

## Perfil plasmidial de *Klebsiella pneumoniae*, cepas endémicas y aisladas de brotes en una unidad de neonatología

Leonardo Maggi C.<sup>1</sup>; Ernesto Payá G.<sup>1</sup>; Patricio Nercelles M.<sup>2</sup>;  
Alvaro Cordovez P.<sup>3</sup>; Juan Martínez D.<sup>6</sup>; Valeria Prado J.<sup>1</sup>;  
Freddy Squella B.<sup>4</sup>; Carmen Mendoza N.<sup>5</sup>

### Plasmid profile of nosocomial *Klebsiella pneumoniae* strains

Plasmid profile analysis is useful in the differentiation of phenotypically similar bacterial strains. Our aim was to evaluate the usefulness of plasmid profile analysis in the identification of different *K. pneumoniae* strains isolated from endemic and occasional nosocomial infections. Seventeen *K. pneumoniae* strains isolated from two separate outbreaks (years 1990 and 1992, twelve and five strains respectively) at a neonatal unit (Carlos Van Buren Hospital, Valparaíso, Chile) and 31 endemic strains obtained along year 1992 from nine different clinical wards within the same hospital were analyzed. Strains were tested for plasmid profile analysis by gel electrophoresis and for antimicrobial susceptibility patterns by the Kirby Bauer method. Plasmid profiles were identical for 11 of the 12 strains in outbreak 1 and for all five strains isolated in outbreak 2. Strains belonging to different outbreaks had different plasmid profiles. Twentyfive plasmid profiles were identified among the 31 endemic strains. Plasmid profile analysis allowed the identification of one different strain in outbreak 1 which was not identified by antimicrobial resistance pattern analysis and also of seven similar endemic strains that showed different antimicrobial resistance patterns. Plasmid profile analysis is useful in epidemiological investigations of nosocomial infections and able to differentiate strains more effectively than the commonly used antimicrobial resistance patterns.

**[Key words:** *Klebsiella pneumoniae*, bacterial typing, plasmids, epidemiological markers.]

Las infecciones intrahospitalarias (IIH) constituyen un problema de salud pública debido a su mortalidad, costo y frecuencia. En Chile se notifican aproximadamente 45 000 episodios de IIH por año, con una tasa de 4,5/100 egresos, estimándose que causan unas 2 500 muertes anuales<sup>1,2</sup>.

*Klebsiella pneumoniae* ocupa el tercer lugar como agente etiológico global, sólo superado por *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*<sup>2</sup>. Produce infecciones graves de la vía urinaria, del

aparato respiratorio y el torrente sanguíneo<sup>3,4</sup>, en forma endémica y también en brotes epidémicos de gran letalidad<sup>5</sup>, especialmente si su localización es la circulación<sup>6</sup>. Además suele presentar resistencia a los antimicrobianos más comunes, lo que hace su tratamiento difícil y costoso<sup>7-9</sup>. Las unidades de neonatología son frecuentemente afectadas por epidemias de fatales consecuencias con este agente<sup>10-12</sup>. Para controlarlas es necesario disponer de métodos microbiológicos eficaces en detectar los brotes, discriminar entre cepas epidémicas y ocasionales y trazar la forma en que ocurre su diseminación entre los distintos servicios clínicos del hospital. Los marcadores epidemiológicos habitualmente utilizados con este fin son el antibiograma, el biotipo y en algunos casos el serotipo o el fagotipo<sup>13</sup>.

Las técnicas de análisis genético (genotipificación) permiten tipificar con alto grado de discriminación cepas bacterianas con características fenotípicas similares<sup>14</sup>. El método más utili-

1. Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
2. Hospital Van Buren, Valparaíso.
3. Hospital Barros Luco-Trudeau, Santiago.
4. Ayudante alumno Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
5. Hospital Dr. Ezequiel González Cortés.
6. Tecnólogo Médico, Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.  
Financiamiento Proyecto Fondecyt 92-1094.

zado es el análisis del ADN ubicado fuera del cromosoma de la bacteria en forma de cadenas superenrolladas, denominadas plasmidios, que pueden ser extraídos y posteriormente examinados mediante electroforesis en gel de agarosa. El estudio se puede complementar cortando los plasmidios mediante enzimas específicas (endonucleasas) y haciendo análisis del ADN cromosómico de la bacteria.

Esta investigación se realizó con el propósito de evaluar el perfil plasmidial (genotipo) como técnica de tipificación de *Klebsiella pneumoniae* en epidemias intrahospitalarias en recién nacidos, comparándolo con el perfil de resistencia a los antimicrobianos (antibiotipo).

## Materiales y Métodos

**Origen de las cepas.** Se incluyeron en este estudio 52 cepas de *K. pneumoniae* aisladas de 52 pacientes internados en el hospital Carlos van Buren, de Valparaíso, Chile; un hospital general de alta complejidad que cuenta con 756 camas, que mantiene un sistema de vigilancia activa de infecciones intrahospitalarias (IIH) desde 1986. Todas ellas provenían de muestras clínicas de enfermos con diagnóstico de infección intrahospitalaria<sup>18</sup>. Los ejemplares fueron clasificadas en: grupo 1 (cepas aisladas durante un brote producido en la unidad de neonatología entre mayo y noviembre de 1990; n= 12); grupo 2 (cepas aisladas durante un segundo brote producido en la misma unidad el mes de abril de 1992; n= 5); grupo 3 (cepas de pacientes de otros servicios del hospital aisladas entre abril y julio de 1992; n= 35).

**Identificación de las cepas.** Las cepas fueron identificadas como *K. pneumoniae* siguiendo las normas de identificación de enterobacterias del Instituto de Salud Pública de Chile<sup>15</sup>.

**Determinación del perfil de resistencia a los antimicrobianos.** La susceptibilidad de las cepas fue determinada por el método de difusión por discos en agar Mueller-Hinton (Kirby-Bauer) según las indicaciones del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)<sup>16</sup>. Los antimicrobianos incluidos fueron: gentamicina, cotrimoxazol, cefazolina, cefotaxima, cefoperazona, ceftioxona, ceftazidima, amikacina, sulbactam/ampicilina, ciprofloxacino y enoxacino. Se utilizaron como puntos de corte para determinar resistencia los establecidos por el NCCLS<sup>16</sup>; se incluyeron como control las cepas ATCC *Pseudomonas aeruginosa* 27853 y *E. coli* 25922.

**Determinación del perfil plasmidial.** Luego de su aislamiento las cepas fueron enviadas en medio "Dorset-egg"<sup>17</sup> al centro de referencia, donde se mantuvieron a 4° C y a -70° C en caldo de soya tripticasa (Trypticase Soy Broth) con glicerol 15%. El ADN plasmidial fue extraído mediante una modificación de la técnica de lisis alcalina de Birboim y Doly<sup>18</sup> como sigue: las cepas fueron inoculadas en 5 ml de caldo Luria e incubadas a 37° C en agitación por 18 horas; 1,5 ml de cultivo fueron traspasados a tubos de

Eppendorf y centrifugados a 16 000 rpm por 45 sec (microcentrifuga Beckman E., Beckman Instruments, inc. P.A. Ca. EUA). El precipitado fue resuspendido en 100 µl de solución de lisis (lisozima 2 mg/ml, 10 mM EDTA, 50 mM glucosa y 25 mM Tris Cl (pH 8,0) e incubado a 4° C por 20 min; se agregaron 200 µl de solución de denaturación (0,2 N NaOH, 1% dodecilsulfato de sodio (SDS)) y se incubó en hielo por 5 min; posteriormente se agregó la solución de precipitación (acetato de sodio 3 M pH 4,8), se mezcló por inversión 5 veces y se incubó en hielo por 15 min; se centrifugó a 16 000 rpm durante 15 min y se traspasaron 400 µl del sobrenadante a tubos de Eppendorf agregándose 1 ml de etanol al 99,8% frío (-20° C); se mezcló por inversión y se incubó a -70° C por 15 min.

Se centrifugó en microcentrifuga por 10 min, se eliminó el sobrenadante por inversión y aspiración suave para posteriormente agregar 200 µl de etanol (99,8%, -20° C) y 100 µl de solución conteniendo NaOAc 0,1 M y Tris Cl 50 mM pH 8,0. Se incubó a -70° C por 15 min, se centrifugó a 16 000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se secó el precipitado en bomba de vacío.

**Electroforesis en gel de agarosa.** Se prepararon geles de agarosa 0,7% en tampón de electroforesis Tris borato IX; el ADN fue resuspendido en 16 µl de agua bidestilada agregándose 4 µl de solución de carga (0,07% azul de bromofenol, 7% SDS, 20% Ficoll, en agua); la electroforesis se hizo a 4 V/cm durante 3 horas; terminada ésta, el gel fue teñido con 150 µl de solución de bromuro de etilo (10 mg/ml), examinado en transiluminador de luz ultravioleta (UVP, Inc. Ca. EUA) y fotografiado (Polaroid instant pack film 667). Como marcadores de peso molecular se usaron plasmidios de la cepa *E. coli* V5171<sup>19</sup>, los que fueron extraídos mediante el procedimiento arriba descrito.

**Análisis de los resultados.** La capacidad de tipificación de ambos métodos fue determinada por el porcentaje de cepas tipificadas y la capacidad de discriminación mediante el índice de Simpson<sup>20</sup>.

## Resultados

**Distribución de las cepas.** En la tabla 1 se observa la distribución de las cepas por servicio y tipo de muestra. Los grupos 1 y 2 corresponden a los brotes detectados en el servicio de neonatología en 1990 y 1992 respectivamente, la mayor parte (10/17) de las cepas provenían de hemocultivos. En el grupo 3 se incluyeron cepas aisladas de distintos servicios, durante los meses de abril a junio de 1992, destacando la mayor frecuencia en neurología y urología (33%), siendo el urocultivo la muestra que aportó la mayor proporción (40%).

**Determinación del antibiotipo.** En las tablas 2, 3 y 4 se detallan los perfiles de resistencia antimicrobiana y los plasmidiales de las cepas de los grupos 1, 2, y 3 respectivamente. Encontramos 25 patrones de resistencia a los 11 antimicrobianos probados; en 14/52 cepas de *K. pneu-*

Tabla 1

Distribución de cepas por servicio clínico

Servicio clínico	n de cepas	%
Neonatología	17	32,7
Urología	9	17,3
Neurocirugía	8	15,4
Medicina	4	7,7
UCI	3	5,7
Cirugía infantil	3	5,7
UCI pediátrica	3	5,7
Traumatología	2	3,8
Pediatría	2	3,8
Ginecología	1	1,9
Total	52	100,0

Tabla 2

Frecuencia de aislamiento según muestra de cepas del grupo 3

Muestra	n	%
Orina	21	40,3
Secreción bronquial	6	11,5
Herida operatoria	3	5,7
Secreción traqueal	2	3,8
Secreción ótica	1	1,9
Sangre	1	1,9
Abceso cerebral	1	1,9
Total	35	67,0

Tabla 3

Perfiles de resistencia

Tipo	Resistencia	Frecuencia
1	G, Co, Cef, Ctx, Cfp, Ctr, Ak, Sam	14
2	G, Co, Cef, Cfp, Sam	5
3	G, Co, Sam	3
4	G, Co, Cef, Ctx, Cfp, Ctr, Caz, Ak, Sam	2
5	G, Co, Cfp, Ctr, Sam	2
6	Cef, Ctr, Sam	2
7	Cef, Ctr	2
8	G, Co, Ctr, Sam	2
9	Co, Cfp	2
10	Co, Cfp, Sam	2
11	G, Co, Cfp, Sam	2
12-25	(14 antibiótipos distintos)	14
Total		52

G: gentamicina; Co: cotrimoxazol; Cef: cefazolina; Ctr: ceftriaxona; Cfp: cefoperazona; Ctx: cefotaxima; Caz: Cefazidima; Ak: Amikacina; Sam: sulbactam/ampicilina; Cfp: ciprofloxacino; En: enoxacino.

*moniae* (27%) el patrón de resistencia era tipo 1 y correspondieron a todas las cepas del grupo 1 (12/12) y a dos cepas del grupo 3 (2/35). 5/52 cepas presentaron patrón tipo 2 (9,6%) y correspondieron a la totalidad de las cepas del grupo 2 (5/5). Las restantes 33 cepas presentaron patrones diversos y correspondieron a cepas del grupo 3, en el cual cuatro cepas eran resistentes simultáneamente a cefotaxima y ceftazidima, tres de ellas eran, además, resistentes a amikacina.

**Determinación del perfil plasmidial.** En las tablas 2, 3 y 4 se detallan los perfiles plasmidiales de las cepas de los grupos 1, 2 y 3 respectivamente. Este se realizó en 48 de las 52 cepas; 4 cepas no fueron recuperables (7,7%). Encontramos 25 perfiles plasmidiales en 46 cepas. Dos cepas no fueron tipificables. El perfil tipo A se presentó exclusivamente en las del primer brote (grupo 1), donde 11 de 12 tenían dicho perfil, mientras otra presentó un perfil similar pero con una banda agregada de 10 Md (perfil tipo E). El perfil tipo B se encontró en siete cepas del grupo 3, las que tenían antibiótipos distintos.

El perfil tipo C fue exclusivo de las cepas del segundo brote (grupo 2) y se encontró en todas ellas (5/5). El perfil tipo D se encontró en 2 cepas del grupo 3 y sus antibiótipos resultaron distintos. Los perfiles tipos F al Y se encontraron individualmente en 20 cepas del grupo 3. Las cepas multirresistentes presentaron patrones plasmidiales diferentes.

**Eficacia de la tipificación.** La capacidad de tipificación fue de 100% para el biotipo y de 95,83% para el perfil plasmidial. El índice de discriminación fue 0,915 para el antibiótipo y 0,922 para el perfil plasmidial.

Tabla 4

Perfiles plasmidiales

Tipo	Plasmidios (md)	Frecuencia
1	7,5; 6,0; 3,8	11
2	52,0	7
3	25,2; 21,0	5
4	70,0; 52,0; 7,5; 4,3; 3,4; 1,2; 1,0	2
5	10,0; 7,5; 6,0; 3,8	1
6-25	(20 perfiles distintos)	20
Total		46

### Comentario

Las infecciones intrahospitalarias constituyen un creciente problema, en nuestro país y en el mundo<sup>1, 21</sup>. El apoyo del laboratorio de microbiología es fundamental para orientar el estudio epidemiológico, especialmente ante la aparición de brotes por patógenos que por su frecuencia, multirresistencia y letalidad constituyen verdaderos desafíos para los equipos encargados del control de las IHH.

*K. pneumoniae* cumple con condiciones que lo hacen ser un patógeno nosocomial por excelencia, ya que produce infecciones intrahospitalarias en pacientes adultos y pediátricos en hospitales de alta y baja complejidad. Es un agente frecuente en las unidades de recién nacidos, donde produce graves brotes epidémicos y probablemente enterocolitis necrótica<sup>22</sup>. El reservorio principal parece ser el intestino de los pacientes<sup>23</sup> y se ha propuesto el mecanismo de traslocación bacteriana para explicar su diseminación desde el tubo digestivo a la sangre<sup>24</sup>.

Por esa razón, en algunos centros se hace rutinariamente vigilancia de *K. pneumoniae* mediante cultivos de deposición de pacientes en tratamiento intensivo y recién nacidos, para detectar sobrecrecimiento y colonización por cepas multirresistentes<sup>25</sup>. Algunos han propuesto, entre las medidas de control, profilaxis con antibióticos en pacientes seleccionados<sup>23</sup>. Sin embargo, en nuestra experiencia lo que ha permitido el control de los brotes han sido la supervisión y el cumplimiento estricto de las normas para procedimientos invasivos y no nos parece útil el cultivo habitual ni el uso de profilaxis en pacientes colonizados.

A partir de 1983 *K. pneumoniae* adquiere una nueva dimensión como patógeno multirresistente, con la aparición —en Alemania— de cepas productoras de beta lactamasas de espectro expandido<sup>26</sup>; desde entonces se han comunicado numerosos brotes por estas cepas<sup>27, 28</sup>, produciendo preocupación la capacidad de transferencia de determinantes de resistencia entre cepas de *K. pneumoniae* y otras enterobacterias mediante la diseminación de plasmidios, fenómeno que se produce en forma frecuente y rápida<sup>29</sup>.

En el Hospital Carlos van Buren, de Valparaíso, se ha organizado un sistema de vigilancia selectiva de infecciones hospitalarias, que ha permitido identificar problemas en forma más espe-

cífica; sin embargo es necesario contar con técnicas microbiológicas discriminativas, especialmente en presencia de un brote, ya que la eficiencia de las medidas para prevenir la diseminación de paciente a paciente, de cepas epidémicas, dependerá de la capacidad para identificar los reservorios y mecanismos de transmisión.

Uno de los problemas aún no resueltos en la investigación de brotes de infección hospitalaria se refiere a los marcadores epidemiológicos útiles para identificar las cepas involucradas. Se han propuesto muchos métodos de tipificación para distintos patógenos; en el caso de *K. pneumoniae* varios pueden emplearse por su costo o su complejidad técnica. La serotipificación basada en el antígeno capsular no está disponible en el comercio, mientras reproducibilidad y sensibilidad de técnicas como biotipificación, tipificación por bacteriocinas y por fagos son bajas<sup>30</sup>. Por esta razón, en nuestro hospital el marcador habitualmente utilizado es el perfil de resistencia o antibiograma.

Las técnicas de epidemiología molecular se han utilizado para trazar la diseminación de casi todos los patógenos de importancia nosocomial, evitan la influencia de factores ambientales que alteran el fenotipo, son relativamente rápidas y pueden ser aplicadas sin mayores variaciones al estudio de distintas especies bacterianas.

En el presente estudio evaluamos la eficiencia del antibiograma y el perfil plasmidial como métodos de tipificación de cepas de *K. pneumoniae* aisladas de infecciones intrahospitalarias. Si tomamos como marcador exclusivamente el antibiograma, el primer brote fue producido por una cepa única y multirresistente, sin embargo el análisis genético reveló la existencia de otra cepa con características fenotípicas similares pero diferente contenido plasmidial, lo que sugiere la presencia de dos clones, uno de tipo epidémico y otro como infección aislada; esto concuerda con lo encontrado por otros autores, en el sentido que el análisis del material genómico permite discriminar cepas fenotípicamente similares pero no relacionadas genéticamente<sup>25</sup>. Es interesante señalar que mientras más marcadores se utilizan, más clones es posible detectar, por lo que algunos recomiendan emplear varios, especialmente cuando uno de ellos es el análisis plasmidial, pues se han descrito cepas con idéntico perfil que, por estudios más finos del genoma, fueron

asignadas a clones diferentes, usando como patrón de referencia el análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción de ADN que codifican el ARN ribosomal (ribotipificación)<sup>25</sup>. Sin embargo, el análisis plasmidial parece ser un buen marcador epidemiológico, siempre que se tome en cuenta esta limitación.

Las cepas resistentes a ceftazidima, ceftriaxona y amikacina, posiblemente corresponden a especímenes aislados, no relacionados genéticamente, a pesar que en dos de ellas los antibiogramas inducen a pensar en infección cruzada. Se ha establecido que la diversidad genética de las cepas multiresistentes es amplia y se han descrito brotes por cepas multiresistentes, con antibiogramas similares, que correspondían a 15 ribotipos diferentes<sup>25</sup>. La mejor correlación entre antibiograma y perfil plasmidial se encontró en el segundo brote, lo que sugiere que éste fue causado por un clon único, siendo ambas técnicas útiles en este caso. Los análisis genético y fenotípico mostraron gran heterogeneidad en las cepas no relacionadas con brotes, lo que apoya la tesis de que en el caso de endemia, la infección es probablemente endógena y no cruzada.

Dos hechos llaman la atención en el análisis de las cepas del grupo 3; el primero es que encontramos ocho antibiogramas distintos, con dos cepas cada uno, y un antibiograma con tres cepas, lo que podría sugerir en un primer momento la existencia de infección cruzada, sin embargo los perfiles plasmidiales fueron diferentes, e indican que probablemente se trata de infecciones aisladas. Por otro lado, basados en el perfil plasmidial, hubo probablemente un brote que afectó los servicios de medicina, neurocirugía, urología y cuidados intensivos de pediatría, involucró a siete pacientes y no pudo ser detectado por el antibiograma.

Las cepas que presentaron el perfil tipo D, probablemente están relacionadas genéticamente y también sería conveniente realizar en ellas estudios más finos, como corte de los plásmidos y análisis de ADN cromosómico, para confirmar su pertenencia a un clon único.

La menor capacidad de tipificación del perfil plasmidial que del antibiograma otorga al primero menor sensibilidad; el mejor índice de discriminación para el perfil plasmidial implica que la probabilidad de asignar correctamente una cepa a un tipo determinado es mayor cuando se utiliza éste que el antibiograma.

Estos resultados indican que las cepas endémicas de los distintos servicios del hospital son genéticamente heterogéneas, lo que resultó concordante con los antibiogramas encontrados. Las cepas provenientes de los brotes en neonatología resultaron homogéneas en sus perfiles plasmidiales y antibiogramas, excepto una cepa del primer brote; esto sugiere que ambos fueron producidos por sendos clones epidémicos. El antibiograma es un marcador adecuado en el estudio de infecciones intrahospitalarias por *K. pneumoniae*; sin embargo, en el caso del estudio específico de un brote por este agente, el perfil plasmidial prestaría mayor utilidad ya que permite identificar mejor los clones involucrados y discrimina satisfactoriamente cepas epidémicas y endémicas. Esto permite identificar la vía de transmisión al estudiar reservorios y adoptar la intervención adecuada.

Por último, se debe destacar la importancia del estudio de las bases genéticas de la resistencia a antimicrobianos en las cepas de origen intrahospitalario, ya que así como se diseminan cepas multiresistentes, se pueden diseminar plásmidos entre cepas de distintas especies. *K. pneumoniae* ha sido identificado como el principal reservorio de plásmidos R capaces de transferirse entre especies, lo que asigna un segundo objetivo de importancia a la determinación del perfil plasmidial.

## Resumen

El perfil plasmidial es utilizado frecuentemente en estudios epidemiológicos para distinguir cepas con características fenotípicas similares. Para evaluar la utilidad de esta técnica en la tipificación de *K. pneumoniae*, estudiamos dos brotes de infección intrahospitalaria ocurridos en la unidad de neonatología del Hospital Carlos van Buren. Se analizó el perfil plasmidial de 12 cepas aisladas de un brote producido en 1990, 5 cepas aisladas de un brote ocurrido en 1992 y 31 cepas aisladas durante 1992 en otros servicios del hospital y no relacionadas con brotes. Como patrón fenotípico se utilizó el perfil de resistencia a los antimicrobianos (antibiograma). Del primer brote 11/12 cepas presentaron el mismo perfil plasmidial y 5/5 cepas del segundo brote, siendo ambos perfiles distintos entre sí. Los patrones plasmidiales de las cepas endémicas de otros

servicios fueron variables y diferentes de las cepas epidémicas. En ambos brotes, el antibiotipo de las cepas epidémicas fue concordante con el patrón plasmidial, excepto en una cepa del primer brote. Estos resultados sugieren que el análisis del perfil plasmidial es una técnica adecuada para discriminar cepas epidémicas y endémicas de *K. pneumoniae* y por lo tanto puede ser útil en estudios de brotes por este agente.

(Palabras clave: *Klebsiella Pneumoniae*, tipificación bacteriana, perfil plasmidial, infecciones hospitalarias.)

### Referencias

- Otalza F, Brenner P: Informe de la vigilancia epidemiológica y actividades de control de las infecciones intrahospitalarias en Chile. Ministerio de Salud, Chile, 1989.
- Otalza F, Brenner P: Vigilancia de las infecciones intrahospitalarias en Chile. Primer congreso chileno de epidemiología. Gredis editores, Stgo., Chile, 1990.
- Palomino C: Prevalencia de infección nosocomial observada en 1988 en el hospital de enfermedades infecciosas Dr. Lucio Córdova. Rev Chil Infect 1990; 7: 51-57.
- Fernández A, Pinto ME: Bacteremia intrahospitalaria, evaluación de cinco años. Rev Chil Infect 1991; 8: 158-161.
- Watanakunakorn C, Jura J: *Klebsiella* bacteremia: a review of 196 episodes during a decade (1980 - 1989). Scand J Infect Dis 1991; 32: 399-405.
- Otalza F, Brenner P: Infecciones intrahospitalarias del torrente sanguíneo en Chile, cinco años de vigilancia epidemiológica. Rev Chil Infect 1992; 9: 48-56.
- Pinto ME: Resistencia de bacilos Gram negativos y *Staphylococcus aureus* en Chile. Rev Chil Infect 1989; 6: 213-214.
- Montiel F: Evolución de la resistencia de bacilos Gram negativos frente a cefalosporinas. Rev Chil Infect 1989; 6: 220-226.
- De Champs C, Guelon D, Joyon D, et al.: Treatment of a meningitis due to an Enterobacter aerogenes producing a depressed cephalosporinase and a *Klebsiella pneumoniae* producing an extended-spectrum beta-lactamase. Infection 1991; 19: 181-183.
- Tellerías L, Oto M, Lagos E, et al.: Infecciones bacterianas neonatales: magnitud y aspectos clínicos. Rev Chil Pediatr 1989; 60: 262-266.
- Grauel E, Halle E, Bollmann R, et al.: Neonatal septicemia: incidence, etiology and outcome. A six years analysis. Acta Paediatr Scand Suppl 1989; 360: 113-119.
- Guerrero P: Infección intrahospitalaria por *Klebsiella pneumoniae* en un brote de sepsis en recién nacidos. Rev Chil Pediatr 1981; 52: 306-313.
- Rubin SJ: *Klebsiella* markers systems. Infect Control 1985; 6: 59-63.
- Shlaes D, Currie-McCumber C: Plasmid analysis in molecular epidemiology: a summary and future directions. Rev Inf Dis 1986; 8: 738-746.
- Valenzuela ME, Cortés JA: Tablas TLM para identificación de enterobacterias. Instituto de Salud Pública, Chile, 1991.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test. 4th ed. Villanova, Pa: National Committee For Clinical Laboratory Standards; 1988.
- Dorset E: American Medicine 1902; 3:555.
- Birboim H, Doly J: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acid Res 1979; 7: 1513-1523.
- Macrina FL, Kopecko DJ, Jones KR et al.: A multiple plasmid-containing *Escherichia coli* strain. Convenient source of size reference for plasmid molecules. 1978; 1: 417-420.
- Hunter PR, Gaston MA: Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: An application of Simpson's index of diversity. J Clin Microbiol 1988; 26: 2454-2466.
- Schaberg DR, Culver DH, Gaynes RP: Major trends in the microbial etiology of nosocomial infections. Am J Med 1991; 91(3B): 728-758.
- Knight P, Cassady G: Control of infection due to *Klebsiella pneumoniae* in an intensive care nursery. J Perinatol 1990; 10: 357-360.
- Taylor ME, Oppenheim BA: Selective decontamination of the intestinal tract as an infection control measure. J Hosp Infect 1991; 17: 271-278.
- Lambert-Zechovsky N, Bingen E, Denamur E, et al.: Molecular analysis provides evidence for the endogenous origin of bacteremia and meningitis due to *Enterobacter cloacae* in an infant. Clin Infect Dis 1992; 15:30-32.
- Bingen E, Desjardins P, Arlet G, et al.: Molecular epidemiology of plasmid spread among extended broad-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in a pediatric hospital. J Clin Microbiol 1993; 31: 179-184.
- Kliebe C, Niels BA, Meyer JF, et al.: Evolution of plasmid coded resistance to broad spectrum cephalosporine. Antimicrob Agents Chemother 1985; 28:302-307.
- De Champs C, Rouby D, Guelon D, et al.: A case control study of an outbreak of infections caused by *Klebsiella pneumoniae* strains producing CTX-1 (TEM-3) beta-lactamase. J Hosp Infect 1991; 18:5-13.
- Arlet G, Sanson-le-Pors M, Rouveau M, et al.: Outbreak of nosocomial infection due to *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-4 beta lactamase. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1990; 9: 797-803.
- Philippon A, Ben-Redjeb S, Fournier G, et al.: Epidemiology of extended-spectrum betalactamases. Infection 1989; 17: 347-354.
- Gaston MA, Ailyng-Smith BA, Pitt TL: New bacteriophage typing scheme for division of the frequent capsular serotyping of *Klebsiella* spp. J Clin Microbiol 1987; 25: 1228-1232.