

Cirugía y Cirujanos

Volumen **73**
Volume

Número **6**
Number

Noviembre-Diciembre **2005**
November-December

Artículo:




**Pseudomonas spp. multirresistentes.
Susceptibilidad in vitro a
combinaciones de dos antibióticos**

Derechos reservados, Copyright © 2005:
Academia Mexicana de Cirugía

**Otras secciones de
este sitio:**

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

***Others sections in
this web site:***

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

***Pseudomonas* spp. multirresistentes. Susceptibilidad in vitro a combinaciones de dos antibióticos**

Q. F. B. Amanda Pliego-Castañeda,* Dr. Jorge Antonio Yáñez-Víguri,** Dr. Tiburcio López-Valle**

Resumen

Introducción: la valoración de la sensibilidad bacteriana a combinaciones de antibióticos *in vitro* puede orientar la terapia de infecciones por bacterias multirresistentes.

Objetivo: estudiar la sensibilidad a combinaciones de dos antibióticos *in vitro*, de cepas de *Pseudomonas* spp. multirresistentes aisladas de pacientes oncológicos.

Material y métodos: se incluyeron 30 cepas de *Pseudomonas* spp resistentes a 26 antibióticos. Se utilizó un método automatizado, adicionando a la solución diluyente una concentración conocida de un segundo antibiótico. Conforme a los lineamientos de *National Committee for Clinical Laboratory Standard*, se incluyeron como controles de calidad las cepas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Escherichia coli* ATCC 35218. Se probaron betalactámicos más aminoglucósidos, carbapenemes más amikacina, quinolonas más cefepime, y ciprofloxacina más ampicilina.

Resultados: más de 50 % de las cepas mostró inhibición a la combinación de amikacina con cefazolina, cefixima o ticarcilina; de 50 a 60 % a amikacina con aztreonam, cefoxitina, cefuroxima, cefotaxima, ceftazidima o piperacilina; 76 % a cefepime más gentamicina; 86 % a cefepime más amikacina; 70 y 76 %, respectivamente, a amikacina con imipenem y meropenem; 83 % a cefepime más ciprofloxacina; 73 % a cefepime más levofloxacina; 100 % a ampicilina con ciprofloxacina.

Conclusiones: la evaluación de la sensibilidad *in vitro* de cepas multirresistentes a combinaciones de antibióticos, permite conocer la asociación de antibióticos más activa contra aquéllas. La combinación de ciprofloxacina y ampicilina fue la más eficaz contra *Pseudomonas* spp. multirresistentes.

Palabras clave: *Pseudomonas*, multirresistencia antibiótica, antibióticos.

Summary

Introduction: *In vitro* antibiotic combination testing would guide therapy selection in patients severely infected by multi-drug resistant *Pseudomonas*.

Objectives: *In vitro*, a two-antibiotic combination susceptible against multi-drug resistant *Pseudomonas* isolated at the Laboratorio Clínico of the Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI in Mexico City were analyzed to determine which antibiotic combination showed the best bactericidal activity.

Material and methods: During 10 months, 30 multi-drug resistant *Pseudomonas* strains were tested. An automated method was used, including a diluting solution with a well-known concentration of a second antibiotic. Quality controls recommended by the NCCLS were used: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; *Escherichia coli* ATCC25922; and *Escherichia coli* ATCC 35218. Combinations were betalactamics-aminoglycosides; carbapenems-amikacin; fluoroquinolones-cefepime and ciprofloxacin-ampicillin.

Results: Ampicillin-ciprofloxacin combination was bactericidal against 100% of the isolates. Cefazolin, cefixime and ticarcillin with amikacin: <50%; aztreonam, cefoxitin, cefuroxime, cefotaxime, ceftazidime and piperacillin with amikacin: 50-60%; cefepime with gentamicin: 76%; cefepime with amikacin: 86%; imipenem and meropenem with amikacin: 70% and 76%; cefepime with ciprofloxacin: 83%; cefepime with levofloxacin: 73%.

Conclusions: *In vitro* antibiotic combination susceptibilities against multi-drug resistant bacteria would be the only way to guide clinicians to select the best therapy in severe infections. We found that the ampicillin-ciprofloxacin combination showed the best *in vitro* effect against multi-drug resistant *Pseudomonas*.

Key words: *Pseudomonas*, multiresistant, antibiotics.

Introducción

El género *Pseudomonas* está conformado por bacilos gramnegativos ampliamente distribuidos en la naturaleza. Habitan en el agua, el suelo, las plantas, materia orgánica en descomposición y aguas negras. En el ambiente hospitalario residen en reservorios húmedos como el suelo, ramos de flores, baños y equipos de terapia respiratoria.¹ Se aíslan de la piel y de materiales inertes,¹⁻⁴ y logran sobrevivir en soluciones detergentes y antisépticas. El material contaminado puede ser fuente de inóculos causantes de infecciones y se ha demostrado la transmisión cruzada de bacterias de paciente a paciente, a través de las manos del personal de salud.¹⁻⁵

* Laboratorio de Microbiología.

** Unidad de Terapia Intensiva.

Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

Solicitud de sobretiros:

Q. F. B. Amanda Pliego-Castañeda,
Bolívar 1050, Col. Niños Héroes de Chapultepec,
03440 México, D. F.
Tel. y fax: 5559 5975.
E-mail: pliegoamanda@yahoo.com.mx

Recibido para publicación: 28-01-2005

Aceptado para publicación: 25-05-2005

Estos bacilos se han convertido en causas importantes y frecuentes de infecciones intrahospitalarias, como neumonías, infecciones de vías urinarias y bacteriemias, las cuales característicamente, aparecen en forma de brotes. Los pacientes que padecen algún tipo de deficiencia del sistema inmunológico, como los internados en terapias intensivas, en unidades de quemados y en centros oncológicos, son particularmente susceptibles de sufrir infecciones graves o fatales.^{1-4,6-9}

Las *Pseudomonas* son resistentes a la mayoría de los antibióticos por su gran capacidad de desarrollar resistencia adquirida. La diseminación de betalactamasas de espectro extendido es la principal causa de su insensibilidad a los medicamentos.¹⁰ El incremento de la resistencia bacteriana es más marcado en áreas de terapia intensiva: en 1998, en Estados Unidos, la frecuencia de infecciones por *Pseudomonas spp.* resistentes a quinolonas y a imipenem se había elevado en 89 y 30 %, respectivamente, en unidades de cuidados críticos, al comparar este año con los cinco previos.¹¹

La elección de antibióticos se realiza con base en recomendaciones de publicaciones médicas y a la experiencia clínica, hasta contar con el reporte de la sensibilidad a antimicrobianos. La terapia para las infecciones causadas por *Pseudomonas* es la combinación de antibióticos, debiendo ser la bacteria susceptible al menos a uno de ellos.^{12,13} Los métodos de antibiosis utilizados en los laboratorios bacteriológicos valoran la sensibilidad a antibióticos aislados a una única combinación: trimetoprim más sulfametoxazol; y a aquellos adicionados de inhibidores de betalactamasas. Cuando el antibiograma reporta *Pseudomonas* multirresistente hay total incertidumbre de que el tratamiento seleccionado logre el alivio de la infección. El conflicto que implica seleccionar un esquema de tratamiento en estos casos ha motivado el desarrollo de métodos que prueben la sensibilidad bacteriana *in vitro* a combinaciones de antibióticos, con el fin de establecer la asociación de fármacos que consiga el mayor efecto bactericida sinérgico.

Ya se ha documentado la calidad de los métodos de antibiosis automatizados que emplean la técnica de microdiluciones seriadas de antibióticos únicos, con mayor eficiencia, en un tiempo más corto y con menos posibilidades de error.¹⁴ También se han informado diversos métodos para valorar la sensibilidad *in vitro* a combinaciones de antibióticos. En 1950, E. Jawetz hizo los primeros ensayos.¹⁵ Otros estudios más recientes son la prueba de susceptibilidad sobre agar-N^{16,17} y los ensayos de susceptibilidad combinada, por los métodos de Monocapa y Biofilm, empleados para valorar la sensibilidad de especies de *Pseudomonas spp.*, incluso las productoras de biofilm, aisladas de pacientes con fibrosis quística.^{18,19} Esta metodología podría llegar a ser la guía terapéutica que ayude a abatir tanto la morbilidad y la mortalidad, como los altos costos económicos y humanos ocasionados por las infecciones por bacterias multirresistentes.^{9-11,13,18-20}

Objetivos

Estudiar la sensibilidad *in vitro* a una combinación de dos antibióticos, de cepas de *Pseudomonas spp.* multirresistentes, aisladas de cultivos de muestras provenientes de pacientes del Hospital de Oncología.

Material y métodos

Se hizo el estudio por duplicado utilizando un método automatizado para valorar la sensibilidad *in vitro* de cepas de *Pseudomonas spp.* multirresistentes, a una combinación de dos antibióticos. Se aprovechó que a las placas se les adiciona una solución para disolver los antibióticos liofilizados de cada pozo, para agregar una solución diluyente, preparada manualmente con una concentración conocida de un segundo antibiótico.

Selección de las cepas

Se incluyeron en el estudio 30 cepas multirresistentes de *Pseudomonas aeruginosa* (18) y *Pseudomonas fluorescens* (12) que habían sido aisladas de heridas quirúrgicas (18), secreciones bronquiales (siete), hemocultivos (tres) y puntas de catéteres venosos centrales (dos). Estas cepas se aislaron de enero a octubre del 2004 y fueron resistentes *in vitro* a los 26 antibióticos de la placa EMIZA-9EF, del equipo automatizado de identificación microbiana y antibiosis "Sensititre Microbiology System" de Instrumental Laboratory. Las concentraciones de antibióticos de esta placa incluyen los rangos para determinar los criterios de sensible, sensibilidad intermedia y resistente, de acuerdo con las recomendaciones del *NCCLS, MIC Testing Supplemental Tables, January, 2003*, Tabla 2B, página 26. La interpretación de las cepas problema se basó en los puntos de corte para los antibióticos individuales establecidos por el mismo comité.

Se incluyeron como controles de calidad las cepas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Escherichia coli* ATCC 35218.

Combinaciones de antibióticos

Las combinaciones de antibióticos que se probaron fueron betalactámicos más aminoglucósidos, carbapenemes más amikacina, quinolonas más cefepime, y ciprofloxacina más ampicilina.

Preparación de las diluciones

Las 30 cepas se sometieron *in vitro* a la combinación de antibióticos, utilizando una placa EMIZA-9EF por cepa, a la que se les adicionó, en cada uno de los pozos de los antibió-

Cuadro I. Combinaciones de betalactámico más aminoglucósido, a diferentes diluciones

Combinaciones	(µg/mL)							
Aztreonam/amikacina	4/4	8/8	16/16	32/32				
Cefazolina/amikacina	2/2	4/8	8/16	16/32				
Cefepime/amikacina	2/4	2/4	4/8	8/16	16/32			
Cefixina/amikacina		4/16	8/16	16/32				
Cefotaxima/amikacina		0.5/32	1/16	2/8	4/4	8/8	16/16	32/32
Cefoxitina/amikacina	2/8	4/8	8/16	16/32				
Cefuroxima/amikacina	2/4	4/8	8/16	16/32				
Ceftazidima/amikacina		0.25/32	0.5/16	¼	2/4	4/8	8/16	16/32
Piperacilina/amikacina	8/4	16/8	32/16	64/32				
Ticarcilina/amikacina	8/7	16/8	32/16	64/32				
Cefepime/gentamicina		2/1	4/2	8/4	16/8			

ticos originales liofilizados, un diluyente que contenía sal pura de un segundo antibiótico a las diluciones que se observan en los cuadros I, II y III.

La amikacina fue proporcionada por cortesía de Bristol Myers Squibb, código 10463016, lote L1T05, con una potencia de 93.1 %, por lo que se ajustaron las diluciones a ésta última. Se pesaron en una balanza analítica electrónica 3.2 mg de sal pura y fueron diluidos en 100 mL de agua inyectable. Esta solución *stock* sirvió de base para obtener cuatro diluciones: 32, 16, 8 y 4 µg/mL.

El cefepime fue proporcionado por Bristol Myers Squibb, código BMY-28142, lote 7R142, con una potencia de 99 %. Se diluyeron 1.6 mg de sal pura en 100 mL de agua inyectable. De esta solución *stock* se obtuvieron las siguientes diluciones: 16, 8, 4 y 2 µg/mL.

La ciprofloxacina fue proporcionada por Bayer de México, lote 99091004PH, con una potencia de 99.8 %. Se diluyeron 0.2 mg de sal pura en 100 mL de agua inyectable. De esta solución *stock* que contenía 2 mg/mL, se obtuvieron diluciones de 1, 0.5 y 0.25 µg/mL de antibiótico.

Tanto los antibióticos de la placa como las sales puras se mantuvieron como polvo liofilizado hasta el momento de llevar a cabo el ensayo, para evitar alteraciones de sus propiedades físicas y químicas.

Se adicionaron a los pozos de reacción 50 µL de los segundos antibióticos diluidos y 50 µL de las cepas problema, previamente ajustadas a 0.5 del estándar de Mc Farland, conforme a la metodología original del equipo automatizado. A los antibióticos betalactámicos de la placa se les añadió amikacina; y a los de gentamicina, cefepime (cuadro I). A los carbapenemes se les adicionó amikacina (cuadro II). A los pozos de quinolonas se les adicionó cefepime y a los pozos de ampicilina se les agregó ciprofloxacina (cuadro III).

Análisis estadístico

Se utilizó χ^2 para comparación de proporciones, considerando un nivel de confianza de 95 %. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos para pruebas de

Cuadro II. Combinación de carbapenem más aminoglucósido, a diferentes diluciones

Combinaciones	(µg/mL)						
Meropenem/amikacina		0.25/8	0.5/16	1/4	2/8	4/16	8/32
Imipenem/amikacina	0.125/18	0.25/32	0.5/16	1/4	2/8	4/16	8/32

Cuadro III. Combinación de betalactámico más quinolona, a diferentes diluciones

Combinaciones	(µg/mL)					
Ampicilina/ciprofloxacina	0.5/1	1/2	2/0.25	4/0.5	8/1	16/2
Cefepime/ciprofloxacina	0.5/1	1/2	2/0.25	4/0.5	8/1	16/2
Cefepime/levofloxacina		2/0.25	4/0.5	8/1	16/2	

Cuadro IV. Resultados de betalactámico más aminoglucósido

Combinaciones	(µg/mL)							% de inhibición*
Aztreonam/amikacina	8/8	16/16	32/32					60.0
Número de cepas inhibidas	9	12	18					
Cefazolina/amikacina		8/16	16/32					50.0
Número de cepas inhibidas		12	15					
Cefepime/amikacina	2/4	4/8	8/16	16/32				86.6
Número de cepas inhibidas	8	4	11	26				
Cefixima/amikacina		8/16	1/32					43.3
Número de cepas inhibidas		12	13					
Cefotaxima/amikacina	0.5/32	1/16	2/8	4/4	8/8	16/16	32/32	60.0
Número de cepas inhibidas	18	11	8	6	8	13	18	
Cefoxitina/amikacina	4/8	8/16	16/32					53.3
Número de cepas inhibidas	8	12	16					
Cefuroxima/amikacina	4/8	8/16	16/32					53.3
Número de cepas inhibidas	9	11	16					
Ceftazidima/amikacina	0.25/32	0.5/16	1/4	2/4	4/8	8/16	16/32	56.6
Número de cepas inhibidas	15	14	9	6	11	17	17	
Piperacilina/amikacina	16/8	32/16	64/32					56.6
Número de cepas inhibidas	9	12	17					
Ticarcilina/amikacina	16/8	32/16	64/32					46.6
Número de cepas inhibidas	9	14	14					
Cefepime/gentamicina	2/1	4/2	8/4	16/8				76.6
Número de cepas inhibidas	18	19	21	23				

* A las mayores concentraciones de antibióticos

hipótesis de dos colas. En las celdas con menos de cinco observaciones se utilizó la prueba exacta de Fisher.

Resultados

Combinaciones de betalactámicos más aminoglucósidos

Las combinaciones de cefazolina, cefixima y ticarcilina con amikacina lograron inhibir menos de 50 % de las cepas. Las de aztreonam, cefoxitina, cefuroxima, cefotaxima, ceftazidima y piperacilina con amikacina inhibieron entre 50 y 60 % de ellas. La de cefepime más gentamicina, 76.6 %. La de cefepime con amikacina dio una inhibición de 86.6 % (cuadro IV).

Combinaciones de carbapenemes más aminoglucósidos

Las combinaciones de imipenem y meropenem con amikacina produjeron inhibiciones de 70 y 76.6 % de las cepas, respectivamente (cuadro V).

Combinaciones de betalactámico más quinolonas

La adición de ampicilina y ciprofloxacina produjo una inhibición de 100 % de las cepas. El cefepime más ciprofloxacina inhibió 83.3 % de ellas. El cefepime más levofloxacina inhibió el desarrollo de 73.3 % de las cepas (cuadro VI).

El duplicado del estudio no mostró diferencia en los resultados de las MIC al compararlo con el original.

Cuadro V. Resultados de carbapenem más aminoglucósido

Combinaciones	(µg/mL)						% de inhibición
Meropenem/amikacina	0.5/16	1/4	2/8	4/16	8/32		76.6
Número de cepas inhibidas	18	10	10	18	23		
Imipenem/amikacina	0.25/32	0.5/16	1/4	2/8	4/16	8/32	70.0
Número de cepas inhibidas	20	18	12	19	19	21	

Cuadro VI. Resultados de betalactámico más quinolona

Combinaciones	(µg/mL)					% de inhibición
Ampicilina/ciprofloxacina	1/2	2/0.25	4/0.5	8/1	16/2	100.0
Número de cepas inhibidas	29	19	19	28	30	
Cefepime/ciprofloxacina	1/2	2/0.25	4/0.5	8/1	16/2	83.3
Número de cepas inhibidas	19	19	19	19	25	
Cefepime/levofloxacina	2/0.25	4/0.5	8/1	16/2		73.3
Número de cepas inhibidas	18	19	19	22		

Se encontró diferencia significativa entre imipenem y meropenem más amikacina contra ampicilina-ciprofloxacina ($p = 0.001$ y $p = 0.01$, respectivamente). No se presentó diferencia al comparar carbapenemes más aminoglucósido contra cefepime más quinolonas, ni contra cefepime más aminoglucósido ($p > 0.05$) (cuadro VII).

Discusión

Con mucha frecuencia se utilizan las combinaciones tanto de betalactámicos como de carbapenemes con aminoglucósidos.^{12,21} De ellas, la mayor sinergia se encontró en la asociación de cefepime con amikacina. Otras combinaciones que podrían ser útiles dado que lograron inhibir más de 70 % el desarrollo de las cepas fueron cefepime-ciprofloxacina (83.3 %),

cefepime-gentamicina (76.6 %), meropenem-amikacina (76.6 %), cefepime-levofloxacina (73.3 %) e imipenem-amikacina (70 %).

En nuestro medio, las cepas de *Pseudomonas spp.* multirresistentes tuvieron mayores porcentajes de sensibilidad a combinaciones de antibióticos que los reportados por Oie y colaboradores¹⁷ en un hospital de Japón: piperacilina-amikacina (33 % *versus* 57 %) meropenem-amikacina (50 % *versus* 77 %) aztreonam-amikacina (50 % *versus* 60 %) Valoraron seis cepas multirresistentes y encontraron que la mejor combinación de dos antibióticos fue la de ceftazidima-amikacina (66 %), que en nuestro laboratorio no fue la más activa (57 %). Lo mismo sucede con los resultados de Lang²⁰ y colaboradores: ciprofloxacina-cefepime (53 cepas), 45 % *versus* 83.3 %; y meropenem-amikacina (54 cepas), 63 % *versus* 77 %. Obtuvieron la mejor sinergia asociando altas dosis de tobramicina, tanto con meropenem (94 %) como con piperacilina/tazobactam (89 %) y

Cuadro VII. Comparación estadística de las combinaciones de antibióticos

Combinaciones	Número de cepas inhibidas	Número de cepas no inhibidas	P
Imipenem/amikacina	21	9	0.001
Ampicilina/ciprofloxacina	30	0	
Meropenem/amikacina	23	7	0.01
Ampicilina/ciprofloxacina	30	0	
Imipenem/amikacina	21	9	0.3
Cefepime/ciprofloxacina	25	5	
Meropenem/amikacina	23	7	0.7
Cefepime/ciprofloxacina	25	5	
Imipenem/amikacina	21	9	0.8
Cefepime/levofloxacina	22	8	
Meropenem/amikacina	23	7	0.8
Cefepime/Levofloxacina	22	8	
Imipenem/amikacina	21	9	0.8
Cefepime/gentamicina	23	7	
Meropenem/amikacina	23	7	1.0
Cefepime/gentamicina	23	7	

ciprofloxacina (88 %), combinaciones que nosotros no valoramos.

En estos estudios las combinaciones que incluyeron aminoglucósidos produjeron un mayor porcentaje de inhibición bacteriana, sin embargo, nosotros observamos que la mejor asociación fue la de ampicilina-ciprofloxacina.

Los hallazgos deben ser tomados con reserva dado que son exclusivamente *in vitro* y no es prudente considerar la combinación eficaz en la práctica clínica hasta no verificar su utilidad en un estudio prospectivo, ya que el empleo de quinolonas, muy extendido en nuestro medio, es un factor de riesgo que favorece la aparición de bacterias multirresistentes.²² Hasta el momento no se han aislado nuevas cepas de *Pseudomonas spp.* multirresistentes causantes de infecciones para valorar si la respuesta clínica al tratamiento antibiótico combinado de ampicilina-ciprofloxacina es satisfactoria.

No existe un método comercial que valore la susceptibilidad a combinaciones de antibióticos. El interés de conocer la susceptibilidad de nuestras cepas multirresistentes nos motivó a probar esta alternativa de diagnóstico al encontrar que resultaba accesible y práctica.

Conclusiones

Las infecciones por cepas de *Pseudomonas spp.* multirresistentes representan un reto terapéutico para los médicos clínicos, por lo que la evaluación *in vitro* de combinaciones de antibióticos podría ser útil para orientar la terapia antibiótica más adecuada.

Aunque se requieren más estudios para validar en la práctica clínica la utilidad de los resultados de estas pruebas, consideramos que con el tiempo cada laboratorio de microbiología instaurará una técnica para llevar a cabo este tipo de estudios.

Referencias

1. Cobben NAM, Drent M, Jonkers M, Wouters EFM, Vaneechoutte M, Stobberingh EE. Outbreak of severe *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infections due to contaminated nebulizers. *J Hosp Infect* 1996;33:63-70.
2. Kolmos HJ, Thuesen B, Nielsen SV, Lohmann M, Kristoffersen K, Rosdahl VT. Outbreak of infection in a burns unit due to *Pseudomonas aeruginosa* originating from contaminated tubing used for irrigation of patients. *J Hosp Infect* 1993;24:11-21.
3. Jumaa P, Chattopadhyay B. Outbreak of gentamicin, ciprofloxacin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an intensive care unit, traced to contaminated quivers. *J Hosp Infect* 1994;28:209-218.
4. Becks VE, Lorenzoni NM. *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a neonatal intensive care unit: a possible link to contaminated hand lotion. *Am J Infect Control* 1995;23:396-398.
5. Pittet D, Mourouga P, Perneger TV, for the Infection Control Program. Compliance with handwashing in a teaching hospital. *Ann Intern Med* 1999;130:126-130.
6. Krcmery V, Trupl J. Nosocomial outbreak of meropenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections in a cancer centre. *J Hosp Infect* 1994;26:69-71.
7. Pliego-Castañeda A, Yáñez-Viguri JA, López-Valle T. Bacterias multirresistentes más comunes en un hospital oncológico. *Rev Med IMSS* 2004;42:217-226.
8. Labarca JA, Pegues DA, Wagar EA, Hindler JA, Bruckner DA. Something's rotten: a nosocomial outbreak of malodorous *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* 1998;26:1440-1446.
9. Murthy R. Implementation of strategies to control antimicrobial resistance. *Chest* 2001;119:405S-411S.
10. Hawkey PM, Munday CJ. Multiple resistance in Gram-negative bacteria. *Rev Med Microbiol* 2004;15:51-61.
11. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS). System report, data summary from January 1990-May 1999, issued June 1999. *Am J Infect Control* 1999;27:520-532.
12. Smith AL, Doershuk C, Goldmann D, et al. Comparison of a lactam alone versus lactam and an aminoglycoside for pulmonary exacerbation in cystic fibrosis. *J Pediatr* 1999;134:413-421.
13. Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, et al; for the Surviving Sepsis Campaign Management Guidelines Committee. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med* 2004;32:858-873.
14. Gerlach EH, Taylor RJ, Bauman B. The comparison of a manual and an automated method of routinely performed serial dilution antibiotic sensitivity test in a large hospital. *Am J Clin Pathol* 1969;52:748-750.
15. Jawetz E. The use of combination of antimicrobial drugs. *Annu Rev Pharmacol* 1968;8:151-170.
16. Oie S, Sawa A, Kamiya A, Mizumo H. *In vitro* effects of a combination of antipseudomonal antibiotics against multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 1999;44:689-691.
17. Oie S, Vematsu T, Sawa A, Mizumo H, et al. *In vitro* effects of combinations of antipseudomonal agents against seven strains of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:911-914.
18. Aaron SD, Ferris W, Henry DA, Speert DP, Mac Donald NE. Multiple combination bactericidal antibiotic testing for patients with cystic fibrosis infected with *Burkholderia cepacia*. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1206-1212.
19. Aaron AD, Ferris W, Ramotar K, Vandemheen K, Chan F, Saginur R. Single and combination antibiotic susceptibilities of planktonic, adherent, and biofilm-grown *Pseudomonas aeruginosa* isolates cultured from sputa of adults with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2002;40:4172-4179.
20. Lang BJ, Aaron SD, Ferris W, Hebert PC, Mac Donald NE. Multiple combination bactericidal antibiotic testing for patients with cystic fibrosis infected with multiresistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:2241-2245.
21. Bochud P-Y, Boten M, Marchetti O, Calandra T. Antimicrobial therapy for patients with severe sepsis and septic shock: an evidence-based review. *Crit Care Med* 2004;32:S495-S512.
22. Nseir S, Di Pompeo Ch, Soubrier S, et al. First-generation fluoroquinolone use and subsequent emergence of multiple drug-resistant bacteria in the intensive care unit. *Crit Care Med* 2005;33:283-289.