

Caracterización molecular de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE causantes de infección intrahospitalaria en el servicio de neonatología de un hospital de Lima, Perú

Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing (ESBL) strains of *Klebsiella pneumoniae* causing nosocomial infections in a neonatal unit in Lima, Peru

Henri Bailón¹, Rosa Sacsquispe²

RESUMEN

Objetivo: Caracterizar por métodos de microbiología y biología molecular siete cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE, de pacientes con bacteremia y sospechosos de pertenecer a un brote de infección intrahospitalaria en el servicio de neonatología de un hospital de Lima-Perú. **Material y métodos:** Se realizó la genotipificación de los aislamientos por Eric-PCR, Rep-PCR y Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) con el fin de determinar la relación clonal. El análisis de susceptibilidad antimicrobiana por el método de Difusión de Doble Disco (DDD) mostró que los siete aislamientos eran portadores de β -lactamasas de Espectro extendido (BLEE). **Resultados:** Los tres métodos de genotipificación, Eric-PCR, PCR-Rep y el método estándar de oro PFGE demostraron relación clonal entre cinco de los aislamientos, revelando que todas pertenecían a una única cepa o clona de *K. pneumoniae*; mientras que los dos aislamientos restantes también provenían de una misma cepa, pero muy diferente genéticamente a la cepa inicial de 5 aislamientos. **Conclusiones:** Este estudio revela la transmisión clonal de algunas cepas de *K. pneumoniae* portadoras de BLEE en el servicio de neonatología de un hospital de Lima-Perú, y pone de manifiesto la utilidad de las técnicas de biología molecular para la investigación de brotes hospitalarios y para la vigilancia epidemiológica. Este es el primer reporte de aplicación del análisis de genotipificación por PFGE a la investigación de brotes hospitalarios de *Klebsiella pneumoniae* en un hospital peruano.

PALABRAS CLAVE: *Klebsiella pneumoniae*, infección hospitalaria, tipificación molecular, electroforesis en gel de campo pulsado. (**Fuente:** DeCS BIREME).

SUMMARY

Objective: To characterize the molecular features of seven extended-spectrum betalactamase-producing (ESBL) strains of *Klebsiella pneumoniae* in patients with bacteremia during a nosocomial outbreak in a neonatal unit in Lima, Peru. **Methods:** Genotyping was performed using Eric-PCR, Rep-PCR and pulsed field gel electrophoresis (PFGE) to evaluate clonality. Disk diffusion test showed that all seven strains were ESBL producing strains. **Results:** The three-genotyping methods showed that five out of seven strains were genetically related to a single clone. **Conclusions:** The study represents the first attempt to apply genotyping methods to study nosocomial outbreaks in

¹ Biólogo. Maestría en Bioquímica y Biología Molecular. Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

² Bióloga. Laboratorio de Infecciones Intrahospitalarias, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

INVESTIGACIÓN ORIGINAL / ORIGINAL RESEARCH

neonatal units in Lima, and reveals clonal transmission of ESBL producing strains of *K. pneumoniae*.

KEY WORDS: *Klebsiella pneumoniae*, cross infection, molecular typing, electrophoresis, gel, pulsed-field. (Source: MeSH NLM).

INTRODUCCIÓN

Klebsiella pneumoniae es actualmente uno de los patógenos causantes de infección intrahospitalaria más comunes (1-5). Es una bacteria Gram negativa perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* que posee mecanismos de resistencia antimicrobiana a los antibióticos β -lactámicos (3) y que causa gran morbilidad y mortalidad, especialmente en unidades de cuidados intensivos, neonatales, médicos y quirúrgicos (6-10). En América Latina, es el tercer patógeno más frecuente aislado en el tracto respiratorio de los pacientes hospitalizados con neumonía y corresponde al 12% de todos los patógenos aislados (11).

La diseminación mundial de cepas de *K. pneumoniae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), resistentes a cefalosporinas de tercera generación y por lo general también con resistencia cruzada a aminoglucósidos y quinolonas es una grave amenaza de salud pública (12,13). Esta situación se vuelve más alarmante debido al creciente número de cepas de *K. pneumoniae* resistentes a los carbapenems, fármacos de elección para los patógenos productores de BLEE (5,6,14). Se estima que la proporción de *K. pneumoniae* productora de BLEE en América Latina es mayor que en otros continentes (13,15), y muchas de estas cepas podrían ser fuente de los brotes intrahospitalarios.

Se han descrito diferentes mecanismos para explicar la gran capacidad de *K. pneumoniae* productora de BLEE para diseminarse en todo el mundo; uno de ellos propone la transmisión de genes de virulencia como adhesinas tipo fimbrias 1 y 3 asociados a plásmidos portadores de BLEE, permitiendo la co-expresión de las fimbrias; ello podría aumentar la capacidad de *K. pneumoniae* para invadir las células del huésped (16). Las técnicas de genotipificación son útiles en el estudio de brotes intrahospitalarios para descubrir el origen, las rutas y el alcance de la transmisión de infecciones; y el uso de esta información puede servir para el control de estos brotes (6,17).

Entre las técnicas disponibles para *K. pneumoniae* se incluyen la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) (17,18), tipificación por secuencias de locus

múltiples (MLST) (1,2,4), el perfil plasmídico (19), la ribotipificación (20) y métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como la detección de elementos extragénicos repetitivos palindrómicos (REP) (17,21,22) y consenso de elementos repetitivos intergénicos de enterobacterias (ERIC) (8,20-24). En las últimas décadas, *K. pneumoniae* portadora de BLEE ha sido responsable de brotes epidémicos en países de todo el mundo (5,25). Hasta la fecha no se ha reportado la genotipificación de aislamientos de *K. pneumoniae* en estudios de brotes intrahospitalarios en el Perú; la técnica de PFGE, es considerada el estándar de oro para este fin.

El objetivo de este estudio fue determinar la relación clonal entre los aislamientos de *K. pneumoniae* del servicio de neonatología de un hospital de Lima Perú, sospechosos de pertenecer a un brote de infección intrahospitalaria.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislamientos bacterianos

Siete aislamientos de *Klebsiella sp.* se obtuvieron de distintos pacientes sospechosos de ser parte de un brote de infección intrahospitalaria en el servicio de Neonatología de un hospital de Lima-Perú en julio del 2008. Los aislamientos fueron obtenidos por hemocultivo e identificados por métodos estándar de laboratorio disponibles en el hospital; luego fueron enviados en placas de Trypticase Soya Agar a los laboratorios del Instituto Nacional de Salud (INS) del Perú para su caracterización.

Genotipificación por REP-PCR y ERIC-PCR

El ADN genómico total de los aislamientos fue extraído y purificado empleando el kit basado en columna de Sílica, QIAamp DNA extraction Kit (Qiagen); este ADN genómico fue utilizado para el análisis por PCR de los elementos repetitivos intergénicos consenso de enterobacterias (ERIC) y elementos repetitivos extragénicos palíndromos (REP). Ambos análisis, ERIC-PCR y REP-PCR se realizaron empleando oligonucleótidos previamente reportados por Versalovic (21) y siguiendo el método del mismo autor (Tabla 1).

Tabla 1. Oligonucleótidos y condiciones de PCR.

Oligonucleótido	Secuencia (5' to 3')*	Condiciones de PCR	Referencia
ERIC1R	CACTTAGGGGTCCTCGAATGTA	1 ciclo de 7 min. a 95°C; 30 ciclos de 1 min. a 94 °C, 1 min a 40 °C, 8 min a 65°C; y 1 ciclo de extensión final de 16min. a 65°C.	Versalovik 1991
ERIC2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG		
Rep1R-Dt	IIINCNGCNCATCNGGC	1 ciclo de 7 min. a 95°C; 30 ciclos de: 30 seg. a 90 °C, 1 min a 43 °C, 8 min a 65°C; y 1 ciclo de extensión final de 16min a 65°C.	Versalovik 1991
Rep2-D	(GA)CG(CT)CTTATC(CA)GGCCTAC		

N representa un nucleósido complementario a cualquiera de los cuatro nucleótidos en el templado (A, C, T o G); I representa al nucleósido Inosina, y en paréntesis están nucleósido que funcionan como cualquiera de los nucleótidos indicados.

Todos los cebadores (“primers”) fueron sintetizados por Operon Biotechnologies GmbH, Alemania. Para los análisis se utilizaron las mismas condiciones de PCR: el volumen final de reacción fue 25 µl, 2 U de Taq ADN polimerasa Platinum® (Invitrogen), 200 mM de cada desoxinucleótido trifosfato (A,G,C,T) (Applied Biosystems), 2,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 1 mM de cada cebador o “primer” y 100 ng de ADN genómico como molde. Las condiciones termodinámicas de PCR se describen en la tabla 1. Terminado este paso 20 µl de los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

Análisis de susceptibilidad antimicrobiana

La susceptibilidad a los antibióticos se determinó e interpretó por el método de disco difusión utilizando agar Mueller-Hinton y siguiendo las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) de Estados Unidos de Norteamérica (26).

Los agentes antimicrobianos analizados fueron los antibióticos que se utilizan actualmente en el Laboratorio de Infecciones Intrahospitalarias del INS-Perú. Los discos de antibióticos utilizados (Oxoid®) fueron la amoxicilina 25 µg, Ticarcilina 75 µg, Amoxicilina más ácido clavulánico 20/10 µg, Cefalotina 30 µg, cefoxitina 30 µg, ceftriaxona 30 µg, cefotaxima 30 µg, imipenem 10 µg, estreptomycin 10 UI, kanamicina 30 UI, tobramicina 10 µg, gentamicina 15 µg, amikacina 30 µg, tetraciclina 30 UI y cloranfenicol 30 µg. Todos los aislamientos fueron identificados como productores de BLEE mediante la prueba de difusión de doble disco (26).

Genotipificación por PFGE

Para el análisis de PFGE, el ADN genómico de los aislamientos de *K. pneumoniae* fue preparado por un procedimiento descrito previamente por Ben et al (9)

con pocos cambios. Los aislamientos se cultivaron por 18 horas en placas de agar tripticosa soya (TSA) a 37°C. Las células bacterianas fueron cosechadas con hisopos de poliestireno y resuspendidas en 1 ml de tampón de suspensión celular (100 mM NaCl, 75 mM EDTA); los hisopos fueron humedecidos previamente en el tampón. Las suspensiones se ajustaron por espectrofotometría a una densidad celular bacteriana equivalente a 1,3 OD (600 nm). Se mezcló por pipeteo 300 µl de las suspensiones celulares con 40 µl de proteinasa K 20 mg/ml (Roche®) en un tubo de polipropileno estéril de 1,5 ml; a esta mezcla se agregó 300 µl de agarosa fundida al 1% (SeaKem Gold - Cambrex®).

La mezcla anterior se colocó en moldes descartables para “plugs” de PFGE (Bio-Rad®) y se dejó solidificar a 4°C durante 15 min. Los bloques de agarosa con bacterias embebidas (“plugs”) se colocaron individualmente en tubos de polipropileno de 50 ml conteniendo 5 ml de tampón de lisis celular (50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM EDTA, pH 8, 1% de N-lauril sarcosina de sodio de marca Sigma® y 0,16 mg/ml de proteinasa K, de marca Roche®) y se incubaron las muestras durante toda la noche (16 horas aproximadamente) a 56°C en un baño maría con agitación constante.

Conservando las muestras en los mismos tubos, el tampón de lisis celular fue reemplazado por 15 ml. de solución de lavado TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) y se incubaron a 50°C en baño maría con agitación por 15 minutos; este procedimiento de lavado se repitió seis veces con solución de lavado TE. Una pequeña porción (2mm x 6mm) de los bloques de agarosa conteniendo el ADN cromosómico bacteriano fue digerida por 50 U de enzima de restricción XbaI (Promega®) a 37°C durante 6 horas.

INVESTIGACIÓN ORIGINAL / ORIGINAL RESEARCH

El ADN digerido con XbaI fue separado por PFGE en un gel de agarosa al 1% (SeaKem Gold®), empleando tampón de corrida TBE 0.5X (Tris 44,5 mM, Ácido Bórico 44,5 mM, EDTA 1 mM pH 8) y el sistema de PFGE, CHEF MAPPER (Bio-Rad®). Todas las soluciones fueron preparadas empleando agua Milli Q (18,2 mΩ). Las condiciones de electroforesis fueron 6 V/cm durante 23 horas, pulso inicial de 5 segundos, pulso final de 35 segundos, rampa lineal. Terminada la electroforesis, el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio durante 30 minutos; luego se realizó dos lavados con agua destilada durante 15 minutos cada lavado, y la imagen del gel fue registrada por el foto documentador Chemi Doc XRS (Bio-Rad®).

Los perfiles genéticos de PFGE obtenidos fueron analizados por el software Gel Compar II v 5.1 (Applied Maths Company). La información de los perfiles de PFGE se almacenó en la Base de datos de PFGE para *Klebsiella pneumoniae* del Instituto Nacional de Salud.

RESULTADOS

Susceptibilidad a los antimicrobianos

Todos los aislamientos mostraron el mismo patrón de resistencia a los antibióticos analizados, salvo las diferencias para gentamicina, amikacina y amoxicilina/ácido clavulánico. De acuerdo a estas

diferencias, los siete aislamientos presentaron dos patrones de antibiotipo, A y B; representados cada uno por 2 y 5 aislamientos respectivamente (Tabla 2).

Genotipificación por ERIC-PCR, REP-PCR y PFGE

El análisis visual de los resultados de ERIC-PCR y REP-PCR reveló la presencia de dos patrones de elementos genéticos repetitivos dentro de los siete aislamientos de *K. pneumoniae* analizados; cinco aislamientos (200, 201, 202, 203 y 204) presentaron un único patrón de elementos repetitivos ERIC y REP; mientras los dos aislamientos restantes (198 y 199) mostraron también un patrón común pero diferente de los otros cinco aislamientos (Figura 1a y b). Ambos análisis basados en PCR (ERIC y REP) clasificaron a los aislamientos por igual en dos grupos; sin embargo el análisis por ERIC-PCR mostró más bandas de diferencia entre estos dos grupos de aislamientos que el análisis REP-PCR (Figura 1a y 1b).

La restricción del ADN cromosómico de los aislamientos de *K. pneumoniae* por el análisis de PFGE con la enzima de restricción XbaI produjo perfiles de bandas de 20 a 22 fragmentos de ADN que van de 18 a 1138 kilobases (kb), calculadas por comparación con el perfil de bandas de la cepa de *Salmonella enterica*, serotipo Braenderup H9812 utilizado como marcador de peso molecular en el análisis de PFGE, por ser el estándar universal de la Red PulseNet.

Tabla 2. Patrones de susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos de *Klebsiella*.

	Aislamiento							Antibiotipo (A)	Antibiotipo (B)
	198-08	199-08	200-08	201-08	202-08	203-08	204-08		
AMIKACINA	S	S	I	S	I	S	S	S	S/I
AMOXICILINA/CLAVULANICO	I	I	R	R	R	R	R	I	R
AZTREONAM	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CEFEPIMA	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CEFOTAXIMA	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CEFOXITINA	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CEFTAZIDIMA	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CEFTRIAXONA	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CIPROFLOXACINA	R	R	R	R	R	R	R	R	R
GENTAMICINA	S	S	R	R	R	R	R	S	R
IMIPENEM	S	S	S	S	S	S	S	S	S
MEROPENEM	S	S	S	S	S	S	S	S	S

R: Resistente; S: Sensible; I: Intermedio.

Antibiotipo A (aislamientos 198 y 199); Antibiotipo B (aislamientos 200, 201, 202, 203, y 204).

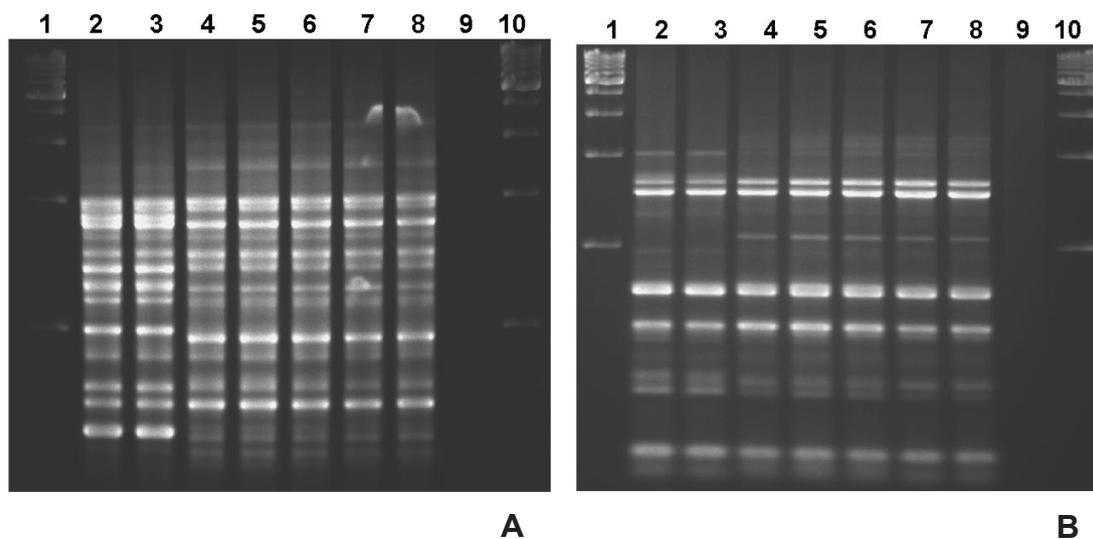


Figura 1. Perfiles de ERIC-PCR y REP-PCR de los aislamientos de *K. pneumoniae*. Resultados de los análisis de ERIC-PCR (A) y REP-PCR (B). Carriles 1 y 10: Marcador de peso molecular de 1Kb., Carril 2: aislamiento 198-08; Carril 3: aislamiento 199-08; Carril 4: aislamiento 200-08; Carril 5: aislamiento 201-08; Carril 6: aislamiento 202-08; Carril 7: aislamiento 203-08; Carril 8: aislamiento 204-08. Carril 9: control negativo. Gel de agarosa al 1.5%, buffer TAE 1x y tinción en solución de bromuro de etidio.

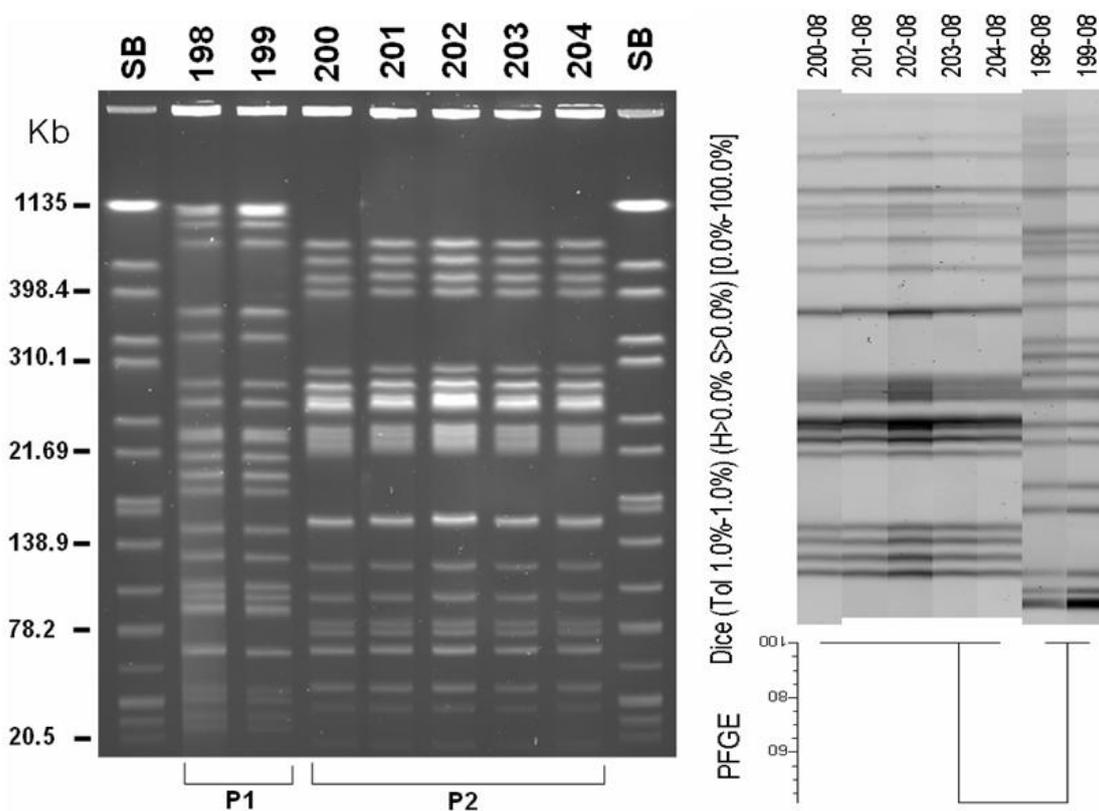


Figura 2. Perfiles de PFGE de los aislamientos de *K. pneumoniae*. El ADN cromosómico fue digerido con la enzima de Restricción XbaI. Se indican los aislamientos correspondientes en cada carril (izquierda). El dendrograma de relación genética (derecha) fue generado con el programa Gel Compror v5.1 usando el coeficiente de Dice y una tolerancia de 1%.

INVESTIGACIÓN ORIGINAL / ORIGINAL RESEARCH

Los patrones de bandas analizados con el programa Gel Compar v 5.1 mostraron la misma agrupación genética de los aislamientos que los análisis de ERIC y REP, con los aislamientos 200 a 204 compartiendo el mismo patrón de PFGE de restricción de los cromosomas, y agrupándose por lo tanto como una única cepa de *K. pneumoniae*; los aislamientos 198 y 199 presentaron también un patrón de PFGE común, pero muy diferente al patrón de la otra cepa (Figura 2).

DISCUSIÓN

En septiembre del 2008, en el servicio de neonatología de un hospital de Lima, Perú se sospechó de un brote de infección intrahospitalaria de *Klebsiella pneumoniae*, siguiendo criterios epidemiológicos y de resistencia a los antimicrobianos y solicitó al Instituto Nacional de Salud la caracterización molecular de siete aislamientos clínicos obtenidos por hemocultivo de pacientes con bacteremia.

Para investigar esta sospecha de brote se realizó la genotipificación y caracterización fenotípica de los aislamientos. Fenotípicamente de acuerdo a los patrones de susceptibilidad antimicrobiana los aislamientos fueron clasificados en dos antibiogramas, sugiriendo la presencia de dos cepas. Esto fue confirmado por los métodos de genotipificación; los aislamientos agrupados por antibiogramas mostraron una agrupación genética muy similar por los análisis ERIC-PCR, REP-PCR y PFGE. El análisis de PFGE demuestra claramente que los siete aislamientos se clasifican en sólo dos cepas únicas de *K. pneumoniae*, con cinco aislamientos para la cepa más representada (aislamientos 200 al 204), de patrón P2 de PFGE, siendo también la más resistente a los antimicrobianos y dos aislamientos para la otra cepa (aislamientos 198 y 199), de patrón P1 de PFGE.

Los patrones similares de resistencia antimicrobiana pueden sugerir que varios aislamientos provienen de una misma cepa; sin embargo esto no ocurre siempre; para saber si estos aislamientos son efectivamente una misma cepa es necesario hacer la caracterización molecular o genotipificación de los aislamientos, basándonos en el análisis de regiones del cromosoma bacteriano a través de métodos como ERIC-PCR, REP-PCR y PFGE. El método de genotipificación bacteriana por PFGE es el recomendado en el estudio de brotes de *Klebsiella*, debido a su alto poder discriminatorio de los aislamientos relacionados genéticamente (27).

La infección por cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE está asociada a graves efectos adversos, pues tiene una mayor tasa de fracaso del tratamiento y de mortalidad que las infecciones causadas por cepas no-BLEE (28). En nuestro estudio, el fenotipo de la cepa más resistente también sugiere la transmisión de ciertos plásmidos portadores de genes BLEE entre las cepas del servicio de este hospital, favorecida por la capacidad de *K. pneumoniae* para adquirir plásmidos de resistencia (6,29). El análisis por ERIC-PCR mostró un mejor poder discriminatorio que REP-PCR para la genotipificación de *K. pneumoniae*; lo cual concuerda con un estudio previo (20); pero el mejor resultado se obtuvo del análisis por PFGE, método recomendado para la confirmación de brotes causados por *K. pneumoniae* (20).

La capacidad de *K. pneumoniae* de propagarse con rapidez entre pacientes de algunos servicios hospitalarios a menudo conduce a brotes de infección intrahospitalaria, especialmente en los recién nacidos (7,8). Los métodos de genotipificación de los aislamientos como PFGE son recomendados en el estudio de estos casos; así como en la vigilancia epidemiológica. En este estudio se demuestra la utilidad del PFGE en la investigación epidemiológica de un caso particular de infección intrahospitalaria, determinando la relación clonal de aislamientos de *K. pneumoniae* del servicio de neonatología de un hospital en Lima-Perú.

Diversos reportes evidencian la existencia de clones internacionales o epidémicos de *K. pneumoniae* en todo el mundo (5,14,30,31); y algunas investigaciones han revelado la existencia de clones identificados por genotipos asociados con infecciones específicas (31). Por lo tanto, es necesario realizar una vigilancia activa de este patógeno, especialmente en países donde este problema aun no es bien investigado. Hasta el momento no se han reportado estudios sobre la caracterización molecular de los aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* causante de infección intrahospitalaria en el Perú, ni la identificación de genotipos o clones de este patógeno presentes en nuestro país.

En conclusión se determinó la existencia de solo dos cepas de *K. pneumoniae* portadoras de BLEE entre los siete aislamientos estudiados del servicio de neonatología del hospital de Lima-Perú; revelando su transmisión clonal, y demostrando de esta forma la utilidad de la genotipificación por el método de PFGE en el estudio de brotes intrahospitalarios en el

INVESTIGACIÓN ORIGINAL / ORIGINAL RESEARCH

Perú. Será necesario el análisis de un mayor número de cepas de *K. pneumoniae* y el uso de otras técnicas moleculares como la tipificación por secuencias de múltiples locus a fin de poder obtener más conclusiones sobre la transmisión y evolución de las cepas de *K. pneumoniae* portadoras de BLEE en el Perú.

Declaración de financiamiento y de conflictos de intereses:

El estudio fue financiado por el Instituto Nacional de Salud. Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Correspondencia:

Henri Bailón Calderón
Dirección: Av. Defensores del Morro No. 2268
Chorrillos – Perú
Teléfono: (511) 6176200 (anexo 1457 y 1459)
Correo electrónico: hbailon@ins.gob.pe, arakis11@yahoo.com

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Suh J, Son J, Chung D, Peck K, Ko K, Song J. Nonclonal Emergence of Colistin-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Blood Samples in South Korea. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54 (1): 560–562.
2. Elhani D, Bakir L, Aouni M, et al. Molecular epidemiology of extended-spectrum b-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in a university hospital in Tunis, Tunisia, 1999–2005. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16: 157–164.
3. Batchoun R, Swedan S, Shurman A. Extended Spectrum β -Lactamases among Gram-Negative Bacterial Isolates from Clinical Specimens in Three Major Hospitals in Northern Jordan. *Int J Microbiol.* 2009 [Citado Julio de 2012]; Article ID 513874:8. URL disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2777014/>
4. Hrabá J, Empel, Bergerova T, et al. International Clones of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* with Extended-Spectrum β -Lactamases in a Czech Hospital. *J Clin Microbiol.* 2009; 47(10): 3353-3357.
5. Kitchel B, Rasheed K, Patel J, 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(8): 3365–3370.
6. Barbier F, Ruppe E, Giakkoupi P, et al. Genesis of a KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* after in vivo transfer from an imported Greek strain. *Euro Surveill.* 2010 [Citado Julio de 2012]; 15(1). URL disponible en: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19457>
7. Oteo J, Cuevas O, López R, Banderas F, Vindel A. Emergence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* of multilocus sequence types 1, 11, 14, 17, 20, 35 and 36 as pathogens and colonizers in newborns and adults. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 64: 524–528.
8. Otman J, Perugini M, Tognim M, Vidotto, M. Atypical phenotypic characteristics of *Klebsiella pneumoniae* isolates from an outbreak in a neonatal intensive care unit in Brazil. *Braz J Microbiol.* 2007; 38:273-277.
9. Ben T, Foulon T, Ben A, Fendri C, Belhadj O, Ben K. Molecular epidemiology of an outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* in a Tunisian neonatal ward. *J Med Microbiol.* 2003; 52: 427–433.
10. Decré D, Gachot B, Lucet J, Arlet G, Bergogne-Bérézin E, Rénier B. Clinical and bacteriologic epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing strains of *Klebsiella pneumoniae* in a medical intensive care unit. *Clin Infect Dis.* 1998; 27: 834–844.
11. Gales A, Bolmström A, Sampaio J, Jones R, Sader H. Antimicrobial susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamase (ESBL) isolated in hospitals in Brazil. *Braz J Infect Dis.* 1997; 1(4):196-203.
12. Gaynes R, Edwards JR; National Nosocomial Infections Surveillance System. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis.* 2005; 41: 848–854.
13. Melano R, Corso A, Petroni A, et al. Multiple antibiotic-resistance mechanisms including a novel combination of extended-spectrum β -lactamases in a *Klebsiella pneumoniae* clinical strain isolated in Argentina. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 52: 36-42.
14. Seki L, Pereira P, de Souza M, et al. Molecular epidemiology of KPC-2- producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011; 70: 274–277.
15. Marra A, Wey S, Castelo A, et al. Nosocomial bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae*: impact of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) production on clinical outcome in a hospital with high ESBL prevalence. *BMC Infect Dis* 2006 [Citado Julio de 2012]; 6:24. URL disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1382232/?tool=pmcentrez>
16. Sahly H, Navon S, Roesler L, et al. Extended-Spectrum β -Lactamase Production Is Associated with an Increase in Cell Invasion and Expression of Fimbrial Adhesins in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52 (9): 3029–

- 3034.
17. Espinal P, Mantilla J, Saavedra C, Leal A, Alpuche C, Valenzuela E. Epidemiología molecular de infección nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* productora de betalactamasa de espectro extendido. *Biomédica*. 2004; 24(3):252-261.
 18. Kiratisin P, Apisarnthanarak A, Laesripa C, Saifon P. Molecular characterization and epidemiology of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates causing health care-associated infection in Thailand, Where the CTX-M Family Is Endemic. *Antimicrob Agents Chemoth*. 2008; 52(8): 2818–2824.
 19. Prodinger W, Fille M, Bauernfeind A, et al. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 beta- lactamase: parallel outbreaks due to multiple plasmid transfer. *J Clin Microbiol*. 1996; 34(3):564.
 20. Gazouli M, Kaufmann M, Tzelepi E, Dimopoulou H, Paniara O, Tzouveleki LS. Study of an Outbreak of Cefoxitin-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in a General Hospital. *J Clin Microbiol*. 1997 35:508–510.
 21. Versalovic J, Koeuth T, Lupski J. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res*. 1991; 19(24): 6823-6831.
 22. Mantilla J, García I, Espinal P, Valenzuela E. Estandarización y evaluación de tres sistemas de rep-PCR para la tipificación de *Klebsiella pneumoniae*. *Rev Col Cienc Quím Farm*. 2004; 33 (1): 48-58.
 23. Lim K, Yasin R, Yeo C, Puthuchery S, Thong K. Characterization of Multidrug Resistant ESBL-Producing *Escherichia coli* Isolates from Hospitals in Malaysia. *J Biomed Biotechnol*. 2009 [Citado Julio de 2012]; URL disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2721974/?tool=pubmed>
 24. Padilla C, Ventura G. Genotipificación de aislamientos de *Bartonella bacilliformis* por amplificación de elementos repetitivos mediante el uso de REP-PCR y ERIC-PCR. *Rev Peru Med Expe Salud Pública*. 2003; 20 (3): 128-131.
 25. Baraniak A, Izdebski R, Herda M, Fiett J. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST258 with KPC-2 in Poland. *Antimicrob Agents and Chemoth*. 2009; 53(10): 4565–4567.
 26. Cockerill F, Wikler M, Bush K, Dudley M, et al. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-first Informational Supplement. CLSI docum M100-S21. Wayne, Pennsylvania USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011 [citado Julio 2012]; 31(1). Disponible en: http://www.rsu.ac.th/medtech/files/CLSI_2011.pdf
 27. Hansen D, Skov R, Bened J, Sperling V, Kolmos H. *Klebsiella* typing: pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in comparison with O:K-serotyping. *Clin Microbiol Infect*. 2002; 8: 397–404.
 28. Song K, Jeon J, Park W, et al. Clinical outcomes of spontaneous bacterial peritonitis due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species: A retrospective matched case-control study. *BMC Infectious Diseases*. 2009; 9:41
 29. Mayer L. Use of Plasmid Profiles in Epidemiologic Surveillance of Disease Outbreaks and in Tracing the Transmission of Antibiotic Resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1988; 1(2): 228-243.
 30. Giani T, D'Andrea. Emergence in Italy of *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 258 Producing KPC-3 Carbapenemase. *J Clin Microbiol*. 2009; 47(11): 3793–3794.
 31. Brisse S, Fevre C, Passet V, et al. Virulent Clones of *Klebsiella pneumoniae*: Identification and Evolutionary Scenario Based on Genomic and Phenotypic Characterization. *PLoS ONE*. 2009 [Citado Julio de 2012]; 4(3): e4982. doi:10.1371/journal.pone.0004982. URL disponible en: <http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0004982>

Recibido: 10/12/2012

Aceptado: 16/04/2013