser N, Sheppard A, Peirano G, Anson L, Pankhurst L, Sebra R, Phan H, et al. 2017.** Genomic epidemiology of global *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Escherichia coli*. *Scientific Reports* 7: 5917. doi: 10.1038/s41598-017-06256-2
23. **Tamta S, Kumar V, Pruthvishree B, Karthikeyan R, Rupner R, Chethan G, Dubai Z, et al. 2020.** Faecal carriage of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) and New Delhi metallo beta-lactamase (NDM) producing *Escherichia coli* between piglets and pig farmworkers. *Comp Immunol Microb* 73: 101564. doi: 10.1016/j.cimid.-2020.101564
24. **Watahiki M, Kawahara R, Suzuki M, Aoki M, Uchida K, Matsumoto Y, Kumagai Y, et al. 2020.** Single-tube multiplex polymerase chain reaction for the detection of genes encoding Enterobacteriaceae carbapenemase. *Jpn J*

- Infect Dis 73: 166-172. doi: 10.7883/yoken.JJID.2019.041
25. **Zhang W, Zhu Y, Wang C, Liu W, Li R, Chen F, Luan T, et al. 2019.** Characterization of a multidrug-resistant porcine *Klebsiella pneumoniae* sequence type 11 strain coharboring blaKPC-2 and fosA3 on two novel hybrid plasmids. mSphere 4: e00590-19. doi: 10.1128/mSphere.00590-19
26. **Zhao W, Hu Z. 2011.** IMP-type metallo- $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacilli: distribution, phylogeny, and association with integrons. Crit Rev Microbiol 37: 214-226. doi: 10.3109/1040841X.2011.559944