



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

Variabilidad genética de *Klebsiella pneumoniae* con carbapenemasa tipo KPC proveniente de diferentes estados de Venezuela

Nirvia Margot Cuaical-Ramos^{a,*}, Marynes Montiel^{b,c} y Daniel Marcano Zamora^a

^a Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, Departamento de Bacteriología, Ciudad Universitaria (UCV), Los Chaguaramos, Caracas, República Bolivariana de Venezuela

^b Unidad de Investigación en Microbiología Ambiental, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, Maracaibo, República Bolivariana de Venezuela

^c Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Facultad de Ciencias de la Vida, Campus Gustavo Galindo, Guayaquil, Ecuador

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 9 de agosto de 2017

Aceptado el 18 de diciembre de 2017

On-line el 13 de febrero de 2018

Palabras clave:

Klebsiella pneumoniae

Variabilidad genética

Venezuela

R E S U M E N

Introducción: En Venezuela hay reportes de *Klebsiella pneumoniae* con carbapenemasa tipo KPC. Sin embargo, desde su primer reporte en el 2008, son muy escasos los estudios de epidemiología molecular que se han realizado en estos aislados.

Métodos: Los objetivos de esta investigación fueron detectar la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) (blaTEM y grupo blaCTX-M-1) y determinar la relación genética de 30 aislados pertenecientes a brotes importantes de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasa tipo KPC derivados por once centros sanitarios de diferentes estados de Venezuela entre enero de 2008 y diciembre de 2012 mediante electroforesis in campo pulsante (ECP).

Resultados: Todos los aislados fueron identificados como *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*. Los aislados mostraron el mayor porcentaje de resistencia al ertapenem, un 97%. En todos los aislados se detectó el gen tipo KPC. El 73% presentó BLEE (en el 68% se detectó blaTEM y en el 27% blaTEM, CTX-M-1). En la ECP se detectaron 11 agrupaciones.

Conclusión: Durante los años 2008–2012 se demostró que existe una gran diversidad genética en los aislados en estudio. Se determinó que algunos aislados circularon en los 11 centros sanitarios. Los resultados de esta investigación plantean la necesidad de fortalecer la vigilancia epidemiológica y el desarrollo de actividades para prevenir y controlar este tipo de microorganismo.

© 2018 Elsevier España, S.L.U.

y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

Genetic variability of carbapenemase KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated at different states in Venezuela

A B S T R A C T

Introduction: In Venezuela, there have been some reports of carbapenemase KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. Nevertheless, since the first report in 2008, only a few studies have been done on their molecular epidemiology in this country.

Methods: The aims of this study were to detect extended-spectrum betalactamase (ESBL)-producing (blaTEM and blaCTX-M-1) and to determine the genetic relationship between 30 isolates of carbapenemase KPC-producing *K. pneumoniae* taken from patients at eleven health centers in different states of Venezuela from January 2008 to December 2012, using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE).

Results: All isolates were identified as *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*. Isolates showed the highest resistance to the ertapenem, 97%. The KPC gene was detected in all studied strains. Seventy three percent showed ESBL, having the blaTEM in 68% and blaTEM, CTX-M-1 in 27% of the strains. Eleven groups were found using the field-pulsed gel electrophoresis.

Keywords:

Klebsiella pneumoniae

Genetic variability

Venezuela

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: ramosnirvia@hotmail.com (N.M. Cuaical-Ramos).

Conclusion: High genetic diversity was found during 2008–2012 in *K. pneumoniae* isolated at different states in Venezuela, some of them circulating at eleven health centers. Results showed the importance of performing epidemiologic studies and the need to develop some activities to control this type of microorganisms.

© 2018 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Introducción

Klebsiella pneumoniae es considerada una de las especies de la familia *Enterobacteriaceae* que comúnmente puede adquirir genes de resistencia a carbapenémicos¹. Entre 2001 y 2011, se reportó un incremento del 1,6 al 10,4% en el número de aislados de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos en Estados Unidos, debido a la producción de carbapenemasas tipo KPC. Se ha descrito que los pacientes infectados con *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa tipo KPC tienen una mortalidad más alta que aquellos que se encuentran infectados con aislados productores de otros tipos de carbapenemasas (47,66 y 46,71%, respectivamente)², considerándose como un problema de salud pública sin precedentes³.

El uso de técnicas moleculares como electroforesis en campo pulsante (ECP) ha permitido evaluar la diseminación de aislados productores de carbapenemasa tipo KPC⁴. Esta técnica posee un alto poder discriminatorio y buena reproducibilidad, siendo considerada la técnica estándar de referencia para la tipificación de bacterias⁵.

Desde el año 2008, se ha demostrado la presencia de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa tipo KPC en Venezuela, según los registros del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel (datos no publicados). Posteriormente se han realizado otros reportes en Distrito Capital⁶, Carabobo y Zulia⁷ en coexistencia con otros determinantes de resistencia a betalactámicos, sin embargo, no hay reportes de la epidemiología molecular de estos primeros aislamientos en diferentes estados del país. El objetivo de la presente investigación fue detectar la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) (*bla*_{TEM} y *bla*_{CTX-M-1}) y determinar la relación genética mediante ECP en aislados de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasa tipo KPC provenientes de diferentes centros sanitarios en diversos estados de Venezuela durante los años 2008 a 2012.

Materiales y métodos

Aislados estudiados

En el Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, mediante el algoritmo de la Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos⁸, los distintos centros sanitarios públicos y privados del país remiten cepas con fenotipos de resistencia inusuales para su confirmación y caracterización. Es así como se seleccionaron 30 aislados clínicos representativos de brotes hospitalarios importantes, no duplicados de diferentes centros sanitarios, de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasa tipo KPC almacenados durante los años 2008–2012 en el cepario de la institución. La identificación de todos los aislados se realizó mediante pruebas bioquímicas convencionales.

La investigación cumple con los principios fundamentales de la bioética y los establecidos en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial⁹ y las pautas éticas internacionales para la investigación biomédica¹⁰.

Estudio de la sensibilidad antibiótica

Se realizó por el método de Kirby-Bauer¹¹ evaluando los discos de imipenem 10 µg, meropenem 10 µg y ertapenem 10 µg (Difco & BBL, EE. UU.) según los puntos de corte establecidos en el documento M100-S25 del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI)¹². Las cepas *Escherichia coli* ATCC[®] 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC[®] 27853 se utilizaron como controles de calidad de los discos de antibióticos.

Caracterización fenotípica de betalactamasas

La detección de carbapenemasas se realizó mediante el uso de inhibidores como el ácido 3-aminofenil-borónico 300 µg/mL (Sigma-Aldrich, EE. UU.) para la búsqueda de serinoenzimas y etilendiaminotetraacético/mercaptoacetato de sodio 1.000 mM para la búsqueda de metalobetalactamasas⁶. La detección de BLEE se realizó por el método confirmatorio de doble disco¹².

Para controlar la actividad de los diferentes inhibidores se emplearon las cepas *K. pneumoniae* M13403¹³, *K. pneumoniae* M9885¹⁴ y *K. pneumoniae* ATCC[®] 700603.

Caracterización genotípica de betalactamasas

En todos los aislados se amplificó el gen que codifica para la carbapenemasa tipo KPC. La detección de los genes que codifican para la betalactamasa tipo TEM y del grupo CTX-M-1 se realizó en aislados BLEE positivos. La detección se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final. Los iniciadores empleados se muestran en la [tabla 1](#).

La extracción del ADN se realizó por el método de ebullición¹⁵ y las reacciones de amplificación y visualización de los productos se realizaron según protocolo empleado en otros estudios⁶.

Los controles positivos fueron: *K. pneumoniae* M13403¹³ y *K. pneumoniae* M9885¹⁴.

Tipificación molecular

La relación genética entre los 30 aislados estudiados se determinó por ECP. Se empleó la enzima de restricción *Xba*I como indica el protocolo estandarizado de la red PulseNet para *E. coli* O157, *Salmonella* pps. y *Shigella sonnei*¹⁶. Se utilizó como estándar la *Salmonella* serovar Braenderup H9812 (ATCC[®] BAA-664).

Los resultados se analizaron con el método de UPGMA (*unweighted pair group method using arithmetic average*) y el coeficiente de Dice del programa Bionumeric, versión 4.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica). Los patrones de ECP se agruparon con una similitud $\geq 85\%$ ¹⁷. En el análisis de los geles de la ECP se emplearon los fragmentos de restricción con tamaños entre 1.135 a 54,7 Kb. La interpretación de los patrones de restricción se basó en los criterios de Tenover et al.¹⁸. Cuando se encontraron diferencias mayores o iguales al 85% en el pulsotipo, los aislados fueron designados como tipos diferentes y se les asignaron letras (A, B, C, etc.). Cuando uno o más fragmentos fueron diferentes entre los aislados de un mismo tipo, se les asignó un subtipo, el cual fue designado con números arábigos.

Tabla 1
Cebadores empleados para la detección de genes que codifican betalactamasas

Cebador	Amplicón (pb)	Secuencia (5'-3')	Referencia	
KPC-Forward	KPC-Reverse	893	TCGCTAAACTTGAACAGG TTACTGCCCGTTGACGCCCAAT	Marcano et al. ⁶
TEM-Forward	TEM-Reverse	504	TTGGGTGCACGAGTGGGTTATAATTGTTGCCGGGAAGCTA	Marcano et al. ⁶
Grupo CTX-M-1-Forward	Grupo CTX-M-1-Reverse	551	CGCTTTGCGATGTGCAG ACCGCGATATCCTTGGT	Marcano et al. ⁶

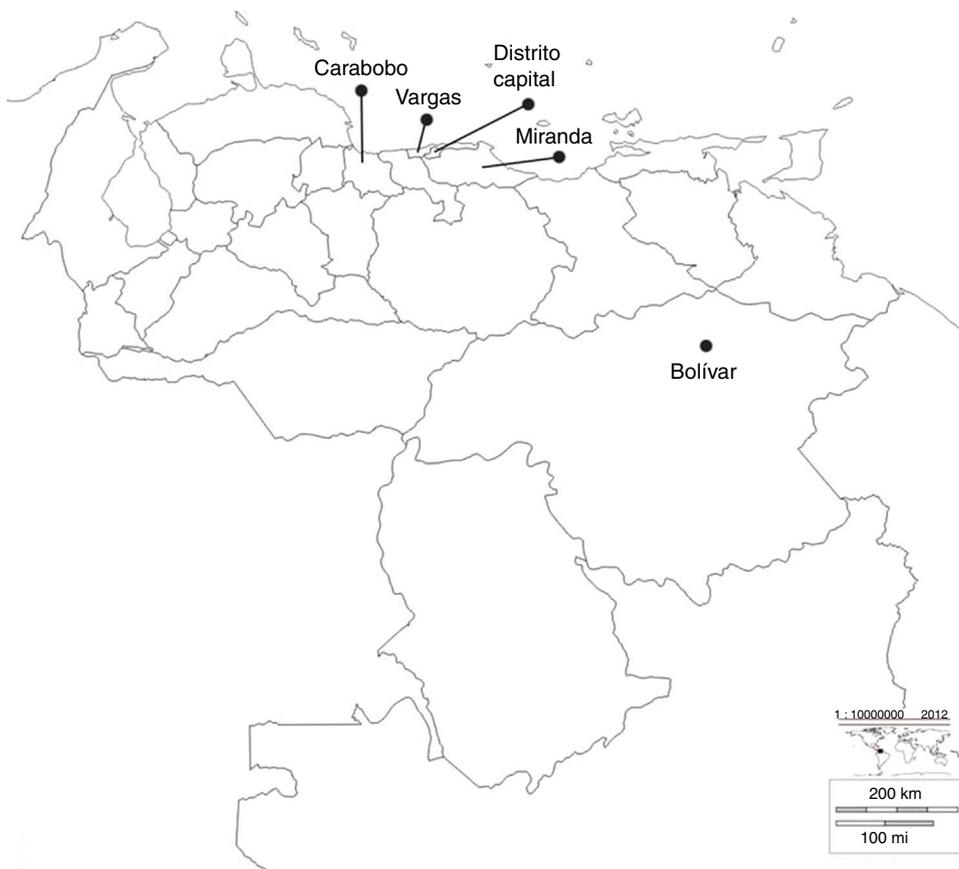


Figura 1. Ubicación geográfica de los estados donde pertenecen los diferentes centros sanitarios incluidos en el estudio. Bolívar: Hospital Raúl Leoni del Instituto Venezolano de los Seguros Sociales (HRL IVSS); Carabobo: Ciudad Hospitalaria Dr. Enrique Tejera (CHET); Distrito Capital: Maternidad Santa Ana (MSA), Hospital Cardiológico Infantil Latinoamericano (HCIL), Hospital Dr. José María Vargas (HJMV), Hospital Dr. Miguel Pérez Carreño (HMP), Hospital de Niños J.M. de los Ríos (HNJMR), Clínica la Arboleda (CA) y Centro Médico Loira (CML); Miranda: Centro Médico Docente la Trinidad (CMDLT); Vargas: Hospital de Pariata (HP).

Resultados

Aislados estudiados

Se analizaron 30 aislados de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasa tipo KPC durante 2008-2012, provenientes de brotes importantes de diferentes centros sanitarios, ubicados en diversos estados de Venezuela, como se muestra en la [figura 1](#).

Estudio de la sensibilidad antibiótica

El 97, 93 y 90% de los aislados fueron categorizados como resistentes a ertapenem, meropenem e imipenem, respectivamente. El resto de los aislados fueron categorizados con susceptibilidad intermedia frente a los carbapenémicos.

Caracterización fenotípica de betalactamasas

En el 100% de los aislados se evidenció la sinergia entre el disco de ácido borónico y los carbapenémicos evaluados, demostrando la producción de serinoenzimas. Mientras que en la búsqueda de

metaloenzimas no se observó sinergia con el EDTA/SMA. El 73% de los aislados fueron positivos en la detección de BLEE.

Caracterización genotípica de betalactamasas

En la [tabla 2](#) se puede observar que en el 100% ($n=30/30$) de los aislados se detectó el gen que codifica para la carbapenemasa tipo KPC. En el 68% se detectó la coexistencia de *bla*_{TEM} y *bla*_{KPC}, mientras que en el 27% la coexistencia de *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM} y *bla*_{grupoCTX-M-1}.

Tipificación molecular

En todos los aislados se obtuvieron patrones de restricción con la enzima *Xba*I (Promega, EE.UU.). El número de fragmentos obtenidos en los patrones varió entre 13 y 19. En el análisis comparativo de los patrones de ADN genómico obtenidos por ECP se determinaron 11 agrupaciones de la letra A a la letra K ([fig. 2](#)), de las cuales 6 contenían al 83% de los aislamientos estudiados.

En la agrupación A se detectaron 5 aislados con pulsotipos «indistinguibles» procedentes de Distrito Capital (KPN-03, KPN-08,

Tabla 2
 Detección por PCR punto final de genes que codifican para betalactamasas en aislados de *Klebsiella pneumoniae*

Aislado	Genes de resistencia			Aislado	Genes de resistencia		
	KPC	TEM	Grupo CTX-M-1		KPC	TEM	Grupo CTX-M-1
KPN-01	+	+	-	KPN-16	+	+	-
KPN-02	+	-	-	KPN-17	+	+	-
KPN-03	+	+	-	KPN-18	+	+	-
KPN-04	+	+	-	KPN-19	+	+	-
KPN-05	+	+	-	KPN-20	+	+	-
KPN-06	+	+	-	KPN-21	+	+	-
KPN-07	+	+	-	KPN-22	+	+	-
KPN-08	+	+	-	KPN-23	+	+	+
KPN-09	+	+	-	KPN-24	+	+	-
KPN-10	+	+	-	KPN-25	+	+	-
KPN-11	+	+	-	KPN-26	+	+	+
KPN-12	+	+	+	KPN-27	+	+	+
KPN-13	+	+	-	KPN-28	+	+	-
KPN-14	+	+	-	KPN-29	+	+	+
KPN-15	+	+	-	KPN-30	+	+	-

KPC-13) y Bolívar (KPN-21), como se muestra en la figura 2. El resto de los aislados de este grupo fueron categorizados como «posiblemente relacionados» (subtipos A1-A3).

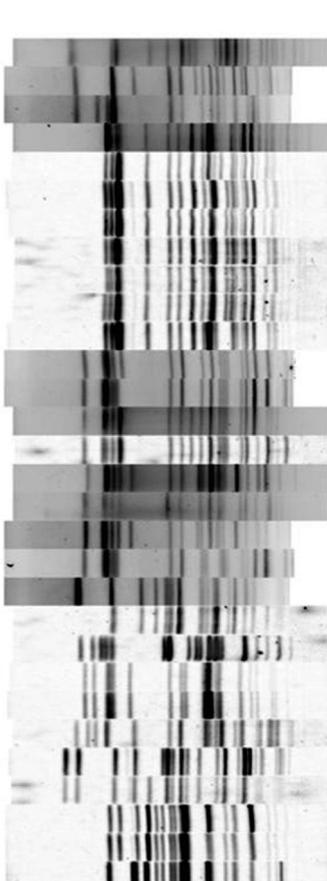
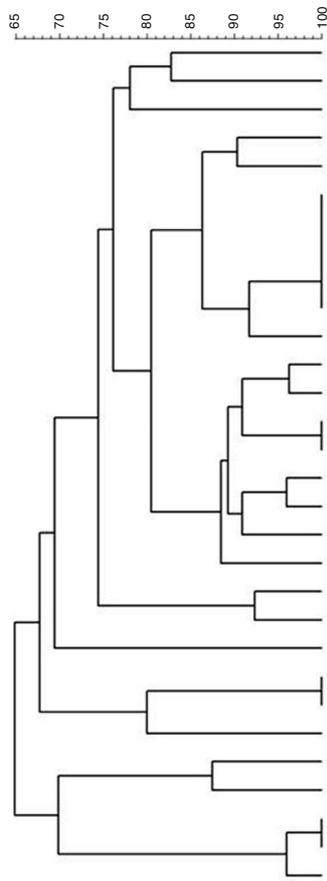
En la agrupación B, los aislados KPN-14 y KPN-18 provenientes de diferentes centros sanitarios del Distrito Capital fueron categorizados como «indistinguibles», mientras que 6 aislados de esta agrupación estuvieron «cercanamente relacionados». Estos pulsotipos corresponden a aislados derivados de centros sanitarios ubicados en diferentes estados.

Las agrupaciones C y E incluyeron, cada una, 2 aislados recuperados en años diferentes los cuales fueron categorizados como «cercanamente relacionados» y correspondieron a los centros sanitarios CHET y HNJMR, respectivamente. En las agrupaciones D y F se detectaron aislados «indistinguibles» en un mismo centro hospitalario.

Los aislados de los patrones G-K presentaron un porcentaje de similitud <85%, por lo que fueron categorizados como «aislados no relacionados», derivados entre 2010-2011 y correspondientes a 5 centros sanitarios ubicados en diferentes estados a excepción de 2 aislados recuperados en un mismo centro de salud, el Hospital Raúl Leoni del Instituto Venezolano de los Seguros Sociales (HRL IVSS), en el año 2011.

Al realizar el análisis por centro de salud, se observó que los aislados del HRL IVSS, CMDLT, HMPC y CML eran «aislados no relacionados». Sin embargo, en la CHET se detectaron clones intra-hospitalarios. En el HNJMR, con un porcentaje de similitud > 85%, se detectaron 3 agrupaciones de aislados cercanamente relacionados

Dice (Opt:1.50%)(Tol 1.5%-1.5%)(H>0.0% S>0.0%)(0.0%-100.0%]
 PFGE-Xbal



Key	Año	Estado	Centro de salud	Patrón
KPN-07	2010	Distrito capital	CML	G
KPN-29	2012	Miranda	CMDLT	H
KPN-09	2011	Carabobo	CHET	I
KPN-26	2012	Distrito capital	CML	A1
KPN-30	2012	Distrito capital	HJMV	A2
KPN-03	2010	Distrito capital	HMPC	A
KPN-08	2010	Distrito capital	MSA	A
KPN-13	2011	Distrito capital	HNJMR	A
KPN-15	2011	Distrito capital	HNJMR	A
KPN-21	2012	Bolívar	HRL IVSS	A
KPN-06	2010	Miranda	CMDLT	A3
KPN-16	2011	Miranda	CMDLT	B1
KPN-22	2012	Distrito capital	CA	B2
KPN-14	2011	Distrito capital	CML	B
KPN-18	2011	Distrito capital	HMPC	B
KPN-17	2011	Distrito capital	HNJMR	B3
KPN-25	2012	Vargas	HP	B4
KPN-28	2012	Bolívar	HRL IVSS	B5
KPN-27	2012	Distrito capital	HNJMR	B5
KPN-10	2011	Carabobo	CHET	C
KPN-24	2012	Carabobo	CHET	C
KPN-20	2011	Bolívar	HRL IVSS	J
KPN-11	2011	Distrito capital	HCIL	D
KPN-12	2011	Distrito capital	HCIL	D
KPN-19	2011	Bolivar	HRL IVSS	K
KPN-04	2010	Distrito capital	HNJMR	E
KPN-23	2012	Distrito capital	HNJMR	E
KPN-01	2008	Carabobo	CHET	F
KPN-02	2008	Carabobo	CHET	F
KPN-05	2010	Distrito capital	HNJMR	F1

Figura 2. Dendrograma de ECP con enzima de restricción XbaI de 30 aislados de *Klebsiella pneumoniae* KPC de diferentes centros sanitarios de Venezuela durante 2008-2012. UPGMA, coeficiente de Dice tolerancia 1,5%. Optimización 1,5%. CA: Clínica la Arboleda; CHET: Ciudad Hospitalaria Dr. Enrique Tejera; CMDLT: Centro Médico Docente la Trinidad; CML: Centro Médico Loira; ECP: electroforesis en campo pulsante; HCIL: Hospital Cardiológico Infantil Latinoamericano; HJMV: Hospital Dr. José María Vargas; HMPC: Hospital Dr. Miguel Pérez Carreño; HNJMR: Hospital de Niños J.M. de los Ríos; HP: Hospital de Pariata; HRL IVSS: Hospital Raúl Leoni del Instituto Venezolano de los Seguros Sociales; MSA: Maternidad Santa Ana; UPGMA: unweighted pair group method using arithmetic average.

durante 2010–2012. Es importante resaltar que en las 3 agrupaciones se incluyeron aislados de diferentes años.

Discusión

K. pneumoniae es un importante patógeno nosocomial, cuyos aislados productores de carbapenemasa tipo KPC han emergido como un problema significativo debido a su amplia diseminación a nivel mundial mediante elementos móviles genéticos¹⁹.

En nuestro estudio, la mayoría de los aislados fueron resistentes a los carbapenémicos evaluados siendo el más afectado el disco de ertapenem, al igual que los resultados obtenidos en aislados productores de carbapenemasa tipo KPC de Noruega y Suecia²⁰, donde el 100% de los aislados fueron resistentes a ertapenem, mientras que algunos fueron categorizados con susceptibilidad intermedia o resistentes a los otros carbapenémicos, por lo cual podría ser considerado como el disco que alertaría sobre la posible existencia de aislados de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasa tipo KPC. Sin embargo, el uso exclusivo del ertapenem como antibiótico indicador de la sospecha de carbapenemasa tipo KPC presenta problemas de especificidad³.

La presencia de *bla*_{KPC} en todos los aislados demostró la amplia distribución de este gen en diferentes aislados de Venezuela. Otros estudios realizados de manera aislada han reportado *bla*_{KPC} en *K. pneumoniae* proveniente de los estados Zulia y Carabobo⁷. Cuzon et al. reconocen que, fuera de los Estados Unidos, *K. pneumoniae* productora de KPC es reportada con mayor frecuencia, encontrándose en países como Francia, Israel, Colombia, Brasil, Argentina, China, Grecia, Alemania, España, Reino Unido, Bélgica, Croacia, Noruega y Polonia, entre otros^{1,21}.

El gen *bla*_{KPC} ha sido reportado en plásmidos conjugativos en combinación con otros genes de resistencia que codifican para las betalactamasas del grupo CTX-M-1, TEM y SHV⁷. En los aislados en estudio, fue evidente la amplia distribución del gen que codifica para la betalactamasa tipo TEM, encontrándose en algunos casos en coproducción con las betalactamasas del grupo CTX-M-1. Es interesante destacar que, en un estudio realizado en América Latina, no se reporta el gen TEM en aislados de Venezuela, pero sí en alta incidencia en Guatemala, mientras que *bla*_{CTX-M} fue detectado en aproximadamente el 50% de los aislados²². El estudio realizado por Cuzon et al., en diferentes países, demuestra la presencia de TEM-1 y SHV-11 en aislados de Estados Unidos, Grecia, Colombia, Brasil e Israel. Igualmente, CTX-M-2, CTX-M-12 y CTX-M-15 fueron reportadas en estos países a excepción de Estados Unidos, Grecia y Suiza, lo cual demuestra la amplia diseminación de este tipo de betalactamasa²¹.

Los resultados obtenidos por ECP demostraron una gran diversidad genética entre los aislados, a diferencia de lo reportado en Argentina por Gómez et al., quienes determinaron 5 agrupaciones en 69 aislados recolectados entre 2006–2010²³. Una de ellas incluía el 91% de los aislados, concluyendo que la diseminación en Argentina se debió a la existencia de un aislado epidémico, el cual posteriormente por *multilocus sequence typing* fue identificado como ST-258.

Sin embargo, los resultados de Cuzon et al. son acordes con los resultados obtenidos en nuestro estudio²¹. Ellos reportaron en 16 aislados de Colombia, Brasil, Israel, Estados Unidos, Suecia y Grecia heterogeneidad entre los aislados productores de carbapenemasa tipo KPC al determinar 9 pulsotipos. En China, Cao et al. demostraron que la diversidad genética en aislados de *K. pneumoniae* portadores de múltiples genes de resistencia, incluyendo *bla*_{KPC}, permitía inferir sobre la fácil transmisión de los determinantes de resistencia entre especies bacterianas a través de elementos

móviles genéticos²⁴. Estos resultados fueron confirmados por la detección de una alta prevalencia de integrones y plásmidos en su estudio.

Además de observar una gran variedad de patrones, se determinó que algunos pulsotipos estuvieron circulando durante los años de estudio en los 11 centros sanitarios de diferentes estados de Venezuela, demostrando el éxito de este tipo de aislados para mantenerse en el tiempo y diseminarse, como se ha demostrado en otros estudios²⁵.

La presencia de aislados similares de diferentes años y centros sanitarios podría estar relacionada con mecanismos tales como la diseminación inter e intrahospitalaria, colonización de pacientes, profesionales de la salud, etc.; equipo médico o fómites como vehículo de transmisión y el uso de antibióticos de amplio espectro²⁶. Robledo et al. infieren que la combinación de múltiples factores contribuyen en la diseminación de aislados de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa tipo KPC, entre los cuales señalan: fallas en el equipo de salud en el seguimiento de las políticas establecidas para el control de infecciones; incremento del tránsito del personal y equipo médico de diferentes hospitales; la tardía detección de pacientes colonizados o infectados con microorganismos multidrogosresistentes adquiridos en otras instituciones; carencia de un sistema de alerta entre los laboratorios, y/o el uso inadecuado de antibióticos²⁶. Estudios realizados en España y Grecia han inferido sobre la posible contaminación cruzada entre pacientes y el equipo médico, originando brotes importantes de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa tipo KPC. Sin embargo, en países como Israel, se ha determinado que los pacientes colonizados por este tipo de microorganismo juegan un rol importante en la diseminación de estos aislados²⁷.

En los patrones obtenidos, se observaron aislados genéticamente relacionados en un mismo centro hospitalario en diferentes años, lo cual podría indicar la permanencia del microorganismo en el ambiente. Este factor se encuentra favorecido por las diferentes propiedades y características de esta bacteria. Algunos autores señalan que los seres humanos pueden ser portadores de *K. pneumoniae* durante muchos años, con el riesgo de adquirir infecciones causadas por este microorganismo y diseminarlo tanto en ambientes hospitalarios como en la comunidad o transmitirse entre personas, así como entre diferentes lugares de un mismo hospital y entre ciudades y países²⁸.

En el análisis de los pulsotipos por años, se determinó que la diversidad genética de los aislados fue incrementándose en el transcurso del tiempo. Es posible que la existencia de subtipos esté relacionada con la sumatoria de eventos genéticos. La Sociedad Española de Infectología y Microbiología Clínica²⁹ señala que este tipo de comportamiento es de esperar, pues al inicio o en la detección de los primeros aislados es probable que la diversidad genética sea baja, sin embargo, al irse acumulando cambios genéticos en las cepas epidémicas o endémicas posiblemente se incrementará la variedad de los patrones obtenidos por ECP.

De igual manera, Sabat et al. refieren que las inserciones o deleciones de elementos móviles genéticos, así como eventos de recombinación en el ADN genómico, pueden resultar en algunos casos como cambios en los patrones de ECP³⁰.

En esta investigación, se evidenció la variabilidad de aislados productores de carbapenemasa de tipo KPC mediante ECP (policlonalidad) en Venezuela, describiendo aislados que permanecieron en el tiempo y la posible diseminación inter e intrahospitalaria en aislados que se encontraron genéticamente relacionados. En este sentido, es necesario fortalecer la vigilancia epidemiológica y el desarrollo de actividades para prevenir y controlar este tipo de aislados en los centros sanitarios de Venezuela.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Este estudio ha sido posible gracias al apoyo del Departamento de Bacteriología; Gerencia de Diagnóstico y Vigilancia Epidemiológica y la Gerencia de Docencia del Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”. La colaboración del personal de las diferentes secciones de bacteriología de los centros sanitarios quienes derivaron las cepas estudiadas. La colaboración del personal del Laboratorio de Aislamiento e Identificación Bacteriana del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel. La Dra. Omaira Da Mata y la Licda. Cirana Rodríguez por la asesoría en la técnica de ECP.

Bibliografía

- Logan L, Weinstein R. The epidemiology of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: The impact and evolution of a global menace. *J Infect Dis*. 2017;215 Suppl. 1:S28–36.
- Xu L, Sun X, Ma X. Systematic review and meta-analysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2017;16, <http://dx.doi.org/10.1186/s12941-017-0191-3>
- Tzouvelekis L, Markogiannakis A, Psychogiou A, Tassios P, Daikos G. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: An evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25:682–700.
- Kitchel B, Rasheed JK, Patel J, Srinivasan A, Navon-Venezia S, Carmeli Y, et al. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: Clonal expansion of multilocus sequence type 258. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53:3365–70.
- Víchez G, Alonso G. Alcances y limitaciones de los métodos de epidemiología molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos. *Rev Soc Ven Microbiol*. 2009;29:6–12.
- Marcano D, de Jesús A, Hernández L, Torres L. Frecuencia de enzimas asociadas a sensibilidad disminuida a betalactámicos en aislados de enterobacterias, Caracas, Venezuela. *Rev Panam Salud Pública*. 2011;30:529–34.
- Falco A, Barrios Y, Torres L, Sandra L, Takiff E. 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. *Invest Clin*. 2017;58:3–21.
- Corso A, Guerrero L, Pasterán F, Ceriana P, Callejo R, Prieto M, et al. Capacidad de los laboratorios nacionales de referencia en Latinoamérica para detectar mecanismos de resistencia emergentes. *Rev Panam Salud Pública*. 2011;30:619–26.
- World Medical Association. Declaración de Helsinki de la AMM-Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos; 2013 [consultado 30 Dic 2012]. Disponible en: <http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-investigacion/fd-evaluacion/fd-evaluacion-etica-investigacion/Declaracion-Helsinki-Esp.pdf>
- Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS). Pautas éticas internacionales para la investigación biomédica en seres humanos [consultado 30 Dic 2012]. Disponible en: http://www.cioms.ch/publications/guidelines/pautas_eticas_internacionales.htm
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; approved standard- eleventh edition (M02-A11). USA: Wayne (PA); 2012.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement. M100-S25. USA: Wayne (PA); 2015.
- Gagetti P, Pasteran F, Martinez MP, Fatourai M, Gu J, Fernandez R, et al. Modeling meropenem treatment, alone and in combination with daptomycin, for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* strains with unusually low carbapenem MICs. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60:5047–50.
- Pasteran F, Albornoz E, Faccione D, Gomez S, Valenzuela C, Morales M, et al. Emergence of NDM-1 producing *Klebsiella pneumoniae* in Guatemala. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67:1795–7, <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks101>
- Petroni A. Identificación de genes codificantes para betalactamasas mediante reacción en cadena de la polimerasa. Manual de procedimientos. Buenos Aires, Argentina: INEI-ANLIS Dr. Carlos Malbrán; 2004.
- Centers for Disease Control and Prevention. Preparation of PFG plugs from agar cultures [consultado 25 Abr 2012]. Disponible en: http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols/ecoli.salmonella.shigella_protocols.pdf
- Hunter S, Vauterin P, Lambert M, van Duyn M, Kubota K, Graves L, et al. Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: Converting the national databases to the new size standard. *J Clin Microbiol*. 2005;43:1045–50.
- Tenover F, Arbeit R, Goering R, Mickelsen P, Murray B, Persing D, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 1995;33:2233–9.
- Hirsch E, Tam V. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): An emerging cause of multidrug-resistant infection. *Antimicrob Chemother*. 2010;65:1119–25.
- Samuelsen Ø, Naseer U, Tofteland S, Skutlaberg D, Onken A, Hjetland R, et al. Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden. *J Antimicrob Chemother*. 2009;63:654–8.
- Cuzon G, Naas T, Truong H, Villegas M, Wisell K, Carmeli Y, et al. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produces betalactamase *bla*_{KPC-2} gene. *Emerg Infect Dis*. 2010;16:1349–56.
- Kazmierczak K, Lob S, Hoban D, Hackel M, Badal R, Bouchillon S. Characterization of extended-spectrum beta-lactamases and antimicrobial resistance of *Klebsiella pneumoniae* in intra-abdominal infection isolates in Latin America, 2008–2012. Results of the study for monitoring antimicrobial resistance trends. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015;82:209–14.
- Gómez S, Pasterán F, Faccione D, Tijet N, Rapoport M, Lucer C, et al. Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST258 harbouring KPC-2 in Argentina. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17:1520–4.
- Cao X, Xu X, Zhang Z, Shen H, Chen J, Zhang K. Molecular characterization of clinical multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2014;13:16.
- Rodríguez E, Saavedra S, Leal A, Álvarez C, Olarte N, Valderrama A, et al. Diseminación de *Klebsiella pneumoniae* productoras de KPC-3 en hospitales de Bogotá durante un periodo de tres años. *Biomédica*. 2014;34:224–31.
- Robledo I, Vásquez G, Moland E, Aquino E, Goering R, Thomson K, et al. Dissemination and molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* collected in Puerto Rico medical center hospitals during a 1-year period. *Epidemiol Res Int*. 2011;2011, <http://dx.doi.org/10.1155/2011/698705>
- Campos A, Albiero J, Ecker A, Kuroda C, Meirelles L, Polato A, et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: A systematic review. *Am J Infect Control*. 2016;44:1374–80.
- Echeverri I, Cataño J. *Klebsiella pneumoniae* como patógeno intrahospitalario: epidemiología y resistencia. *latrea*. 2010;23:240–9.
- Sociedad Española de Microbiología. Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología; 2005 [consultado 24 Jun 2015]. Disponible en: http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientos_microbiologia/seimc-procedimientomicrobiologia18.pdf
- Sabat A, Budimir A, Nashev D, Sá-Leao R, Dijil J, Laurent F, et al. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill*. 2013;18:1–14.