

Epidemiología molecular de aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* productores de carbapenemasas tipo KPC provenientes de dos hospitales públicos en los estados Carabobo y Zulia, Venezuela.

Aura Falco^{1, 2}, Yotsimar Barrios², Luis Torres³, Lisette Sandra⁴ y Howard Takiff^{2, 5}.

¹Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Santiago de Cali, Cali, Colombia.

²Laboratorio de Genética Molecular, Centro de Microbiología y Biología Celular, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas, Venezuela.

³Universidad Central de Venezuela, Cátedra de Microbiología, Escuela de Bioanálisis, Caracas, Venezuela.

⁴Centro de Referencia Bacteriológica, Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo, Facultad de Medicina, Escuela de Bioanálisis, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

⁵Unité de Génétique Mycobacterienne, Inst. Pasteur, Paris, France.

Palabras clave: KPC; *Klebsiella pneumoniae*; carbapenemes.

Resumen. *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas tipo KPC es uno de los principales agentes causante de infecciones nosocomiales a nivel mundial. En Venezuela se han identificado aislados de esta bacteria, sin embargo, se conoce poco sobre su dispersión. El objetivo de este estudio fue realizar la epidemiología molecular de aislados de *K. pneumoniae* productores de KPC provenientes de dos hospitales públicos ubicados en los estados Carabobo y Zulia. Se seleccionaron 32 aislados de *K. pneumoniae* clasificados fenotípicamente como productores de KPC, se les realizó la detección del gen *blaKPC* así como su ubicación en el transposón *Tn4401* a través de PCR. El producto de PCR del gen *blaKPC* se secuenció para identificar los alelos circulantes. El análisis genotípico se realizó empleando las técnicas de amplificación por PCR de las secuencias repetidas extragénicas palindrómicas (rep-PCR) y la secuenciación de múltiples loci (MLST). Mediante ensayos de conjugación, se determinó

Autor de Correspondencia: Aura Falco, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Santiago de Cali, Cali, Colombia.
Correo electrónico: aura.falco00@usc.edu.co.

si los genes *blaKPC* se encontraban en moléculas plasmídicas. Los resultados indican que los 32 aislados contenían la variante del gen *blaKPC-2* asociada a la isoforma *Tn440Ib* y se distribuyeron en 9 secuencias tipo (ST), siendo una de ellas nueva. Los ensayos de conjugación indican que el 87,5% de los aislados tienen al gen *blaKPC* en plásmidos movilizables. En estos hospitales el gen *blaKPC-2* se está dispersando a través de plásmidos que llevan al transposón *Tn440Ib*. Las ST más comunes pertenecen a los Complejos Clonales CC258 y CC147, que desempeñan un papel importante en la dispersión de la resistencia a carbapenems a nivel mundial.

Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients in two public hospitals in Carabobo and Zulia states, Venezuela.

Invest Clin 2017; 58(1): 3 - 21

Keywords: KPC; *Klebsiella pneumoniae*; carbapenems.

Abstract. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing bacteria (*K. pneumoniae carbapenemase*) are the most important causative agents of nosocomial infections worldwide. These isolates have been identified in Venezuela, but little is known about their local spread. The aim of this study was to perform molecular epidemiology of KPC-producing *K. pneumoniae* isolated from two public hospitals in the Carabobo and Zulia states of Venezuela. Thirty-two *K. pneumoniae* isolates, phenotypically classified as KPC producers were subjected to PCR to detect the presence of *blaKPC* genes and their location within transposon *Tn440I*, and the *blaKPC* product was sequenced to identify the KPC allele. Genotypic analysis was performed using repeated extragenic palindromic PCR (rep-PCR) and Multi Locus Sequence Typing (MLST). Finally, a conjugation assay determined whether the *blaKPC* genes were carried on transferable plasmids. The results indicate that the 32 isolates contained the *blaKPC-2* variant associated with isoform *Tn440Ib*, and were distributed in nine sequence types (ST), one of which was new. Conjugation assays indicate that 87.5% of the isolates contain the gene *blaKPC* on mobilizable plasmids. In these hospitals, the *blaKPC-2* gene is spreading through the plasmids carrying the transposon *Tn440Ib*. The most common ST belongs to Clonal Complexes CC258 and CC147, which play an important role in the dispersion of resistance to carbapenems worldwide.

Recibido: 15-11-2015 Aceptado: 24-11-2016

INTRODUCCIÓN

Klebsiella pneumoniae productora de carbapenemasas tipo KPC es uno de los principa-

les patógenos resistente a múltiples antibióticos causante de infecciones nosocomiales a nivel mundial(1-3). Las bacterias que producen carbapenemasas son capaces de hidrolizar todos los

β -lactámicos incluyendo a los carbapenemes, que constituyen el tratamiento de elección en las infecciones ocasionadas por bacterias Gram-negativas productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)(3). Las carbapenemasas KPC tienen una alta capacidad de propagación debido a que el gen que las codifica, *blaKPC*, se encuentra en elementos genéticos móviles como plásmidos conjugativos y el transposón *Tn4401*(4,5). En Venezuela, el Programa Venezolano de Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos (PROVENRA, <http://www.provenra.org>), ha hecho una evaluación acumulada de la resistencia a carbapenemes y reportan que para aislados de *K. pneumoniae* fue del 9,4% durante el año 2013. En el país son pocos los estudios que se han realizado acerca de aislados de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasas tipo KPC. El primero de ellos fue hecho por Marcano y col. en el año 2011 (6), en ocho centros de salud ubicados en Caracas. Los resultados obtenidos indican que el 2,1% de los aislados evaluados fenotípicamente eran *K. pneumoniae* productores de carbapenemasas tipo KPC. Por su parte, Labrador y Araque en el año 2014, describieron un aislado de *Klebsiella oxytoca* productora de carbapenemasa tipo KPC-2, proveniente de un paciente pediátrico que adquirió una neumonía nosocomial en el Hospital de la Universidad de los Andes en el estado Mérida (7), mientras que Martínez y col. en el año 2015, reportaron un aislado de *Enterobacter cloacae* co-productor de KPC y VIM proveniente de un paciente de 83 años con infección urinaria severa que ingresó al Hospital de Cumaná (8). Aunque se ha detectado la presencia de aislados de *K. pneumoniae* productores de KPC en algunos hospitales en Venezuela, no se ha descrito ni su epidemiología ni su impacto clínico. En este estudio se planteó realizar la caracterización molecular de los aislados resistentes circulantes en dos hospitales públicos ubicados en los estados Carabobo y Zulia. Para ello se seleccionaron 32

cepas clasificadas por pruebas fenotípicas como *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasas tipo KPC, las cuales fueron aisladas durante el año 2013. Se determinó su relación genética, se identificaron los alelos del gen *blaKPC* y su posible ubicación en el transposón *Tn4401*, así como si se encuentran en plásmidos con capacidad de transferencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de aislados clínicos de *K. pneumoniae*

Se recolectaron aislados clínicos de *K. pneumoniae* durante los meses de febrero a noviembre del año 2013 provenientes de la Ciudad Hospitalaria “Dr. Enrique Tejera” (CHET), localizado en la ciudad de Valencia, estado Carabobo, y del Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo (SAHUM), ubicado en el estado Zulia (Fig. 1). Los análisis moleculares se realizaron con el primer aislado bacteriano recuperado de cada paciente, mientras que la información clínica se obtuvo del registro de cada centro hospitalario y se mantuvo en estricta e irreversible confidencialidad. Este estudio contó con la aprobación de la Comisión de Bioética del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

Criterios de selección de los aislados de *K. pneumoniae* y pruebas de sensibilidad a antibióticos

El criterio de selección de los aislados clínicos de *K. pneumoniae* fue resistencia o resistencia intermedia a cefalosporinas de tercera generación y a carbapenemes. Los niveles de resistencia fueron determinados mediante el método de Kirby-Bauer siguiendo las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) del año 2013 (9). Los antibióticos ensayados fueron: ceftazidima (30 μ g), ceftriaxona (30 μ g), cefotaxima (30 μ g), imipenem

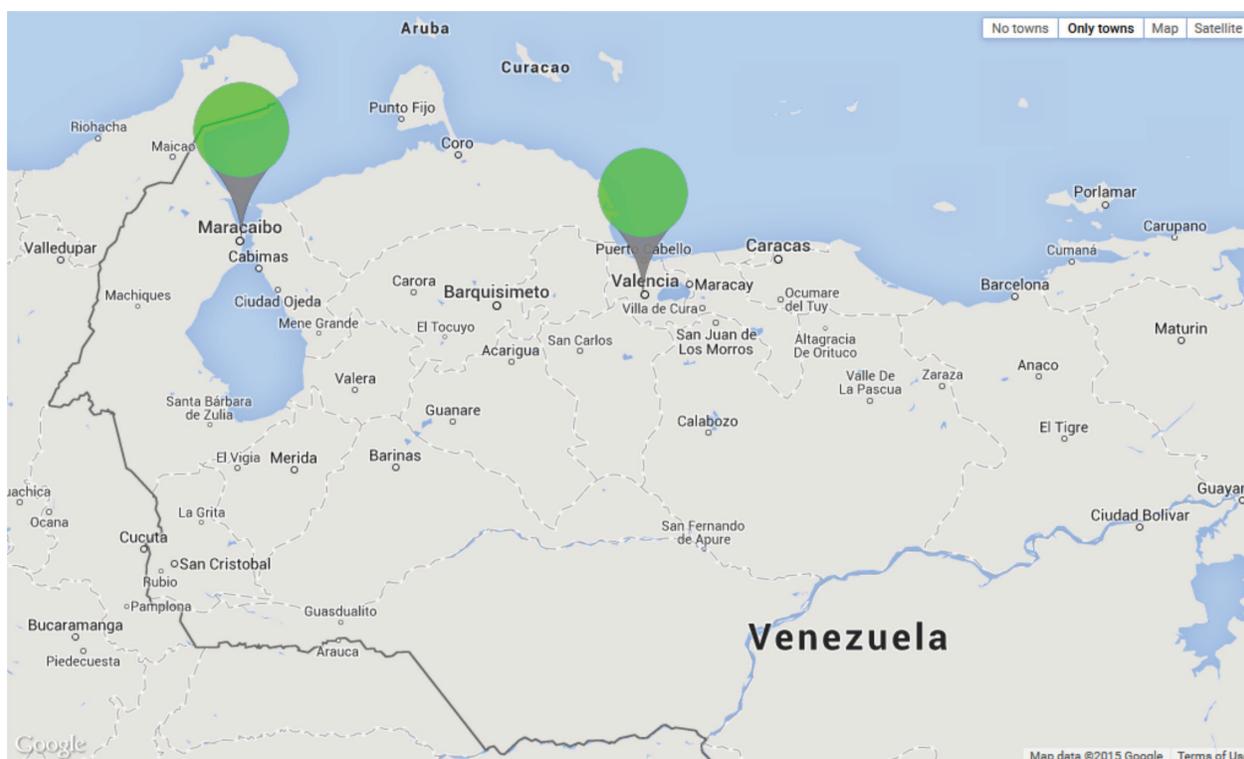


Fig. 1. Ubicación de los hospitales públicos donde se obtuvieron los aislados de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasas tipo KPC. La Ciudad Hospitalaria “Dr. Enrique Tejera” está localizada en la ciudad de Valencia, estado Carabobo; mientras que el “Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo” se encuentra en la ciudad de Maracaibo, estado Zulia.

(10 µg), meropenem (10 µg) y ertapenem (10 µg). A los aislados seleccionados se les realizaron dos pruebas fenotípicas adicionales. La primera de ellas fue el Test de Hodge Modificado (THM), el cual ha sido recomendado por el CLSI, para la detección fenotípica de carbapenemasas en aislados de la Familia *Enterobacteriaceae*.

La segunda prueba que se aplicó fue el test con el ácido 3-aminofenilborónico (AFB), el cual se utilizó para realizar la detección fenotípica de las β-lactamasas del tipo KPC, debido a que el AFB ejerce un efecto inhibitorio sobre el sitio activo (residuo de serina) de este tipo de enzimas.

Detección del gen *blaKPC* y determinación de su entorno genético

Se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar el gen *blaKPC* (10) empleando los iniciadores que se observan en la *Tabla I*. También se determinó el entorno genético del gen *blaKPC* utilizando iniciadores específicos para el transposón *Tn4401* (11) (*Tabla I*). Después de la amplificación por PCR de los fragmentos, éstos fueron secuenciados en MacroGen, Corea, empleando los iniciadores delantero y reverso correspondientes. Se compararon las secuencias con las disponibles en la base de datos Lahey (www.lahey.org/Studies/) y el GenBank® utilizando el Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (www.ncbi.nlm.gov/blast/).

TABLA I
INICIADORES EMPLEADOS DURANTE ESTE ESTUDIO

	Secuencias de los iniciadores	Tamaño producto (pb)	Temp. hibridación (°C)	Referencias
Carbapenemases				
KPC-F	5-ATGTCACTGTATCGCCGTCT-3			
KPC-R	5-TTTTCAGAGCCTTACTGCCC-3 5-GATATCGTTGGTGGTGCCAT-3	894	53	10
Tn4401				
4281	5-GGCACGGCAAATGACTA-3	651	55	11
4714	5-GAAGATGCCAAGGTCAATGC-3			
EcoRIout	5-CACCCGACCTGGACGAACTA-3	252	55	11
3'YCEnd	5-GCATCAAACGGAAGCAAAAAG-3			
3781L	5-CACAGCGGCAGCAAGAAAGC-3	Variable	55	11
3098U	5-TGACCCTGAGCGGCGAAAGC-3			
905L	5-GCGACCGGTCAGTTCCTTCT-3	199	55	11
816U	5-CACCTACACCACGACGAACC-3			
141R-6	5-TCACCGGCCCTCACCTTTGG-3	463	55	11
5'endYC	5-CTTAGCAAATGTGGTGAACG-3			
rep-PCR				
REP1	5-IIIGCGCCGICATCAGGC-3	Variable	50	12
REP2	5-ACGTCTTATCAGGCCTAC-3			
MLST				
rpoB F Vic3	5-GGCGAAATGGCWGAGAACCA-3	1070	50	14
rpoB R Vic2	5-GAGTCTTCGAAGTTGTAACC-3			
mdh F 130	5-CCCAACTCGCTTCAGGTTTCAG-3	757	50	14
mdh R 867	5-CCGTTTTTCCCCAGCAGCAG-3			
pgiF 1R	5-GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC-3	718	50	14
pgi R 1F	5-CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT-3			
gapA F 173	5-TGAAATATGACTCCACTCACGG-3	663	60	14
gapA R 181	5-CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT-3			
phoE F 604.1	5-ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG-3	603	50	14
phoE R 604.2	5-TGATCAGAAGTGGTAGGTGAT-3			
tonB 1F	5-CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT-3	540	45	14
tonB 2R	5-ATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG-3			
infB 1F	5-CTCGTCTGCTGGACTATATTCG-3	463	50	14
infB 1R	5-CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC-3			

Genotipificación molecular

Las relaciones genéticas entre los aislados de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasas tipo KPC fueron determinadas empleando las técnicas de amplificación por PCR de las secuencias repetidas extragénicas palindrómicas (rep-PCR) y la secuenciación de múltiples loci (MLST). El rep-PCR se realizó empleando los iniciadores REP1 y REP2 descritos por Versalovic y col. (12). Los criterios empleados para interpretar los patrones generados por rep-PCR, fueron los establecidos por Tenover y col. en el año 1995 (13), quienes definieron cuatro categorías de relación genética y epidemiológica: a) Indistinguibles: son aislamientos que muestran patrones de bandas iguales por lo que pueden ser considerados clones; b) Estrechamente relacionados: los patrones de bandas difieren en dos o tres bandas; c) Posiblemente relacionados: sus patrones muestran cuatro a seis bandas de diferencia; y d) No relacionados: los patrones de bandas difieren en más de seis. Adicionalmente, los patrones de bandas generados para cada aislado bacteriano se analizaron con el software Bionumerics, versión 7.5 (Applied Maths NV/ Inc.), empleando el coeficiente binario Dice y la media aritmética UPGM (Unweighted Pair Group Method), con ajustes de tolerancia y optimización del 1% para crear el dendograma. La posición de las bandas en cada gel se normalizó empleando el marcador de peso molecular 100 pb Ladder (New England Biolabs® Inc.) como un estándar de referencia externo.

El MLST se realizó de acuerdo a Diancourt y col. (14) (Tabla I). Después de la amplificación por PCR, los fragmentos fueron secuenciados por Macrogen, Corea. Los alelos y las ST fueron asignados por el sitio web del MLST de *Klebsiella pneumoniae* (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Kpneumoniae.html>). Para establecer las relaciones entre las secuencias tipo, se empleó el algoritmo goeBURST (15) implementado en el softwa-

re PHYLOViZ (<http://goeburst.phyloviz.net/>) (16). Los Complejos Clonales (CC) fueron definidos a nivel de variantes tanto en un solo locus (SLV) como en dos (DLV) y tres locus (TLV).

Ensayos de conjugación

Se realizaron ensayos de conjugación con el fin de determinar si los genes *blaKPC* se encuentran en moléculas de ADN plasmídico movilizables. Se emplearon como cepas donantes los aislados de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasas KPC y sensibles a rifampicina, mientras que como cepa receptora se empleó a *Escherichia coli* J-62 (F⁻, *his*⁻, *pro*⁻, *trp*⁻, *lac*⁻, RIF^R). Las transconjugantes fueron seleccionadas en placas de agar LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL) y rifampicina (50 µg/mL). La presencia del gen *blaKPC* en las transconjugantes fue confirmada por PCR.

RESULTADOS

Recolección de aislados clínicos

Se seleccionaron 32 aislados clínicos de *K. pneumoniae*, 10 de ellos provenientes de la Ciudad Hospitalaria “Dr. Enrique Tejera” (CHET) y 22 del Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo (SAHUM). El servicio de procedencia de las muestras fue variado, 13 (43,3%) provenían de la unidad de terapia intensiva de adultos y 8 (26,7%) de terapia intensiva pediátrica, seguida de 4 (13,4%) de medicina interna, 3 (10%) del servicio neonatal y 1 (3,3%) de observación de adultos y pediatría, respectivamente. Hubo 2 aislados del CHET que no tenían la información correspondiente al servicio de procedencia.

Criterios de selección de los aislados de *K. pneumoniae* y pruebas de sensibilidad a antibióticos

Todos los aislados fueron resistentes a cefalosporinas de tercera generación y carbapene-

mes ensayados. Así mismo, todos los aislados fueron positivos para las pruebas fenotípicas THM y Test AFB, lo cual indica que son presuntos productores de carbapenemasas tipo KPC.

Detección del gen *blaKPC* y determinación de su entorno genético

El gen *blaKPC* fue detectado en los 32 aislados evaluados y se pudo determinar que el alelo circulante fue KPC-2 para todos ellos. Con respecto al entorno genético de los genes, se detectó en los 32 aislados un producto de PCR de 703 pb, el cual ha sido asociado con la variante "b" del transposón *Tn4401*. La secuencia de inserción *ISKpn6* y el gen *tnpA* también fueron amplificados en los 32 aislados. Sin embargo, para ninguno de ellos se obtuvieron los amplificadores correspondientes a las secuencias repetidas invertidas del *Tn4401* descritos por Naas y col. (5,17).

Genotipificación molecular

El análisis de los perfiles generados por rep-PCR reveló que los aislados de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasas tipo KPC evaluados tienen diferentes genotipos (Fig. 2), esta tendencia también se pudo apreciar cuando se realizó el análisis por MLST. Aunque se reportan 9 secuencias tipo diferentes, ninguna se encontró en ambos hospitales. Así tenemos que en el SAHUM se localizaron los siguientes genotipos: ST14 en los servicios de neonatal y terapia intensiva, ST45 en terapia intensiva de adultos y pediátrica, ST147 en los servicios de neonatal y terapia intensiva de adultos, ST273 en neonatal, pediatría y terapia intensiva pediátrica, ST833 en terapia intensiva y ST1035 en el servicio de terapia intensiva pediátrica (Figs. 2 y 3). Mientras que en el CHET se identificaron los siguientes genotipos: ST437 localizado en los servicios terapia intensiva y medicina interna, ST1535 y una secuencia tipo nueva, ST1858, que fue depositada en la base de datos de *K. pneumoniae*,

y se encontraba en el servicio de terapia intensiva de adultos (Figs. 2 y 3).

Con respecto a los perfiles generados por rep-PCR para los aislados procedentes del CHET, se pudo determinar que hay 3 grupos, y en dos de ellos, sus miembros mantienen una relación genética clonal. El primero está conformado por los aislados HCV25 y HCV67, mientras que el segundo por los aislados HCV13, HCV19, HCV23 y HCV66 (Fig. 2). Estos hallazgos fueron confirmados usando la técnica MLST, cuyos resultados indican que los aislados de cada uno de los grupos comparten la misma secuencia tipo, siendo para el primer grupo, la ST1858, mientras que para el segundo, la ST437 (Fig. 3). Finalmente, se pudo comprobar que los aislados HCV12, HCV20, Kpn10346 y Kpn126169 se pueden considerar estrechamente relacionados (Fig. 2). En este caso, los resultados del MLST indican que tres de estos cuatro aislados comparten la misma secuencia tipo, la ST437, mientras que Kpn126169, es portador de la ST1535 (Fig. 3). Con respecto a los perfiles generados por rep-PCR para los aislados procedentes del SAHUM, se pudo determinar que hay 6 grupos, 5 de los cuales mantienen una relación clonal entre sus miembros. El grupo 1 está constituido por los aislados HUZ1, HUZ2, HUZ3 y HUZ4; el grupo 2 por las muestras HUZ5, HUZ6 y HUZ7; el grupo 3 por los aislados HUZ9 y HUZ10; el grupo 4 por las muestras HUZ17, HUZ19, HUZ20 y HUZ22; y el grupo 5 por los aislados HUZ21, HUZ23, HUZ24 y HUZ25 (Fig. 2). Los resultados obtenidos por rep-PCR indican que los grupos 1 y 2 están posiblemente relacionados, mientras que los grupos 2, 3, 4 y 5 están estrechamente relacionados. Sin embargo, los resultados del MLST indican que todos los aislados que forman parte del grupo 1 y 2 tienen la ST273, mientras que los aislados que forman parte del grupo 3 y 4, tienen la ST14 y ST147, respectivamente. En el grupo 5, aun cuando los aislados pueden ser considerados clones por rep-

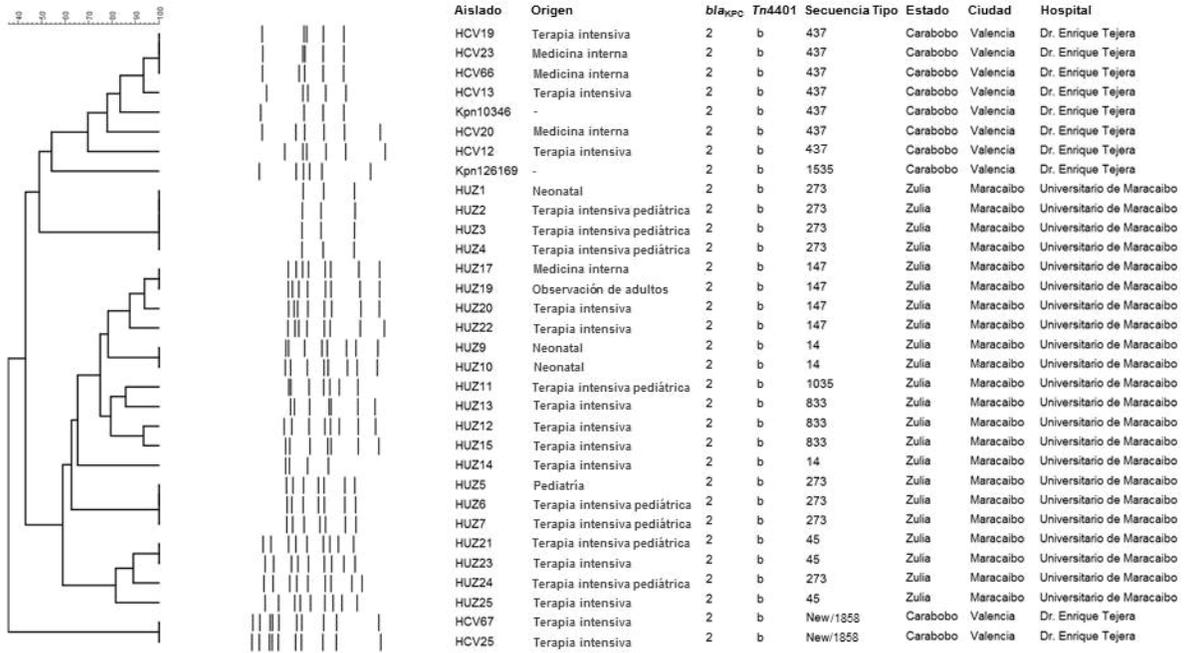


Fig.2. Relación genética de los 32 aislados de *K. pneumoniae* productores de *blaKPC-2* (Bionumerics versión 7.5, Applied Maths NV/Inc). La lista de la derecha contiene el origen de las muestras, los resultados del análisis de las secuencias del gen *blaKPC*, de la región no conservada del transposón *Tn4401*, la secuencia tipo (ST), el estado, ciudad y hospital de donde provienen las muestras.

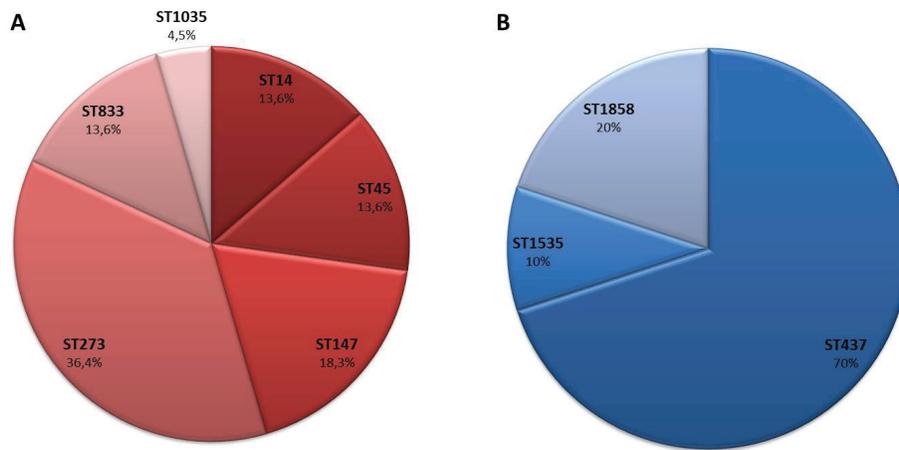


Fig.3. Porcentaje de las Secuencias Tipo (ST) encontradas en A) “Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo” (SAHUM) y en B) Ciudad Hospitalaria “Dr. Enrique Tejera” (CHET).

PCR, difieren en la secuencia tipo. Las muestras HUZ21, HUZ23 y HUZ25 pertenecen al ST45, mientras que la HUZ24 a la ST273. Finalmente, el grupo 6 está constituido por los aislados HUZ11, HUZ12, HUZ13 y HUZ15, que están estrechamente relacionados entre sí y pertenecen a la ST833; y la muestra HUZ14, que tiene un perfil único y pertenece al ST14 (Fig. 3).

Los resultados obtenidos aplicando el algoritmo goeBURST indican que, al evaluar los perfiles alélicos usando como parámetros que los STs compartan 6 (SLV) o 5 (DSV) de los 7 genes con al menos otro miembro del grupo, se observa que tanto los STs 273 y 147 (ambos ubicados en el SAHUM) como los STs 437 y 833 (ubicados en CHET y SAHUM, respectivamente), se agrupan en un mismo CC, mientras que el resto de los STs permanecen sin agruparse ("singletons") (Fig. 4A). Al usar como parámetro que los STs en el mismo grupo compartan al menos 4 de los 7 genes (TLV) con al menos otro miembro del grupo, se encontraron los mismos CC mencionados previamente, pero además se puede observar que el ST14, aislado en el SAHUM, es un TLV del ST437, aislado en el CHET (Fig. 4B).

Ensayos de conjugación

Veintiocho de los 32 aislados (87,5%) de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasas tipo KPC fueron capaces de transferir el gen *blaKPC* a la cepa receptora *E. coli* J-62, mientras que cuatro aislados (12,5%) no lo hicieron bajo las condiciones ensayadas. La presencia del gen *blaKPC* fue confirmada por PCR en todos los transconjugantes, lo que indica que los genes se encuentran en plásmidos conjugativos. Los aislados provenientes del SAHUM que no conjugaron fueron HUZ2 y HUZ4. Ambos pertenecen a la misma secuencia tipo (ST273) y proceden del servicio de terapia intensiva pediátrica. Del CHET, los aislados que no conjugaron fueron la muestra HCV67, con la secuencia

tipo ST1858 y localizada en la sala de terapia intensiva de adultos, y Kpn10346 con ST437, de la cual no se obtuvo información acerca de su ubicación.

DISCUSIÓN

Los carbapenemes han sido el tratamiento de elección para las infecciones causadas por enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), sin embargo, su uso ha traído como consecuencia la selección de bacterias resistentes (18). Aunque la resistencia a carbapenemes en enterobacterias es todavía poco común en Venezuela, es importante destacar que generalmente el gen *blaKPC* se localiza en elementos genéticos móviles como transposones y plásmidos que tienen capacidad de transmitirse de forma horizontal entre bacterias (5). Por este motivo, es muy importante tomar medidas de control eficaces que permitan la detección rápida de bacterias portadoras del gen *blaKPC* con el fin de evitar su diseminación a nivel hospitalario. En este estudio se integran los datos clínicos y moleculares de aislados de *K. pneumoniae* provenientes de dos hospitales públicos ubicados en los estados Carabobo y Zulia, y en el que además, se pudo determinar la presencia de los alelos *blaKPC* y de los genotipos circulantes.

Un total de 21 de los 32 (70%) aislados de *K. pneumoniae* carbapenemes resistentes provienen de terapia intensiva de adultos y niños, mientras que el 30% restante fueron aislados de las áreas de medicina interna, servicio neonatal, observación de adultos y pediatría, lo cual significa que estas bacterias se encuentran ampliamente distribuidas en diferentes servicios de ambos hospitales, que son considerados centros de alta complejidad debido a que están clasificados dentro del sistema de salud venezolano como tipo IV.

Se han descrito 23 variantes del gen *blaKPC*

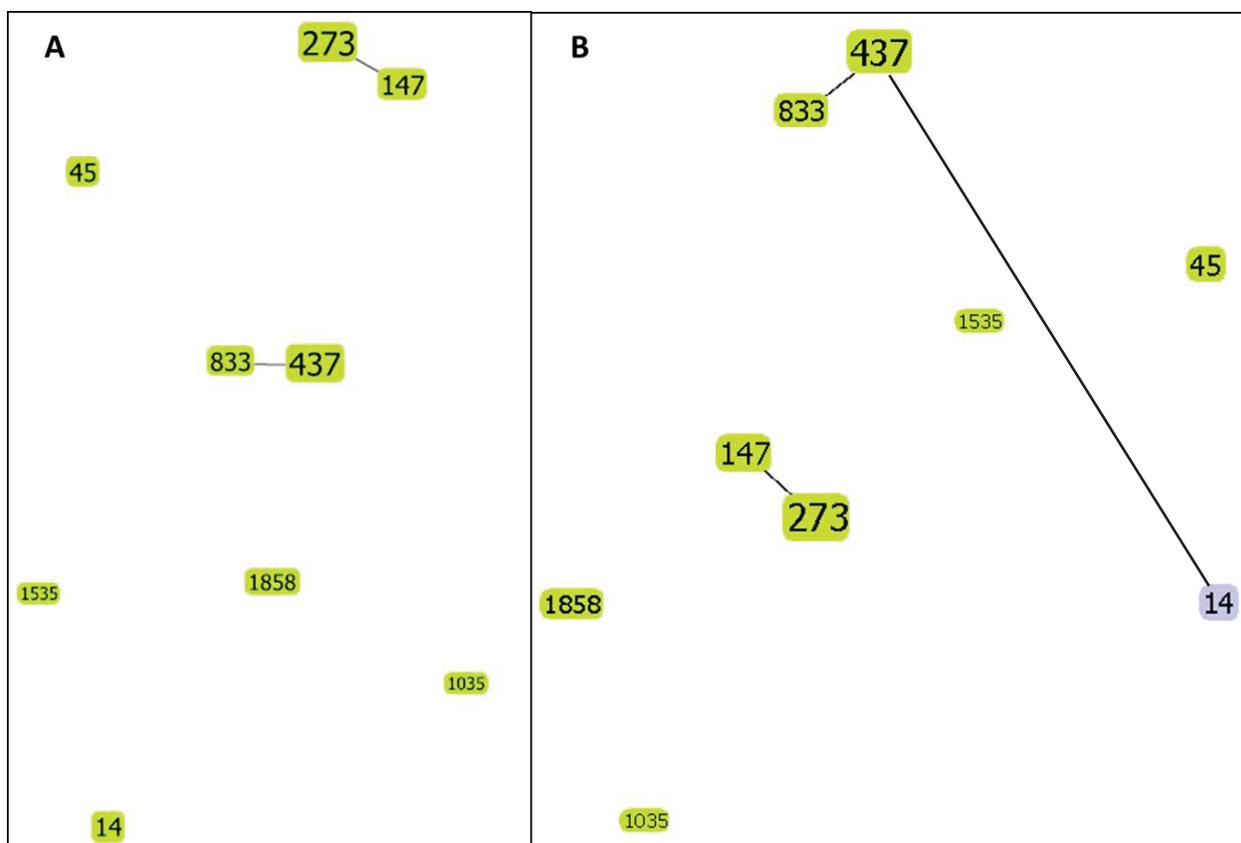


Fig. 4. Grupo generado con goeBURST de aislados de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasas tipo KPC que comparten A) al menos 6 (SLV) y 5 DLV) genes de los evaluados y B) al menos 3 (TLV) de los 7 genes evaluados en el esquema del MLST. El color verde representa al genotipo ancestral hipotético, el negro conecta los STs relacionados, mientras que el color azul relaciona a los STs que difieren en 3 genes (TLV).

(desde KPC-2 hasta KPC-24) (<http://www.lahey.org/studies/other.asp#table1>), y en este estudio se pudo determinar que los 32 aislados evaluados eran portadores del alelo KPC-2, uno de los más distribuidos a nivel mundial (19,20) incluyendo países de América del Sur como Colombia (21-23), Brasil (24-27), Argentina (28,29) y Venezuela (7). Con respecto al ambiente genético que rodea al gen *blaKPC*, se ha descrito a nivel mundial que este gen generalmente se encuentra asociado al elemento móvil *Tn4401*, el cual también está compuesto por los genes que codifican para una transposasa y una resolvasa y

dos secuencias de inserción (*ISKpn6* y *ISKpn7*) (5). Hasta el momento, se han descrito 5 isoformas del transposón (a-e), que se diferencian por polimorfismos localizados hacia el extremo 5' del gen *blaKPC*. En este estudio se encontró que el gen *blaKPC-2* está asociado con la isoforma "b" del transposón *Tn4401* en los 32 aislados estudiados, la cual se ha descrito en diversos países como EUA (20), Grecia (30), Colombia (11) y Brasil (4). En este estudio no se obtuvieron los amplificadores correspondientes a las secuencias repetidas invertidas de las regiones que flanquean al transposón *Tn4401*, al igual que lo

han reportado Pereira y col. (17), lo que sugiere que los sitios de inserción del elemento móvil podrían ser diferentes a los descritos en el aislado de *K. pneumoniae* mencionados por Naas y col. (5).

Con respecto a la genotipificación molecular de los aislados de *K. pneumoniae* a través del rep-PCR y MLST, se pudo evidenciar que hay una diversidad de genotipos circulando en ambos hospitales (Figs. 2 y 3). Sin embargo, aunque rep-PCR es una técnica sencilla, rápida, de relativo bajo costo con excelente reproducibilidad, tiene la desventaja de poseer una versatilidad y poder de resolución menor que el MLST (31,32). Es por este motivo, que esta técnica suele utilizarse como primer paso ante un estudio epidemiológico y se debe complementar con otra técnica que tenga un poder de discriminación mayor como el MLST(33). Los resultados de este estudio indican que las secuencias tipo obtenidas a través de MLST y los perfiles de bandas por rep-PCR, se correlacionan en gran medida. Sin embargo, hay aislados que por rep-PCR se encuentran estrechamente relacionados pues tienen patrones de bandas que varían en 2 bandas, pero tienen la misma secuencia tipo, como por ejemplo HCV13 y HCV20. Esto puede deberse a que en el genoma de estas bacterias ocurrió algún cambio, como una inserción o una deleción, lo cual provocó una variación en el patrón de bandas pero no afectó ninguno de los 7 genes secuenciados en el esquema de MLST para *K. pneumoniae*. Los resultados indican que el SAHUM fue el que mostró una mayor diversidad genética debido, muy probablemente, a que había un mayor número de aislados procedentes del mencionado hospital. Entre los 32 aislados de *K. pneumoniae* portadores del gen *blaKPC-2*, se encontraron 9 STs establecidos por MLST (Figs. 2 y 3) y 7 perfiles indistinguibles por rep-PCR (Fig. 2). El 66,6% de los genotipos se encontró en el SAHUM, mientras que el 33,3% restante en el CHET y

ninguna de las secuencias tipo se encontraron de forma compartida entre ambos hospitales (Tabla II). La ST437 ubicada en los servicios de terapia intensiva y medicina interna de adultos del CHET, y la ST833(34) localizados en el servicio de terapia intensiva de adultos del SAHUM, representan el 31,25% (n = 10/32) de los aislados y forman parte del mismo CC (Fig. 4). Ambos genotipos son variantes en un locus (*tonB*) de las secuencias tipo ST258, que a su vez forman parte del Grupo Clonal 258 (GC258), que incluye los genotipos más exitosos para dispersar los genes *blaKPC* a nivel mundial. Mientras que en Venezuela es la primera vez que se reporta la presencia de GC258, éste ha sido reportado en países como: China (35), Corea (36,37), Hungría (38), Polonia (39), Brasil (4,40,41), Grecia (30) España (42) e Inglaterra (43). La ST437 se ha conseguido en Brasil, tanto en aislados clínicos (4,40,41,44-46) como en aislados procedentes de ríos urbanos ubicados al sureste de ese país (47). La secuencia tipo ST833 se ha reportado principalmente en Israel (34), pero también se ha conseguido en Italia (48), específicamente en un aislado clínico de *K. pneumoniae* productor de carbapenemasa tipo KPC-2 proveniente de un hemocultivo de un paciente de tres años de edad procedente de Venezuela que fue admitido en el Hospital Pediátrico de Trieste para someterse a un trasplante de médula. Es importante mencionar que el estudio epidemiológico de aislados clínicos de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasas tipo KPC que estamos desarrollando en Venezuela, ha permitido evidenciar la presencia del ST833 en otros 2 estados diferentes: Distrito Capital (datos no publicados) y Anzoátegui (49) (Tabla II).

El segundo ST más común en este estudio es el ST273, el cual representa el 25% (n = 8/32) de los aislados y es variante en un locus (*tonB*) de la secuencia tipo ST147, que a su vez está representada por 4 aislados (12,5%). Ambos genotipos se encuentran en el SAHUM (Tabla

TABLA II
SECUENCIAS TIPO REPORTADAS DURANTE LA REALIZACIÓN DE ESTE ESTUDIO

ST	Hospital de procedencia	Localización a nivel mundial	Genes <i>bla</i> asociados a las ST
14	SAHUM	India, Reino Unido, Suecia, Finlandia	CTX-M-1, NDM-1, OXA-48, SHV, OXA-1, OXA-181
45	SAHUM	Brasil, Japón, Irlanda	CTX-M-15, SHV-1, OXA-1
147	SAHUM	Grecia, Italia	KPC-2
273	SAHUM	Rusia, Italia	KPC-2, KPC-3
437	CHET	Brasil	KPC-2
833	SAHUM	Italia, Venezuela	KPC-2
1035	SAHUM	Brasil	No se han descrito
1535	CHET	Japón	No se han descrito
1858	CHET	Venezuela (este estudio)	KPC-2

ST: secuencia tipo, SAHUM: Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo, CHET: Complejo Hospitalario Dr. Enrique Tejera.

II) y forman parte del mismo Complejo Clonal (Fig. 4), el CC147, el cual ha sido encontrado principalmente en Israel (34) y ha sido asociado a la producción de diferentes tipos de carbapenemasas como: VIM (50-52), NDM (53,54) y KPC. Precisamente, se ha reportado el ST147 en aislados de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasas tipo KPC-2 en Grecia (30) e Italia (55). Por su parte, el genotipo ST273, ha sido asociado previamente con aislados productores de CTX-M-15 en países como Hungría (56), Italia (57), España (58) y Tunes (59). Además se ha encontrado este ST en países como Noruega e Italia (60), asociados a la producción de β -lactamasas como VIM, SHV y TEM, así como productores de carbapenemasa tipo KPC-2 en Rusia (61) y tipo KPC-3 en Italia (62) (Tabla II).

El Grupo Clonal 15 (GC15), compuesto por las secuencias tipo ST14/15, ha sido reportado de forma frecuente como productor de BLEE y otras β -lactamasas a nivel mundial (34,53,56,63-66). Específicamente, la ST14 se

ha relacionado frecuentemente como portadora de genes del tipo *bla*CTX-M grupo 1 (53), *bla*NDM-1, *bla*OXA-48, *bla*SHV, *bla*OXA-1 y *bla*OXA-181 (53,67-70). Sin embargo, hasta la fecha este genotipo, localizado en el SAHUM, no había sido asociado con la producción de carbapenemasas tipo KPC-2, como se hace en este estudio (Tabla II). Por su parte, la secuencia tipo ST45 ha sido reportada en tres países: Brasil (71), Japón (72) e Irlanda (70). En todos los casos ha sido relacionada con la producción de β -lactamasas como: CTX-M-15, SHV-1 y OXA-1 pero este también nunca antes como productora de carbapenemasas tipo KPC-2 (Tabla II). Otros genotipos observados durante la realización de este trabajo, como ST1035 y ST1535, no han sido reportados previamente, por lo tanto, no se han relacionado con la producción de carbapenemasas tipo KPC. Sin embargo, en la base de datos del Instituto Pasteur que maneja el MLST de *K. pneumoniae*, se puede evidenciar que la ST1035 ha sido detectada en Rio

de Janeiro, Brasil, mientras que la ST1535 ha sido aislada en Kyoto, Japón. Adicionalmente, en este estudio reportamos una secuencia tipo nueva, ST1858, que fue depositada en la base de datos de *K. pneumoniae* (Tabla II).

Los resultados obtenidos usando el algoritmo goeBURST indican que hay 2 complejos clonales formados por los STs 273/147 y 437/833, que comparten 6 de los 7 genes evaluados por MLST (Fig. 4). Sin embargo, debido a la presencia de 5 STs que permanecen sin agruparse en CC y debido a que el número de STs es tan pequeño y tan variable entre sus loci, la herramienta no puede diferenciar un genotipo ancestral hipotético. En general, los resultados de genotipificación obtenidos en este estudio sugieren que la diseminación de los genes blaKPC-2 en ambos hospitales ocurre a través de genotipos que forman parte de clones epidémicos como: GC258, CC147 y GC15, los cuales representan el 66,6% (n = 6/9) de los genotipos en este estudio, y que además se han descrito como exitosos para propagar los genes blaKPC a nivel mundial.

Los ensayos de conjugación realizados usando como cepas donantes los aislados de *K. pneumoniae* portadores del gen blaKPC, indican que el 87,5% contenían el gen en plásmidos que eran transferibles horizontalmente a través del proceso de conjugación. En conjunto, estos resultados indican que aun cuando los aislados compartan o no una secuencia tipo, lo que está contribuyendo a la resistencia a carbapenemes mediada por el gen blaKPC es el ADN plasmídico de cada una de las muestras, por lo que sería importante aislarlos y evaluar su perfil. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de los plásmidos en la diseminación del gen blaKPC en las diferentes salas de un hospital y a su vez resalta la necesidad de tomar las medidas de control que eviten su diseminación a nivel intra e interhospitalario.

Conocer la epidemiología molecular de ais-

lados clínicos de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasas tipo KPC es un paso importante hacia el desarrollo de estrategias específicas para prevenir la propagación de este patógeno resistente a múltiples drogas en nuestro país. Hay evidencia de que en Venezuela la expansión del gen blaKPC-2 se produce a través de la dispersión del transposón Tn4401b, que se localiza generalmente en plásmidos conjugativos. En este trabajo se han descrito 9 genotipos circulantes en dos hospitales públicos del país. El 66,6% (n = 6/9) de los genotipos pertenecen a clones epidémicos como: GC258, CC147 y GC15, los cuales se han descrito como exitosos en la dispersión de los genes blaKPC a nivel mundial. Esto podría significar que en Venezuela, la propagación de los genes que codifican para carbapenemasas tipo KPC puede estar favorecida por su localización en plásmidos y transposones, y también por clones eficientes.

AGRADECIMIENTOS

Al equipo de “curadores” que manejan la base de datos del MLST y del genoma de *Klebsiella pneumoniae* del Instituto Pasteur por incorporar la nueva secuencia tipo reportada en este trabajo y ponerla a disposición del público a través del enlace en <http://bigsdw.web.pasteur.fr/>. La realización de este trabajo fue financiada por el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, bajo el número de proyecto 1237.

REFERENCIAS

1. Nordmann P. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: overview of a major public health challenge. *Med Mal Infect* 2014; 44(2): 51-56.
2. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 2011; 17(10): 1791-1798.

3. **Nordmann P, Cuzon G, Naas T.** The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 2009; 9(4): 228-236.
4. **Pereira PS, de Araujo CF, Seki LM, Zahner V, Carvalho-Assef AP, Asensi MD.** Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). *J Antimicrob Chemother* 2013; 68(2): 312-316.
5. **Naas T, Cuzon G, Villegas MV, Lartigue MF, Quinn JP, Nordmann P.** Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase *bla* KPC gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(4): 1257-1263.
6. **Marcano D, De Jesus A, Hernandez L, Torres L.** Frequency of enzymes associated with reduced sensitivity to beta-lactam antibiotics in enterobacteria isolates, Caracas, Venezuela. *Rev Panam Salud Pública* 2011; 30(6): 529-534.
7. **Labrador I, Araque M.** First description of KPC-2-producing *Klebsiella oxytoca* Isolated from a pediatric patient with nosocomial pneumonia in Venezuela. *Case Rep Infect Dis* 2014; 2014: 434987.
8. **Martínez D, Marcano D, Rodulfo H, Salgado N, Cuaical N, Rodriguez L, Caña L, Medina B, Guzman M, De Donato M.** KPC and VIM producing *Enterobacter cloacae* strain from a hospital in northeastern Venezuela. *Invest Clin* 2015; 56(2): 182-187.
9. **CLSI.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 22nd International Supplement M100-S22, Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA: CLSI; 2012. p. 52-61.
10. **Bradford PA, Bratu S, Urban C, Visalli M, Mariano N, Landman D, Rahal JJ, Brooks S, Cebular S, Quale J.** Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 beta-lactamases in New York City. *Clin Infect Dis* 2004; 39(1): 55-60.
11. **Cuzon G, Naas T, Truong H, Villegas MV, Wisell KT, Carmeli Y, Gales AC, Venezia SN, Quinn JP, Nordmann P.** Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce beta-lactamase *bla*KPC-2 gene. *Emerg Infect Dis* 2010; 16(9): 1349-1356.
12. **Versalovic J, Koeth T, Lupski JR.** Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 1991; 19(24): 6823-6831.
13. **Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B.** Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33(9): 2233-2239.
14. **Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grumont PA, Brisse S.** Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol* 2005; 43(8): 4178-4182.
15. **Francisco AP, Bugalho M, Ramirez M, Carrico JA.** Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach. *BMC Bioinformatics* 2009; 10: 152.
16. **Francisco AP, Vaz C, Monteiro PT, Melo-Cristino J, Ramirez M, Carrico JA.** PHYLOViZ: phylogenetic inference and data visualization for sequence based typing methods. *BMC Bioinformatics* 2012; 13: 87.
17. **Pereira CA, Marra AR, Camargo LF, Pignatari AC, Sukiennik T, Behar PR, Medeiros EA, Ribeiro J, Girão E, Correa L, Guerra C, Carneiro I, Brites C, Reis**

- M, de Souza MA, Tranchesi R, Barata CU, Edmond MB; **Brazilian SCOPE Study Group**. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian pediatric patients: microbiology, epidemiology, and clinical features. *PLoS One* 2013; 8(7): e68144.
18. **Guzman-Blanco M, Labarca JA, Villegas MV, Gotuzzo E, Latin America Working Group on Bacterial Resistance**. Extended spectrum beta-lactamase producers among nosocomial Enterobacteriaceae in Latin America. *Braz J Infect Dis* 2014; 18(4): 421-433.
 19. **Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, Cornaglia G, Garau J, Gniadkowski M, Hayden MK, Kumarasamy K, Livermore DM, Maya JJ, Nordmann P, Patel JB, Paterson DL, Pitout J, Villegas MV, Wang H, Woodford N, Quinn JP**. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis* 2013; 13(9): 785-796.
 20. **Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB, Srinivasan A, Navon-Venezia S, Carmeli Y, Brolund A, Giske CG**. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(8): 3365-3370.
 21. **Mojica MF, Correa A, Vargas DA, Maya JJ, Montealegre MC, Rojas LJ, Ruiz SJ, Quinn JP, Villegas MV; Colombian Nosocomial Bacterial Resistance Study Group**. Molecular correlates of the spread of KPC-producing Enterobacteriaceae in Colombia. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 40(3): 277-279.
 22. **Villegas MV, Lolans K, Correa A, Suarez CJ, Lopez JA, Vallejo M, Quinn JP; Colombian Nosocomial Resistance Study Group**. 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): 2880-2882.
 23. **Lopez JA, Correa A, Navon-Venezia S, Correa AL, Torres JA, Briceño DF, Montealegre MC, Quinn JP, Carmeli Y, Villegas MV**. Intercontinental spread from Israel to Colombia of a KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* strain. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17(1): 52-56.
 24. **Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS**. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 73(4): 354-360.
 25. **Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC**. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(1): 333-334.
 26. **Seki LM1, Pereira PS, de Souza Conceição M, Souza MJ, Marques EA, Carballido JM, de Carvalho ME, Assef AP, Asensi MD**. Molecular epidemiology of CTX-M producing Enterobacteriaceae isolated from bloodstream infections in Rio de Janeiro, Brazil: emergence of CTX-M-15. *Braz J Infect Dis* 2013; 17(6): 640-646.
 27. **Chagas TP, Seki LM, da Silva DM, Asensi MD**. Occurrence of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in hospital wastewater. *J Hosp Infect* 2011; 77(3): 281.
 28. **Pasteran FG, Otaegui L, Guerriero L, Radice G, Maggiore R, Rapoport M, Faccione D, Di Martino A, Galas M**. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina. *Emerg Infect Dis* 2008; 14(7): 1178-1180.
 29. **Gomez SA, Pasteran FG, Faccione D, Tjjet N, Rapoport M, Lucero C, Lastovets-**

- ka O, Albornoz E, Galas M; KPC Group, Melano RG, Corso A, Petroni A. Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST258 harbouring KPC-2 in Argentina. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17(10): 1520-1524.
30. Giakkoupi P, Papagiannitsis CC, Miriagou V, Pappa O, Polemis M, Tryfinopoulou K, Tzouvelekis LS, Vatopoulos AC. An update of the evolving epidemic of *blaKPC-2*-carrying *Klebsiella pneumoniae* in Greece (2009-10). *J Antimicrob Chemother* 2011; 66(7): 1510-1513.
 31. Vilchez G, Alonso G. Alcances y limitaciones de los métodos de epidemiología molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos. *Rev Soc Venez Microbiol* 2009; 29: 6-12.
 32. Fernández F. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22(6): 355-360.
 33. Coll P, Coque M, Domínguez M, Vázquez J, Vila J. Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en Bacteriología. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005; 18: 1-68.
 34. Baraniak A, Izdebski R, Fiett J, Sadowy E, Adler A, Kazma M, Salomon J, Lawrence C, Rossini A, Salvia A, Vidal Samso J, Fierro J, Paul M, Lerman Y, Malhotra-Kumar S, Lammens C, Goossens H, Hryniewicz W, Brun-Buisson C, Carmeli Y, Gniadkowski M; MOSAR WP2 and WP5 Study Groups. Comparative population analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains with extended-spectrum beta-lactamases colonizing patients in rehabilitation centers in four countries. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57(4): 1992-1997.
 35. Qi Y, Wei Z, Ji S, Du X, Shen P, Yu Y. ST11, the dominant clone of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66(2): 307-312.
 36. Ko KS, Lee JY, Baek JY, Suh JY, Lee MY, Choi JY, Yeom JS, Kim YS, Jung SI, Shin SY, Heo ST, Kwon KT, Son JS, Kim SW, Chang HH, Ki HK, Chung DR, Peck KR, Song JH. Predominance of an ST11 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* clone causing bacteraemia and urinary tract infections in Korea. *J Med Microbiol* 2010; 59(Pt 7): 822-828.
 37. Rhee JY, Park YK, Shin JY, Choi JY, Lee MY, Peck KR, Song JH, Ko KS. KPC-producing extreme drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate from a patient with diabetes mellitus and chronic renal failure on hemodialysis in South Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(5): 2278-2279.
 38. Tóth A, Damjanova I, Puskás E, Jánvári L, Farkas M, Dobák A, Böröcz K, Pászti J. Emergence of a colistin-resistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clone in Hungary. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29(7): 765-769.
 39. Baraniak A, Izdebski R, Herda M, Fiett J, Hryniewicz W, Gniadkowski M, Kern-Zdanowicz I, Fileczak K, Łopaciuk U. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST258 with KPC-2 in Poland. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(10): 4565-4567.
 40. Seki LM, Pereira PS, de Souza Mda P, Conceição Mde S, Marques EA, Porto CO, Colnago EM, Alves Cde F, Gomes D, Assef AP, Samuelsen Ø, Asensi MD. Molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 70(2): 274-277.
 41. Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC,

- Longo JM, Clímaco EC, Martínez R, Bellissimo-Rodrigues F, Basile-Filho A, Evaristo MA, Del Peloso PF, Ribeiro VB, Barth AL, Paula MC, Baquero F, Cantón R, Darini AL, Coque TM.** Dissemination of *bla*KPC-2 by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae species in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(7): 3579-3583.
42. **Pena I, Picazo JJ, Rodriguez-Avial C, Rodriguez-Avial I.** Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in a tertiary hospital in Madrid, Spain: high percentage of colistin resistance among VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 isolates. *Int J Antimicrob Agents* 2014; 43(5): 460-464.
43. **Virgincar N, Iyer S, Stacey A, Maharjan S, Pike R, Perry C, Wyeth J, Woodford N.** *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in a district general hospital in the UK. *J Hosp Infect* 2011; 78(4): 293-296.
44. **Castanheira M, Costello AJ, Deshpande LM, Jones RN.** Expansion of clonal complex 258 KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Latin American hospitals: report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56(3): 1668-1669; author reply 1670-1671.
45. **Fehlberg LC, Carvalho AM, Campana EH, Gontijo-Filho PP, Gales AC.** Emergence of *Klebsiella pneumoniae*-producing KPC-2 carbapenemase in Paraiba, Northeastern Brazil. *Braz J Infect Dis* 2012; 16(6): 577-580.
46. **Nicoletti AG, Fehlberg LC, Picao RC, Machado Ade O, Gales AC.** Clonal complex 258, the most frequently found multilocus sequence type complex in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in Brazilian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56(8): 4563-4564; author reply 4565.
47. **Oliveira S, Moura RA, Silva KC, Pavéz M, McCulloch JA, Dropa M, Matté MH, Mamizuka EM, Sato MI, Pestana de Castro AF, Lincopan N.** Isolation of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains belonging to the high-risk multi-resistant clonal complex 11 (ST437 and ST340) in urban rivers. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69(3): 849-852.
48. **Garbari L, Busetti M, Dolzani L, Petix V, Knezevich A, Bressan R, Gionchetti F, Tonin EA, Lagatolla C.** pKBU13, a KPC-2 encoding plasmid from *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 833, carrying *Tn4401b* inserted into a Xer site-specific recombination locus. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59(9): 5226-5231.
49. **Falco A, Ramos Y, Franco E, Guzman A, Takiff H.** A cluster of KPC-2 and VIM-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST833 isolates from the pediatric service of a Venezuelan Hospital. *BMC Infect Dis* 2016; 16(1): 595.
50. **Samuelsen Ø, Toleman MA, Hasseltvedt V, Fuursted K, Leegaard TM, Walsh TR, Sundsfjord A, Giske CG.** Molecular characterization of VIM-producing *Klebsiella pneumoniae* from Scandinavia reveals genetic relatedness with international clonal complexes encoding transferable multidrug resistance. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17(12): 1811-1816.
51. **Papagiannitsis CC, Kotsakis SD, Petinaki E, Vatopoulos AC, Tzelepi E, Miriagou V, Tzouvelekis LS.** Characterization of metallo-beta-lactamase VIM-27, an A57S mutant of VIM-1 associated with *Klebsiella pneumoniae* ST147. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(7): 3570-3572.

52. Hasan CM, Turlej-Rogacka A, Vatopoulos AC, Giakkoupi P, Maatallah M, Giske CG. Dissemination of blaVIM in Greece at the peak of the epidemic of 2005-2006: clonal expansion of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 147. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20(1): 34-37.
53. Giske CG, Fröding I, Hasan CM, Turlej-Rogacka A, Toleman M, Livermore D, Woodford N, Walsh TR. Diverse sequence types of *Klebsiella pneumoniae* contribute to the dissemination of blaNDM-1 in India, Sweden, and the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56(5): 2735-2738.
54. Peirano G, Pillai DR, Pitondo-Silva A, Richardson D, Pitout JD. The characteristics of NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* from Canada. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 71(2): 106-109.
55. Richter SN, Frasson I, Franchin E, Bergo C, Lavezzo E, Barzon L, Cavallaro A, Palù G. KPC-mediated resistance in *Klebsiella pneumoniae* in two hospitals in Padua, Italy, June 2009-December 2011: massive spreading of a KPC-3-encoding plasmid and involvement of non-intensive care units. *Gut Pathog* 2012; 4(1): 7.
56. Damjanova I, Tóth A, Pászti J, Hajbel-Vékony G, Jakab M, Berta J, Milch H, Füzi M. Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005--the new 'MRSA's'? *J Antimicrob Chemother* 2008; 62(5): 978-985.
57. Mammina C, Aleo A, Bonura C, Calà C, Degl'Innocenti R, Conti A, Pecile P, Pesavento G, Nastasi A. Multiclonal emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Tuscany, Italy. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 36(6): 576-578.
58. Coelho A, Mirelis B, Alonso-Tarrés C, Nieves Larrosa M, Miró E, Clivillé Abad R, Bartolomé RM, Castañer M, Prats G, Johnson JR, Navarro F, González-López JJ. Detection of three stable genetic clones of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* in the Barcelona metropolitan area, Spain. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64(4): 862-864.
59. Elhani D, Bakir L, Aouni M, Passet V, Arlet G, Brisse S, Weill FX. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in a university hospital in Tunis, Tunisia, 1999-2005. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16(2): 157-164.
60. Mammina C, Bonura C, Di Bernardo F, Aleo A, Fasciana T, Sodano C, Saporito MA, Verde MS, Tetamo R, Palma DM. Ongoing spread of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in different wards of an acute general hospital, Italy, June to December 2011. *Euro Surveill* 2012; 17(33): pii: 20248.
61. Ageevets VA, Partina IV, Lisitsyna ES, Iliina EN, Lobzin YV, Shlyapnikov SA, Sidorenko SV. Emergence of carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Saint Petersburg, Russia. *Int J Antimicrob Agents* 2014; 44(2): 152-155.
62. Bonura C, Giuffrè M1, Aleo A, Fasciana T, Di Bernardo F, Stampone T, Giammanco A; MDR-GN Working Group, Palma DM, Mammina C. An update of the evolving epidemic of blaKPC carrying *Klebsiella pneumoniae* in Sicily, Italy, 2014: Emergence of multiple non-ST258 clones. *PLoS One* 2015; 10(7): e0132936.
63. Lee MY, Ko KS, Kang CI, Chung DR, Peck KR, Song JH. High prevalence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Asian countries: diverse clones and clonal dissemination. *Int J Anti-*

- microb Agents 2011; 38(2): 160-163.
64. Breurec S, Guessennd N, Timinouni M, Le TA, Cao V, Ngandjio A, Randrianirina F, Thiberge JM, Kinana A, Dufouge-ray A, Perrier-Gros-Claude JD, Boisier P, Garin B, Brisse S. *Klebsiella pneumoniae* resistant to third-generation cephalosporins in five African and two Vietnamese major towns: multiclonal population structure with two major international clonal groups, CG15 and CG258. Clin Microbiol Infect 2013; 19(4): 349-355.
 65. Nielsen JB, Skov MN, Jorgensen RL, Heltberg O, Hansen DS, Schonning K. Identification of CTX-M15-, SHV-28-producing *Klebsiella pneumoniae* ST15 as an epidemic clone in the Copenhagen area using a semi-automated Rep-PCR typing assay. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2011; 30(6): 773-778.
 66. Hrabák J, Empel J, Bergerová T, Fajfrlík K, Urbásková P, Kern-Zdanowicz I, Hryniewicz W, Gniadkowski M. International clones of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* with extended-spectrum beta-lactamases in a Czech hospital. J Clin Microbiol 2009; 47(10): 3353-3357.
 67. Osterblad M, Kirveskari J, Hakanen AJ, Tissari P, Vaara M, Jalava J. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Finland: the first years (2008-11). J Antimicrob Chemother 2012; 67(12): 2860-2864.
 68. Jayol A, Poirel L, Brink A, Villegas MV, Yilmaz M, Nordmann P. Resistance to colistin associated with a single amino acid change in protein PmrB among *Klebsiella pneumoniae* isolates of worldwide origin. Antimicrob Agents Chemother 2014; 58(8): 4762-4766.
 69. Sonnevend Á, Ghazawi AA, Hashmey R, Jamal W, Rotimi VO, Shibl AM, Al-Jardani A, Al-Abri SS, Tariq WU, Weber S, Pál T. Characterization of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae with high rate of autochthonous transmission in the Arabian Peninsula. PLoS One 2015; 10(6): e0131372.
 70. Morris D, O'Connor M, Izdebski R, Corcoran M, Ludden CE, McGrath E, Buckley V, Cryan B, Gniadkowski M, Cormican M. Dissemination of clonally related multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Ireland. Epidemiol Infect 2015; 144(2): 443-448.
 71. Novais A, Rodrigues C, Branquinho R, Antunes P, Grosso F, Boaventura L, Ribeiro G, Peixe L. Spread of an OmpK36-modified ST15 *Klebsiella pneumoniae* variant during an outbreak involving multiple carbapenem-resistant Enterobacteriaceae species and clones. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012; 31(11): 3057-3063.
 72. Matsumura Y, Tanaka M, Yamamoto M, Nagao M, Machida K, Ito Y, Takakura S, Ogawa K, Yoshizawa A, Fujimoto Y, Okamoto S, Uemoto S, Ichiyama S. High prevalence of carbapenem resistance among plasmid-mediated AmpC beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* during outbreaks in liver transplantation units. Int J Antimicrob Agents 2015; 45(1): 33-40.