



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
Facultad de Medicina
Departamento de Microbiología

TESIS DOCTORAL

**Colonización vagino-rectal y transmisión materno-neonatal de
Enterobacteriaceae productores de betalactamasas de espectro
extendido**

Trabajo realizado para alcanzar el grado de Doctor por el licenciado en
Medicina D. Carlos Jiménez Rámila

Sevilla, mayo de 2017



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
Facultad de Medicina
Departamento de Microbiología

Dr. D. Álvaro Pascual Hernández, Catedrático de Microbiología de la Universidad de Sevilla y Dr. D. Jesús Rodríguez Baño, Profesor Asociado del Departamento de Medicina de la Universidad de Sevilla

CERTIFICAN:

Que la tesis para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla que lleva por título “Colonización vagino-rectal y transmisión materno-neonatal de Enterobacteriaceae productores de betalactamasas de espectro extendido” ha sido realizada por D. Carlos Jiménez Rámila bajo nuestra supervisión, considerando que reúne los requisitos necesarios para su presentación.

Y para que conste donde proceda firmamos el presente certificado en Sevilla a 5 de mayo de 2017.

Fdo. Dr. D. Álvaro Pascual Hernández

Dr. D. Jesús Rodríguez Baño

A mis padres y mi hermano

A mi mujer e hijas

A Pepito

Agradecimientos

Debo agradecer a José Luis Dueñas que pensara en los doctores Pascual Hernández y Rodríguez Baño para que fueran mis directores de tesis.

A Jesús y Álvaro que me hayan permitido cumplir uno de mis sueños profesionales a pesar de las dificultades que han ido surgiendo durante estos cuatro años.

A Lorena por su abnegación, su capacidad de trabajo, su esfuerzo y su comprensión.

A los “eternos doctorandos”, en especial a Lara, por su paciencia a la hora de explicarme los procedimientos microbiológicos en la poyata.

Al Departamento de Microbiología de la Universidad de Sevilla y al Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen Macarena por su apoyo desde el primer día, su cercanía y su trabajo desinteresado.

A los colaboradores del Servicio de Obstetricia y Ginecología, en especial a Chelo, Pepe, Alessio, Zoraida, Verónica y Marta en el área de hospitalización de púerperas y Karolina, Irene e Inma que repartieron torundas, vales y consentimientos por todo el área Macarena y Sevilla Norte.

Al servicio de Neonatología, en especial a Julia y Soco, que por mi culpa incrementaron bastante su carga de trabajo.

A todos los familiares y amigos, médicos o no, que me animaron a seguir cuando todo se puso en contra.

A mis padres y mi hermano por servirme de ejemplo, como en tantas otras cosas de la vida, y ayudarme para tener tiempo que dedicar a este trabajo.

A Rosario por su tiempo y su agobio.

A mi mujer por la ayuda en el trabajo de mecanización de datos y por el tiempo que le debo desde hace cuatro años, por la paciencia en los momentos bajos.

A mis hijas que espero puedan disfrutar de su padre más de lo que lo han hecho hasta ahora.

A Pepito que me acompañó hasta el final.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| ÍNDICE..... | 13 |
| ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS | 19 |
| TABLAS: | 19 |
| FIGURAS:..... | 20 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 25 |
| 1.1 Microbiota | 25 |
| 1.1.1 Aspectos generales | 25 |
| 1.1.2 La microbiota en el recién nacido..... | 27 |
| 1.1.2.1 Microbiota adquirida desde la madre. Aspectos condicionantes..... | 27 |
| 1.1.2.2 Adquisición de bacterias en Unidades Neonatales..... | 32 |
| 1.1.2.3 Las enterobacterias como parte de la microbiota intestinal del recién nacido | 33 |
| 1.2 Las enterobacterias como causa de sepsis neonatal..... | 33 |
| 1.2.1 Sepsis neonatal: concepto y criterios | 33 |
| 1.2.2 Clasificación y factores de riesgo | 35 |
| 1.2.3 Etiología..... | 37 |
| 1.2.4 Epidemiología..... | 40 |
| 1.2.5 Prevención..... | 40 |
| 1.3 La resistencia a los antimicrobianos | 41 |
| 1.3.1 Los betalactámicos..... | 43 |
| 1.3.2 Mecanismos de resistencia a betalactámicos | 45 |
| 1.3.3 Betalactamasas | 45 |
| 1.3.4 Clasificaciones de las betalactamasas:..... | 46 |
| 1.3.4.1 Betalactamasas de espectro extendido..... | 49 |
| 1.3.4.1.1 Características..... | 49 |
| 1.3.4.1.2 Clasificación | 49 |
| 1.3.4.1.3 Emergencia y diseminación de enzimas de la familia CTX-M | 49 |
| 1.3.4.1.4 Epidemiología de las enterobacterias productoras de BLEE | 50 |

| | |
|--|-----------|
| 1.3.4.1.5 Métodos de detección de enterobacterias productoras de BLEE | 56 |
| 1.3.4.2 Cefamicinasas | 57 |
| 1.3.4.3 Carbapenemasas..... | 58 |
| 1.3.4.3.1 Clasificación | 59 |
| 1.3.4.3.2 Epidemiología actual y el caso de España..... | 62 |
| 1.3.4.3.3 Detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas | 64 |
| 1.4 Colonización e infección por enterobacterias multirresistentes en el embarazo; transmisión vertical y en las unidades neonatales..... | 65 |
| 1.4.1 Embarazo | 65 |
| 1.4.2 Transmisión intraparto | 68 |
| 1.4.3 Transmisión de enterobacterias productoras de BLEE y carbapenemasas en unidades de neonatos. | 69 |
| 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE TRABAJO | 77 |
| Hipótesis..... | 77 |
| Objetivos | 77 |
| 3. MATERIAL Y MÉTODOS | 83 |
| 3.1 Diseño del estudio..... | 83 |
| 3.2 Lugar y periodo del estudio..... | 83 |
| 3.3 Población del estudio..... | 83 |
| 3.4 Variables del estudio | 84 |
| 3.5 Fuentes de información. | 85 |
| 3.6 Procedimiento para la toma de muestras..... | 85 |
| 3.7 Definiciones | 85 |
| 3.8 Estudios microbiológicos | 89 |
| 3.8.1 Toma de muestras..... | 89 |
| 3.8.2 Procesamiento de las muestras..... | 89 |
| 3.8.3 Caracterización de los aislados | 90 |
| 3.8.4 Confirmación de producción de BLEE | 91 |
| 3.8.5 Análisis de filogrupos | 92 |
| 3.8.6 Caracterización de la BLEE..... | 92 |

| | |
|---|------------|
| 3.8.7 Secuenciación de los genes que codifican BLEE..... | 94 |
| 3.8.8 | 97 |
| Secuenciación de los genes que codifican BLEE | 97 |
| 3.9 Aspectos éticos..... | 99 |
| 3.10 Análisis estadístico | 99 |
| 3.10.1 Tamaño muestral..... | 99 |
| 3.10.2 Cálculo de la prevalencia de colonización por enterobacterias productoras de BLEE. | 100 |
| 3.10.3 Análisis de los factores de riesgo | 100 |
| 4. RESULTADOS | 105 |
| 4.1 Prevalencia de colonización en el tercer trimestre del embarazo y duración de la colonización hasta el parto..... | 105 |
| 4.2 Prevalencia de colonización en el parto..... | 105 |
| 4.3 Características microbiológicas de los aislados de enterobacterias productoras de BLEE colonizantes de madres en el parto..... | 106 |
| 4.4 Descripción del brote de colonización por <i>K. pneumoniae</i> productor de BLEE en el periparto..... | 107 |
| 4.5 Características de las madres estudiadas en el parto..... | 108 |
| 4.4 Factores de riesgo colonización por enterobacterias productoras de BLEE en madres en el momento del parto..... | 115 |
| 4.7 Prevalencia de colonización en neonatos..... | 122 |
| 4.8 Características microbiológicas de las enterobacterias productoras de BLEE aisladas de neonatos en relación con las de sus madres..... | 123 |
| 4.9 Transmisión vertical..... | 124 |
| 4.10 Factores de riesgo para la colonización periparto por enterobacterias productoras de BLEE en neonatos..... | 125 |
| 4.11 Factores de riesgo de neonato colonizado en madres colonizadas con parto vaginal..... | 131 |
| 4.12 Enterobacterias productoras de carbapenemasas: | 135 |
| 5. DISCUSIÓN | 141 |
| 5.1 Prevalencia de colonización en embarazadas y en la población general | 141 |

| | |
|---|------------|
| 5.2 Brote nosocomial. | 147 |
| 5.3 Factores de riesgo para la colonización en el parto | 147 |
| 5.4 Prevalencia de colonización en neonatos. Transmisión vertical..... | 151 |
| 5.5 Factores de riesgo para la colonización en neonato, global y en mujeres con parto vaginal..... | 154 |
| 5.5 Limitaciones y fortalezas del presente trabajo..... | 155 |
| 6. CONCLUSIONES | 161 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA..... | 167 |
| 8. ANEXOS..... | 199 |
| 9. ABREVIATURAS | 219 |

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS:

| | |
|---|-----|
| Tabla 1: Etiología de la sepsis vertical en España | 38 |
| Tabla 2: Etiología de la sepsis nosocomial en España | 38 |
| Tabla 3: Clasificación de los antibióticos betalactámicos | 44 |
| Tabla 4: Clasificación y propiedades de las betalactamasas según Bush, Jacoby y Medeiros | 47 |
| Tabla 5: Familias de enzimas de tipo AmpC..... | 57 |
| Tabla 6: Carbapenemasas comúnmente detectadas en Enterobacteriaceae..... | 59 |
| Tabla 7: Métodos de detección enzimática de EPC | 65 |
| Tabla 8: Características de las fases de cada ciclo de PCR para cada tipo de familia de BLEE tras desnaturalización previa de 95°C durante 3'..... | 93 |
| Tabla 9: Tipos de BLEE..... | 106 |
| Tabla 10: Tipos de BLEE en función de los filogrupos de <i>E. coli</i> | 107 |
| Tabla 11: Principales características sociodemográficas de las madres estudiadas | 108 |
| Tabla 12: Factores obstétricos anteparto en 811 madres estudiadas..... | 109 |
| Tabla 13: Variables relacionadas con el parto en las 811 mujeres estudiadas | 112 |
| Tabla 14: Vía y tipo de finalización del parto | 113 |
| Tabla 15: Comparación para los distintos factores de riesgo entre las madres colonizadas por enterobacterias productoras de BLEE y las no colonizadas | 113 |
| Tabla 16: Análisis univariante del riesgo de colonización materna por enterobacterias productoras de BLEE en función de la exposición a factores sociodemográficos..... | 116 |
| Tabla 17: Análisis univariante del riesgo para la colonización materna por enterobacterias productoras de BLEE para factores obstétricos anteparto | 117 |
| Tabla 18: Análisis univariante del riesgo para la colonización materna por enterobacterias productoras de BLEE para factores obstétricos intraparto. | 120 |
| Tabla 19: Análisis multivariante de los factores de riesgo para la colonización por enterobacterias productoras de BLEE en el momento del parto..... | 121 |
| Tabla 20: Características básicas de los 800 recién nacidos estudiados..... | 123 |

| | |
|---|-----|
| Tabla 21: Análisis univariante de la asociación entre las características de los neonatos y la colonización por enterobacterias productoras de BLEE..... | 125 |
| Tabla 22: Análisis univariante de la asociación entre los factores demográficos de la madre y la colonización neonatal por enterobacterias productoras de BLEE..... | 126 |
| Tabla 23: Análisis univariante del riesgo para la colonización neonatal por enterobacterias productoras de BLEE para factores obstétricos anteparto | 127 |
| Tabla 24: Análisis univariante del riesgo para la colonización neonatal por enterobacterias productoras de BLEE para factores obstétricos intraparto | 129 |
| Tabla 25: Análisis univariante del riesgo para la colonización neonatal por enterobacterias productoras de BLEE para factores sociodemográficos maternos en partos vaginales..... | 131 |
| Tabla 26: Análisis univariante del riesgo para la colonización neonatal por enterobacterias productoras de BLEE para factores obstétricos anteparto en partos vaginales..... | 132 |
| Tabla 27: Análisis univariante del riesgo para la colonización neonatal por enterobacterias productoras de BLEE para factores obstétricos intraparto en partos vaginales..... | 134 |
| Tabla 28: Riesgo de transmisibilidad según el grupo de la BLEE..... | 135 |
| Tabla 29: Comparativa entre los principales estudios sobre prevalencia de BLEE en embarazadas..... | 146 |

FIGURAS:

| | |
|--|-----|
| Figura 1: Curva COR del modelo multivariante del estado de portador materno..... | 122 |
|--|-----|

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Microbiota

1.1.1 Aspectos generales

Se denomina microbiota al conjunto de microorganismos residentes en un nicho ecológico determinado, en este caso el ser humano (1). Podemos dividirla en dos categorías:

- Residente: compuesta por microorganismos que formarán parte de la microbiota del individuo durante la mayor parte de su vida, normalmente en relación de simbiosis y con escasas fluctuaciones.

- Transitoria: compuesta por microorganismos cuya presencia fluctuará continuamente, influida por factores externos tales como cambios en la alimentación, uso de antibióticos, edad, cambios de hábitat o estación del año, etc. Al desaparecer el factor externo suele ser desplazada por la flora residente.

La microbiota del tracto gastrointestinal humano está compuesta por una población dinámica de entre 500 y 1000 especies microbianas diferentes, que se mantienen en equilibrio a pesar de las variaciones entre individuos y en el tiempo en un mismo individuo, debidas a la edad, el estado de salud, la dieta y a factores genéticos. Se estima que el microbioma o genoma colectivo de la microbiota de cada individuo supone al menos unas cien veces el genoma humano y que aproximadamente el 75% de este microbioma está dominado por los *phyla Actinobacterium, Firmicutes y Bacteroidetes*, mientras que el restante 25% quedaría aún por filiar (2). Las técnicas modernas de detección molecular y secuenciación masiva nos han ayudado a acercarnos aún más al conocimiento de la microbiota y microbioma neonatal, descubriendo la presencia de un gran número de microorganismos no cultivables y acercándonos a su relación con nuestro organismo.

Si aceptamos las teorías clásicas, en el feto la luz intestinal sería estéril y con una baja concentración de oxígeno. En el recién nacido (RN) se produce la

colonización en las primeras 24-72 horas por parte de anaerobios facultativos como enterobacterias, coliformes, lactobacilos (*Bifidobacterium longum*, *B. infantis* y *B. breve* serían los más comunes) (2) y estreptococos de la microbiota fecal y vaginal materna que agotarán el poco oxígeno existente generando unas condiciones que favorecen el crecimiento de anaerobios a partir del segundo o tercer día de vida, tales como bacteroides, bifidobacterias, clostridios y eubacterias, teniendo los perfiles microbiológicos fecales del lactante una gran similitud con los perfiles del canal del parto y de la leche materna. Cuando se comienzan a introducir otros alimentos y se empieza a realizar el destete, la complejidad y diversidad de la microbiota aumenta, siendo estos cambios más acusados en los infantes alimentados con leche materna frente a los alimentados con leche maternizada y culminando este proceso entre los 12 meses y los tres años de vida (algunos autores hablan de la finalización completa a los 8 años), alcanzando un cierto grado de estabilidad, característica de la microbiota del adulto (1).

La importancia de la microbiota humana se viene estudiando desde hace años en tanto que juega un papel fundamental en la salud y la fisiología del hospedador, el ser humano en este caso. El mantenimiento de un equilibrio entre los diferentes grupos de microorganismos que la componen se ha demostrado crucial para el mantenimiento de un estatus de salud y cuando se ve alterado puede tender a la enfermedad (3). Esta importancia se refleja en el desarrollo del “Human Microbiome Project” desarrollado por el National Institutes of Health de Estados Unidos, que estudia mediante secuenciación genómica y metagenómica el cómo los cambios en la microbiota se correlacionan con la enfermedad en el humano (4).

Algunos estudios sugieren que la exposición a diferentes microorganismos durante el embarazo pueden alterar los perfiles inmunológicos y metabólicos de la gestación y favorecer el desarrollo de patologías a lo largo de la vida (1,2,5). La disbiosis es un término que hace referencia a una situación de alteración de la microbiota normal del individuo tanto en tamaño como en composición que podría favorecer la aparición de enfermedades. De hecho, determinadas alteraciones en la microbiota o determinadas composiciones de la misma se han relacionado con patologías diversas como la enfermedad inflamatoria intestinal, el colon irritable, la atopía, la obesidad, la diabetes, diversos tipos de enfermedades digestivas, entre

otras. Muchas de estas teorías se encuentran en fase de hipótesis y no se sabe a ciencia cierta si son causa o consecuencia de cada patología (1,2,5-14).

La microbiota no deja de estar conformada como hemos visto por microorganismos en una relación de simbiosis pero esta puede cambiar si cambian ciertos factores, generalmente la localización del microorganismo. Así se definen a las infecciones endógenas como aquellas en las que el microorganismo que causa la infección se encuentra previamente colonizando al huésped. Son generalmente producidas por debilitamiento en el hospedador (fallo del sistema inmunitario), pero también por otras causas como traumatismos, cirugía, diabetes, cambios de pH, etc.

1.1.2 La microbiota en el recién nacido

1.1.2.1 Microbiota adquirida desde la madre. Aspectos condicionantes.

Revisaremos los factores fundamentales que influyen en la microbiota intestinal del recién nacido. Al referirnos a la microbiota del RN nos centraremos en la microbiota intestinal, por ser la que mayor importancia tiene para el objeto del estudio de esta tesis.

Microbiota placentaria. La microbiota materna es el factor más importante para determinar la microbiota neonatal o incluso fetal, si atendemos a los estudios recientes que ponen de manifiesto la existencia de bacterias en la cavidad uterina durante la gestación (15). Así, durante años se ha pensado que el feto se desarrolla en un ambiente estéril, donde la presencia de bacterias podría causar un gran daño para su desarrollo, tanto más cuanto más precoz fuera el curso de la gestación. Este daño, más que por virulencia de los microorganismos vendría mediado por la respuesta inflamatoria causada (16,17). No obstante, se tenía constancia de la presencia de bacterias en el líquido amniótico de gestaciones a término y sin complicaciones, sobre todo en el segundo trimestre, por parte de microorganismos presentes normalmente en la cavidad uterina, tales como *Mycoplasma hominis* y *Ureoplasma urealyticum*, pero como eventos en los que por motivos desconocidos, no habría ocurrido una corioamnionitis y el desencadenamiento de un parto prematuro (18). Del mismo modo se había descrito la detección de bacterias o ADN

bacteriano en el meconio de RN sanos así como la colonización placentaria intracelular en eventos con un mínimo riesgo de contaminación como lo son las cesáreas electivas con membranas íntegras, tanto en placentas de gestaciones a término como pretérmino, siendo más frecuente y con mayor número de microorganismos en éstas últimas (19–23).

Así pues se tenía constancia de la presencia de microorganismos en ausencia de infección tanto clínica como histológica durante el embarazo. Hoy en día se postula la existencia de una microbiota placentaria en toda regla formada por bacterias comensales placentarias que pertenecerían a los *phyla Firmicutes, Tenericutes, Proteobacteria, Bacteroidetes y Fusobacteria*, siendo particularmente frecuente el aislamiento de estreptococos, estafilococos y propionibacterias, y los estudios más recientes en este sentido intentan establecer una separación entre la presencia patológica de bacterias y la microbiota placentaria natural (24). A la hora de analizar cómo se formaba esta microbiota placentaria clásicamente se postulaba que sería a través de una vía ascendente desde el tracto genital inferior (17) y, más recientemente, vía hematogena a través de bacteriemias de bajo grado (25) o a través de la permanencia en el epitelio de la mujer no gestante hasta la implantación placentaria en un futuro embarazo (26). De entre todas la más probable parece ser la hematogena, si bien pudiera ser en forma de infecciones subclínicas o viajando a través del torrente sanguíneo vehiculizadas en células dendríticas (véase más adelante la vía enteromamaria). Algunos autores abogan por explicar este fenómeno dada la capacidad de algunas bacterias como *Fusobacterium nucleatum* de unirse al epitelio vascular y alterar su permeabilidad, por lo que favorecerían el paso de otras bacterias comensales como *Escherichia coli* (15). La existencia de esta vía y la evidencia de que la microbiota anteriormente descrita se asemeja mucho a la microbiota oral, explicaría en gran medida la relación entre gingivitis, corioamnionitis y parto prematuro, aunque este hecho también puede explicarse por otras hipótesis como la existencia de endotoxinas circulantes alcancen al feto a través de la placenta o que citoquinas inflamatorias desencadenen el aborto o parto prematuro.

Finalmente, también se ha descrito una microbiota del meconio como reflejo de la colonización intestinal que se establece antes del nacimiento. En niños sanos, las bacterias del meconio pertenecen principalmente al filo *Firmicutes* (14).

Por lo anteriormente expuesto, parece que la gestación no se desarrolla siempre en condiciones de esterilidad, al menos en lo que respecta a la placenta. Este posible contacto durante la vida fetal con productos bacterianos podría jugar un papel fundamental en el desarrollo de la respuesta inmune. Se ha demostrado que estas bacterias, cuyo número no es muy elevado y posiblemente por ello no provocan daño alguno, se encuentran en sangre de cordón umbilical, líquido amniótico y placenta de embarazos sin signos de infección por lo que si asumimos este fenómeno como natural sería asumible que el papel de la microbiota oral/intestinal materna en el desarrollo de la microbiota neonatal fuera más importante de lo que se pensaba hasta ahora.

Microbiota vaginal, intestinal y vía del parto. El ser humano nace a través del canal del parto, que está ampliamente colonizado aunque por una relativamente escasa cantidad de especies, sobre todo de *Lactobacillus*, que representa más del 50% de la flora, siendo las especies más habituales *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* y *L. jensenii* (27). En el momento del parto en el ambiente vaginal predominan *Lactobacillus* spp, *Prevotella* spp. y *Sneathia* spp. (28). Diversos estudios demuestran que el ambiente vaginal cambia con respecto a las mujeres no embarazadas, aumentando la frecuencia de anaerobios (29–33) y, progresivamente, de *Lactobacillus* spp (31,33).

Los niños nacidos por vía vaginal adquieren las bacterias del canal del parto materno y fecales. De hecho, la vía del parto parece tener un papel fundamental en el desarrollo posterior de la microbiota, como se ha visto en estudios comparativos de niños nacidos por vía vaginal y mediante cesárea. En EEUU la tasa de cesáreas supera el 30% de los nacimientos (34) y en nuestro país el 20% (35), por lo que es relevante conocer las diferencias ocasionadas en la microbiota por la vía del parto; en conjunto, el parto mediante cesárea conduce a una microbiota intestinal inicial más semejante a la de la piel, con predominio de *Staphylococcus* spp, *Propionibacterium* spp y *Corynebacterium* spp. y menos lactobacilos y

bifidobacterias (28,36,37). Este hecho pone de manifiesto de manera inequívoca la transmisión de microbiota del canal del parto durante el parto vaginal. Además, en el caso del parto por cesárea, la microbiota no es más parecida a la de la madre que a la de otros individuos, por lo que estos recién nacidos podrían obtener esta microbiota inicial también de otras personas con las que están en contacto así como del ambiente hospitalario. Estas diferencias entre microbiota de niños nacidos por vía vaginal frente a vía abdominal se mantendrán durante meses o incluso años (36,38,39); de hecho se ha relacionado el nacimiento por cesárea con mayor propensión a enfermedades atópicas, rinitis alérgica, celiaquía y asma, entre otras enfermedades (5,6,28,40,41).

Leche materna. En contra de lo que se pensaba clásicamente, ni la leche ni el calostro son fluidos estériles. El número de especies microbianas presentes en la leche es relativamente bajo, aunque los estudios de secuenciación masiva pueden estar poniendo en duda esta cuestión. Esto explicaría el reducido espectro de especies encontrados en los lactantes y el por qué el aumento de la complejidad en la microbiota del niño coincide con la introducción de los diferentes alimentos y el destete (42-44), cosa que no ocurre en los niños alimentados con fórmula, que exhiben diferencias significativas en la composición de su microbiota desde el inicio de la misma (36,45).

Por géneros destacan *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Weissella*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Propionibacterium* y *Bifidobacterium* (14); por especie, tanto en distribución como en concentración, el más común es *Staphylococcus epidermidis*. Se han llegado a aislar en leche materna especies Gramnegativas como *E. coli* (8) y en los últimos años también se han hallado bacterias anaerobias estrictas de los géneros *Faecalibacterium*, *Eubacterium*, *Roseburia*, *Bacteroides* o *Ruminococcus* (14). Se pensaba que estas bacterias existentes en la leche provenían de la boca del neonato, a su vez contaminada por la flora vaginal y fecal materna. Sin embargo, más recientemente se ha puesto de manifiesto la existencia de una vía de transmisión vertical desde la madre al niño de estas bacterias a través de la leche materna. Incluso algunos autores hipotetizan que el canal del parto no supondría la fuente principal de bacterias al RN, colocando a la leche materna en su lugar (43,46-51).

Así, estudios recientes abogan por la existencia de una vía entero-mamaria, a través de la cual los microorganismos comensales del tracto digestivo de la madre llegarían a la mama y de allí pasarían al niño. Células dendríticas y macrófagos atravesarían el epitelio intestinal captando estas bacterias del tracto gastrointestinal materno y posteriormente migrarían a la mama a través de la circulación sistémica (52,53). Se ha puesto de manifiesto un aumento de la traslocación bacteriana desde el intestino a los ganglios linfáticos mesentéricos, y de allí a la mama. Este proceso, que podría enriquecer la microbiota de la leche con bacterias intestinales maternas, se regularía por las hormonas lactogénicas y se produciría durante últimos meses de gestación y la lactancia (54). Así se ha demostrado la presencia de bacterias circulantes asociadas a células del sistema inmune tanto en la leche como en la sangre periférica, además de ADN bacteriano libre. Estas bacterias que siguen la vía entero-mamaria deben ser capaces de sobrevivir tanto en el torrente sanguíneo materno como en el tracto gastrointestinal del lactante (8,14). La presencia de bacterias en la leche podría ser una de las razones por las que se observan propiedades bactericidas en la leche humana que se pierden total o parcialmente con la pasteurización (8).

Además del aporte continuo de bacterias por parte de la leche, es conocido que aporta otra serie de nutrientes como oligosacáridos, grandes cantidades de IgA, lisozima y lactoferrina. La composición de la leche tiene una gran variabilidad interindividual determinados por el estilo de vida, alimentación y estatus inmune entre otros factores, y varía también en el tiempo en un mismo individuo (2,55).

Alimentación con fórmula. Como ya se ha adelantado, la microbiota en los infantes alimentados con fórmula es mucho más compleja y semejante a la del adulto, predominando los anaerobios del tipo *Bacteroides* y *Clostridium*, seguidos de estafilococos, estreptococos y enterobacterias, siendo la colonización por bifidobacterias menor en número y más tardía en el tiempo (56,57).

Estilo de vida y localización geográfica. Se ha demostrado que los hijos únicos tienden a tener una menor cantidad de bifidobacterias, enterobacterias (excepto *E. coli*) y clostridios al mes de vida (39), y menor *ratio* de bacterias aeróbicas facultativas al año de vida cuando se comparan con niños con hermanos (58). Al mismo tiempo los niños que habitan en zonas rurales tienden a tener una microbiota

menos compleja, dominada por clostridios y eubacterias. Por último, un estudio ha demostrado un “gradiente geográfico” en Europa debido seguramente a las diferencias en los hábitos alimenticios, entre el norte y el sur del continente encontrándose tasas más altas de bacteroides, eubacterias y lactobacilos en el sur y más bifidobacterias y clostridios, entre otras, en el norte (59).

Uso de antibióticos. El uso de antibióticos se realiza casi siempre sin tener en cuenta el posible daño que puede causar en la microbiota comensal. El uso de antibióticos, dependiendo del tipo y duración, disminuye el número bacterias anaeróbicas del grupo de los *Bacteroides*, así como de *E. coli* y bifidobacterias, permitiendo el crecimiento de clostridios y *Klebsiella* spp. (2,39).

Probióticos. Expuestos todos los anteriores factores se especula hoy en día con la posibilidad de monitorizar la microbiota materna para modificarla mediante el uso de probióticos para controlar la transferencia al neonato, con el fin de disminuir el riesgo de distintas enfermedades. Se han realizado estudios en este sentido, con distintos resultados, con respecto al espectro de enfermedades atópicas (60,61), la obesidad (62) y el parto pretérmino (63), así como para un correcto desarrollo cognitivo (64).

1.1.2.2 Adquisición de bacterias en Unidades Neonatales

La microbiota intestinal de los neonatos que ingresan en las Unidades Neonatales, casi siempre por prematuridad, durante largos periodos de tiempo y estando por tanto separados de sus madres, tienden a presentar grandes diferencias en la composición de su microbiota en comparación con los RN que no ingresan en estas unidades, teniendo el ambiente un papel fundamental en su desarrollo. Las Unidades de Cuidados Intensivos neonatales (UCIN) tienen su propio ecosistema formado por bacterias comensales y otras patógenas (7). Esta flora influye en el microbioma de los lactantes. Así por ejemplo algunos estudios revelan la aparición de microorganismos en la flora intestinal de los pacientes días después de aparecer en superficies de la unidad neonatal (65–69). Sin embargo, la manera en que el microbioma ambiental, el personal sanitario, el tipo de alimentación, el uso de materiales específicos y procedimientos invasivos (catéteres, intubación, etc.), y los

antibióticos afectan al desarrollo de microbioma del niño a través del tiempo no es bien conocida y requiere más estudios (7). En cualquier caso, se recomienda la aplicación de medidas de control de infecciones, el fomento del uso de la leche materna, y la disminución en el uso de antibióticos (7) para minimizar en lo posible la transferencia de bacterias desde estos entornos al recién nacido.

1.1.2.3 Las enterobacterias como parte de la microbiota intestinal del recién nacido

Actualmente, se postula la teoría de que la colonización del neonato por bacterias fecales y lácteas maternas contribuyen a madurar la respuesta inmunitaria, modulando desde el patrón TH2 (propio de la etapa intrauterina y que genera propensión a manifestaciones alérgicas) hacia el perfil TH1, más maduro, que se asocia con la manifestación de tolerancia. Al mismo tiempo mejorarían la cantidad de mucina y la barrera de la mucosa a este nivel, estimularían la síntesis de péptidos con actividad antimicrobiana por las células de Paneth y el desarrollo del tejido GALT (*gut-associated lymphoid tissue*) (5).

Las bacterias provenientes de la leche materna tienen una alta afinidad para adherirse al epitelio intestinal y una gran capacidad de producir sustancias antimicrobianas. Entre las enterobacterias destaca el papel de *E. coli*. En el caso específico de esta especie, se ha demostrado la existencia de cepas comensales con propiedades beneficiosas para nuestro organismo, que disminuyen el número y gravedad de infecciones infantiles, siendo incluso la base de alimentos prebióticos comercializados en Alemania (70).

1.2 Las enterobacterias como causa de sepsis neonatal

1.2.1 Sepsis neonatal: concepto y criterios

Según el concepto clásico, el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) es la consecuencia de una activación global de la respuesta inmunitaria, y la sepsis es el SRIS desencadenado por una infección, probada o sospechada, definida ésta como un proceso patológico inducido por un microorganismo (71). Para el

diagnóstico de SRIS se han exigido tradicionalmente al menos dos de los siguientes criterios:

- Temperatura $>38^{\circ}$ o $<36^{\circ}$
- Frecuencia cardiaca >90 latidos por minuto
- Frecuencia respiratoria: taquipnea (>20 respiraciones por minuto) o hiperventilación ($\text{PaCO}_2 < 32$ mm Hg)
- Recuento leucocitario: leucocitosis (>12.000 células/ mm^3), leucopenia (<4.000 células/ mm^3) o $>10\%$ de neutrófilos no segmentados en el recuento diferencial.

En el mismo consenso de 1.992 se definió como sepsis grave aquella que produjera la alteración funcional de al menos un órgano, aparecieran signos de hipoperfusión (oliguria, obnubilación o trastornos del estado mental, acidosis láctica), o hipotensión (presión arterial sistólica <90 mm Hg o con un descenso >40 mm Hg con respecto a las cifras iniciales del paciente). El shock séptico se definió como la persistencia de la hipotensión a pesar de una correcta reposición de volumen, junto con disfunción orgánica o signos de hipoperfusión, sin que exista otra causa plausible. En 2002 se añadieron más signos y síntomas por los que sospechar sepsis, sin modificar las definiciones anteriormente citadas, y se establecieron una serie de puntualizaciones para la población pediátrica, incluyendo neonatos (72).

Recientemente se ha propuesto una nueva definición de sepsis, en la que se exige que exista una respuesta alterada del huésped, manifestada habitualmente como fallo orgánico, de manera que sería similar a la definición previa de sepsis grave (73). Esta definición y sus descriptores no se han valorado en pacientes pediátricos.

La sepsis neonatal es aquella que se produce hasta los 28 días de vida (74). Para el establecimiento de los criterios diagnósticos hay que tener en cuenta la fisiología pediátrica. Los criterios diagnósticos de sepsis en la población que nos atañe se definen como signos y síntomas inflamatorios en presencia de infección asociado a hiper o hipotermia (temperatura rectal >38.5 o $<35^{\circ}\text{C}$), taquicardia

(puede faltar en pacientes hipotérmicos), y al menos uno de los siguientes indicadores de alteración funcional orgánica: hipoxemia, estatus mental alterado, incremento de los niveles de lactato sérico y pulso saltón o capricante. Para la sepsis grave, el fallo de órgano se puede diagnosticar mediante las definiciones desarrolladas por Wilkinson y cols., Proal y cols., y Doughty y cols. o las definiciones utilizadas para la puntuación de Pernod y PELOD (75).

En general, estas definiciones son poco sensibles (76). Por ello se ha propuesto considerar un mayor número de signos y síntomas que deben hacer sospechar sepsis en el recién nacido (77):

1. Signos respiratorios: (a) Taquipnea: >60 respiraciones por minuto durante >60 min que no responde a cuidados básicos. (b) Apneas de >20 segundos, repetidas y que precisen intervención activa. (c) Aumento de las necesidades de oxígeno o ventilación mecánica durante >60 min. (d) Dificultad respiratoria: quejido, aleteo, retracción subcostal-intercostal, etc.
2. Signos hemodinámicos: (a) Bradicardia, al menos 3 episodios de 20 s en 3 h y que precisen intervención activa. (b) Taquicardia. (c) Hipotensión arterial.
3. Signos neurológicos: (a) Irritabilidad: no justificada por dolor. (b) Hipotonía. (c) Letargia. (d) Convulsiones.
4. Signos digestivos: (a) Rechazo de tomas. (b) Mala tolerancia digestiva. (c) Diarrea. (d) Distensión abdominal. (e) Deposiciones sanguinolentas.
5. Signos cutáneos: (a) Ictericia. (b) Color pajizo, pálido-grisáceo. (c) Perfusión enlentecida. (d) Púrpura, petequias.
6. Signos metabólicos: (a) Hipo/Hiperglucemia. (b) Acidosis metabólica. (c) Inestabilidad térmica.

1.2.2 Clasificación y factores de riesgo

Clásicamente, la sepsis neonatal se ha clasificado en precoz (aparece antes de los siete días de vida) y tardía (más allá de la semana y hasta los 28 días). Actualmente, en los RN pre-término o ingresados en UCIN se tiende a considerar como precoz aquellas sepsis que aparecen antes de las 72 horas de vida (74); incluso

algunos autores usan el criterio de 72 horas también para pacientes a término (77). Algunos autores ampliar el intervalo de tiempo para la sepsis neonatal hasta los 90 o 120 días (78).

Estas consideraciones y la distinción según cuándo se desencadene el episodio tienen especial importancia en tanto que los microorganismos causantes suelen ser diferentes según el caso. Así, en las sepsis precoces suelen ser típicamente colonizadores habituales del tracto genitourinario femenino que ascienden al romperse las membranas, antes de iniciarse el parto, causando una infección intraamniótica o intraparto durante el descenso fetal a través del canal, por lo que hablaríamos de una transmisión vertical (74). Los microorganismos causantes de la sepsis neonatal tardía podrían ser adquiridos en algunos casos por transmisión vertical, pero también podrían ser patógenos adquiridos por transmisión horizontal, de origen tanto nosocomial como comunitario, aunque estos últimos son muy poco frecuentes.

Uno de los grupos más importantes de nuestro país en lo que a infecciones pediátricas se refiere aboga por abandonar el criterio temporal para clasificar la sepsis, para abrazar un modelo que tenga en cuenta la vía de transmisión y así clasificar la sepsis en sepsis de transmisión vertical, de transmisión nosocomial y de transmisión comunitaria, todo ello siguiendo criterios epidemiológicos y de tratamiento. El problema de esa clasificación radica en que no siempre es posible establecer esta diferenciación o aislar el microorganismo causante (79).

En este sentido, los factores de riesgo para la sepsis neonatal vertical descritos son: la presencia de microorganismos patógenos en el canal del parto (80), la prematuridad (< 37 semanas), la rotura prematura (< 37 semanas) o prolongada de membranas (> 18 h), la corioamnionitis materna, la necesidad de reanimación avanzada, la infección urinaria materna en el tercer trimestre sin tratamiento o tratamiento incompleto de la misma y el cultivo vagino-rectal positivo, sobre todo para *Streptococcus agalactiae*. Un meta-análisis encontró un riesgo 6,6 veces mayor de sepsis en RN de mujeres con infección probada o con signos clínicos de infección, 9,4 veces mayor en recién nacido de gestantes colonizadas por *S. agalactiae* (cultivos positivos, urinario, vaginal o vagino-rectal, sin signos ni síntomas de infección) y 2,3 veces mayor en gestantes sin infección o colonización pero con otros factores de

riesgo(80). El caso concreto de la corioamnionitis es especial en tanto que su etiología varía ligeramente. Normalmente esta inflamación de las membranas y el corion se produce en presencia de rotura prematura de membranas por vía ascendente, aunque también es posible con membranas íntegras (*Mycoplasma genitalium*: *Ureaplasma*, *M.hominis*) o por vía hematógica (*Listeria monocytogenes*). Son factores de riesgo además de algunos de los anteriormente citados como la rotura prematura de membranas, el parto prolongado o la presencia de *S. agalactiae* en el cultivo vagino-rectal (77).

En el caso de los pacientes ingresados en UCIN o Unidades Neonatales, los factores de riesgo de sepsis neonatal nosocomial descritos son (79): El lavado y la desinfección insuficientes de las manos del personal sanitario, la falta de personal sanitario suficiente, la sobreutilización de antibióticos, el uso de catéteres intravasculares, tubos endotraqueales, válvulas de derivación ventriculoperitoneal, sondajes o nutrición parenteral y lípidos, el uso de antibióticos de amplio espectro, la cirugía, los corticoides, la hospitalización prolongada o la presencia de otros neonatos colonizados por bacterias específicas.

En el caso específico de los pretérmino y con muy bajo peso al nacimiento (<1500g) la inmadurez inmunológica, la mayor tasa de procedimientos invasivos, el mayor tiempo de ingreso (y por tanto de oportunidades) y la mayor tasa de población bacteriana patógena sobre la saprófita en las unidades y UCIN explican la mayor tasa de sepsis encontrada en esta población (79).

1.2.3 Etiología

Las tablas 1 y 2 recogen los datos más recientes en población española sobre los agentes etiológicos de la sepsis neonatal (77). En la sepsis de transmisión vertical la etiología más frecuente es bacteriana, siendo los virus y hongos los causantes de menos del 1% de las mismas (79).

Tabla 1: Etiología de la sepsis vertical en España (77)

| Transmisión vertical | 2002(%) | 2009 (%) |
|---------------------------------|----------------|-----------------|
| GRAM POSITIVOS | 63,5 | 59,6 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | 37 | 33,3 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 9,9 | 3 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 3,3 | 7,1 |
| GRAM NEGATIVOS | 34,6 | 30,7 |
| <i>Escherichia coli</i> | 26,1 | 25,7 |
| <i>Klebsiella spp.</i> | 3,3 | 2 |

Tabla 2: Etiología de la sepsis nosocomial en España (77)

| Etiología de la sepsis nosocomial | 2002(%) | 2009(%) |
|--|----------------|----------------|
| GRAM POSITIVOS | 59,2 | 65,5 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 44,2 | 48,1 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 7,8 | 6,6 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 4,2 | 4,4 |
| GRAM NEGATIVOS | 28,6 | 28,1 |
| <i>Escherichia coli</i> | 7,9 | 4 |
| <i>Klebsiella spp.</i> | 7 | 11,3 |
| <i>Pseudomonasspp.</i> | 4,9 | 2,2 |
| <i>Enterobacterspp.</i> | 3,8 | 4,5 |
| HONGOS | 12,2 | 6,4 |
| <i>Candida spp</i> | 11,6 | 6,1 |

En los recién nacidos pre-término y aquéllos con muy bajo peso al nacer (<1500g) predominan sin embargo las infecciones debidas a *E. coli* y otros coliformes Gram negativos (74). Esto es importante ya que *E. coli* se asocia normalmente a sepsis grave y meningitis, con una tasa de mortalidad entre el 25 y el 33% entre estos pacientes; la tasa de mortalidad es inversamente proporcional al peso y edad gestacional, hasta llegar a suponer la primera causa de muerte asociada en estos subgrupos, lo que lo convierte en un problema importante (74,81).

Cuando la sepsis se produce en el contexto de una corioamnionitis, la etiología es ligeramente diferente, siendo la mayoría de las veces polimicrobiana (65%) y siendo los microorganismos más frecuentes *M. genitalium*, *U. urealyticum* y *M. hominis*. También podemos encontrar: anaerobios (*Gardenerella vaginalis*, *Bacteroides*), *S. agalactiae* y bacilos gramnegativos (77). Cuando la corioamnionitis aparece en ausencia de rotura prematura de membranas lo más probable es que la infección sea causada por un *Ureaplasma*. Desencadenaría lo que se ha venido a llamar FIRS (*fetal inflammatory response syndrome*), en analogía al SRIS.

De entre los microorganismos causantes de sepsis nosocomial la prevalencia de Gram-positivos es más elevada; asimismo, la mortalidad es mucho más elevada, hasta tres veces mayor, en neonatos con muy bajo peso al nacer (81).

Si estratificamos por peso, los RN de más de 1500 g serían más frecuentemente afectados por *E. coli* y *Enterobacter* spp. y los recién nacidos de menos de 1.500 g por *Candida* spp. (79). Si exceptuamos *E. coli*, los bacilos Gram negativos no han jugado un papel demasiado importante en las sepsis de transmisión vertical pero sí en las nosocomiales, y su importancia en los últimos años aumenta por las resistencias bacterianas. Entre las enterobacterias, *Enterobacter* spp, *Klebsiella* spp. y *Serratia* spp. son causas importantes de sepsis (74).

En cualquier caso, las bacterias Gram negativas se consideran ahora un grupo etiológico emergente tras la puesta en marcha de la profilaxis antibiótica intraparto frente al *S. agalactiae*, lo cual es importante dada la mayor gravedad y riesgo de muerte en sepsis causadas por este grupo (81). En este sentido, *E. coli* es particularmente importante (82,83) especialmente porque un alto porcentaje de

cepas de *E. coli* son resistentes a ampicilina o amoxicilina, fármacos usado en el tratamiento de la colonización por *S. agalactiae* (84).

Entre las cepas de *E. coli*, cuya estructura antigénica es bastante compleja, se han identificado varios factores de virulencia asociados a los episodios de sepsis neonatal, siendo el antígeno capsular K1 el mejor descrito, está muy vinculado a la meningitis neonatal. Otros factores de virulencia vinculados a sepsis neonatal incluyen un grupo de proteínas (adhesinas) que ayudan en la unión de la superficie y la invasión de endotelio cerebral (85,86).

1.2.4 Epidemiología

Se estima que las infecciones neonatales invasivas causan aproximadamente el 36 % de las aproximadamente 4 millones muertes neonatales anuales en todo el mundo (81). El grupo de referencia en España para el estudio de la sepsis neonatal situaba en 2002 la incidencia en 2,5‰ recién nacidos vivos y la de sepsis nosocomial en 2,9% de los ingresos en unidades neonatales, siendo de 15,6% en RN de menos de 1.500 g. En sus últimos datos publicados en 2009 se redujo drásticamente la incidencia de transmisión vertical hasta el 0,99‰ (relacionado con la profilaxis para el EGB) aunque subía la de sepsis nosocomial a 23,7% en menores de 1.500 g (77).

En cuanto a la sepsis nosocomial, la principal dificultad para estimar su incidencia se deriva de los diferentes criterios de inclusión utilizados en las series publicadas, ya que muchas hacen referencia a poblaciones sesgadas bien por peso, por ingreso en UCIN y sobre todo por el criterio cronológico, excluyendo sepsis nosocomiales de inicio precoz (<3-7 días según el caso) o incluyendo sepsis verticales de comienzo tardío, además de no incluir sepsis de RN ingresados que sobrepasaban los 28 días al inicio de la sintomatología pero estaban ingresados desde antes de esa fecha (79).

1.2.5 Prevención

Teniendo en cuenta las altas de morbimortalidad asociadas a la sepsis neonatal es necesario desarrollar estrategias preventivas, más aún cuando se

evalúan las consecuencias a largo plazo; así, los supervivientes a un episodio de sepsis neonatal tienden a tener problemas en el desarrollo neurológico (87-89).

Respecto a la sepsis vertical, los esfuerzos se centran hoy en día en la búsqueda de test rápidos de detección de *S. agalactiae*, así como de una vacuna efectiva contra el mismo para entornos con menos recursos o donde la profilaxis intraparto no sea posible (74).

En cuanto a la sepsis nosocomial, supone la principal causa de muerte evitable en el recién nacido; las medidas de prevención incluyen (79) la higiene adecuada de las manos antes y después del contacto con el paciente y los equipos de diagnóstico y tratamiento; la disminución del uso de antibióticos si la indicación no es clara, para lo que deben realizarse protocolos para tal efecto, con el fin de evitar el aumento de resistencias en la flora de la propia unidad neonatal; el seguimiento adecuado de los protocolos de limpieza y esterilización del material; la existencia de una plantilla de sanitarios y unas estructuras suficientes; la restricción de la nutrición parenteral a los mínimos días posibles, favoreciendo siempre que sea posible la alimentación enteral precoz; la realización de todos los procedimientos con las medidas adecuadas de asepsia; y la concienciación del equipo de trabajo mediante la realización de sesiones periódicas intermodales para tal efecto que traten el problema de las infecciones nosocomiales en general y las acaecidas en cada centro en particular, analizando posibles fallos y mejoras (79).

Debido al alto uso de recursos que suponen las infecciones nosocomiales se están estudiando nuevas estrategias para reducirlas. Por ejemplo, se está evaluando la utilidad de anticuerpos dirigidos frente a alguno de los patógenos más frecuentes, la lactoferrina bovina y los probióticos (90,91), entre otras.

1.3 La resistencia a los antimicrobianos

La resistencia a los antimicrobianos es a día de hoy uno de los mayores problemas de salud pública en todo el mundo según han concluido la mayoría de los organismos más importantes en la materia. Las infecciones producidas por microorganismos resistentes son cada vez más frecuentes y algunos de los patógenos que las producen son ahora resistentes a múltiples tipos o clases de

antibióticos. Existen en la actualidad bacterias panresistentes, es decir, resistentes a todos los antimicrobianos disponibles. El rápido incremento de la resistencia antimicrobiana se ha visto agravado por una rápida diseminación.(92,93).

Los factores más influyentes en la aparición de resistencias serían el uso inadecuado de antibióticos para el tratamiento de enfermedades infecciosas en la especie humana, el uso de antibióticos en veterinaria, agricultura y acuicultura, y la transmisión de las bacterias resistentes o los genes de resistencia entre personas, entre diferentes especies animales o entre el ambiente y los seres vivos.

Sólo en E.E.U.U. se estiman en, al menos, dos millones anuales las infecciones producidas por bacterias resistentes, que causan unas 23.000 muertes al año (92). En Europa, las estimaciones realizadas por el ECDC indican que el exceso de mortalidad debido a las infecciones nosocomiales bacterianas resistentes supera las 25.000 muertes anuales y que los costos de atención de salud atribuibles y la pérdida de productividad se estiman al menos en mil quinientos millones de euros cada año (94). La mayoría de los datos que manejamos suelen ser de países desarrollados pero el problema es aún mayor en países del tercer mundo o en vías de desarrollo, donde el control del uso de antibióticos es muy limitado.

En el momento actual, el principal problema en el mundo de la resistencia antimicrobiana es el causado por las bacterias Gram negativas, y especialmente frente al grupo de antibióticos betalactámicos, el más relevante en el uso clínico. En las últimas décadas han ido apareciendo y diseminándose distintos mecanismos de resistencia frente a betalactámicos en estas bacterias, como son las beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE), las beta-lactamasas tipo AmpC y las carbapenemasas. También han aparecido mecanismos relacionados con resistencia a quinolonas de configuración cromosómica o plasmídica o las enzimas inactivadoras de aminoglucósidos. La consecuencia es que la incidencia de infecciones causadas por bacterias multirresistentes ha aumentado en todo el mundo y a veces nos encontramos con bacterias panresistentes frente a las que no existen prácticamente opciones terapéuticas.

1.3.1 Los betalactámicos

Los betalactámicos son antibióticos cuyo mecanismo de acción radica en impedir la formación de la pared celular bacteriana. Son, estructuralmente, análogos al aminoácido terminal de la subunidad peptídica D-alanil-D-alanina precursora de la formación del peptidoglicano que conforma la pared celular bacteriana. En el paso final para la formación de los peptidoglicanos (transpeptidación) juegan un papel fundamental las proteínas de unión a las penicilinas, conocidas como PBP por su nombre en inglés (*penicilin binding proteins*). La semejanza que existe entre la D-alanil-D-alanina y los betalactámicos favorece su unión al sitio activo de las PBP en lugar del citado aminoácido de manera irreversible, lo que se traduce en la paralización de la transpeptidación, evitando la formación de la capa de peptidoglicanos y por tanto la síntesis de la pared celular. Todos los antibióticos betalactámicos, naturales o semisintéticos, derivan de la penicilina y en las últimas décadas han supuesto el principal tratamiento antimicrobiano frente a las enterobacterias.

Existen cuatro grandes grupos dentro de esta familia: penicilinas, cefalosporinas, monobactamas y carbapenemas (tabla 3). Además, se dispone de inhibidores de betalactamasas, que pueden ser o no beta-lactámicos, y actúan inhibiendo las betalactamasas, como el ácido clavulánico, el tazobactam, el sulbactam y, más recientemente, avibactam.

Tabla 3: Clasificación de los antibióticos betalactámicos

| Grupo betalactámico | Subgrupo betalactámico | Antibióticos |
|----------------------------|--|--|
| Penicilinas | | |
| Naturales | | Bencilpenicilina (penicilina G) Fenoximetilpenicilina (penicilina M) |
| Semisintéticas | Resistentes a penicilinasas | Meticilina, nafcilina, cloxacilina, dicloxacilina, oxacilina |
| | Aminopenicilinas | Ampicilina, amoxicilina, becampicilina, pivamcilina |
| | Carboxipenicilinas | Carbenicilina, ticarcilina |
| | Ureidopenicilinas | Azlocilina, mezlocilina, piperacilina |
| | Combinación penicilina + inhibidor de betalactamasas | Ampicilina-sulbactam, ticarcilina-clavulánico, amoxicilina-clavulánico, piperacilina-tazobactam |
| Carbapenemas | | Imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem, faropenem, panipenem |
| Monobactamas | | Aztreonam |
| Cefalosporinas | Primera generación | Cefalotina, cefapirina, cefradina, cefazolina, cefalexina, cefaloridina, cefadroxilo, cefroxadina |
| | Segunda generación | Cefaclor, cefamandol, cefonicida, ceforanida, cefuroxima, cefprozil, loracarbef, cefmetazol, cefminox, cefotetan, cefoxitina |
| | Tercera generación (Oximinobetalactámicos) | Cefnidir, ceftiroden, cefixima, cefoperazona, cefotaxima, cefpodoxima, ceftazidima, ceftibuteno, ceftioxizima, ceftriaxona |
| | Cuarta generación | Cefepima, cefpiroma, cefelidina, cefaclidina |
| | Quinta generación | Ceftobiprole, certarolina |

1.3.2 Mecanismos de resistencia a betalactámicos

La resistencia bacteriana a los antimicrobianos puede ser natural o adquirida. La primera es intrínseca a una familia, especie o grupo bacteriano y, por tanto, inmutable. La segunda se produce como consecuencia de mutaciones cromosómicas o mediante la adquisición de genes de resistencia a través de plásmidos, transposones e integrones, a veces incluso entre diferentes especies. En el caso concreto de los betalactámicos los mecanismos de resistencia descritos son los siguientes:

- Alteraciones en la permeabilidad de la membrana externa. Este fenómeno ocurre normalmente por mutaciones en los genes que codifican las proteínas que conforman los canales en la membrana o porinas.
- Alteraciones en las bombas de expulsión.
- Alteraciones en la diana del antimicrobiano: las PBP pueden sufrir pérdidas de afinidad por los betalactámicos al sufrir cambios en su estructura terciaria.
- Inactivación del antimicrobiano mediante enzimas producidas por la propia bacteria como es el caso de las betalactamasas, que trataremos más en profundidad por tratarse, sin duda, del mecanismo de resistencia más relevante en enterobacterias.

1.3.3 Betalactamasas

Las betalactamasas son enzimas que hidrolizan los betalactámicos. En las bacterias Gram negativas se localizan entre la pared celular y la membrana externa (espacio periplásmico), y en Gram positivos son liberadas al medio extracelular. Pueden estar codificadas en el cromosoma bacteriano o en plásmidos y su síntesis puede ser constitutiva o inducible. Los genes que codifican estas enzimas se denominan genes *bla*. El nivel de resistencia que confieren depende directamente del grado de afinidad con el sustrato (en este caso el antibiótico), las propiedades hidrolíticas del enzima y del nivel de concentración de éste, que a su vez puede verse condicionado por el número de copias del gen *bla* existente en los plásmidos.

Las betalactamasas constituyen el principal mecanismo de resistencia a

betaláctámicos en las bacterias Gram negativas. Parecen haber evolucionado desde las PBP pues se ha visto que comparten ciertas similitudes secuenciales. Su mecanismo de acción consta de varios pasos: (1º) Unión no covalente de la enzima y el anillo betalactámico. (2º) Rotura del anillo penicilánico por parte del grupo hidroxilo libre del anillo de serina. Se forma en este paso un enlace acil covalente. (3º) Hidrólisis de este enlace con la liberación del antibiótico inactivo y el enzima activo. (4º) Las metalobetalactamasas actúan mediante la unión de una molécula de agua y un catión divalente (Zn^{2+}); en estas enzimas, no se forma un enlace acil covalente intermedio (95).

1.3.4 Clasificaciones de las betalactamasas:

Existen dos clasificaciones para las betalactamasas. La primera de ellas es la clasificación molecular de Ambler (96), que estipula cuatro tipos según sus secuencias aminoacídicas. Los grupos A, C y D serían aquéllas que poseen un residuo de serina en su centro activo (serina-betalactamasas) y el grupo B un residuo de zinc (metalobetalactamasas). El otro esquema es el de Bush, Jacoby y Medeiros (tabla 4), que las divide en cuatro grupos funcionales, según las características estructurales, bioquímicas y nucleotídicas de estas enzimas (97,98)

Tabla 4: Clasificación y propiedades de las betalactamasas según Bush, Jacoby y Medeiros

| Grupo Bush Jacoby y Medeiros | Clase Ambler | Centro activo | Tipo de enzima | Sustrato preferido | Inhibidas por | | Enzimas representativas |
|------------------------------------|-----------------|------------------|--|--|---------------|------|--|
| | | | | | CLAV | EDTA | |
| 1 | C | Serina | Cefalosporinas de espectro ampliado | Penicilinas, cefalosporinas de espectro reducido y extendido, cefamicinas y monobactamas | - | - | CMY-2 a 13, LAT-1, MOX-1 y 2, FOX-1 a 6, ACT-1, MIR-1, DHA-1 y 2, ACC-1, CFE-1, algunas enzimas cromosómicas de bacterias Gram negativas |
| 2 a | A | Serina | Penicilinas | Penicilinas | + | - | Penicilinas de bacterias Gram positivas |
| 2 b | A | Serina | Betalactamasas de espectro ampliado | Penicilinas y cefalosporinas de 1ª generación | + | - | TEM-1, TEM-2, SHV-1 |
| 2 be | A | Serina | Betalactamasas de espectro extendido | Penicilinas, Cefalosporinas 1ª-3ª generación Monobactamas | + | - | Numerosas variantes de SHV y TEM, CTX-M, PER, VEB, GES-1, IBC-1 |
| 2 br | A | Serina | Betalactamasas de espectro extendido resistentes a los inhibidores | Penicilinas, Cefalosporinas de 1ª, 2ª y 3ª generación (bajo nivel) | - | - | TEM-50 (CMT-1) TEM-68 (CMT-2) TEM-89 (CMT-3) |
| 2 c | A | Serina | Penicilina y Carbenicilina | Penicilinas, Carbenicilina | + | - | PSE-1, PSE-3 a 5 |

| | | | | | | | |
|-----|-----|--------|--------------------------------------|--|-----|---|---|
| 2 d | D | Serina | Penicilinas de espectro reducido | Penicilinas y Cloxacilina | +/- | - | Numerosas variantes OXA |
| | | Serina | Betalactamasas de espectro extendido | Penicilinas, Cloxacilina, Betalactámicos de espectro extendido, a veces monobactamas o cefalosporinas de 3ª generación | +/- | - | Algunas derivadas de OXA-2 y OXA-10, OXA-18, 29, 30, 31, 32 y 45 |
| | | Serina | Carbapenemasas | Penicilinas, Oxacilina y Carbapenemas | + | - | OXA-23 a 27, 40, 48, 54 |
| 2 e | A | Serina | Penicilinas y Cefalosporinas | Penicilinas y Cefalosporinas de 1ª-3ª generación | + | - | Betalactamasa cromosómica de <i>B. fragilis</i> , <i>B. uniformis</i> , <i>B. vulgatus</i> , <i>C. diversus</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Y. enterocolitica</i> , <i>C. Koseri</i> y <i>C. sediaki</i> |
| 2 f | A | Serina | Carbapenemasa | Penicilinas, Cefalosporinas de 1ª-4ª generación, Carbapenemas | + | - | NMC-A, SME-1 a 3, IMI-1, KPC-1 a 3, GES-2 |
| 3 | B | Zinc | Carbapenemasa | Penicilinas, Cefalosporinas de 1ª-4ª generación, Carbapenemas | - | + | IMP-1 a 13, VIM-1 a 7, SPM-1, algunas bacterias cromosómicas de bacterias Gram negativas (AmpC) |
| 4 | NI* | Serina | Penicilinas | Penicilinas | - | - | Enzima cromosómica de <i>Burkholderia cepacia</i> |

NI: no incluido

CLA: ácido clavulánico

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

Betalactamasas de espectro extendido (BLEE)

1.3.4.1 Betalactamasas de espectro extendido

1.3.4.1.1 Características

Las BLEE se caracterizan por hidrolizar las penicilinas, las oximinocefalosporinas (como cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima y cefepima) y aztreonam, pero no las cefamicinas (como la cefoxitina) y por ser inhibidas por los inhibidores de betalactamasas. Son habitualmente enzimas de codificación plasmídica y se encuentran principalmente en enterobacterias. Es frecuente que las BLEE se asocien a otros mecanismos de resistencia que afectan a otros grupos de antimicrobianos como quinolonas, cotrimoxazol o aminoglucósidos, por lo que las bacterias productoras de BLEE son habitualmente multirresistentes.

1.3.4.1.2 Clasificación

Existen tres familias principales de BLEE: TEM, SHV y CTXM. Las familias TEM y SHV provienen de mutaciones de las betalactamasas de espectro ampliado TEM-1 y SHV-1, y suelen ser más activas frente a ceftazidima que frente a cefotaxima, Fueron las BLEE predominantes en los ochenta y noventa del siglo pasado (sobre todo en cepas nosocomiales de *K. pneumoniae*). Las enzimas de la familia CTX-M derivan de cefalosporinasas cromosómicas de *Kluyvera* spp. y suelen ser más activas frente a cefotaxima que frente a ceftazidima, con algunas excepciones. Actualmente son las BLEE más prevalentes. Además existen otras familias menos frecuentes de BLEE como PER, VEB, BES, GES, TLA, SFO, BEL y algunas enzimas del grupo OXA(99). Los distintos tipos de BLEE se encuentran recogidas en la página web www.lahey.org/Studies.

1.3.4.1.3 Emergencia y diseminación de enzimas de la familia CTX-M

Como se ha explicado anteriormente, las enzimas de la familia CTX-M se han diseminado extraordinariamente por todo el mundo desde finales de los años 90 del siglo pasado, siendo actualmente el tipo de BLEE más frecuente. De hecho se consideran como endémicas en muchas áreas del mundo. La prevalencia en determinados países asiáticos llega a ser de más del 30% en *E. coli* (100).

El análisis filogenético indica que los genes *bla*_{CTX-M} provienen de la inclusión en elementos transferibles de genes *bla* cromosómicos de *Kluyvera* spp (101), bacteria saprofita o patógeno oportunista ambiental y ocasionalmente presente en la microbiota intestinal (102,103). Las enzimas CTX-M pueden subclasificarse a su vez en cinco grupos filogenéticos: los grupos CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25, a los que hoy en día se han sumado otros dos nuevos, CTX-M-74 y CTX-M-75 (104,105). Sumando las enzimas de todos los grupos, en la actualidad se han identificado más de 150 variantes. En concreto las enzimas CTX-M más ampliamente distribuidos a nivel mundial son CTX-M-15 (perteneciente al grupo de CTXM-1) y CTX-M-14 (perteneciente al grupo de CTX-M-9), aunque existen importantes diferencias geográficas (106–109).

La rápida expansión de las enzimas CTX-M se ha producido tanto a nivel nosocomial como en la comunidad, asociada tanto a la diseminación de plásmidos y elementos genéticos móviles específicos como a determinados clones, denominados clones exitosos o de alto riesgo. En España, la enzima más frecuente ha sido CTX-M-14, perteneciente al grupo de CTX-M-9. En los últimos años está aumentando la prevalencia de CTX-M-15, que es de forma global la más frecuente en todo el mundo. La diseminación de esta enzima se ha asociado al complejo clonal ST131 de *E. coli* (110,111), que se ha diseminado por todo el mundo en las últimas décadas; pero además, CTX-M-15 está asociada a una secuencia de inserción muy efectiva tanto en términos de expresión como de movilización, *ISEcp1*, que se supone como uno de los mecanismos del éxito de la dispersión de la enzima(112). Las cepas del clon ST 131 poseen los factores de virulencia típicos de las cepas de *E. coli* patógenas extraintestinales, al pertenecer al filogrupo tipo B2. Las razones de su éxito epidemiológico no han sido dilucidadas por completo, aunque pueden tener relación en parte con la resistencia a quinolonas que es frecuente en estas cepas (111,113–115).

1.3.4.1.4 Epidemiología de las enterobacterias productoras de BLEE

Diseminación y transmisión de BLEE en la comunidad. Desde finales de los años 90 se comenzó a apreciar la aparición y diseminación de BLEE en la comunidad. Si bien previamente las BLEE predominantes eran de las familias TEM y SHV, y se

describían sobre todo en cepas de *K. pneumoniae* causantes de brotes nosocomiales, en esos años se comenzó a apreciar la emergencia de cepas de *E. coli* productoras de enzimas de la familia CTX-M no ya solo en los hospitales, sino también en la comunidad, fenómeno de gran importancia epidemiológica y clínica (116,117). Las bases moleculares de esta diseminación son diversos. Por un lado, estaría la diseminación entre distintas cepas de elementos genéticos móviles; esto fue probablemente lo que predominó en España en la primera década del siglo XXI, con la diseminación policlonal principalmente de CTX-M-14. Pero por otro lado, la diseminación de determinadas BLEE a través de clones exitosos, el más importante de ellos *E. coli* ST131, se ha asociado con la emergencia y preponderancia mundial de CTX-M-15. En España, la diseminación de cepas de ST131 con CTX-M-15 ha sido algo más tardía que en otros países aunque en los últimos años ha sido relevante (118).

Se han realizado múltiples estudios para investigar los factores de riesgo asociados al desarrollo de infecciones comunitarias por cepas de *E. coli* productoras de BLEE. Uno de los primeros fue realizado por el equipo del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla (119). Otros estudios posteriores, incluyendo infecciones urinarias o bacteriemias, han confirmado y ampliado sus resultados (99,120–122). En resumen, los factores de riesgo más relevantes son la edad, la diabetes mellitus, la existencia de relación reciente con los cuidados sanitarios, el tener infecciones urinarias de repetición, la sonda urinaria y el uso reciente de quinolonas y cefalosporinas.

Al ser *E. coli* y otras enterobacterias parte de la flora intestinal normal, desde el principio pareció obvio que la colonización intestinal por cepas productoras de BLEE debía jugar un papel clave en la epidemiología de las mismas. Los primeros trabajos publicados sobre portadores fecales de *E. coli* productor de BLEE en la comunidad datan de principios de siglo en nuestro país (123) y de Polonia (124). En un artículo publicado por nuestro grupo en 2008 se encontró una prevalencia de colonización intestinal en pacientes con infección del tracto urinario (ITU) por estas cepas del 67,9%, confirmando el carácter endógeno de las infecciones. Además, la prevalencia de portadores fue mayor entre convivientes de estos pacientes (26,4%) que en familiares no convivientes (15,5%) y pacientes no relacionados (7%), lo que

indicaba la importancia de una fuente común o la transmisión de persona a persona dentro de las familias (125). En este mismo artículo se identificó el hecho de comer la comida principal fuera de casa más de quince veces al mes como factor protector frente al estado de portador en los familiares de pacientes con ITU por *E. coli* BLEE, sugiriendo la comida casera como posible fuente de transmisión o reservorio. También se encontró que el hecho de que los pacientes índice tuvieran un catéter urinario y fueran varones se relacionaba con aumento de probabilidad de estado de portador en parientes, de nuevo apuntando a la transmisión de persona a persona. Es reseñable que el haber usado antibióticos recientemente, hecho que siempre aparece como factor de riesgo para las infecciones comunitarias, no lo era para ser portador, lo que parece reforzar la idea de que los antimicrobianos producen la selección de cepas productoras de BLEE en personas previamente colonizados (125). Este dato se ha repetido en varios estudios (26). Sin embargo, un meta-análisis reciente, que incluye principalmente estudios en los que no se analiza la transmisión intrafamiliar, concluye que la exposición reciente a antimicrobianos y el viaje a zonas endémicas son factores de riesgo para la adquisición de cepas de enterobacterias productoras de BLEE (126). En otros estudios de portadores dentro de una misma familia se identificó el que al menos una persona de la misma hubiera vivido fuera de la ciudad y la menor superficie de la vivienda como factores asociados a la colonización (127).

En el meta-análisis antes citado, realizado sobre la base de 28.909 individuos incluidos en 66 estudios, la prevalencia de colonización fecal por enterobacterias productoras de BLEE a nivel mundial fue del 14% (IC 95%: 9-20). Estratificando los resultados por las regiones definidas por la OMS, la prevalencia fue del 46% en el Pacífico occidental, del 22% en el sudeste asiático, del 22% en África, del 15% en el Mediterráneo oriental, del 4% en Europa y del 2% en las Américas (126). Es importante resaltar que, de manera global, se apreció un crecimiento anual del 5,38% en la frecuencia de colonización en una década. Según la estimación de la OMS del año 2010, más de mil millones de personas serían portadores de BLEE en el sudeste asiático, 280 millones en el Pacífico Occidental, 180 millones en el Mediterráneo Oriental y 110 en África. En América y Europa la cifra baja considerablemente, hasta los 48 y 35 millones respectivamente (128).

Todos estos datos sugieren que la falta de acceso al agua potable, la pobreza, y una alta densidad de población son promotores para una difusión más eficiente de BLEE, como cualquier caso de enfermedad de transmisión fecal-oral. De hecho el papel del agua como reservorio se ha estudiado no solo en aguas residuales (129,130) sino también en ríos (131,132), ecosistemas acuáticos (133), agua de pozo (134) y otros sistemas relacionados con el agua, incluso en playas (135) y en el agua de la Antártida (136).

Un aspecto de importancia capital en la diseminación de las BLEE es la transmisión a través de los alimentos. Las condiciones de explotación, transporte, sacrificio de los animales destinados a la producción cárnica, y la manipulación de los productos favorece la contaminación de las carnes con bacterias intestinales, sobre todo en la carne de pollo y pavo. Esto, junto con el uso de antimicrobianos para fines no terapéuticos en los animales de granja, favorece la diseminación de resistencias y en los animales y su transmisión a la cadena alimentaria (108,137–139). Además, la contaminación cruzada de frutas y verduras pueden ocurrir cuando son irrigadas con aguas residuales. En este sentido, nuestro grupo y el de la Universidad de Pittsburgh identificaron, en Sevilla y Pittsburgh, la presencia en la carne de pollo cruda de las betalactamasas más frecuentes en los pacientes de cada zona (140). Estudios posteriores han confirmado la importancia de la contaminación alimentaria en la diseminación de determinados tipos de BLEE (141–143).

También hay que destacar que las mascotas también forman parte de la cadena de transmisión en la comunidad, tanto como animales portadores como infectados, lo que también se ha demostrado con el análisis genético de cepas aisladas en este tipo de animales y en humanos. Se sugiere con estos hallazgos una vía bidireccional entre mascotas y humanos, aunque hay variantes genéticas de BLEE sólo halladas en animales de compañía (128,144–148). Así se especula con el papel de reservorio y de factor de riesgo para sus dueños.

Casi desde el principio del estudio de la pandemia de BLEE se ha postulado la posibilidad de que los viajes internacionales favorecieran la difusión de la misma. Tomando como referencia de origen el continente europeo, se ha puesto de manifiesto tras observar como la tasa de portadores aumentaba entre los viajeros a

zonas como el sudeste asiático, Oriente medio, India, África y Norte América (149–153). El estado de portador en los viajeros dura en general unas pocas semanas excepto si existe diarrea del viajero o se ven expuestos a antibióticos en el extranjero (154,155); también es más prolongada en los niños africanos adoptados en Europa (156); como referencia, la duración de la colonización es mayor en general en pacientes que se colonizan desde un ambiente hospitalario (157).

Al hilo de este tema, un estudio Birgy y cols. (158) han realizado un estudio en Francia en niños de 6 a 24 meses donde analizan el estado de portador de *E. coli* productor de BLEE clasificando según lo fueran del clon ST131 o de cualquier otro durante el quinquenio 2010-2015. Encontraron una prevalencia total de colonización del 7.6%, aumentando desde un 4.8% en el primer año a un 10.2% en el último. El clon ST131 se encontró en el 25,8%, aumentando desde el 5,0% al 37%. Encontraron diferencias para los factores de riesgo del estado de portador según el tipo de clon. Así el clon ST 131 se asoció con la hospitalización previa, y el resto, que englobaba un grupo de alta heterogeneidad genética, con el tratamiento con antibióticos, antecedentes de viaje reciente o la no asistencia a la guardería. La no asistencia a guarderías también fue un factor de riesgo en un estudio llevado a cabo en nuestro país recientemente, que encontró una alarmante tasa del 24% de portadores en niños sanos (159).

En el estudio de Birgy y cols. (158), el 90% de los aislados eran productores de una enzima del grupo CTX-M, siendo CTX-M-1, CTX-M-15, CTX-M-14 y CTX-M-27 las más prevalentes con un 32.5, 21.3%, 19.4% y un 13.8% respectivamente. Llama la atención la disminución en este estudio de CTX-M-1 del 40.9% al 18.8% y el ascenso de CTX-M-27 del 4.5% al 25% del primer al último periodo de estudio.

Diseminación de BLEE en hospitales. En la epidemiología de las BLEE en los hospitales tiene mucha importancia la transmisión cruzada o a partir de reservorios ambientales de cepas de *Klebsiella* spp portadoras de estas enzimas. *Klebsiella* spp productora de BLEE, a diferencia de *E. coli*, tiene un comportamiento epidémico y produce frecuentemente brotes nosocomiales. En un meta-análisis realizado por Hendrik y cols. sobre el tema se identificaron varios factores de riesgo para la presencia, bien en forma de infección o de colonización, de *K. pneumoniae* productor de BLEE, siendo los principales la exposición previa a algún antibiótico, en particular

a cefalosporinas y quinolonas, mayor duración de la estancia hospitalaria, uso de dispositivos médicos (ventilación invasiva, catéteres, etc.), además de las características propias del paciente y la existencia de patología concomitante (160).

En el caso de la epidemiología de *E. coli* productor de BLEE nosocomial, la situación es más compleja dado que los pacientes pueden ingresar ya colonizados. Esto hace difícil discernir, en caso de infección nosocomial, cuando se trata de cepas adquiridas en el hospital y cuando de cepas que ya traía el paciente al ingreso. De hecho, distintos estudios han mostrado una menor transmisibilidad de cepas de *E. coli* BLEE en comparación con las de *Klebsiella*, lo que determina que rara vez produzca brotes nosocomiales de relevancia (161). Sin embargo, la transmisión de plásmidos desde cepas de *E. coli* "comunitarias" que entran en el hospital con los pacientes, a clones de *Klebsiella* nosocomiales es un fenómeno que ha sido poco estudiado.

En cuanto al control de la transmisión en los hospitales, se recomienda el cribado de pacientes colonizados en situaciones de brote o transmisión activa; además, puede considerarse el cribado en unidades de alto riesgo como UCI incluso en situaciones no epidémicas, o de pacientes trasladados desde centros con endemia de BLEE. La formación del personal, refuerzo de la higiene de manos y del uso adecuado de antibióticos son medidas básicas recomendadas en cualquier caso. Ante pacientes colonizados o infectados se recomienda la implantación de precauciones de contacto (aunque el nivel de evidencia es mayor en caso de brote). En el caso de *E. coli*, dada su alta prevalencia y menor transmisibilidad, la toma de estas medidas es más discutible, salvo en situaciones de brote. Finalmente, la búsqueda de reservorios ambientales, especialmente aquellos ocultos y fuera del circuito de limpieza normal (sifón de lavabos, lavabos, etc) es esencial siempre que no se controle la transmisión a pesar de la puesta en marcha de las medidas anteriores (162).

1.3.4.1.5 Métodos de detección de enterobacterias productoras de BLEE

Recientemente ha sido publicado un documento de consenso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) que incluye recomendaciones para la detección de BLEE en el laboratorio (163). Sigue sin haber consenso a la hora de evaluar el mejor indicador y puntos de corte para el cribado de BLEE tanto en muestras de vigilancia epidemiológica como clínicas. Así cefpodoxima tiene una alta sensibilidad, mayor que cefotaxima, ceftazidima y ceftriaxona, pero se sigue recomendando el uso de ceftazidima junto con cefotaxima, siguiendo las guías del European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) y del Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI) debido a su mayor especificidad.

Para el cribado en muestras de vigilancia epidemiológica se recomienda el uso de medios de cultivo selectivos cromogénicos, que facilita el reconocimiento de aislados productores de BLEE. Su mayor limitación es la falta de especificidad, al poder ser positivos para cepas hiperproductoras de AmpC, *K. oxytoca* hiperproductora de K1/OXY y *E. coli* productora de OXA-30. Alternativamente se pueden utilizar el Agar-MacConckey con ceftazidima o cefotaxima, que presenta una buena sensibilidad. La confirmación fenotípica de los aislados productores de BLEE se realiza mediante la inhibición de la actividad de la betalactamasa sobre cefalosporinas por el ácido clavulánico, con el método de doble disco o el método combinado de doble disco. La técnica tiene ciertas limitaciones debido a la existencia de otros mecanismos que pueden simular una BLEE (como la hiperproducción de SHV-1 o K1, o algunas carbapenemasas) o enmascararla (disminución o pérdida de las porinas de membrana o producción simultánea de AmpC). En el documento de consenso se recomienda como mejor opción el uso del método combinado de doble disco con cefotaxima, ceftazidima y cefepima y, en el caso de sospechar la producción simultánea de AmpC, utilizando un medio de agar enriquecido con cloxacilina o el uso de discos que contienen ácido 3-fenilborónico.

Para la detección rápida de enterobacterias BLEE (menos de veinticuatro horas) pueden utilizarse métodos moleculares (incluyendo Multiplex PCR, reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real [RT-PCR], *microarrays* de ADN y

pirosecuenciación). Además, recientemente se han desarrollado métodos proteómicos como el MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) cuya aplicación a la detección de BLEE y otros mecanismos de resistencia está en desarrollo.

1.3.4.2 Cefamicinasas

Aunque en nuestro trabajo se estudiaron cepas productoras de AmpC, no constituye el objetivo principal del mismo por lo que se revisarán de manera sucinta. Las betalactamasas tipo AmpC pertenecen al grupo 1 de la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros (97) y la clase C de la clasificación estructural de Ambler (96). Esas enzimas pueden hidrolizar un amplio espectro de antimicrobianos incluyendo las penicilinas, las cefamicinas (que son estables frente a las BLEE), las cefalosporinas de tercera generación y aztreonam. No hidrolizan ni cefalosporinas de cuarta generación ni las carbapenemas, y se caracterizan por no ser habitualmente inhibidas por los inhibidores de betalactamasas exceptuando la asociación de piperacilina con tazobactam. Los genes que codifican estas enzimas, denominados *bla*_{AmpC} se encuentran en el cromosoma de algunas bacterias Gram negativas, en algunas de las cuales la expresión de AmpC es baja pero inducible en respuesta a la exposición a betalactámicos. Adicionalmente, las enzimas AmpC se han integrado en elementos genéticos móviles, lo que ha permitido su diseminación. Actualmente se conocen 6 familias de enzimas AmpC (tabla 5).

Tabla 5: Familias de enzimas de tipo AmpC

| Familia AmpC | Derivadas de |
|---------------------|---|
| CIT: CMY y LAT | <i>Citrobacter freundii</i> |
| DHA | <i>Morganella morganii</i> |
| ACC | <i>Hafnia alvei</i> |
| FOX | <i>Aeromonas media</i> |
| MOX | <i>Aeromonas caviae</i> |
| EBC: ACT y MIR | <i>Enterobacter cloacae</i> y/o <i>absuriae</i> |

Las AmpC plasmídicas se han descrito a nivel mundial pero parece que son menos prevalentes que las BLEE (164) y, en *E. coli*, parecen ser causa de resistencia

a cefoxitina en menor número de ocasiones que la hiperproducción de AmpC cromosómica. AmpC CMY-2 presenta la distribución más amplia (a nivel mundial, europeo y nacional) (164,165). En España la primera AmpC plasmídica fue descrita en el año 2000 (166). Los datos disponibles reflejan siempre una prevalencia menor del 1% y se ha constatado una gran variabilidad genética entre los aislados de *E. coli* productores de CMY-2 (165).

Deben sospecharse en presencia de resistencia a cefalosporinas, siendo buenos marcadores la resistencia a cefoxitinay/o sensibilidad disminuida a amoxicilina/clavulánico y/o resistencia a una o varias cefalosporinas de tercera generación (165). La detección puede realizarse mediante métodos fenotípicos (165,167–176) y moleculares. En el caso de *Klebsiella* spp., *Salmonella enterica*, *Citrobacter koseri* y *Proteus mirabilissu* detección es por sí misma la confirmación de la existencia de una enzima plasmídica ya que no poseen AmpC cromosómico(165). En el caso de *E. coli* y *Shigella*, que expresan de manera constitutiva AmpC aunque a muy bajo nivel, serían válidos los test fenotípicos, aunque se ha encontrado una baja especificidad en el caso de algunas cepas concretas (177,178). Los test fenotípicos no pueden distinguir entre las familias de enzimas pAmpC y pueden pasar por alto AmpC cromosómicos con espectro extendido, por lo que el *gold standard* es la detección molecular por PCR. Este método tiene como inconveniente no poder detectar las pAmpC de las bacterias pertenecientes a los géneros que poseen AmpC cromosómica (*E. cloacae*, *M. morganii*, *H. alvei*, *C. freundii*, *A. caviae*) (179).

1.3.4.3 Carbapenemasas

Al igual que para las cefamicinasas, se revisan de forma somera.

La aparición de las carbapenemasas se describió inicialmente en *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* en el sudeste asiático y Grecia. Desde entonces su difusión a nivel mundial en patógenos frecuentes como *E. coli* y *K. pneumoniae* ha sido un fenómeno causante de gran preocupación (180).

Los tipos de carbapenemasas mas importantes en enterobacterias en la actualidad se muestran en la tabla 6.

Tabla 6: Carbapenemasas comúnmente detectadas en Enterobacteriaceae (180)

| Carbapenemasa | Clase molecular | Espectro de hidrólisis | Especies | Epicentros geográficos |
|---------------|-----------------|-------------------------------|---------------------------------------|---|
| KPC | A | Cefalosporinas y carbapenemas | Sobre todo <i>K. pneumoniae</i> | EEUU, Grecia, Italia, Israel, China |
| VIM | B | Cefalosporinas y carbapenemas | Sobre todo <i>K. pneumoniae</i> | Grecia |
| NMD | B | Cefalosporinas y carbapenemas | <i>K. pneumoniae</i> y <i>E. coli</i> | Subcontinente indio, Balcanes, Oriente Medio |
| OXA-48 | D | Carbapenemas | <i>K. pneumoniae</i> y <i>E. coli</i> | Norte de África, Oriente Medio, algunos países de Europa occidental |

Las carbapenemas (imipenem, meropenem, biapenem, ertapenem, y doripenem) poseen el más amplio espectro de los betalactámicos y se utilizan principalmente para tratar las infecciones por bacterias Gram-negativas aerobias. La actividad hidrolítica de estas enzimas sobre las carbapenemas es variable, lo que hace que su detección fenotípica sea a veces difícil. Es frecuente la asociación de las carbapenemasas con otro tipo de betalactamasas (BLEE, AmpC plásmidica, etc) en el mismo aislado, lo que confiere un alto grado de resistencia antimicrobiana.

1.3.4.3.1 Clasificación

De igual manera que el resto de betalactamasas, y según la molécula presente en su sitio activo, las carbapenemasas pueden dividirse en metalocarbapenemasas (clase B, zinc dependientes) o serinocarbapenemasas (zinc-independientes, clases A, C, y D) (96).

Carbapenemasas clase A

Incluyen a KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), IMI (imipenem-hydrolyzing β -lactamase), SME (*Serratia marcescens* enzyme), SFC (*Serratia fonticola* carbapenemase), las familias NMC-A (no-metallo-carbapenemasa de clase A), y algunas enzimas tipo GES (Guiana extended-spectrum β -lactamase). Se han

descrito predominantemente en aislados de *Enterobacteriaceae* y de especies tales como *P.aeruginosa*. Estas enzimas son inhibidas por ácido clavulánico, a excepción de algunas enzimas de tipo KPC como KPC-2, e hidrolizan penicilinas o cefalosporinas más eficientemente que los carbapenémicos (95).

La familia KPC se ha identificado principalmente de *K. pneumoniae* y actualmente son las enzimas más clínicamente significativas entre las carbapenemasas clase A debido a que confiere altos niveles de resistencia a los carbapenémicos, así como la mayoría de los betalactámicos (181).

Las tasas de muerte atribuible y tasas crudas de fallecimiento por infecciones causadas por bacterias con enzimas KPC se han descrito como mayores comparadas con las producidas por otro tipo de carbapenemas sin que se haya encontrado causa a este hecho (182).

Carbapenemasas clase B

Aquí se incluyen las familias VIM (Verona integron-encoded metallo- β -lactamase), IMP (imipenem-resistant Pseudomonas), y SPM-1 (Sao Paulo metallo- β -lactamase). Se han detectado en cepas de *P. aeruginosa*, *A.baumannii*, y los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (183).

Como en el caso general de las metalobetalactamasas requieren de cinc u otro metal pesado para la catálisis enzimática. Prácticamente hidrolizan todos los antibióticos betalactámicos, incluyendo carbapenemas, excepto los monobactamas. No son inactivadas por los inhibidores, tales como clavulanato, sulbactam, tazobactam, o NXL-104, mientras que son inactivados por los quelantes de metales tales como EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) (184–186). Las familias más comunes de la clase B adquirida aisladas en enterobacterias incluyen los grupos VIM e IMP, junto con el emergente grupo NDM (New Delhi metallo-beta-lactamase) que se aisló por primera vez en a finales de 2009 detectándose más tarde en India, Pakistán, Reino Unido, EE.UU. y Canadá (95). Se especula que además de en el subcontinente indio, que sería el reservorio principal de especies productoras de este grupo de carbapenemasas, habría otros dos secundarios en la zona de los Balcanes y la zona del Golfo Pérsico (187,188). Como se ha comentado se han

descrito episodios e incluso brotes alrededor de todo el mundo, constatándose una diseminación mucho más rápida que la de KPC, afectando además a nivel comunitario y nosocomial (189).

NDM en comparación con las carbapenemasas descritas hasta ese momento presentaba una difusión fuera del ámbito hospitalario o de instituciones sanitarias y su diseminación ha sido más rápida aún que la de KPC (180,189). En comparación con NDM-1, NDM-4, NDM-5, y NDM-7 poseen mayor efecto hidrolítico frente a carbapenemas (190,191).

Carbapenemasas clase C

Se incluirían en este subgrupo ACT-1 (AmpC-tipo β -lactamase), DHA-1 (Darán Hospital in Saudí Arabia β -lactamase), CMY-2 (cephamycin-hydrolyzing β -lactamase), y CMY-10, que fueron identificadas en Enterobacteriaceae y son betalactamasas codificadas por plásmidos que exhiben actividad catalítica para imipenem. Recientemente ha sido descrita ADC-68 (Acinetobacter-derived cephalosporinase) a partir de *A. baumannii* D015 resistente a carbapenemasas. En particular, CMY-10 es la primera carbapenemasa de clase C plasmídica descrita (192). Respecto a enzimas codificadas por genes cromosómicos ha sido ADC-68 de *A.baumannii* D015 la primera en mostrar actividad frente a carbapenemas (193).

En comparación con las de clase A, las carbapenemas de clase C poseen un sitio activo más amplio lo que les permite la unión con las cefalosporinas de espectro extendido (95).

Carbapenemasas clase D

Se denominaron OXA (oxacilinasas), ya que hidrolizan la isoxazolilpenicilina oxacilina mucho más rápido que bencilpenicilina. Se identificaron en *Acinetobacter* spp. A día de hoy la familia OXA incluye más de 400 tipos (194) algunos de los cuales poseen actividad carbapenemasa. En base a su secuencia de aminoácidos, las carbapenemasas clase D se han reclasificado recientemente en 12 subgrupos (195).

OXA-48, la más eficiente carbapenemasa de tipo D respecto a imipenem, se identificó en *K. pneumoniae* en Turquía en 2003 (196) y han sido identificadas diez

variantes del gen *bla*_{OXA-48} (95). OXA-48 confiere resistencia a penicilinas y carbapenemas pero no a cefalosporinas. OXA-48 está contenido en un plásmido Incl auto-conjugado de 61,8 kb, lo que probablemente contribuye a su capacidad para propagarse en Enterobacteriaceae (197) pero casi todos los casos se han descrito en *K.pneumoniae*, siendo en estos casos también resistentes a cefalosporinas por la producción simultánea de alguna BLEE. Su prevalencia no está estimada con seguridad debido a la dificultad en su detección (189) pero parece que es la más frecuente en nuestro país (198). El subgrupo OXA-51 es el más grande entre los subgrupos de tipo OXA beta-lactamasas (95).

1.3.4.3.2 Epidemiología actual y el caso de España

Hoy en día podemos afirmar que los países fuera de los epicentros no se han visto afectados en la misma medida, aunque ha habido varios informes de transmisión transfronteriza relacionada con la estancia hospitalaria en los países endémicos en las primeras década de 2010. El primer país tras Estados Unidos si hablamos de *K. pneumoniae* productor de KPC en sufrir una diseminación nacional fue Israel(199). Actualmente, existe evidencia de diseminación regional e interregional de las CPE en varios países de Europa, con una situación endémica en algunos de estos países como por ejemplo Italia (200) y Grecia (201). *Klebsiella* spp. productoras de carbapenemasas también son endémicas en algunas partes de los EE.UU., mientras que han aparecido estudios que sugieren que la situación en muchos países como Brasil, Colombia(202), y China entre otros países asiáticos, es alarmante (203–207). Determinadas enzimas KPC han tenido una diseminación global en relación con el complejo clonal ST258 de *K. pneumoniae* y otros relacionados (ST512, ST11 y ST437) (208–212).

Hasta la fecha, no hay evidencia de que las carbapenemasas estén muy extendidas entre *E. coli* en Europa o en los EE.UU., pero ha habido un creciente número de informes de carbapenemasas OXA-48 en esta especie, y también evidencia para sugerir que la diseminación en *E. coli* ya ha sucedido en el Oriente Medio y la India (213).

Epidemiología de las carbapenemasas en España. En una revisión de reciente publicación por parte de investigadores de nuestra unidad se ha visto que la

prevalencia de colonización/infección en nuestro país es baja pero en clara tendencia a aumentar y se describen diferentes patrones según el tipo de carbapenemasa producida (214). Así, los casos con aparición de OXA-48 o derivados están en relación con la cepa *K. pneumoniae* ST405 y la adquisición en residencias, y los relacionados con metalobetalactamasas aparecían mayoritariamente asociadas a cepas de *Enterobacter* spp. y la adquisición en UCI y plantas hospitalarias de cirugía. Es reseñable al mismo tiempo que más de un tercio de los casos aparecieron en la comunidad pero en relación con cuidados sanitarios, mayormente en residencias de ancianos.

El estudio refleja la evolución del mapa de resistencias en España, donde son más frecuentes los casos de detección de OXA-48 que los de VIM y pone de manifiesto tasas de bacteriemia de un 10% y de sepsis severa y shock de un 15%, recalcando la importancia de establecer recomendaciones en los casos no complicados de infección por ECP, ya que las existentes se basan en estudios realizados en casos con bacteriemia o infecciones severas (214).

Un estudio posterior llevado a cabo por algunos de los investigadores anteriores también en territorio nacional pone de manifiesto aumento progresivo de la prevalencia de *E. coli* productores de carbapenemas, principalmente debido a la difusión de OXA-48 y de clones como el ST131.

Entre enero de 2012 y diciembre de 2014, se aislaron 239 *E. coli* no susceptibles a carbapenemas. De estos, 121 (50,6%) produjeron carbapenemasas. Durante el mismo período de tiempo, el mismo laboratorio de referencia identificó un total de 2.443 enterobacterias productoras de carbapenemas, de los cuales 121 (4,9%) eran *E. coli*.

La tendencia es claramente alcista en lo que respecta a *E. coli* productor de carbapenemas: 1,7% en 2012, el 5,2% en 2013 y un 5,4% en 2014.

De los 121 aislados, 87 (71,9%) produjeron OXA-48; 27 (22,3%) produjeron VIM-1, 4 (3,3%) produjeron KPC-2, 2 (1,7%) produjeron NDM (1 NDM-1 y 1 NDM-5) y 1 (0,8%) produjo IMP-22.

Treinta y siete de los 121 (30,6%) aislados de *E. coli* también produjeron BLEE. De éstos, 16 (43,3%) produjeron CTX-M-15 y 13 (35,1%) produjeron CTX-M-14, 6 (16,2%) (215).

1.3.4.3.3 Detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas

La detección de ECP por parte de un laboratorio de microbiología puede llegar a ser todo un desafío ya que se combinan varios problemas: la frecuente expresión concomitante de una BLEE y/o Amp cromosómico o plasmídico, la poca utilidad de los cortes de detección clínicos y las diferencias en los niveles de expresión, que hacen que puedan aparecer como sensibles en el antibiograma, lo que se traduce en que a pesar de aumentar siempre la CMI, pueden no ser suficientes para ser llamado de alta resistencia o resistencia intermedia (189,198). Por todo ello debe hacerse un estudio pormenorizado del antibiograma y, por orden, un estudio de sensibilidad a todos los betalactámicos, realizar un cribado con métodos fenotípicos y una vez confirmada la presencia mediante la demostración de actividad frente a carbapenemasas y su inactivación con enzimas específicos, la detección inequívoca del tipo de enzima mediante métodos moleculares (PCR o arrays de ADN) (198).

Según el European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), se establecen diferentes límites de corte en los estudios de cribado para cada carbapenema. Hay que tener en cuenta la susceptibilidad según el tipo de enzima y según el aislado portador de la misma (198,216).

Por otra parte el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) bajó los puntos de corte para la detección de carbapenemas en 2010 dado que se ha demostrado que muchas no eran identificadas con los antiguos puntos de corte (189).

Para el estudio de la hidrólisis de la enzima tenemos varios métodos: en primer lugar el estudio MALDI-TOF (proteómico), la espectrofotometría y el test de Hodge modificado (test biológico) que usa una cepa indicadora, sensible a la carbapenema (189,198). Además recientemente se ha desarrollado otro test

colorimétrico (Carba-NP test) bastante específico y más rápido para la detección de OXA-48 (217,218).

Con respecto a los métodos de inhibición enzimática por compuestos específicos:

Tabla 7: Métodos de detección enzimática de EPC

| Compuesto | Tipo de enzima |
|---|--|
| Ácido fenilborónico | Clase A (KPC u otras) |
| Ácido fenilborónico + Cloxacilina | AmpC |
| Ácido dipicolínico o con EDTA | Metalobetalactamasa (clase B, tipos VIM, IMP, NDM) |
| Ausencia de inhibición con cualquiera de los anteriores | Clase D (OXA-48 y derivados) |

1.4 Colonización e infección por enterobacterias multirresistentes en el embarazo; transmisión vertical y en las unidades neonatales

1.4.1 Embarazo

Que conozcamos, no hay muchos estudios sobre el estado de portador de enterobacterias productoras de BLEE en la mujer embarazada, lo que pone de manifiesto la necesidad de este trabajo.

Como se ha expuesto anteriormente *E. coli* es un habitante natural de la vagina llegando a estar presente hasta en el 20% de las embarazadas; puede transmitirse al neonato llegando a producir infecciones neonatales (219); de hecho, la presencia de colonización vaginal por *E. coli* se ha identificado como un factor de riesgo de complicaciones durante la gestación (220), aunque en nuestro país no se hace un cribado gestacional como el de la bacteriuria asintomática o el del *S. agalactiae*. Un estudio español comparó la virulencia de aislados de *E. coli* de muestras vaginales de mujeres embarazadas y no embarazadas, observando que los genes *hly*, *cnf*, *pap* e *iron* eran más frecuentes en aislados de mujeres embarazadas;

la conclusión fue que las cepas de las mujeres embarazadas parecen ser más virulentas que las de las no embarazadas, siendo por lo tanto más proclives al desarrollo de infecciones y aumentando de este modo la posibilidad de aparición de sepsis neonatal (219).

Si nos ceñimos exclusivamente a la colonización por enterobacterias productoras de BLEE en embarazadas, existen pocos estudios. El mayor publicado hasta la fecha se realizó en Noruega (221). Se encontró una prevalencia e colonización por *E. coli* BLEE del 2.9%. En el momento del parto se repitió la toma de muestra a las colonizadas, siendo sólo el 53.8% de ellas aún portadoras. Ninguna de las mujeres colonizadas sufrió infección por estas cepas. Esto sugiere que de llegar el caso de implementación de estrategias de cribado, éstas deberían llevarse a cabo en el momento del parto (222), circunscribiendo éstas a madres con amenaza de parto prematuro o partos inducidos por debajo del término debido a su riesgo sustancialmente mayor de desarrollar sepsis neonatal en comparación con los recién nacidos de más de 37 semanas de gestación. En dicho estudio, las mujeres de origen asiático o africano presentaron mayor riesgo de colonización.

Un estudio anterior realizado en Alemania (223) se centraba en estudiar factores de riesgo para la colonización por enterobacterias BLEE de madres y niños de muy bajo peso al nacer (<1500g). La prevalencia de colonización materna por fue del 11%, que según los autores puede deberse a que la población no es representativa de la población ya que las mujeres con posibles complicaciones en el parto como son la amenaza de parto prematuro en general y la sospecha de corioamnionitis en particular, son frecuentemente tratadas con antibióticos durante la gestación y/o parto y presentar ingresos de larga duración. Otro estudio argentino encontró una prevalencia de colonización por *E. coli* productoras de BLEE en muestras vaginales del 5.4% (224). En India, Pathak y cols. (225) estudiaron 710 mujeres de una población rural mediante muestras perianales. Determinaron presencia de *E. coli* multirresistente (cuando resistía a tres o más antibióticos de los testados) o *E. coli* BLEE propiamente dicho. Para el primer caso encontraron como factores de riesgo el haber cursado estudios superiores, el pertenecer a una familia de más de 10 personas, el uso de antibióticos en las últimas cuatro semanas y la hospitalización en las últimas cuatro semanas. Para la presencia de *E. coli* productor

de BLEE sólo los dos últimos factores fueron significativos. En el caso de aislados productores de BLEE casi siempre se debió a CTX-M-15. Un segundo estudio realizado en India es el de Devi y cols. (220) sobre 246 mujeres embarazadas a las que tomaron muestras exclusivamente vaginales. El 7% estaban colonizadas por cepas que producían BLEE.

Los anteriores estudios hacían referencia al estado de portador vaginal y/o rectal pero, durante el embarazo, debido a los numerosos cambios anatómicos y fisiológicos que se producen, se observa un aumento de la incidencia de bacteriuria asintomática en la mujer, hecho que se estudia por las posibles implicaciones que conlleva, como el parto prematuro. Así se observa una prevalencia de bacteriuria asintomática que afecta a un porcentaje entre el 2 y el 10 % de las mujeres gestantes, causando *E. coli* el 70-80% de ellas (225). Un estudio realizado en Colombia investigó la prevalencia y factores de riesgo para la infección urinaria en la comunidad y encontró una mayor frecuencia de enterobacterias productoras de BLEE en las mujeres embarazadas, aunque esta asociación no se mantuvo en el análisis multivariante (226). Las embarazadas con ITU a su vez tendrán más riesgo de pielonefritis y parto prematuro; se ha observado un dramático incremento del número de episodios provocados por enterobacterias productoras de BLEE (227).

Al-Mayahie y cols. realizaron un estudio en Irak (228) en el que ponía de manifiesto las diferencias entre aislados de *E. coli* productores de BLEE obtenidos mediante cultivos vaginales en mujeres gestantes y no gestantes que presentaban sintomatología infecciosa del tracto genital. La prevalencia en el grupo de embarazadas fue del 73.9% y en las no gestantes del 60.5%. En las gestantes, la familia de BLEE más común fue CTX-M (69,5%), siendo CTX-M-1 en todos los casos mientras que las no gestantes predominaron enzimas SHV y CTX-M (44,7% vs. 39,4, respectivamente). En general, los estudios muestran en gestantes una prevalencia relacionada con el nivel de endemia de los países donde viven.

1.4.2 Transmisión intraparto

La transmisión vertical, definiendo ésta como aquella que sucede de madres a hijos y que puede tener lugar antes (congénita), durante (perinatal) o después del parto (neonatal), de enterobacterias multirresistentes es un tema que empieza a cobrar importancia a finales de la primera década de este siglo cuando se demuestra la posibilidad de transmisión en varios casos en una maternidad (229). Nuestro grupo comunicó el primer caso de sepsis producida por una enterobacteria productora de BLEE transmitida de madre a hijo y no debida a un brote nosocomial en 2008 (230).

Sin embargo no existen muchos estudios que hayan puesto el foco de atención sobre este hecho. El mayor estudio hasta la fecha sobre madres portadoras de *E. coli* productor de BLEE en el momento del parto se publicó en 2013 por parte de Birgy y cols (231). En él se tomaron durante cinco años una media aproximada de 2500 muestras maternas vaginales intraparto y 2000 neonatales (oído externo o fluidos gástricos), realizadas estas menos de tres horas después del nacimiento, haciendo especial hincapié al caso específico del clon de *E. coli* ST131. Hallaron 68 aislados de *E. coli* productores de BLEE lo que suponía una prevalencia del 2.46% para el total de muestras recogidas. De estas, 28 fueron maternas y 36 neonatales. Encontraron un total de 68 aislados de *E. coli* productores de BLEE de los cuales un 44% fueron maternos y un 56% neonatales, ascendiendo cada año la tasa de *E. coli* BLEE detectados desde un 1.1% a un 4.1%. De estas muestras la mayoría (84.3%) fue positiva para CTX-M, predominando CTX-M-14 (mayoritariamente asociadas a cepas del filogrupo D), CTX-M-1 y CTX-M-15 (asociadas a cepas del filogrupo B2) respectivamente. La prevalencia del clon ST131 fue del 9.4%. Otro de los estudios centrados en la transmisión vertical de enterobacterias productoras de BLEE es el realizado por Rettedal y cols. citado en el epígrafe anterior realizado en Noruega. Como ya hemos visto se estudió la prevalencia de portadoras en semana 36 de gestación y a todas las madres positivas se las siguió hasta el parto. De las 26 madres portadoras de *E. coli* productor de BLEE al inicio del estudio solo se mantuvieron como tales en el momento del parto catorce, no obstante se cribaron a los 26 recién nacidos, estableciéndose transmisión en cinco parejas madre-hijo, al identificarse el mismo pulsotipo en ambos. La tasa de transmisión desde madres positiva en el parto

fue del 37.5%; todos los partos fueron vaginales, con una media de 7 horas de bolsa rota. Estos datos sugieren que el estado de portador de BLEE-E de la madre es un factor de riesgo sustancial para la colonización del neonato. De los cuatro a los que se siguió más allá del parto, tres de ellos seguían siendo positivos a los dos meses, de media, del nacimiento (221).

Finalmente, Denkel y cols. (223) llevado a cabo un estudio en dos UCIN separadas geográficamente pero pertenecientes a una misma institución, y sus respectivas maternidades, sobre una población compuesta por recién nacidos de “muy bajo peso al nacer” (<1500g) y sus madres, entre las que se identificaron 18 madres y 12 neonatos colonizados por enterobacterias productoras de BLEE. El cribado materno se realizaba al ingreso y en el día del parto, dentro de un protocolo a realizar en toda amenaza de parto pretérmino, y el neonatal a las 72 horas del parto y semanalmente hasta el alta de la UCIN. Se encontró transmisión madre-neonato en 3 casos (dos parejas madre-hijo y una madre con un embarazo múltiple de tres neonatos) demostrada por PCR. La colonización por parte de la madre supuso un riesgo seis veces mayor de colonización en el neonatos. Concluyeron que el estado de portador materno es un factor significativo para la colonización neonatal en recién nacidos de muy bajo peso al nacer.

1.4.3 Transmisión de enterobacterias productoras de BLEE y carbapenemasas en unidades de neonatos.

Los pacientes ingresados en estas unidades por prematuridad, por alto riesgo o por ambos motivos, pueden colonizarse por la flora contaminante de las mismas a través del contacto con los profesionales sanitarios y los procesos de cuidado (7). Algunos estudios han evaluado los factores de riesgo para la adquisición de colonización por enterobacterias productoras de BLEE en UCIN. Así, Abdel-Hady y cols. identificaron el bajo peso, la duración de la hospitalización, la nutrición parenteral, el uso de antimicrobianos previo y la ventilación mecánica como factores de riesgo para adquirir *K. pneumoniae* productor de BLEE en neonatos ingresados en UCIN y en unidades neonatales de riesgo intermedio (232). Cassetari y cols. por su parte identifican la lactancia materna como un factor protector frente a la

colonización por este mismo microorganismo durante los brotes dentro de las unidades (233).

Si bien es importante el reconocimiento de estos factores de riesgo no menos importancia recae sobre el hecho de identificar los reservorios de este tipo de bacterias; así, los estudios de Rettedal, Dubois y Denkel señalan que la presencia de madre portadores enterobacterias productoras de enterobacterias productoras de BLEE puede ser una forma de entrada y transmisión en las unidades de neonatos y plantas de maternidad de este tipo de bacterias (221,222,229). Tschudin-Sutter y cols. (234) demostraron esta hipótesis en 2010 a raíz del caso de una madre embarazada de gemelos que durante un ingreso prolongado por una rotura prematura de membranas a las 32 semanas sufrió una infección urinaria por *E. coli* productor de BLEE dos días después del parto (vaginal para ambos fetos). Ambos neonatos fueron cribados resultando positivos para el mismo microorganismo que la madre que también se halló con posterioridad en un trabajador sanitario y varios niños más dentro de la misma UCI neonatal. Este estudio es relevante en tanto que la mayoría de brotes nosocomiales por enterobacterias productoras de BLEE son debidos a *K. pneumoniae*, mostrando que la transmisión de *E. coli* productor de BLEE es también posible, aunque mucho más rara. Así, Millar y cols. (235) analizaron muestras de 1310 neonatos de 14 días de vida provenientes de 24 unidades neonatales. Un 5.5% de las muestras recibidas fue positiva para enterobacterias productoras de BLEE, encontrándose 33 *E. coli* (10 pertenecientes al ST131), 21 *K. pneumoniae*, 4 *K. oxytoca*, 6 *E. cloacae* y 1 *E. aerogenes*; sólo uno de los pacientes colonizados desarrolló una bacteriemia por una *K. pneumoniae* productora de BLEE. Al analizar las cepas aisladas encontraron una falta de agrupación entre las distintas cepas de *E. coli* que apoyan la verosimilitud de la adquisición vertical. Por el contrario, el análisis mediante PCR aportaba pruebas de que otras especies productoras de BLEE (*E. cloacae* y *K. pneumoniae*) se propagaban dentro de las unidades.

La importancia de la colonización neonatal en estas unidades no viene solo determinada por la posibilidad de desarrollar una infección o la aparición de brotes sino por el hecho de la transmisibilidad desde el neonato a sus convivientes al abandonar estas unidades. Así en el estudio ya citado de Rettedal y cols. se expone

que tras brotes por *K. pneumoniae* en UCIN, los niños llegan a ser portadores durante más de doce meses (e incluso algunos hasta dos años), y éstos a su vez transmitían la bacteria hasta a un tercio de sus convivientes (221); otro estudio también encontró una duración de la colonización en los niños de hasta doce meses tras un brote nosocomial (236).

En cuanto a los reservorios ambientales, el meta-análisis y la revisión sistemática realizada por Hendrik y cols. (160) encontró que los reservorios más frecuentes lo constituían los desagües de lavabos contaminados, seguidos de diferentes superficies e incubadoras. Como curiosidad encontraron referencias a la presencia en gel de ecografía, termómetros y básculas para bebés. En definitiva la presencia de BLEE en el ambiente se halló en numerosas localizaciones. En lo que respecta a la transmisión, la vía directa persona-persona y la transmisión cruzada por las manos del personal sanitario son las más importantes (160).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE TRABAJO

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE TRABAJO

Hipótesis

1. La prevalencia de colonización intestinal por enterobacterias productoras de BLEE al final del embarazo es similar a la encontrada en estudios previos en la población general; la prevalencia de colonización por enterobacterias productoras de AmpC o carbapenemasas es muy baja.
2. Existen factores de riesgo para la colonización por enterobacterias productoras de BLEE en el momento del parto.
3. La transmisión vertical de enterobacterias productoras de BLEE es frecuente en mujeres colonizadas.
4. El principal factor de riesgo para la colonización del recién nacido por enterobacterias productoras de BLEE es la colonización materna.

Objetivos

1. Conocer la prevalencia de portadores de enterobacterias productoras de BLEE, AmpC y carbapenemasas en la semana 35-37 de embarazo y en el momento del parto.
2. Conocer los factores de riesgo asociados con la colonización por enterobacterias productoras de BLEE en mujeres embarazadas en el momento del parto.
3. Estudiar la frecuencia de transmisión vertical de enterobacterias productoras de BLEE.
4. Conocer los factores de riesgo para la colonización periparto en los recién nacidos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Diseño del estudio

Se trata de un estudio transversal, en el que se ha estudiado la colonización por enterobacterias productoras de BLEE, AmpC y carbapenemasas en mujeres embarazadas en el momento del parto y sus recién nacidos; en un subgrupo de las mujeres se había tomado además una muestra en la semana 35-37.

3.2 Lugar y periodo del estudio

El estudio se realizó en la Unidad de Obstetricia y Ginecología del Hospital Universitario Virgen Macarena, hospital de tercer nivel situado en la ciudad de Sevilla, y que atiende a una población de unos 550.000 habitantes de la zona norte de la ciudad y provincia. En esta maternidad se atienden habitualmente unos 3.600 partos al año. Además, las mujeres estudiadas en la semana 35-37 lo fueron en los centros de Atención Primaria dependientes del Hospital Universitario Virgen Macarena, en el contexto de la visita rutinaria del tercer trimestre del embarazo.

El estudio se realizó entre los meses de Agosto de 2013 y Junio de 2014.

3.3 Población del estudio

Se incluyeron mujeres embarazadas que parieron en el Hospital Universitario Virgen Macarena; las mujeres estudiadas en la semana 35-37 habían expresado su deseo de parir en el Hospital Virgen Macarena. Las mujeres participantes firmaron un consentimiento informado propio y otro para el neonato (ver anexos 2 y 3).

La selección de las pacientes en el tercer trimestre se realizó en la visita protocolaria del proceso asistencial de Embarazo, Parto y Puerperio del Sistema Sanitario Público de Andalucía (SSPA), ofertando el reclutamiento a todas las pacientes y realizando la encuesta de datos epidemiológicos en las pacientes que aceptaran entrar en el estudio. La inclusión de mujeres en el parto y sus respectivos

neonatos se realizó en las dos salas de hospitalización de maternidad del Hospital Universitario Virgen Macarena.

Las muestras fueron recogidas de manera consecutiva/diaria según lo fuera permitiendo la carga de trabajo en las dos alas de hospitalización de puérperas.

El único criterio de exclusión fue el no desear participar y no firmar el consentimiento informado.

3.4 Variables del estudio

Variable resultado principal. La variable resultado principal fue la colonización vagino-rectal en las mujeres y la colonización rectal en los neonatos por enterobacterias productoras de BLEE.

Variables explicativas (ver las definiciones más adelante). Se incluyeron las siguientes:

- i. Datos demográficos y sociales: Edad, sexo, etnia, tiempo de residencia en España, nivel educativo, número de convivientes, si es cuidadora de enfermo.
- ii. Variables de interés en el embarazo: Fecundación in vitro, gemelar o no, partos previos, complicaciones en partos previos, colonización por *S. agalactiae*, viajes al extranjero en el último año, enfermedades crónicas (diabetes mellitus, hipertensión arterial, insuficiencia renal crónica, cardiopatía, enfermedad hepática), diabetes gestacional, hipertensión arterial gestacional, toma de fármacos inmunosupresores, infección urinaria durante el embarazo y número de episodios, toma de antibióticos y motivo, durante el embarazo y en los últimos 6 meses, uso de fosfomicina y uso de betalactámicos.
- iii. Variables del parto: semana en que ocurrió, vía (vaginal, cesárea), duración del parto, rotura prematura de membranas, uso de instrumentación, episiotomía, epidural, enema, sonda uretral.
- iv. Variables del recién nacido: peso al nacer, bajo peso, macrosoma, APGAR, necesidad de ingreso en Unidad Neonatal, aspiración de secreciones.

3.5 Fuentes de información.

Los datos se recogieron mediante una encuesta específica prediseñada, mediante entrevista con la mujer embarazada y la revisión de la historia clínica cuando fue necesario. Los datos fueron recogidos por los dos facultativos especialistas (FEA) al cargo del área de hospitalización de púerperas y los especialistas internos residentes de Obstetricia y Ginecología de primer año, los dos FEA al cargo de la hospitalización de neonatos no complicados y por el propio doctorando (FEA). Se introdujeron en una base de datos informatizada, con datos codificados para mantener el anonimato siguiendo las directrices de la Ley Orgánica de Protección de Datos, que está custodiada en ordenadores con control de acceso restringido en el Servicio de Obstetricia y Ginecología.

3.6 Procedimiento para la toma de muestras

En las mujeres embarazadas en semana 35-37 se utilizó la muestra de exudado vagino-rectal que se toma para el cribado de *S. agalactiae*. El laboratorio utilizó la misma muestra para la determinación solicitada (cribado de *S. agalactiae*) y para los análisis microbiológicos específicos de este estudio, que se explican posteriormente. La muestra periparto, igualmente un frotis vagino-rectal, se tomó entre el momento del parto y como máximo las 48 horas siguientes. En los recién nacidos, la muestra rectal se tomó antes de las 48 horas del parto, preferiblemente antes de las 24 horas.

La toma de muestras fue realizada por el personal investigador excepto en el caso de las muestras de semana 35-37 que fueron recogidas por la propia paciente a la que se le dieron las indicaciones necesarias (anexo 4).

3.7 Definiciones

Datos de la mujer

- Edad: en años
- Etnia: fue clasificada en caucásica, melanoderma, magrebí, asiática, indoamericana y gitana.
- Tiempo de residencia en España: menos o más de 24 meses en España

- Nivel educativo: se indicaba los estudios de mayor nivel finalizados, clasificados en sin estudios, primarios, secundarios y universitarios
- Número de convivientes: incluyendo a la paciente, número de personas que habitaran en la misma vivienda.
- Cuidador de enfermo: se consideró si la embarazada era trabajadora de un centro sanitario o residencia, o era la cuidadora principal de un familiar enfermo crónico .
- Viajes al extranjero en el último año.
- Número de comidas principales fuera del domicilio en el último mes: se preguntó cuál de las comidas del día (desayuno, almuerzo o cena) consideraba la principal del día y cuántas de éstas había realizado la paciente fuera del domicilio habitual. Se estratificaron los resultados en menos de siete comidas principales fuera de casa en el último mes, entre siete y quince y más de quince.
- Fórmula obstétrica: número de gestaciones, partos, abortos y cesáreas
- Complicaciones en gestaciones anteriores: se recabó información sobre cualquier tipo de complicación en gestaciones anteriores llegaron o no a término.
- Colonización por *S. agalactiae* durante el embarazo actual: negativa, positiva o desconocida. En el caso de que fuera positiva se diferenció entre el urocultivo positivo o el cultivo de exudado vagino-rectal positivo.
- Gestación única o múltiple
- Método de obtención de la gestación: Espontánea, por inseminación o por fecundación *in vitro* (FIV)/ inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)
- Hipertensión arterial: definida como tensión arterial mayor de 140/90 mm Hg. Se recogió si la presentaba antes del embarazo o había aparecido durante el mismo. Además se preguntaba si era necesario el uso de medicación para su control. Al mismo tiempo se estudió la aparición de preeclampsia definida como hipertensión arterial acompañada de proteinuria y/o edemas, diagnosticada más allá de la semana 20.
- Diabetes mellitus: se diferenció entre pacientes con diagnóstico previo al embarazo de diabetes mellitus y pacientes diagnosticadas durante el

embarazo bien con el cribado realizado en primer trimestre a pacientes con factores de riesgo (edad mayor de 35 años, obesidad, antecedentes familiares de primer grado con la enfermedad, diabetes gestacional confirmada o sospechada en anteriores gestaciones) o con el cribado universal recomendado en el segundo trimestre. Tras un cribado positivo fue necesario como es habitual una sobrecarga oral de 100g de glucosa con dos puntos alterados para el diagnóstico de diabetes gestacional.

- Insuficiencia renal: con valores de creatinina superiores a 2,5 mg/dL en la analítica más reciente o aclaramiento menor de 50 mL/min.
- Cardiopatía: en caso afirmativo se anotó el diagnóstico preciso.
- Enfermedad hepática: en caso afirmativo se anotó el diagnóstico preciso.
- Uso de fármacos inmunosupresores: en caso afirmativo se anotó el tratamiento preciso y el diagnóstico preciso.
- Infecciones del tracto urinario (ITU): se incluyó el padecimiento de alguna infección urinaria durante el embarazo, catalogando como ITU de repetición a la aparición de dos o más casos. En caso afirmativo se dejó constancia del tratamiento prescrito y su posología.
- Uso de antibióticos en los últimos seis meses: se dejó constancia en caso afirmativo del motivo y el antimicrobiano utilizado con la posología.
- Ingreso hospitalario durante el embarazo: en días. Se diferenció según el trimestre durante el que desarrollara el ingreso y el motivo que lo causara.
- Edad gestacional: en días. La variable se clasificó siguiendo la tradicional definición de “pretérmino” que serían menos de 37 semanas (primera categoría) y posteriormente se clasifican en “a término precoz” (segunda categoría) entre las 37 y 38+6 semanas, y por último el resto, dividiendo la categoría “a término” en 39-40+6 y mayores de 41 semanas, siendo la última cuando se describen una mayor tasa de complicaciones, por lo que en nuestro hospital de realizan las inducciones del parto en dicha semana, normalmente a las 41+5.
- Rotura prematura de membranas: en horas, en caso afirmativo. Se establecieron diferentes categorías. La división de la primera categoría, menos de 8 horas, es arbitraria; las dos siguientes reflejan los puntos claves

de las 12 y 24 horas de bolsa rota, en los que la mayoría de las guías de práctica clínica establecen los límites para inducir por dicho motivo.

- Uso de antibióticos intraparto: se registró el motivo, la duración del tratamiento y la dosis administrada.
- Horas de duración del parto: en horas. Se definió inicio del parto como cérvix borrado al cien por cien, dos centímetros de dilatación y dinámica uterina instaurada regular.
- Sondaje uretral: se registró el número de sondajes
- Inicio del parto: espontáneo, estimulado, inducido con misoprostol (dinoprostona en el caso de cesáreas anteriores).
- Modo de finalización: vaginal (espontáneo o instrumental, con ventosa obstétrica, espátulas de Thierry o fórceps), mediante cesárea (electiva o urgente).
- Episiotomía: en el caso de necesitar de la técnica se reflejó si esta era media o mediolateral.
- Desgarro vaginal: si existió y el grado (I: mucosa; II: mucosa y muscular; III: afectación del esfínter; III-A: menos del 50% del esfínter anal; III-B: más del 50% del esfínter anal; III-C: esfínter anal completo; IV: afectación de la mucosa rectal). Se recogió también la existencia de desgarros de paredes vaginales.

Datos del neonato

- Peso: en gramos
- Bajo peso: menos de 2.500 gramos.
- Macrosoma: más de 4.000 gramos.
- Puntuación del test de APGAR: para el análisis de factores de riesgo se tomo arbitrariamente el punto de corte de una valoración de 8 puntos en los tres registros que conlleva dicho test, es decir, al minuto, a los cinco y diez minutos respectivamente.
- Ingreso en neonatología: en los casos de pacientes que ingresaron en neonatología se reflejó el motivo de ingreso y la duración de la estancia.

3.8 Estudios microbiológicos

3.8.1 Toma de muestras.

- a) Semana 35-37: se proporcionó una torunda Amies W/O CH (Copan, Italia) para muestra vagino-rectal y una hoja explicativa (anexo 4) con las instrucciones para la correcta toma de la muestra haciendo especial hincapié en la importancia de que fuera realizada por la matrona de referencia siempre que fuera posible.
- b) Periparto madre: Se tomó la muestra vagino-rectal durante el periodo expulsivo, tras el alumbramiento o, en la mayoría de los casos en la sala de hospitalización de puérperas antes de pasadas 48 horas desde el parto (casi siempre menos de 24 horas).
- c) Neonatal: Se tomó la muestra rectal en los dos primeros días de vida durante la revisión rutinaria protocolizada por el servicio de Neonatología de nuestro centro.
- d) Neonatal en hijo de madre positiva en semana 35-37: además del cultivo rectal, en dos casos de madre positiva en el tercer trimestre que se siguieron hasta el parto se tomaron los siguientes cultivos en el mismo paritorio: faríngeo, ótico (bilateral), nasal, conjuntival y rectal.
En todos los casos la torunda utilizada fue el mismo modelo que se indica en el primer punto.
- e) Ambientales: en los casos de las dos madres positivas en el tercer trimestre que fueron seguidas hasta el parto se realizaron cultivos ambientales en los siguientes lugares del paritorio: mesa de parto, abrazaderas, lámpara, sifón y grifo del lavabo y cuna de reanimación. Para ello se impregnaron gasas estériles en caldo peptonado (Broth Heart Infusion, BHI) que posteriormente se pasaron por las diferentes superficies.

3.8.2 Procesamiento de las muestras

a) Muestra materna o fetal

La muestra se introdujo en 1 ml de suero fisiológico, agitando en vórtex. A partir de esta emulsión se sembraron:

- 100 µl directamente en medio agar MacConkey suplementado con 4 mg/L de cefotaxima. Se incubó a 35 °C 24 horas.
- 100 µl en caldo peptonado. Se incubó a 35 °C 24 horas
- Se realizaron dos alícuotas de 100 µl que se congelaron a -80° C para estudios moleculares u otras determinaciones futuras.

Se identificaron mediante pruebas bioquímicas básicas (oxidasa, TSI, urea en tubo e indol en caldo peptonado) todas las colonias compatibles con enterobacterias y se realizó el despistaje de producción de BLEE, AmpC plasmídica y carbapenemasa con discos de cefalosporinas de 3ª generación y carbapenémicos en medio agar Müeller Hinton con y sin 200 mg/L de cloxacilina.

En los aislados que expresaban alguna de estas enzimas, se completó el estudio de sensibilidad mediante difusión en agar a los siguientes antibióticos: amoxicilina/clavulánico, piperacilina/tazobactam, cefuroxima, cefepime, aztreonam, tobramicina, gentamicina, amikacina, nalidíxico, ciprofloxacina, tetraciclina, cotrimoxazol y fosfomicina siguiendo la normativa del CLSI (237). Se conservaron los aislados analizados a -80° C

En los casos en que no se detectó ninguna enterobacteria en la siembra directa, se inoculó 100 µl del caldo peptonado, tras incubación 24 horas a 35°C, en agar MacConkey con 4 mg/l de cefotaxima. A las 24 horas de incubación se procedió como en la inoculación directa.

b) Muestra ambiental:

Las gasas se incubaron 24 horas a 37°C en caldo BHI y posteriormente se subcultivaron 100 microlitros en agar MacConkey suplementado con 4 mg/l de cefotaxima durante 24 h a 37°C.

3.8.3 Caracterización de los aislados

La identificación de los enzimas se realizó en función del fenotipo, y mediante PCR con cebadores específicos para cada tipo: a) BLEE (CTX-M-1, CTX-M-9, SHV y

TEM), b) AmpC plasmídica (CMY, DHA); y c) carbapenemasas (A, D y C). Posteriormente se realizó la secuenciación de los amplicones para determinar el tipo específico.

La identificación epidemiológica de los aislados de *E. coli* y *Klebsiella* spp se realizó mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE) con la enzima de restricción *XbaI*.

Los plásmidos se estudiaron mediante conjugación en *E. coli* J53 y/o transformación en *E. coli* DH10, visualización mediante técnica de Kieser y determinación del grupo de incompatibilidad mediante PCR con el esquema de Carattoli (238).

Todos estos métodos se describen con más detalle a continuación.

3.8.4 Confirmación de producción de BLEE

Material:

- Discos antimicrobianos (Becton Dickinson, EE.UU.) :
 - Ceftazidima, 30 µg
 - Cefotaxima, 30 µg
 - Ceftazidima 30 µg + Ácido clavulánico 10 µg
 - Cefotaxima 30 µg + Ácido clavulánico 10 µg

- Agar Mueller-Hinton con Ampicilina 100 µg /L (AMP, Sigma-Aldrich).

Procedimiento:

La producción de BLEE se confirmó en el centro de referencia mediante la técnica de difusión en disco siguiendo las normas del CLSI (237) usando placas de Mueller-Hinton y discos conteniendo 30 µg de cefotaxima o ceftazidima, con y sin ácido clavulánico, siguiendo las instrucciones de fabricante.

Considerándose cepas productoras de BLEE aquellas en las que la diferencia entre los diámetros de los halos de inhibición en al menos uno de los dos antibióticos

era mayor o igual a 5 mm, entre el disco del antibiótico con ácido clavulánico respecto del mismo antibiótico sin clavulánico.

Para evitar la pérdida del plásmido codificante de la BLEE todos los cultivos de mantenimiento de las bacterias se realizaron en MHA suplementando con ampicilina a una concentración de 100 mg/L (MHA + AMP).

3.8.5 Análisis de filogrupos

El análisis de filogrupos de las cepas de *E. coli* se llevó a cabo mediante PCR múltiple de los genes *chuA*, *yjaA* y el fragmento de ADN *tspEC2*, según el método descrito por Clermont y cols. (239). La interpretación de los filogrupos y subgrupos se realizó según el esquema descrito por Branger y cols. (240).

El protocolo seguido para la amplificación fue el siguiente:

- Desnaturalización inicial: 94°C durante 5 minutos o
- 30 ciclos:
 - o Desnaturalización: 30 segundos a 95 °C
 - o Anillamiento: 30 segundos a 59 °C
 - o Extensión: 7 segundos a 72 °C.
- Extensión final de 5 minutos a 72 °C.

3.8.6 Caracterización de la BLEE

PCR

Material:

- Material de PCR
 - o Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs, Invitrogen)
 - o Tampón de PCR (Invitrogen)
 - o Cloruro magnésico (MgCl₂, Invitrogen)
 - o Taq ADN polimerasa (Invitrogen)
 - o Agua destilada (Braun Medical)
 - o Marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Invitrogen)
 - o Agarosa Grade Molecular Biology (Promega)
 - o Bromuro de etidio (Sigma-Aldrich)
 - o Azul de bromofenol (Amersham Pharmacia Biotech)

- Iniciadores específicos de tipos de BLEE (TIB Molbiol, Alemania):
 - TEM-F: 5' - ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG
 - TEM-R: 5' - CTG ACA GTT ACC AAT GCT TA
 - SHV-F: 5' - GGG TTA TTC TTA TTT GTC GC
 - SHV-F2: 5' - GGT TAT GCG TTA TAT TCG CC
 - SHV-R: 5' - TTA GCG TTG CCA GTG CTC
 - CTX-M-1-F: 5' - ATG GCG ACG GCA ACC GTC A
 - CTX-M-1-R: 5' - CAA ACC GTT GGT GAC GAT TTT A
 - CTX-M-9-F: 5' - GTG ACA AAG AGA GTG CAA CGG
 - CTX-M-9-R: 5' - ATG ATT CTC GCC GCT GAA GCC

Procedimiento

La detección de las betalactamasas se realizó a través de los genes codificantes utilizando cebadores específicos de los grupos de BLEE: TEM, SHV, CTX-M-1 y CTX-M-9 mediante la técnica de la PCR.

Para realizar dicha técnica se obtuvo en primer lugar ADN bacteriano a partir de una colonia crecida en MHA + AMP y resuspendida en 50 μ L de agua destilada estéril, con posterior tratamiento de calor a 100 $^{\circ}$ C durante 10 min. Tras centrifugación a 13.000 rpm durante 1 min se tomaron 2 μ L del sobrenadante y se añadieron a una mezcla de 48 μ L que contenía: tampón de PCR 1X, 1,5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs, cada uno de los cebadores a 0,5 μ M y 2,5 U de Taq polimerasa.

La amplificación se llevó a cabo según el tipo de betalactamasa, teniendo en común un ciclo inicial de desnaturalización de 95 $^{\circ}$ C durante 3 min, seguido de 35 ciclos con diferentes temperaturas y tiempos (Tabla 8).

Tabla 8: Características de las fases de cada ciclo de PCR para cada tipo de familia de BLEE tras desnaturalización previa de 95 $^{\circ}$ C durante 3'.

| | TEM | SHV | CTX-M-9 | CTX-M-1 |
|-------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|
| Desnaturalización | 94 $^{\circ}$ C 45" | 94 $^{\circ}$ C 45" | 95 $^{\circ}$ C 30" | 95 $^{\circ}$ C 1' |
| Anillamiento | 58 $^{\circ}$ C 30" | 60 $^{\circ}$ C 30" | 62 $^{\circ}$ C 30" | 64 $^{\circ}$ C 1' |
| Extensión | 72 $^{\circ}$ C 1'30" | 72 $^{\circ}$ C 1'30" | 72 $^{\circ}$ C 1'15" | 72 $^{\circ}$ C 2' |
| Extensión final | 72 $^{\circ}$ C 10' | 72 $^{\circ}$ C 10' | 72 $^{\circ}$ C 10' | 72 $^{\circ}$ C 7' |

El producto de la PCR obtenido se visualizó a través de electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en TAE IX y teñido con bromuro de etidio 0,5 µg/mL, En cada pocillo se cargaron 3 µL de producto de PCR y 2 µL de marcador de avance (azul de bromofenol). Se utilizó como marcador de peso molecular la 100 Pb DNA Ladder. Se utilizó para el análisis de la imagen el mismo aparato y programa antes mencionado.

3.8.7 Estudio de la relación clonal

A) Electroforesis en campo pulsado (pulsed field gel electrophoresis, PFGE):

Material:

PCR

Reactivos:

- Lisozima (Sigma-Aldrich)
- SmaI (Roche, España)
- Buffer A (Roche)
- XbaI (Roche)
- Buffer H (Roche)
- Lisoestafina (Sigma-Aldrich)
- RNasa (Roche)
- Proteínasa K (Roche)
- Agarosa Pulse Field (Bio-Rad)
- Low Melting Agarosa (Bio-Rad)
- Solución PIV:

Para 1 L:

10 mL Tris 1M pH=8

200 mL NaCl 5 M

790 mL agua bidestilada

- Solución básica de lisis:

Para 100 mL:

0.6 mL. Tris pH-8

20 mL NaCl 5 M

20 mL EDTA 0.5 M pH=8

2 mL Desoxicolato sódico 10%

5 mL Sarcosil 10%

○ Solución ES:

Para 100 mL:

90 mL EDTA 0.5 M pH=8

10 mL Sarcosil 10%

○ Solución TE:

Para 1 L:

2 mL EDTA 0.5 M pH=8

10 mL Tris 1 M pH=7.5

988 mL agua bidestilada

○ Solución TBE (10x):

Para 1 L:

55 g Ácido bórico

180 g Trizma base

40 mL EDTA 0.5 M pH=8

B) Electroforesis

Reactivos:

- Marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Invitrogen)
- Agarosa Grade Molecular Biology (Promega)
- Bromuro de etidio (Sigma-Aldrich)
- Tampón de electroforesis Tris-Acético-EDTA (TAE; Sigma-Aldrich)
- Tampón de electroforesis Tris-Borato-EDTA (TBE; Sigma-Aldrich)
- Azul de bromofenol (Amersham Pharmacia Biotech)

Equipos:

- Cubetas de electroforesis Sub-Cell GT (Bio-Rad)

- Fuente de alimentación modelo 1000/500 (Bio-Rad)

Equipos de captura y análisis de la imagen:

- Cámara de fotos digital Kodak DC290 (Eastman Kodak)
- Sistema de análisis digital de imágenes Kodak ID EDAS 290 (Eastman Kodak)

Procedimiento

A partir de un cultivo fresco se tomó un asa de crecimiento y se suspendió en 500 PL de PIV, tras una centrifugación a 13.000 rpm durante 1 min y eliminación del sobrenadante se añadió 200 VL del mismo reactivo a la suspensión hasta conseguir una suspensión de 0,9-1 de densidad óptica a 620 nm de radiación. A 100 VL de esta suspensión se añadió 100 VL de agarosa (Low Melting Agarosa al 2% en buffer SE . mantenida a 80 °C) y se procedió a la obtención de bloques de agarosa conteniendo el ADN.

A continuación se hizo la lisis bacteriana con lisozima 50 mg/mL y RNAsa 10 mg/mL a razón de 2 µL y 5 µL por mililitro de reacción, utilizando 500 µL /cepa bacteriana de buffer ST. La lisis se realizó a 37 °C durante 5 h.

Transcurrido el tiempo se retiró el líquido y se le añadió 500 µL de buffer ES y se enjuagaron los bloques, se tiró el buffer y se le añadió proteinasa K 20 mg/mL para destruir las proteínas. Esta enzima se añadía en concentración 1 mg/mL de reacción habiendo 500 µL/cepa de solución de lisis formada por la enzima de . restricción y la solución ES, se mantuvo a 50 °C durante 18 h. Una vez terminada esta fase el bloque se cambió a un nuevo tubo con 2 mL de buffer TE, tras agitar durante 30-45 min a temperatura ambiente se eliminó el TE y se procedió a realizar este paso de lavado de 4 a 5 veces. Para el proceso de digestión del ADN se introdujo el bloque en 100 µL de buffer H al 1x y 40 U de enzima XbaI 10 U/µL, previamente atemperada la mezcla a 37 °C durante 25 min, dejando durante toda la noche a 37 °C que se produjera la digestión.

Cada bloque obtenido mediante moldes se colocó en el peine del soporte de electroforesis. Tras colocar de forma vertical el peine se vertió la solución de agarosa pulse Field (1,7 g de agarosa en TBE 0,5X) dejando solidificar el gel. Posteriormente

se retiró el peine de forma que el bloque de agarosa conteniendo el ADN quedó incluido en el gel dejando un pocillo hueco, que se procedió a rellenar con la agarosa restante. Se dejó enfriar durante 20 min a 4°C. Paralelamente se preparó un control de peso molecular y una cepa control de *S. aureus* de igual forma pero con la enzima Smal y buffer A. La escalera comercial usada fue en forma de bloque, se tomaron 500 µL de buffer TBE y se pusieron en un éppendorf, se cortó un trozo pequeño de escalera y se dejó 10 min a 45°C; hasta su colocación en el peine junto con los bloques se mantuvo en hielo.

El aparato de electroforesis se cubrió de TBE 0,5X y se puso a circular a 4 °C . antes de iniciar el proceso.

El programa de electroforesis utilizado fue:

- 6 V/cm², 14°C y 999 de tiempo

Bloque 1: 1" a 10" durante 10 h

Bloque 2: 10" a 35" durante 12 h

Se preparó un baño de bromuro de etidio a concentración de 1 µg /mL en agua destilada. Se introdujo el gel una vez terminado el programa y se dejó durante 30 min. Se lavó a continuación con agua destilada durante 1 h.

Se realizó la observación y análisis del gel mediante fotografías a diferentes distancias, tiempos de exposición e intensidades de luz UV.

Para su interpretación se siguieron los criterios de Tenover y cols. (241): cepas indistinguibles aquellas cuyo patrón de bandas era igual, estrechamente relacionadas cuando hubiera 2 o 3 bandas diferentes, posiblemente relacionadas cuando hubiera de 4 a 6 bandas distintas y no relacionadas cuando el número de bandas diferentes fuera igual o superior a 7.

3.8.8 Secuenciación de los genes que codifican BLEE

Material

- Reactivos: Iniciadores específicos de tipos de BLEE (TIB Molbiol, Alemania):

- Kit de purificación de ADN Sephaglas BandPrep (Farmacia)
- Kit de purificación de ADN: Microsep TM Centrifugal Devices (PALL Life Sciences, EE.UU.)
- Los análisis informáticos se llevaron a cabo empleando las siguientes herramientas *on line*:
 - La página web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (NCBI: National Center for Biotechnology Information), BLAST, BLASTX
 - Página del EBI-European Bioinformatics Institute, EMBL Outstation (<http://www.ebi.ac.uk>)
 - Página de Lahey Hospital & Medical Center (<http://www.lahey.org>)

Procedimiento

Los productos de PCR específicos de BLEE fueron purificados con el kit de purificación de ADN Sephaglas BandPrep o kit Microsep siguiendo las instrucciones de los fabricantes para la secuenciación directa de éstos.

Las secuencias se determinaron en una empresa externa (Macrogen; Corea del Sur). Posteriormente fueron analizadas con un programa informático de análisis de secuencias Chromas Pro y con los softwares de Internet NCBI BLAST, Traduction Multiple y ClustalW2 de EMBL-EBI.

Otros equipos:

- Vórtex Reax 2000 (Heidolph, Alemania)
- Agitador Agimatic-N (J. P. Selecta, España)
- Pipetum Pipet-Aid XP (Drummond, EE.UU.)
- Pipetas Digital Colors (Thermo Labsystems, Bélgica)
- Pipeta multicanal Titertek (Labsystems, Finlandia)
- Espectrofotómetro Spectronic 501 (Bausch & Lomb, EE.UU.)
- Espectrofotómetro Termo Spectronic Genesys 20 (Termo Fisher Scientific, EE.UU.)

- Espectrofotómetro Termo Electronic Corporation BioMate (Termo Spectronic, EE.UU.)
- Congelador – 80 °C Revco ULT-2586-5 (Revco Scientific, EE.UU.)
- Frigorífico Liebherr FKS-3600-1 (Liebherr, Alemania)
- Estufa 37 °C Heraeus B6420 (Heraeus, Alemania)
- Estufa orbital ORBI-SAFE (Gallenkump, Reino Unido)
- Balanzas electrónicas AND modelos EW-300A y ER-120A (A&D, Japón)
- Microondas Sanyo EM-G4760 (Sanyo Electrics, Reino Unido)
- Máquina de hielo AF10 (Scotsman, EE.UU.)

3.9 Aspectos éticos

El Comité Ético del Hospital Universitario Virgen Macarena aprobó el estudio. Se requirieron consentimientos informados (anexos 2 y 3) para la participación de las mujeres y para la participación de los neonatos (en este caso, la autorización se realizó por los padres). Los datos fueron anonimizados.

3.10 Análisis estadístico

3.10.1 Tamaño muestral

Dado que se trata de un estudio epidemiológico, el tamaño muestral se estimó en base a la posibilidad de detectar un número razonable de mujeres y neonatos colonizados que permitiera evaluar las hipótesis, en base a los factores de riesgo encontrados en estudios previos o en otras poblaciones.

Se estimó que la colonización rectal por enterobacterias productoras de BLEE en la población general, por estudios previos en el área, es del 7%. Por tanto, se estimó que se deberían incluir unas 800 mujeres embarazadas en el momento del parto para detectar unas 50-60 colonizadas con las que poder investigar los factores de riesgo; esto permitiría además estudiar la transmisión vertical, que se estimó hipotéticamente en un 10%, con lo que dispondríamos de unos 5-6 episodios de transmisión vertical. Una muestra de 150 mujeres sería suficiente para comprobar

si la colonizadas en el tercer trimestre (se estimó que se detectarían unas 10-15) se mantenía en el parto.

3.10.2 Cálculo de la prevalencia de colonización por enterobacterias productoras de BLEE.

La prevalencia se calculó como el porcentaje de mujeres o neonatos colonizados entre el total de mujeres o neonatos estudiados; se calculó el intervalo de confianza (IC) del 95% para la estimación realizada.

3.10.3 Análisis de los factores de riesgo

Para el análisis de factores de riesgo de colonización tanto en mujeres en el parto como en neonatos se realizó primero un análisis univariante mediante la comparación de la frecuencia de colonización en los expuestos y no expuestos a las distintas variables estudiadas, con cálculo de los riesgos relativos (RR) y sus intervalos de confianza al 95%. En cuanto a los tests estadísticos, para las variables dicotómicas se realizó el test de Chi cuadrado o el de Fisher cuando fue necesario. Las variables policotómicas se dicotomizaron en su mayoría para un manejo más simple realizándose el mismo análisis ya referido. Las variables continuas fueron analizadas mediante T de Student o test de U de Mann-Whitney si no se cumplía el criterio de normalidad.

Posteriormente se realizó un análisis multivariante. La selección de las variables para su inclusión en los diferentes modelos se realizó teniendo en cuenta aquellas variables que resultaron significativas o cercanas a la significación (valor de $p < 0,1$) en el análisis univariante o si tenían sentido biológico. Se seleccionaron una a una, manualmente, mediante un procedimiento hacia atrás. Se calcularon las Odds Ratio (OR) ajustadas y sus IC 95%. Para conocer la capacidad predictiva del modelo sobre los datos observados se le calculó el área bajo la curva COR y su IC 95%.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico SPSS® versión 17.0.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Prevalencia de colonización en el tercer trimestre del embarazo y duración de la colonización hasta el parto.

En el estudio de colonización en la semana 35-37 se incluyeron 118 mujeres embarazadas. La prevalencia de colonización por enterobacterias productoras de BLEE fue del 3,3% (4 mujeres, IC 95%: 1,3% - 7,5%); las 4 mujeres colonizadas lo estaban por *E. coli*; 2 pertenecientes al filogrupo D y productoras de CTX-M-1, 1 del filogrupo B2/3 productora de CTX-M-3 (esta paciente era originaria de Azerbaiyán) y 1 del filogrupo B22 productora de CTX-M-1. No se halló colonización por enterobacterias productoras de AmpC o carbapenemasas.

De estas mujeres, pudieron ser estudiadas en el momento del parto 47, entre las cuales estaban las 2 que habían sido detectadas como colonizadas por cepas del filogrupo D en la semana 35-37. Las otras dos no fueron estudiadas, una por desgarro vaginal grado IV y la otra por parto en otro centro. Las muestras periparto fueron negativas en todas ellas para enterobacterias productoras de BLEE, AmpC o carbapenemasas.

Además, se realizaron cultivos ambientales y cultivos en otras áreas anatómicas del neonato en los casos de dos madres positivas en semana 35-37 que fueron seguidas hasta el momento del parto. Todos los cultivos, tanto ambientales como del neonato, resultaron negativos.

4.2 Prevalencia de colonización en el parto.

En el estudio de colonización en el parto se estudiaron 815 mujeres (incluyendo las 47 ya referidas en el apartado anterior). De ellas, se encontraron como colonizadas por enterobacterias productoras de BLEE 59. La colonización en 4 de ellas se consideró debida a transmisión nosocomial (ver después), por lo que fueron excluidas del cálculo de prevalencia (al desconocer el impacto de esa adquisición nosocomial en la posibilidad de detección de un aislado causante de colonización comunitaria) y del estudio de factores de riesgo. La prevalencia de

colonización comunitaria se estimó en el 6,8% (55 de 811 mujeres) con un IC al 95% de 5,2 a 8,7%.

Se aislaron 65 enterobacterias productoras de AmpC en 65 madres diferentes (8% IC 95% [6.15-9.88]) de las cuales 11 (1.4% IC 95% [0.56-2.15]) correspondieron a *E.coli* y el resto a otros tipos de enterobacterias. No se determinó la naturaleza cromosómica o plasmídica del enzima dado su baja frecuencia y que no era relevante para el desarrollo del estudio. No se encontraron madres colonizadas por enterobacterias productoras de carbapenemasas.

4.3 Características microbiológicas de los aislados de enterobacterias productoras de BLEE colonizantes de madres en el parto.

De las 55 mujeres colonizadas se obtuvieron 58 aislados de enterobacterias productoras de BLEE (3 de ellas eran portadoras de 2 cepas distintas de *E. coli*); en total, 56 fueron *E. coli* (99.6%), 1 *K. oxytoca* (1.7%) y 1 *K. pneumoniae* (1.7%). En cuanto a los aislados de *E. coli*, el filogrupo más frecuente fue el A (22 aislados, 39.3%), seguido de B1 (19; 33.9 %), D (8; 14.3%) y B2 (7; 12.5%).

Fueron productoras de enzimas tipo CTX-M 45 aislados (77,5%), 13 (22,4%) de tipo SHV y 1 (1,78%) de tipo TEM; 1 aislado fue productor de una enzima CTX-M y de SHV. Los tipos específicos de BLEE se muestran en la tabla 9.

Tabla 9: Tipos de BLEE.

| Grupo | Enzima | Nº (%) |
|---------------|---------------------|---------------|
| Grupo CTX-M-1 | TOTAL GRUPO CTX-M-1 | 15 (25,8) |
| | CTX-M-1* | 10 (17,2) |
| | CTX-M-15 | 4 (6,8) |
| | CT-M-32 | 1 (1,7) |
| Grupo CTX-M-9 | TOTAL GRUPO CTX-M-9 | 30 (51,7) |
| | CTX-M-14 | 25 (43,1) |
| | CTX-M-24 | 2 (3,4) |
| | CTX-M-27 | 3 (5,1) |
| SHV | SHV-12* | 13 (22,4) |
| TEM | TEM-52 | 1 (1,7) |

*Un aislado fue productor de CTX-M-1 y SHV-12

Los aislados de *K. pneumoniae* y una *K. oxytoca* fueron productores de CTX-M-1. En cuanto a los aislados de *E. coli*, la distribución de tipos de BLEE por filogrupo fue como se muestra en la tabla 10. Cabe resaltar que no se halló ningún *E. coli* B2 CTX-M-15.

Tabla 10: Tipos de BLEE en función de los filogrupos de *E. coli*.

| | CTX-M-1 | CTX-M-15 | CTX-M-32 | CTX-M-14 | CTX-M-24 | CTX-M-27 | SHV-12 | TEM-52 |
|----|---------|----------|----------|----------|----------|----------|--------|--------|
| A | 4 | 2 | 1 | 8 | 1 | 2 | 4 | 0 |
| B1 | 4 | 0 | 0 | 9 | 1 | 0 | 4 | 1 |
| B2 | 1+1* | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 1* | 0 |
| D | 2 | 0 | 0 | 3 | 0 | 1 | 4 | 0 |

*Un aislado filogrupo B2 fue productor de CTX-M-1 y SHV-12. En total son siete aislados B2

4.4 Descripción del brote de colonización por *K. pneumoniae* productor de BLEE en el periparto.

Se detectaron 4 mujeres colonizadas por *K. pneumoniae* productoras de SHV-2, que presentaban idéntico patrón de PGFE. Las cuatro mujeres parieron en dos días consecutivos, con menos de 24 horas de diferencia entre la primera y la última. Cuatro personas atendieron a las mujeres antes de dar a luz, una EIR, un matrón y dos residentes de matrona. Tres de los partos fueron realizados por la EIR, debiendo instrumentarse con espátulas (2 de ellos) o ventosa (1).

Ninguno de los recién nacidos de estas madres se detectó como colonizado por *K. pneumoniae* productor de BLEE; el recién nacido de una de ellas se detectó como colonizado por *E. coli* productor de BLEE, en concreto SHV-12. No se produjeron infecciones ni en la madre ni en los recién nacidos.

Estas mujeres se excluyeron del cálculo de prevalencia de colonización y del estudio de los factores de riesgo, puesto que consideramos que se trató de un episodio de transmisión nosocomial cruzada o por foco ambiental común, y no refleja la situación de colonización en la comunidad.

4.5 Características de las madres estudiadas en el parto.

Las características demográficas de las 811 madres incluidas en el análisis se muestran en la tabla 11.

Tabla 11: Principales características sociodemográficas de las madres estudiadas (n=811). Los datos se muestran como número de mujeres (porcentaje) excepto donde se especifica.

| Variable | | Valor |
|---|--------------|-------------------|
| Edad | Media (DE) | 30.88 años (5.43) |
| Etnia | Caucásica | 741 (91.4) |
| | Negra | 6 (0.7) |
| | Asiática | 5 (0.6) |
| | Magrebí | 13 (1,6) |
| | Gitana | 20 (2.5) |
| | Sudamericana | 26 (3.2) |
| Tiempo en España en meses | ≤24 | 15 (1.8) |
| | >24 | 796 (98.2) |
| Estudios | Sin estudios | 13 (1.6) |
| | Primarios | 232 (28.6) |
| | Secundarios | 345 (43.5) |
| | Terciarios | 221 (27.3) |
| Convivientes | 1 ó 2 | 375 (46.2) |
| | >2 | 486 (53.8) |
| Cuidadora de enfermo | | 59 (7.3) |
| Viajes al extranjero en los últimos 12 meses | | 129 (15.9) |
| Comida principal fuera de casa en el último mes | <7 días | 514 (63.4) |
| | 7-15 días | 181 (22.3) |
| | >15 días | 116 (14.3) |

DE: Desviación estándar

Las características obstétricas preparto de las mujeres se muestran en la tabla 12.

Tabla 12: Factores obstétricos anteparto en 811 madres estudiadas. Los datos se muestran como número de mujeres (porcentaje) excepto donde se especifica.

| Variable | | Valor |
|-------------------------------------|-------------------|--------------|
| Gestaciones | 1 | 337 (41.6) |
| | 2 | 291 (35.9) |
| | 3 o más | 183 (8.5) |
| Partos | 0 | 466 (57.5) |
| | 1 | 268 (33) |
| | 2 o más | 77 (9.5) |
| Abortos | 0 | 639 (78.8) |
| | 1 | 117 (14.4) |
| | 2 o más | 55 (6.8) |
| Cesáreas | 0 | 731 (90.15) |
| | 1 | 74 (9.15) |
| | 2-3 | 6 (0.7) |
| Complicaciones en embarazo anterior | | 42 (5.2) |
| Gestación gemelar | | 18 (2.2) |
| Fecundación | Espontánea | 790 (97.4) |
| | Inseminación | 3 (0.4) |
| | FIV/ICSI | 18 (2.2) |
| Hipertensión pregestacional | | 10 (1.2) |
| Hipertensión gestacional | Sin proteinuria | 27 (3.3) |
| | Preeclampsia | 5 (0.6) |
| Diabetes mellitus | Pregestacional | 7 (0.9) |
| | Gestacional | 36 (4.4) |
| Control de la diabetes | Insulina | 16 (2) |
| | Dieta y ejercicio | 27 (3.3) |

Resultados

| | | |
|---|-------------------------|-------------------|
| Infección urinaria | 1 | 46 (5.6) |
| | 2 o más | 92 (11.3) |
| Antibióterapia durante el embarazo | | 169 (20.8) |
| Antibióterapia últimos 6 meses | | 148 (18.2) |
| Antibióticos usados últimos seis meses | Beta-lactámico* | 82 (10,1) |
| | Fosfomicina* | 71 (8,7) |
| | Otros | 5 (0,6) |
| Motivos antibióterapia últimos seis meses | Infección urinaria | 114 (14) |
| | Infección respiratoria | 13 (1.7) |
| | Infección odontógena | 18 (2.2) |
| | Bolsa rota a pretérmino | 1 (0.1) |
| Ingreso hospitalario durante el embarazo | | 49 (6) |
| Duración del ingreso | Media (DE) | 4.96 días (4.5) |
| | >7 días | 9 (1.1) |
| Edad gestacional | Media (DE) | 277.6 días (10.8) |
| | <37 semanas | 43 (5,3) |
| | 37-38+6 semanas | 134 (16,5) |
| | 39-40+6 semanas | 476 (58,7) |
| | >41 semanas | 158 (19,5) |
| Rotura prematura de membranas | | 285 (35.1) |
| Tiempo desde rotura prematura de membranas a inicio del parto | Media (DE) | 15.8 horas (13.7) |
| Portadora de <i>S. agalactiae</i> | Frotis vaginal | 115 (14.2) |
| | Urocultivo | 18 (2.2) |
| | Desconocido | 54 (6.7) |

DE: Desviación estándar.

FIV/ICSI: Fecundación *in vitro* / *Intracytoplasmatic sperm injection*.

*20 pacientes habían recibido fosfomicina y un betalactámico.

En cuanto a las complicaciones en anteriores embarazos, los eventos más repetidos fueron 7 fetos muertos anteparto (16.5% del total de complicaciones) , 6 embarazos ectópicos (14.3%), diabetes gestacional (9.5%), 4 oligoamnios (9.5%), 4 preeclampsias (9.5%) y 4 hipertensión arterial (9.5%) (sin preeclampsia). El despistaje de *S. agalactiae* fue negativo en 636 mujeres (78.4%), tanto en los urocultivos realizados durante el embarazo como en el despistaje universal que se realiza entre las semanas 35 y 37. Con respecto a los antibióticos recibidos, los betalactámicos fueron amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulánico o cefalosporina oral.

Sobre el tiempo de embarazo, sólo cinco mujeres llegaron a la semana 42. Llama la atención el que sólo hubo un 5.3% de prematuros (<37 semanas). En 285 mujeres (35,1%) hubo rotura de bolsa antes de iniciar el trabajo de parto; en éstas, el parto se produjo en <8 horas tras la rotura en 75, entre 8 y 12 hora en 56, entre 12 y 24 horas en 119, y en más de 24 horas en 35.

Las variables relacionadas con el parto en sí se muestran en la tabla 13.

Tabla 13: Variables relacionadas con el parto en las 811 mujeres estudiadas. Los datos se muestran como número de mujeres (porcentaje) excepto donde se especifica.

| Variable | | Valor |
|--|-------------------|-----------------|
| Duración | Media (DE) | 6.7 horas (5.0) |
| Antimicrobianos administrados intraparto | Total | 362 (44.6) |
| | Ampicilina | 132 (16.3) |
| | Penicilina | 152 (18.7) |
| | Cefazolina | 67 (8.3) |
| | Clindamicina | 11 (1.4) |
| Anestesia epidural | | 681 (84) |
| Enema | | 16 (2) |
| Sondaje vesical | | 537 (66.2) |
| Nº sondajes | 0 | 274 (33.8) |
| | 1 | 388 (47.8) |
| | 2 o más | 149 (18.4) |
| Inicio del parto | Espontáneo | 657 (81) |
| | Estimulado | 6 (0.8) |
| | Inducido | 148 (18.2) |
| Cesárea | | 137 (16.9) |
| Episiotomía | Media | 112 (13.8) |
| | Mediolateral | 123 (15.2) |
| | No | 439 (54,1) |
| Desgarro vaginal | No | 317 (39.1) |
| | D-I | 148 (18.2) |
| | D-II | 166 (20.5) |
| | D-III | 20 (2.5) |
| | D-IV | 3 (0.4) |
| | Paredes laterales | 20 (2.5) |
| Instrumental | Ventosa | 75 (9.2) |
| | Espátulas | 6 (0.7) |
| | Fórceps | 32 (3.9) |
| Cesárea | Urgente | 105 (12.9) |
| | Electiva | 32 (3.9) |

DE: desviación estándar

La tabla 14 resume las vías de parto en el total de las madres estudiadas.

Tabla 14: Vía y tipo de finalización del parto

| Vía | | Número (porcentaje) | |
|-----------|--------------|---------------------|----------|
| Vaginales | Eutócicos | 561 (69,2) | |
| | Instrumental | Ventosa | 75 (9.2) |
| | | Espátulas | 6 (0.7) |
| | | Fórceps | 32 (4) |
| Cesáreas | Urgentes | 105 (12,9) | |
| | Electivas | 32 (4) | |

Tabla 15: Comparación para los distintos factores de riesgo entre las madres colonizadas por enterobacterias productoras de BLEE y las no colonizadas (excluidas las 4 del brote nosocomial)

| Variables | Madres colonizadas (n=55) | Madres no colonizadas (n=756) | p |
|--|---------------------------|-------------------------------|--------|
| Edad >30 años | 31 (56.4) | 405 (53.6) | 0.688 |
| Raza no caucásica | 12 (21.8) | 58 (7.7) | 0.001 |
| Tiempo en España <24 meses | 3 (5.5) | 52 (6.5) | 0.075* |
| Más de estudios primarios | 34 (61.8) | 532 (70.4) | 0.182 |
| >2 Convivientes | 32 (58.2) | 454 (60.1) | 0.785 |
| Cuidadora enfermo | 6 (10.9) | 53 (7) | 0.279* |
| Viajes al extranjero en los últimos 12 meses | 12 (21.8) | 119 (15.7) | 0.237 |
| Comida principal >15 días | 16 (29.1) | 100 (13.2) | 0.001 |
| Multigesta | 32 (58.2) | 442 (58.5) | 0.967 |
| Múltipara | 22 (40) | 323 (42.7) | 0.693 |
| Aborto previo | 14 (25.5) | 158 (20.9) | 0.425 |
| Cesárea previa | 4 (7.3) | 76 (10.1) | 0.504 |

Resultados

| | | | |
|--|-----------|------------|--------|
| Complicaciones en gestaciones anteriores | 6 (10.9) | 36 (4.8) | 0.058* |
| TRA | 2 (3.6) | 19 (2.5) | 0.648 |
| HTA pregestacional | 0 (0) | 10 (1.3) | 1* |
| HTA gestacional | 4 (7.3) | 28 (3.7) | 0.266* |
| Preeclampsia | 1 (1.8) | 4 (0.5) | 0.297* |
| Diabetes pregestacional | 0 (0) | 7 (0.9) | 1* |
| Diabetes gestacional | 3 (5.5) | 33 (4.4) | 0.705* |
| Insuficiencia renal | 0 (0) | 1 (0.1) | 1* |
| Cardiopatía | 0(0) | 4 (0.5) | 1* |
| Hepatopatía | 0 (0) | 4 (0.5) | 1* |
| Inmunosupresores | 0 (0) | 4 (0.5) | 1* |
| Infección urinaria | 16 (29.1) | 122 (16.1) | 0.014 |
| Más de un episodio de infección urinaria | 78 (10.3) | 14 (25.5) | 0.001 |
| Tratamiento previo con cualquier antibiótico durante el embarazo | 16 (29.1) | 154 (20.4) | 0.125 |
| Tratamiento previo con cualquier antibiótico en los últimos seis meses | 11 (20) | 137 (18,1) | 0.728 |
| Tratamiento previo con fosfomicina | 8 (14.5) | 90 (11.9) | 0.562 |
| Tratamiento previo con betalactámicos | 8 (14.5) | 83 (11) | 0.418 |
| Más de un ciclo de antibioterapia | 1 (1.8) | 22 (1.8) | 0.638 |
| Ingreso hospitalario durante el embarazo | 1 (1.8) | 47 (6.2) | 0.244 |
| Más de 38 semanas de amenorrea | 50 (90.9) | 672 (88.9) | 0.644 |
| Más de 41 semanas de amenorrea | 11 (20) | 147 (19.4) | 0.920 |
| Rotura prematura de membranas | 20 (36.4) | 265 (35.1) | 0.844 |
| Portadora de <i>S. agalactiae</i> (n=757) | 9 (6.8) | 44 (7.1) | 0.907 |
| BLEE en semana 35 | 0 (0) | 2 (0.3) | 1* |

| | | | |
|------------------------------------|-----------|------------|-------|
| Antibióterapia intraparto | 25 (45.5) | 337 (44.6) | 0.899 |
| Parto >12 horas | 11 (20) | 137 (18.1) | 0.728 |
| Parto >8 horas | 18 (32.7) | 239 (31.6) | 0.864 |
| Epidural | 44 (80) | 637 (84.3) | 0.406 |
| Enema | 1 (1.8) | 15 (2) | 1* |
| Sondaje | 34 (61.8) | 501 (66.3) | 0.501 |
| Inducido | 13 (23.6) | 141 (18.7) | 0.363 |
| Vaginal | 42 (76.4) | 632 (83.6) | 0.167 |
| Desgarro (N= 674) | 20 (47.6) | 337 (53.3) | 0.473 |
| Desgarro III-IV (N=674) | 1 (2.4) | 22 (3.5) | 1* |
| Instrumental (N=674) | 6 (14.3) | 107 (16.9) | 0.657 |
| Episiotomía (N=674) | 13 (31) | 222 (35.1) | 0.583 |
| Antibióterapia por desgarro (N=23) | 1 (100) | 15 (68.2) | 1* |

TRA: Terapia de reproducción avanzada

HTA: Hipertensión arterial

BLEE: Betalactamasa de espectro extendido

Nota: N varía en la variable "Portadora de *S. agalactiae*" dado que no se toman aquellas par las que se desconocía el estado de portador. Además varía en las últimas variables dado que se toman sólo los partos vaginales, y en el caso de "Antibióterapia por desgarro" sólo aquellos partos que lo requirieron.

4.4 Factores de riesgo colonización por enterobacterias productoras de BLEE en madres en el momento del parto.

Como se ha comentado, se han incluido en este análisis 811 mujeres, de las cuales estaban colonizadas 55. Se exponen a continuación los análisis de la asociación entre la colonización y las distintas variables estudiadas (análisis univariantes). En la tabla 15 se muestran las variables sociodemográficas estudiadas. Para las distintas variables se exploraron distintas posibilidades de dicotomización, mostrándose las relevantes en función de la asociación encontrada o del sentido clínico-epidemiológico.

Tabla 16: Análisis univariante del riesgo de colonización materna por enterobacterias productoras de BLEE en función de la exposición a factores sociodemográficos.

| Variable | | Colonizadas / expuestas (%) | RR (IC 95%) | p |
|--------------------------------------|----------------|--------------------------------|------------------|--------|
| Edad materna en años | ≤30 | 24/375 (6.5) | 0.90 (0.53-1.51) | 0.68 |
| | >30 | 31/436 (7.1) | | |
| Raza materna | No caucásica | 12/70 (17.1) | 2.95 (1.63-5.35) | 0.001* |
| | Caucásica | 43/741 (5.8) | | |
| Tiempo en España en meses | ≤24 | 3/15 (20) | 3.06 (1.07-8.71) | 0.07* |
| | >24 | 52/796 (6.5) | | |
| Nivel de estudios | No o primarios | 21/245 (8.6) | 1.42 (0.84-2.40) | 0.18 |
| | Más avanzados | 34/566 (6) | | |
| Convivientes | 1-2 | 23/375 (7.1) | 1.07 (0.64-1.80) | 0.78 |
| | >2 | 32/486 (6.6) | | |
| Cuidadora de enfermo | No | 49/752 (6.5) | 1.56 (0.69-3.57) | 0.27* |
| | Sí | 6/59 (10.2) | | |
| Viajes al extranjero | No | 43/680 (6.3) | 1.45 (0.78-2.67) | 0.23 |
| | Sí | 12/131 (9.2) | | |
| Comida principal fuera de casa | >15 mes | 16/116 (13.8) | 2.46 (1.42-4.25) | 0.01 |
| | ≤15 mes | 39/695 (5.6) | | |

*Test de Fisher (el resto se calculó mediante Chi cuadrado).

Por tanto, se encontró que las mujeres de etnias distintas a la caucásica, las que tenían una estancia en España de 24 meses o menos y las que habían hecho la comida principal más de 15 veces fuera de su casa tenían más riesgo de estar colonizadas.

La asociación con variables obstétricas previas al parto se muestran en la tabla 17.

Tabla 17: Análisis univariante del riesgo para la colonización materna por enterobacterias productoras de BLEE para factores obstétricos anteparto

| Variable | | Colonizadas / expuestas (%) | RR (IC 95%) | p |
|--|----|--------------------------------|------------------|-------|
| Multigesta | Sí | 32/474 (6.8) | 1.01 (0.60-1.69) | 0.96 |
| | No | 23/337 (6.8) | | |
| Multípara | Sí | 22/345 (6.4) | 1.11 (0.65-1.87) | 0.69 |
| | No | 33/466 (7.1) | | |
| Abortos previos | Sí | 14/172 (8.1) | 1.27 (0.70-2.27) | 0.42 |
| | No | 41/639 (6.4) | | |
| Cesárea previa | Sí | 4/80 (5) | 0.71 (0.26-1.93) | 0.50 |
| | No | 51/731 (7) | | |
| Complicaciones en gestaciones anteriores | Sí | 6/42 (14.3) | 2.24 (1.01-4.92) | 0.05* |
| | No | 49/769 (6.4) | | |
| Gestación múltiple | Sí | 0/18 (0) | - | 0.62 |
| | No | 55/793 (6.9) | | |
| Terapia de reproducción avanzada | Sí | 2/21 (9.5) | 1.42 (0.37-5.43) | 0.64* |
| | No | 53/790 (6.7) | | |
| Hipertensión arterial pregestacional | Sí | 0/10 (0) | - | 1* |
| | No | 55/801 (6.9) | | |
| Hipertensión arterial gestacional (n=801) | Sí | 4/31 (12.9) | 1.94 (0.75-5.05) | 0.15 |
| | No | 51/770 (6.6) | | |
| Preeclampsia | Sí | 1/5 (20) | 2.98 (0.50-1.75) | 0.23 |
| | No | 54/806 (6.7) | | |
| Diabetes pregestacional | Sí | 0/7 (0) | - | 1* |
| | No | 55/804 (6.8) | | |
| Diabetes gestacional (n=804) | Sí | 3/36 (8.3) | 1.23 (0.40-3.75) | 0.72* |
| | No | 52/768 (6.8) | | |
| Insuficiencia Renal | Sí | 0/1 (0) | - | 1* |
| | No | 55/810 (6.8) | | |

Resultados

| | | | | |
|--|----|---------------|------------------|-------|
| Hepatopatía | Sí | 0/4 (0) | - | 1* |
| | No | 55/807 (6.8) | | |
| Cardiopatía | Sí | 0/4 (0) | - | 1* |
| | No | 55/807 (6.8) | | |
| Inmunosupresores | Sí | 0/4 (0) | - | 1* |
| | No | 55/807 (6.8) | | |
| Infección urinaria | Sí | 16/138 (11.6) | 2.0 (1.15-3.47) | 0.02* |
| | No | 39/673 (5.8) | | |
| Más de un episodio de infección urinaria | Sí | 14/92 (15.2) | 2.66 (1.15-4.69) | 0.001 |
| | No | 41/719 (5.7) | | |
| Tratamiento previo con cualquier antibiótico durante el embarazo | Sí | 16/170 (9.4) | 1.54 (0.88-2.7) | 0.125 |
| | No | 39/641 (6.1) | | |
| Tratamiento previo con cualquier antibiótico en los últimos seis meses | Sí | 11/148 (7.4) | 1.11 (0.59-2.11) | 0.72 |
| | No | 44/633 (6.6) | | |
| Tratamiento previo con fosfomicina | Sí | 8/98 (8.2) | 1.23 (0.60-2.54) | 0.562 |
| | No | 47/713 (6.6) | | |
| Tratamiento previo con betalactámicos | Sí | 8/91 (8.8) | 1.34 (0.65-2.76) | 0.418 |
| | No | 47/720 (6.5) | | |
| Más de un ciclo de antibioterapia | Sí | 1/23 (4.3) | 0.63 (0.09-4.38) | 1* |
| | No | 54/788 (6.9) | | |
| Ingreso hospitalario durante el embarazo | Sí | 1/48 (2.1) | 0.29 (0.04-2.08) | 0.24* |
| | No | 54/763 (7.1) | | |
| Más de 38 semanas de amenorrea | Sí | 53/764 (6.9) | 0.62 (0.24-1.63) | 0.31 |
| | No | 4/36 (11.1) | | |
| Más de 41 semanas de amenorrea | Sí | 11/158 (7) | 1.03 (0.54-1.95) | 0.92 |
| | No | 44/653 (6.7) | | |
| Rotura prematura de membranas | Sí | 35/526 (6.7) | 1.05 (0.62-1.79) | 0.84 |
| | No | 20/258 (7) | | |
| Portadora de <i>S. agalactiae</i> (n=757) | Sí | 9/133 (6.8) | 0.95 (0.48-1.91) | 0.90 |
| | No | 44/624 (7.1) | | |

*Test de Fisher (el resto se calculó mediante chi cuadrado).

Nota: N varía en los apartados hipertensión arterial pregestacional y gestacional dado que una mujer no puede tener ambas a la vez. Lo mismo sucede con las variables diabetes gestacional y diabetes pregestacional. En el caso de portador de *S. agalactiae* se excluyeron aquellos casos en que se desconocía el estado materno.

Se encontró mayor riesgo de colonización en mujeres con complicaciones en gestaciones anteriores y en aquellas que habían sufrido una infección urinaria durante el embarazo (la asociación fue mayor en caso de haber sufrido más de una infección urinaria). Sin embargo no se encontró asociación con haber recibido antibioterapia en general, durante el embarazo ni en los seis últimos meses de gestación. Tampoco se observó asociación según el tipo de antibiótico usado, ya fuera fosfomicina o un betalactámico (amoxicilina con o sin clavulánico o cefalosporina) Es relevante señalar que algunas de las variables estudiadas presentaron una muy baja o nula frecuencia de exposición, lo que hace que la potencial asociación que pudieran tener no se ha podido analizar; es el caso de diversas patologías de base como cardiopatías, insuficiencia renal, hepatopatía, hipertensión pregestacional, diabetes pregestacional o el tratamiento con inmunosupresores.

El análisis de las variables obstétricas intraparto se muestra en la tabla 18.

Tabla 18: Análisis univariante del riesgo para la colonización materna por enterobacterias productoras de BLEE para factores obstétricos intraparto.

| Variable | | Colonizadas / expuestas (%) | RR (IC 95%) | p |
|------------------------------------|----|--------------------------------|------------------|------|
| Antibióterápia intraparto | Sí | 25/362 (6.9) | 1.03 (0.01-1.72) | 0.89 |
| | No | 30/449 (6.7) | | |
| Parto >12 horas | Sí | 44/633 (6.6) | 0.89 (0.47-1.68) | 0.72 |
| | No | 11/148 (7.4) | | |
| Parto >8 horas | Sí | 18/257 (7) | 1.04 (0.62-1.80) | 0.86 |
| | No | 37/554 (6.7) | | |
| Anestesia epidural | Sí | 44/681 (6.5) | 0.76 (0.40-1.43) | 0.40 |
| | No | 11/130 (8.5) | | |
| Enema | Sí | 1/16 (6.2) | 0.91 (0.13-6.25) | 1* |
| | No | 54/795 (6.8) | | |
| Sondaje urinario | Sí | 21/276 (7.6) | 1.19 (0.71-2.02) | 0.50 |
| | No | 34/535 (6.4) | | |
| Parto inducido | Sí | 13/154 (8.4) | 1.32 (0.72-2.39) | 0.36 |
| | No | 42/657 (6.4) | | |
| Cesárea | Sí | 13/137 (9.5) | 1.52 (0.84-2.76) | 0.16 |
| | No | 42/674 (6.2) | | |
| Desgarro vaginal (N=674) | Sí | 20/357 (5.6) | 0.80 (0.44-1.45) | 0.47 |
| | No | 22/317 (6.9) | | |
| Desgarro grado III o IV (N=674) | Sí | 1/23 (4.3) | 0.69 (0.09-4.80) | 1* |
| | No | 41/651 (6.3) | | |
| Parto instrumental (N=674) | Sí | 6/113 (5.3) | 0.82 (0.35-1.91) | 0.65 |
| | No | 36/561 (6.4) | | |
| Episiotomía (N=674) | Sí | 13/235 (5.5) | 0.83 (0.44-1.57) | 0.58 |
| | No | 29/439 (6.6) | | |

*Test de Fisher (el resto se calculó mediante chi cuadrado).

Nota: N varía en las últimas variables dado que se toman como referencia sólo los partos vaginales.

Por tanto, no se encontró asociación entre variables intraparto y la colonización por enterobacterias productoras de BLEE. La duración del parto se dicotomizó con dos puntos de corte (8 horas y 12 horas), en base a la media de duración del parto y en el hecho de que las bolsas rotas se suelen inducir en nuestro servicio a las doce horas. Para las variables relacionadas con el desgarro vaginal, la instrumentación y la episiotomía solo se consideraron los partos vaginales.

A continuación se realizó el análisis multivariante. En el mismo se incluyeron las variables "Complicaciones en gestaciones anteriores", "Más de un episodio de infección urinaria", "Raza no caucásica" y "Comida principal >15 días fuera de casa". El modelo final se muestra en la tabla 19.

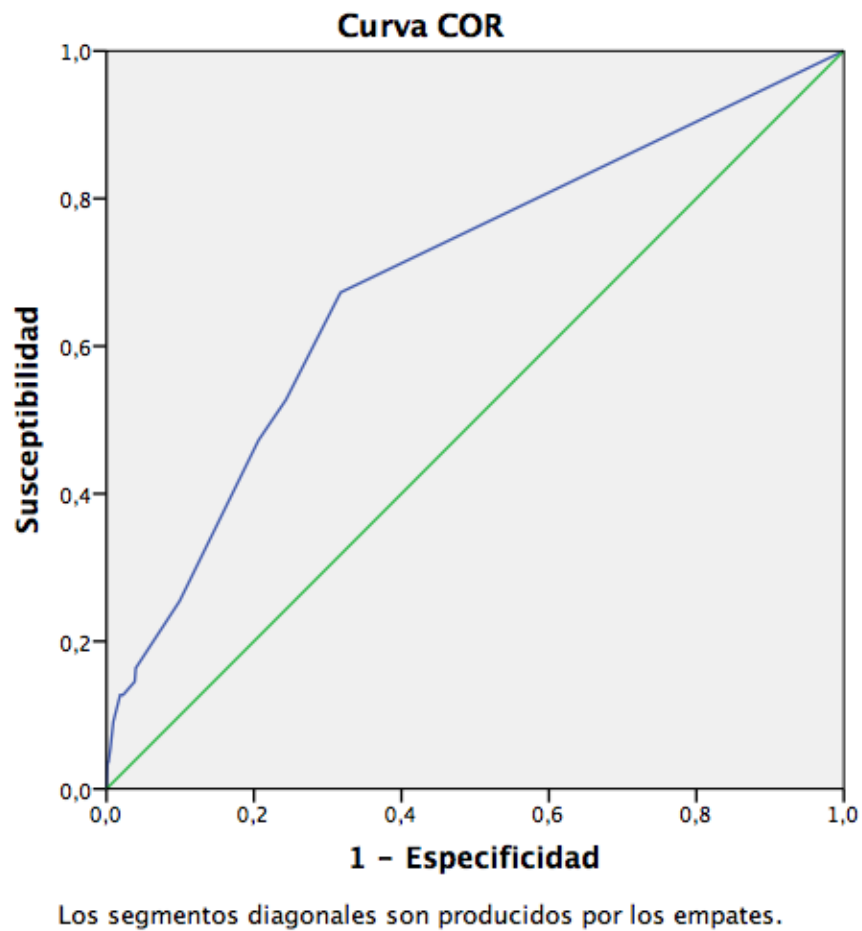
Tabla 19: Análisis multivariante de los factores de riesgo para la colonización por enterobacterias productoras de BLEE en el momento del parto.

| Variables | β | OR (IC 95%) | P |
|--|---------------------------|--------------------|----------|
| Complicaciones en gestaciones anteriores | 1,027 | 2,79 (1,08-7,17) | 0,03 |
| Más de un episodio de infección urinaria | 1,004 | 2,73 (1,38-5,37) | 0,004 |
| Raza no caucásica | 1,238 | 3,45 (1,67-7,11) | 0,001 |
| Comida principal >15 días fuera de casa | 1,070 | 2,91 (1,52-5,55) | 0,001 |

Por tanto, haber tenido complicaciones en gestaciones anteriores, haber sufrido más de un episodio de infección urinaria, ser de etnia no caucásica y haber realizado la comida principal más de 15 días el último mes se asociaron de forma independiente con mayor riesgo de estar colonizadas. Cabe resaltar que los modelos con al menos un episodio de infección urinaria y con al menos siete comidas principales fuera de casa en el último mes de embarazo también fueron válidos aunque con una menor significación.

Para evaluar la capacidad predictiva del modelo sobre los datos observados, se realizó una curva COR (figura 1); el área bajo la curva fue de 0,69 (IC 95%: 0,61-0,76), lo que indica una capacidad de predicción moderada-baja.

Figura 1: Curva COR del modelo multivariante del estado de portador materno



4.7 Prevalencia de colonización en neonatos.

Se estudiaron 800 recién nacidos de los que el estado de portadora de enterobacterias productoras de BLEE de la madre era conocido. En 11 casos no se estudió al neonato. Las características de los neonatos se muestra en la tabla 20.

Tabla 20: Características básicas de los 800 recién nacidos estudiados.

Los datos se muestran como número de neonatos (porcentaje) excepto donde se especifica.

| Variable | | Valor |
|---------------------------|------------|------------------|
| Sexo | Varón | 430 (53.8) |
| Peso | Media (DE) | 3.280 gr (472.9) |
| Bajo peso | <2500 gr | 41 (5.12) |
| Macrosoma | >4000 gr | 45 (5.62) |
| APGAR min 1 | Mediana | 10 |
| APGAR min 5 | Mediana | 10 |
| APGAR min 10 | Mediana | 10 |
| Aspiración de secreciones | | 241 (30.1) |
| Lavado gástrico | | 43 (5.4) |
| Ingreso en neonatología | | 5 (0.6) |

En total, 13 neonatos (prevalencia: 1,6%; IC 95%: 0.75-2.5) estaban colonizados por enterobacterias productoras de BLEE. Se hallaron 14 aislados productores de AmpC (ninguno *E. coli*) lo que supone una prevalencia del 1.75% (IC 95%:0.84-2.66). No se encontraron neonatos colonizados por enterobacterias productoras de carbapenemasas.

4.8 Características microbiológicas de las enterobacterias productoras de BLEE aisladas de neonatos en relación con las de sus madres.

En todos los neonatos colonizados, la enterobacteria productora de BLEE fue *E. coli* (7 del filogrupo A, 3 del D, 2 del B2 y 1 del B1). Los enzimas producidos fueron de la familia CTX-M en 7 (53,8%) y SHV-12 en 6 (46,2%). La enzima más frecuente fue SHV-12 (6), seguida de CTX-M-14 (5), CTX-M-15 (1) y CTX-M-1 (1).

En 10 de los neonatos colonizados, su madre también lo estaba en el momento del parto; en 8 de ellos, el aislado de la madre y el recién nacido poseían el mismo PFGE y eran productores de la misma BLEE (CTX-M-14 en 5, SHV-12 en 2 y CTX-M-1 en 1); en uno de los dos casos restantes, la madre estaba colonizada por *E. coli* productor de CTX-M-14 y el neonato por *E. coli* productor de SHV-12 y por *K.*

pneumoniae también productor de SHV-12, y en otro caso la madre estaba colonizada por *K. pneumoniae* productor de SHV-2 y el neonato por *E. coli* productor de SHV-12 (este último caso se describió en el brote nosocomial anteriormente expuesto).

4.9 Transmisión vertical

En base a los datos anteriores, se considera que hubo transmisión vertical inequívoca en 8 casos (aislados con idéntico patrón de PFGE) de 57 madres colonizadas con neonato estudiado (14%). Si incluimos solo a aquellas que parieron por vía vaginal y descartamos a aquellas con parto por cesárea (n=46) la tasa aumenta hasta el 17.39% y si lo que consideramos es el total de parejas madre-hijo estudiadas (n=800), la tasa de transmisión es del 1%.

La madre de los otros 3 neonatos colonizados no se detectó como tal; en estos 3 neonatos, los aislados pertenecían al filogrupo A y las BLEE producidas fueron SHV-12 en dos casos y CTX-M-15 en uno.

4.10 Factores de riesgo para la colonización periparto por enterobacterias productoras de BLEE en neonatos

En este análisis se evaluó la frecuencia de exposición a distintas variables en los neonatos colonizados y no colonizados. Se incluyeron todos los neonatos colonizados, independientemente de que lo fueran por la misma cepa que la madre. Los resultados se muestran en las tablas 21 a 24.

Tabla 21: Análisis univariante de la asociación entre las características de los neonatos y la colonización por enterobacterias productoras de BLEE.

| Variable | | Colonizados / expuestas (%) | RR (IC 95%) | p |
|------------------------------|-------|--------------------------------|------------------|--------|
| Sexo | Varón | 5/430 (1.2) | 1.85 (0.61-5.64) | 0.265 |
| | Mujer | 8/370 (2.2) | | |
| Bajo peso | Sí | 0/41 (0) | - | 1* |
| | No | 13/759 (1.7) | | |
| Macrosoma | Sí | 1/45 (2.2) | 1.39 (0.18-1.05) | 0.532* |
| | No | 12/755 (1.6) | | |
| APGAR min 1 | ≥8 | 13/760 (1.7) | - | 1* |
| | <8 | 0/40 (0) | | |
| APGAR min 5 | ≥8 | 13/799 (1.6) | - | 1* |
| | <8 | 0/1 (0) | | |
| APGAR min 10 | ≥8 | 13/799 (1.6) | - | 1* |
| | <8 | 0/1 (0) | | |
| Aspiración de secreciones | Sí | 3/241 (1.2) | 0.69 (0.19-2.5) | 0.764* |
| | No | 10/559 (1.8) | | |
| Lavado gástrico | Sí | 0/43 (0) | - | 1* |
| | No | 13/757 (1.7) | | |
| Ingreso en neonatología | Sí | 0/5 (0) | - | 1* |
| | No | 13/795 (1.6) | | |

*Test de Fisher (el resto se calculó mediante Chi cuadrado).

Tabla 22: Análisis univariante de la asociación entre los factores demográficos de la madre y la colonización neonatal por enterobacterias productoras de BLEE.

| Variable | | Colonizados / expuestos (%) | RR (IC 95%) | p |
|-----------------------------------|--------------|--|--------------------|----------|
| Edad materna en años | ≤30 | 6/367 (1.6) | 1.01 (0.34-2.98) | 0.98 |
| | >30 | 7/433 (1.6) | | |
| Raza materna | No caucásica | 2/70 (2.9) | 1.89 (0.42-8.38) | 0.31* |
| | Caucásica | 11/730 (1.5) | | |
| <24 meses en España | Sí | 0/14 (0) | - | 1* |
| | No | 13/786 (1.6) | | |
| >Estudios primarios | Sí | 8/560 (1.4) | 0.68 (0.22-2.07) | 0.54* |
| | No | 5/240 (2.1) | | |
| Estudios terciarios | Sí | 3/217 (1.4) | 0.80 (0.22-2.89) | 1* |
| | No | 10/583 (1.7) | | |
| Convivientes | 1 ó 2 | 6/332 (1.9) | 1.27 (0.43-3.75) | 0.66 |
| | >2 | 7/478 (1.5) | | |
| Cuidador de enfermo | Sí | 1/58 (1.7) | 1.06 (0.14-8.06) | 1* |
| | No | 12/742 (1.6) | | |
| Viajes extranjero | Sí | 1/126 (0.8) | 0.44 (0.05-3.40) | 0.70* |
| | No | 12/674 (1.8) | | |
| Comida principal fuera de casa | >15 días | 3/114 (2.6) | 1.80 (0.50-6.45) | 0.41* |
| | <15 días | 10/686 (1.5) | | |
| Comida principal fuera de casa II | >7 días | 5/291 (1.7) | 1.09 (0.36-3.31) | 1* |
| | <7 días | 8/509 (1.6) | | |

*Test de Fisher (en el resto se analizó mediante Chi cuadrado)

Tabla 23: Análisis univariante del riesgo para la colonización neonatal por enterobacterias productoras de BLEE para factores obstétricos anteparto

| Variable | | Colonizados / expuestos (%) | RR (IC 95%) | p |
|---|----|--------------------------------|-------------------|-------|
| Multigesta | Sí | 7/467 (1.5) | 0.83 (0.28-2.45) | 0.73 |
| | No | 6/333 (1.8) | | |
| Multípara | Sí | 5/338 (1.5) | 0.85 (0.28-2.59) | 0.78 |
| | No | 8/462 (1.7) | | |
| Aborto previo | Sí | 3/171 (1.8) | 1.10 (0.30-3.96) | 1* |
| | No | 10/629 (1.6) | | |
| Cesárea previa | Sí | 2/80 (2.5) | 1.63 (0.36-7.24) | 0.37* |
| | No | 11/720 (1.5) | | |
| Complicaciones gestación anterior | Sí | 1/41 (2.4) | 1.54 (0.20-1.16) | 0.49* |
| | No | 1/759 (1.6) | | |
| Portadora de <i>S.</i> <i>agalactiae</i> (n=762) | Sí | 3/129 (2.3) | 1.47 (0.41-5.26) | 0.47* |
| | No | 10/633 (1.6) | | |
| Terapia de reproducción avanzada | Sí | 1/25 (4) | 2.58 (0.34-19.23) | 0.34 |
| | No | 12/775 (1.5) | | |
| Hipertensión pregestacional | Sí | 0/10 (0) | - | 1* |
| | No | 13/790 (1.6) | | |
| Hipertensión gestacional | Sí | 0/32 (0) | - | 1* |
| | No | 13 /768 (1.7) | | |
| Preeclampsia | Sí | 0/5 (0) | - | 1* |
| | No | 13/795 | | |
| Diabetes pregestacional | Sí | 0/7 (0) | - | 1* |
| | No | 13/787 (1.6) | | |
| Diabetes gestacional (n=793) | Sí | 2/36 (5.6) | 3.81 (0.87-16.6) | 0.11* |
| | No | 11/757 (1.5) | | |
| Insuficiencia renal | Sí | 0/1 (0) | - | 1* |
| | No | 13/799 (1.6) | | |
| Hepatopatía | Sí | 0/4 (0) | - | 1* |
| | No | 13/796 (1.6) | | |
| Cardiopatía | Sí | 0/4 (0) | - | 1* |
| | No | 13/796 (1.6) | | |

Resultados

| | | | | |
|--|----|--------------|----------------------|--------|
| Inmunosupresores | Sí | 0/4 (0) | - | 1* |
| | No | 13/796 (1.6) | | |
| Infección urinaria | Sí | 4/137 (2.9) | 2.15 (0.67-6.89) | 0.25* |
| | No | 9/663 (1.4) | | |
| Más de una infección urinaria | Sí | 3/92 (3.3) | 2.30 (0.64-8.26) | 0.18* |
| | No | 10/708 (1.4) | | |
| Tratamiento previo con cualquier antibiótico durante el embarazo | Sí | 4/167 (2.4) | 1.68 (0.52-5.40) | 0.376* |
| | No | 9/633 (1.4) | | |
| Antibioterapia en los últimos 6 meses | Sí | 3/147 (2) | 1.33 (0.37-4.78) | 0.71* |
| | No | 10/653 (1.5) | | |
| Tratamiento previo con fosfomicina | Sí | 4/97 (4.1) | 3.22 (1.01-10.3) | 0.61* |
| | No | 9/703 (1.3) | | |
| Tratamiento previo con betalactámicos | Sí | 3/92 (3.3) | 7.99 (0.64-8.26) | 0.180* |
| | No | 10/708 (1.4) | | |
| Más de un ciclo de antibioterapia | Sí | 2/24 (8.3) | 5.88 (1.37-25) | 0.055* |
| | No | 11/776 (1.4) | | |
| Ingreso hospitalario | Sí | 1/47 (2.1) | 1.33 (0.17-10.10) | 0.54* |
| | No | 12/753 (1.6) | | |
| Gestación >37 semanas | Sí | 12/764 (1.6) | 0.56 (0.07-4.23) | 0.45* |
| | No | 1/36 (2.8) | | |
| Gestación >41 semanas | Sí | 1/155 (0.6) | 0.34 (0.04-2.64) | 0.48* |
| | No | 12/645 (1.9) | | |
| Rotura prematura de membranas | Sí | 6/282 (2.1) | 1.57 (0.48-5.02) | 0.39* |
| | No | 7/518 (1.4) | | |
| Madre colonizada por E-BLEE | Sí | 10/57 (17.5) | 43.47 (12.34-142.85) | <0.001 |
| | No | 3/743 (0.4) | | |
| Madre colonizada por adquisición nosocomial | Sí | 1/4 (25) | 16.66 (2.77-100) | 0.06* |
| | No | 12/796 (1.5) | | |

*Test exacto de Fisher (el resto se estudió mediante Chi cuadrado).

Tabla 24: Análisis univariante del riesgo para la colonización neonatal por enterobacterias productoras de BLEE para factores obstétricos intraparto

| Variables | | Colonizados / expuestos (%) | RR (IC 95%) | p |
|-----------------------------------|----|--------------------------------|-------------------|-------|
| Antibióterapia intraparto | Sí | 7/354 (2) | 1.47 (0.49-4.32) | 0.48 |
| | No | 6/446 (1.4) | | |
| Parto >12 horas | Sí | 2/147 (1.4) | 0.80 (0.18-3.61) | 1* |
| | No | 11/653 (1.7) | | |
| Parto >8 horas | Sí | 6/258 (2.3) | 1.80 (0.61-5.29) | 0.36* |
| | No | 7/542 (1.3) | | |
| Anestesia epidural | Sí | 11/674 (1.6) | 1.02 (0.23-4.58) | 1* |
| | No | 2/126 (1.6) | | |
| Enema | Sí | 0/16 (0) | - | 1* |
| | No | 13/784 (1.7) | | |
| Sondaje urinario | Sí | 8/533 (1.5) | 0.80 (0.26-2.42) | 0.76* |
| | No | 5/267 (1.9) | | |
| Parto inducido | Sí | 3/156 (1.9) | 1.23 (0.34-4.44) | 0.72* |
| | No | 10/644 (1.6) | | |
| Parto vaginal | Sí | 13/670 (1.9) | - | 0.14* |
| | No | 0/130 (0) | | |
| Desgarro vaginal | Sí | 7/354 (2) | 1.41 (0.35-3.06) | 0.94 |
| | No | 6/316 (1.9) | | |
| Desgarro vaginal grados III-IV | Sí | 1/25 (4) | 2.15 (0.29-15,87) | 0.39* |
| | No | 12/645 (1.9) | | |
| Parto instrumental | Sí | 4/116 (3.4) | 2.12 (0.66-6.75) | 0.25* |
| | No | 9/554 (1.6) | | |
| Episiotomía | Sí | 5/237 (2.1) | 1.14 (0.37-3.44) | 0.77* |
| | No | 8/433 (1.8) | | |

*Test exacto de Fisher (el resto se estudió mediante Chi cuadrado). Para el análisis de los factores relacionados con el desgarro, la instrumentación y la episiotomía solo se incluyeron los partos vía vaginal.

Como se aprecia en las tablas, la única variable asociada a la colonización del neonato fue que la madre estuviera colonizada. Dado que todos los recién nacidos colonizados habían nacido por vía vaginal, se decidió realizar el análisis multivariante solo con los niños nacidos por esta vía. Se incluyeron las variables con un valor univariante de $p < 0.2$; ninguna variable influyó significativamente en la asociación de la colonización de la madre con el riesgo de colonización neonatal. Por tanto, el modelo equivale a la asociación univariante entre colonización de la madre y la colonización neonatal, que mostró una OR de 57,5 (IC 95%: 15,1-218,1; $p < 0.001$).

4.11 Factores de riesgo de neonato colonizado en madres colonizadas con parto vaginal.

Finalmente, entre los 46 neonatos nacidos por vía vaginal de madres colonizadas (incluyendo las que se colonizaron en el brote nosocomial) se investigaron los factores asociados a la colonización neonatal; 10 de estos 46 neonatos estaban colonizados. No se encontró ninguna variable de las estudiadas como asociadas a mayor riesgo de colonización neonatal.

Tabla 25: Análisis univariante del riesgo para la colonización neonatal por enterobacterias productoras de BLEE para factores sociodemográficos maternos en partos vaginales

| Factor de riesgo de transmisión BLEE de madres portadoras con partos vaginales (n=49) | Nºcolonizados / Nºexpuestos (%) | RR (IC 95%) | p | |
|--|--|--------------------|------------------|--------|
| Edad materna | ≤30 | 5/22 (22.7) | 1.09 (0.36-3.26) | 1* |
| | >30 | 5/24 (20.8) | | |
| Raza materna | No caucásica | 2/12 (16.7) | 0.71 (0.17-2.88) | 1* |
| | Caucásica | 8/34 (23.5) | | |
| <24 meses en España | Sí | 0/2 (0) | - | 1* |
| | No | 10/44 (22.7) | | |
| >Estudios primarios | Sí | 6/27 (22.2) | 1.05 (0.34-3.23) | 1* |
| | No | 4/19 (21.1) | | |
| Estudios terciarios | Sí | 1/10 (10) | 0.4 (0.05-2.79) | 0.420* |
| | No | 9/36 (25) | | |
| Convivientes | 1 ó 2 | 4/16 (25) | 1.25 (0.41-3.79) | 0.720* |
| | >2 | 6/30 (20) | | |
| Cuidador de enfermo | Sí | 1/4(25) | 1.16 (0.19-6.99) | 1* |
| | No | 9/42 (21.4) | | |
| Viajes extranjero | Sí | 1/8 (12.5) | 0.52 (0.07-3.59) | 0.664* |
| | No | 8/38 (23.7) | | |
| Comida principal fuera de casa | >15 días | 3/12 (25) | 1.21 (0.37-3.95) | 0.706* |
| | <15 días | 7/34 (20.6) | | |
| Comida principal fuera de casa II | >7 días | 5/20 (25) | 1.30 (0.43-3.87) | 0.726* |
| | <7 días | 5/26 (19.2) | | |

BLEE: Betalactamasa de espectro extendido

*Test exacto de Fisher

Resultados

Tabla 26: Análisis univariante del riesgo para la colonización neonatal por enterobacterias productoras de BLEE para factores obstétricos anteparto en partos vaginales

| Factor de riesgo de transmisión BLEE de madres portadoras con partos vaginales (n=49) | | Nºcolonizados / Nºexpuestos (%) | RR (IC 95%) | p |
|---|----|---------------------------------|------------------|--------|
| Multigesta | Sí | 5/27 (18.5) | 0.70 (0.23-2.09) | 0.719* |
| | No | 5/19 (26.3) | | |
| Múltipara | Sí | 4/20 (20) | 0.86 (0.28-2.66) | 1* |
| | No | 6/26 (23.1) | | |
| Aborto previo | Sí | 2/12 (16.7) | 0.70 (0.17-2.88) | 1* |
| | No | 8/34 (23.5) | | |
| Cesárea previa | Sí | 1/3 (33.3) | 1.59 (0.29-8.77) | 0.530* |
| | No | 9/43 (20.9) | | |
| Complicaciones gestación anterior | Sí | 1/6 (16.7) | 0.74 (0.11-4.85) | 1* |
| | No | 9/40 (22.5) | | |
| TRA | Sí | 0/2 (0) | - | 1* |
| | No | 10/44 (22.7) | | |
| HTA pregestacional | Sí | 0/0 (0) | - | 1* |
| | No | 10/46 (21.7) | | |
| HTA gestacional | Sí | 0/0 (0) | - | 1* |
| | No | 10/46 (21.7) | | |
| Preeclampsia | Sí | 0/1 (0) | - | 1* |
| | No | 10/45 (22.2) | | |
| Diabetes pregestacional | Sí | 0/0 (0) | - | 1* |
| | No | 10/46 (21.7) | | |
| Diabetes gestacional | Sí | 2/3 (66.7) | 3.58 (1.29-9.90) | 0.115* |
| | No | 8/43 (18.6) | | |
| Insuficiencia renal | Sí | 0/0 (0) | - | 1* |
| | No | 10/46 (21.7) | | |
| Hepatopatía | Sí | 0/0 (0) | - | 1* |
| | No | 10/46 (21.7) | | |
| Cardiopatía | Sí | 0/0 (0) | - | 1* |
| | No | 10/46 (21.7) | | |

| | | | | |
|--|----|--------------|------------------|--------|
| Inmunosupresores | Sí | 0/0 (0) | - | 1* |
| | No | 10/46 (21.7) | | |
| ITU de repetición | Sí | 2/12 (16.7) | 0.70 (0.17-2.88) | 1* |
| | No | 8/34 (23.5) | | |
| Al menos una ITU | Sí | 3/10 (30) | 1.54 (0.48-4.90) | 0.666* |
| | No | 7/36 (19.4) | | |
| Tratamiento previo con cualquier antibiótico durante el embarazo | Sí | 3/14 (21.4) | 0.97 (0.29-3.24) | 1* |
| | No | 7/32 (21.9) | | |
| ATB <6 meses | Sí | 2/10 (20) | 0.90 (0.22-3.58) | 1* |
| | No | 8/36 (23.1) | | |
| Tratamiento previo con fosfomicina | Sí | 1/6 (16.7) | 0.74 (0.11-4.85) | 1* |
| | No | 9/40 (22.5) | | |
| Tratamiento previo con betalactámicos | Sí | 2/8 (25) | 1.18 (0.30-4.56) | 1* |
| | No | 8/38 (21.1) | | |
| Más de un ciclo de antibioterapia | Sí | 0/1 (0) | - | 1* |
| | No | 10/45 (22.2) | | |
| Ingreso hospital | Sí | 1/1 (100) | 5 (2.78-9) | 0.217* |
| | No | 9/45 (20) | | |
| >38 Semanas | Sí | 9/42 (21.4) | 0.85 (0.14-5.15) | 1* |
| | No | 1/4 (25) | | |
| >41 Semanas | Sí | 0/5 (0) | - | 0.570* |
| | No | 10/41 (24.4) | | |
| RPM | Sí | 4/20 (20) | 0.86 (0.28-2.66) | 1* |
| | No | 6/26 (23.1) | | |
| Portadora de <i>S. agalactiae</i> | Sí | 3/7 (42.9) | 2.38 (0.80-7.09) | 0.163* |
| | No | 7/39 (17.9) | | |
| Nosocomial | Sí | 1/4 (25) | 1.16 (0.19-6.99) | 1* |
| | No | 10/42 (21.4) | | |

BLEE: Betalactamasa de espectro extendido

*Test exacto de Fisher

TRA: Terapia de reproducción avanzada

HTA: hipertensión

ITU: Infección del tracto urinario bajo

ATB: Antibiótico

RPM: Rotura prematura de membranas

Resultados

Tabla 27: Análisis univariante del riesgo para la colonización neonatal por enterobacterias productoras de BLEE para factores obstétricos intraparto en partos vaginales

| Factor de riesgo de transmisión BLEE de madres portadoras con partos vaginales (n=49) | | Nºcolonizados / Nºexpuestos (%) | RR (IC 95%) | p |
|---|----|---------------------------------|------------------|--------|
| ATB intraparto | Sí | 5/19 (26.3) | 1.42 (0.47-4.23) | 0.719* |
| | No | 5/27 (18.5) | | |
| Parto >12 horas | Sí | 2/9 (22.2) | 1.02 (0.26-4.03) | 1* |
| | No | 8/37 (21.6) | | |
| Parto >8 horas | Sí | 6/17 (29.4) | 1.70 (0.57-5.05) | 0.462* |
| | No | 5/29 (17.2) | | |
| Epidural | Sí | 8/35 (22.9) | 1.25 (0.31-5.07) | 1* |
| | No | 2/11 (18.2) | | |
| Enema | Sí | 0/1 (0) | - | 1* |
| | No | 10/45 (22.2) | | |
| Sondaje | Sí | 6/24 (25) | 1.27 (0.44-4.23) | 0.725* |
| | No | 4/22 (18.2) | | |
| Inducido | Sí | 3/12 (25) | 1.21 (0.37-3.95) | 0.706* |
| | No | 7/34 (20.6) | | |
| Desgarro | Sí | 3/23 (21.7) | 1 (0.33-2.99) | 1* |
| | No | 5/23 (21.7) | | |
| Desgarro III-IV | Sí | 0/3 (0) | - | 1* |
| | No | 10/43 (23.3) | | |
| Instrumental | Sí | 3/9 (33.3) | 1.76 (0.56-5.49) | 0.384* |
| | No | 7/37 (18.9) | | |
| Episiotomía | Sí | 3/16 (18.8) | 0.80 (0.23-2.68) | 1* |
| | No | 7/30 (23.3) | | |
| ATB por desgarro | Sí | 0/3 (0) | - | 1* |
| | No | 10/45 (22.2) | | |

BLEE: Betalactamasa de espectro extendido

*Test exacto de Fisher

ATB: Antibiótico

D-III: Desgarro nivel III

D-IV: Desgarro nivel IV

Tabla 28: Riesgo de transmisibilidad según el grupo de la BLEE

| Factor de riesgo de transmisión BLEE de madres portadoras con partos vaginales (n=49) | | Nºcolonizados / Nºexpuestos (%) | RR (IC 95%) | p |
|---|----|---------------------------------|------------------|--------|
| CTX-M-1 | Sí | 1/11 (9.1) | 0.34 (0.05-2.40) | 0.415* |
| | No | 10/38 (26.1) | | |
| CTX-M-9 | Sí | 7/25 (28) | 1.68 (0.56-5.02) | 0.342 |
| | No | 4/24 (16.7) | | |
| SHV-12 | Sí | 3/12 (25) | 1.15 (0.36-3.67) | 1* |
| | No | 8/37 (21.6) | | |

Para este análisis al ser el factor de estudio la transmisibilidad de la BLEE en lugar de la colonización del neonato se duplicaron los casos en que la madre estaba colonizada por dos BLEE, de ahí el n=49 en vez de 46.

Al analizar los factores intraparto se profundizó aún más investigando si alguno de los grupos maternos predisponía a una mayor probabilidad de aparición de BLEE en el neonato pero cuando se enfrentaron CTX-M-1, CTX-M-9 y SHV maternos frente al resto, de manera consecutiva, no se observaron diferencias en el estado de portador del neonato.

4.12 Enterobacterias productoras de carbapenemasas:

No se encontraron enterobacterias productoras de carbapenemasas ni en la muestra materna ni tampoco en la neonatal.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Al inicio de nuestra investigación no existían, en nuestro conocimiento, estudios que evaluaran de forma completa la colonización por BLEE en gestantes, la evolución del estado de portador durante el embarazo y la transmisión vertical más allá de casos aislados en brotes localizados en UCI neonatales, razón por la que se diseñó este proyecto de tesis doctoral que ha permitido disponer de mayor información y vislumbrar nuevas perspectivas de estudios futuros en dicho campo.

5.1 Prevalencia de colonización en embarazadas y en la población general

En primer lugar nos ha permitido constatar una prevalencia de colonización en mujeres gestantes similar a la de la población general de nuestro medio. Por ejemplo, en nuestro país, Valverde y cols. presentaron casi una década antes del inicio de nuestro estudio un incremento desde un 0.7% a un 5.5% en pacientes no hospitalizados entre los años 1993 y 2004, y del 3.7% en un grupo control de voluntarios sanos (242), observando una diversidad creciente de tipos de BLEE. Así, mientras que en 1991 fueron TEM-4 y CTX-M-10 las únicas enzimas detectadas, una década después se aislaron TEM-4, TEM-52, SHV-12, CTX-M-9, CTX-M-10, CTX-M-14 y una enzima de tipo CTX-M-2; los aislados productores de ESBL recuperados de pacientes ambulatorios en 2003 correspondieron al grupo CTX-M-9 en un 62,5% y a SHV-12 en un 31,2%, mientras que TEM-4 se detectó sólo en pacientes hospitalizados.

Castillo García y cols. también en España describieron un aumento del 2.1% al 7.2% en un periodo de solo dos años (2002-2004) (243). Estos datos concuerdan con los presentados por nuestro grupo de investigación en 2008 en el grupo control de un estudio sobre la prevalencia de colonización por *E. coli* BLEE, en los que dicho grupo, formado por pacientes elegidos al azar que acudieron al servicio de Urgencias, presentaba una prevalencia del 7.4%. (125) Es reseñable que la prevalencia es similar en la misma población de referencia pasados varios años entre este estudio y el que nos ocupa.

Curiosamente, estudios más recientes realizados en Holanda también ponen de manifiesto tasas similares. Así Reuland y cols. en Amsterdam encuentran una prevalencia del 8.6% predominantemente asociada a *E.coli* productor de CTX-M-1 y CTX-M-15. En este último caso asociado al clon ST131. (149). Otro estudio llevado a cabo en Perú y Bolivia informa también de un rápido aumento entre los años 2002 y 2005 del 0.1% al 1.7% en niños sanos principalmente asociadas a cepas comensales de *E.coli* productor de CTX-M (244).

Es relevante que mientras que en Holanda, la colonización es sobre todo debida a aislados productores de enzimas del grupo CTX-M-1, predominantemente CTX-M-15, y observándose una agrupación clonal en los tipos ST131, ST10 y ST38, en nuestro estudio hemos apreciado que se mantiene la situación encontrada en años anteriores, con una mayor proporción de BLEE pertenecientes al grupo CTX-M-9, mayoritariamente CTX-M-14, y presentando tan sólo cuatro aislados CTX-M-15.

Mención aparte merece el estudio llevado a cabo en el norte de España por Fernández-Reyes y cols. que informa sobre las mayores tasas para BLEE halladas en nuestro país. Así un 26.5% de los pacientes (niños sanos) portaban *E. coli* productoras de BLEE, siendo las más frecuentes SHV-12, CTX-M-1, CTX-M-14, y TEM-52, por ese orden. Tan solo dos registraron 2 aislados productores de CTX-M-15 y dos pertenecientes al filogrupo B2 (159).

Por tanto, concluimos que la prevaecía y tipos de BLEE encontradas en nuestro estudio en mujeres embarazadas probablemente refleja la situación de colonización en la población general por enterobacterias BLEE.

Cabe destacar las diferencias de prevalencia halladas entre las muestras tomadas en semana 35-37 y las obtenidas en el parto, observándose una duplicación de la tasa de prevalencia para la colonización por BLEE en esta última. Este hecho en nuestra opinión debe interpretarse más como un problema en la calidad de la muestra obtenida mediante la toma por parte de la propia paciente o de la persona que realiza la misma (familiar la mayoría de las veces), a pesar de las instrucciones facilitadas por escrito. Este dato se corresponde con las bajas tasas de detección de *S. agalactiae* en nuestro medio, lo que nos hace pensar en que es necesario mejorar la calidad de la toma de las muestras en este cribado, de importancia fundamental.

Creemos conveniente realizar la toma de muestras de una manera estandarizada, de manera que los estudios sean lo más parecidos posible para realizar comparaciones.

En lo que respecta a estudios llevados a cabo en embarazadas, Birgy y cols. encontraron en París una prevalencia global, sumando madres y neonatos, del 2.46% en un periodo de 5 años, teniendo sólo en cuenta cepas de *E. coli* productoras de BLEE. Observaron asimismo un aumento en la prevalencia desde el 1.1% el primer año (2006) al 4.15% el último (2010). Las enzimas más prevalentes fueron CTX-M-14 (29.7%), CTX-M-1 (26.5%) y CTX-M-15 (18.8%) aunque subrayan la amplia heterogeneidad de enzimas encontradas dado que describen, además de las citadas, CTX-M-2, CTX-M-3, CTX-M-57, CTX-M-27, TEM-52, SHV-12 y SHV-2a. No hallaron carbapenemasas. Como aspectos destacables del estudio podemos decir que las muestras maternas eran tomadas solo en vagina y no en vagina y recto como en nuestro caso(231).

Denkel y cols. realizaron otro estudio en Alemania entre 2013 y 2014 sobre el que es necesario comentar ciertos aspectos diferenciales en su diseño: el estudio estaba centrado en los neonatos y a partir de ellos se estudiaron a las madres. Además se centró en una población muy determinada como son los recién nacidos con muy bajo peso al nacer (<1500g), casi siempre asociados a prematuridad, que posee unas características especiales debidas a la inmadurez en general y del sistema inmunológico en particular. Estos niños ingresan siempre en UCI neonatales, que hemos visto pueden ser lugares donde se favorece la existencia de bacterias multirresistentes. En este estudio las muestras rectales maternas se tomaron durante el ingreso por parto pretérmino, el parto o las primeras 72 horas tras el mismo (para pacientes externos) y las muestras rectales neonatales se tomaron semanalmente a partir del día tercero desde el nacimiento (o al ingreso si venían de otros centros). Obtuvieron una prevalencia para madres colonizadas del 11.1% (teniendo en cuenta valores perdidos y embarazos múltiples). Como hecho significativo no informan sobre las BLEE observadas sino que se limitan a informar del hecho de transmisión cuando las parejas madre-hijo comparten aislados con más de un 95% de similitud. Otro aspecto a destacar es que la mediana del momento de aparición de un resultado positivo para BLEE fue de 8 días con un rango

intercuartílico entre los 7 y 30 días (223). En nuestro estudio todas las muestras neonatales fueron tomadas en menos de 48 horas.

Pathak y cols., en la India entre 2007 y 2009, encontraron una prevalencia de *E. coli* productor de BLEE en embarazadas que acudían a visitas rutinarias antes del parto del 15% a expensas de enzimas del tipo CTX-M-15 o del grupo TEM y OXA, sin encontrar ninguna del tipo SHV; llaman la atención sobre el hecho de que la prevalencia de colonización fue menor que la encontrada en episodios de infección en pacientes pertenecientes al mismo área geográfica (69%). Más del 50% de portadoras poseían más de una BLEE.

En el estudio de Rettedal y cols. llevado a cabo en Noruega en 2012 se objetivó una prevalencia para enterobacterias resistentes a cefalosporinas del 2.9%, mucho menor que la de nuestro estudio. De ese porcentaje, un 11.5% eran productoras de *depAmpC* y un 88.5% de BLEE. Dicho estudio es el más parecido al nuestro tanto por la estructura del mismo como por las fechas en que tuvo lugar la recogida de muestras. Como hechos diferenciales las muestras maternas fueron rectales exclusivamente y las neonatales fueron fecales, recogidas nunca antes de los dos días postparto (>48h). Las muestras maternas se recogieron en semana 36 y se repitieron en el momento del parto. Continuaron como positivas en el parto un 53.8%. En cuanto a enzimas se estudiaron los grupos y no las enzimas específicas; el 52% correspondieron al grupo CTX-M-1, el 44% al grupo CTX-M-9 y el porcentaje restante a un espécimen productor de SHV. Sólo una madre portaba un aislado de *K. pneumoniae* además de *E. coli* (221).

Al-Mayahie y cols., en Irak entre 2008 y 2010, encontraron unas tasas muy altas de prevalencia de BLEE en su estudio en el que comparan *E. coli* aislados en muestras vaginales de mujeres gestantes y no gestantes. Así hallan tras análisis mediante PCR un 73.9% y un 60.5% respectivamente de aislados productores de BLEE. Ambos grupos diferían en la frecuencia de enzimas de las familias CTX-M (44.7% vs. 39.4%) y SHV (4.3% vs. 44.7%) de manera significativa; el 100% de los casos la enzima producida del primero de los grupos perteneció al grupo CTX-M-1 (228).

Villar y cols., en Argentina, en 2012, encontraron una prevalencia de *E. coli* productor de BLEE en mujeres embarazadas del 5.4% sin caracterizar las enzimas. Las muestras fueron perianales y vaginales y provenían de madres que no hubieran sido hospitalizadas por ningún motivo en los 30 días previos (224).

Dubois y cols. en su estudio realizado entre 2007 y 2008 en Francia encontraron una tasa de prevalencia de *E. coli* productor de CTX-M del 4% (muestras maternas y fetales) con enzimas CTX-M-1 (n=4); CTX-M-14 (n=3); CTX-M-32 (n=2) y CTX-M-28 (n=1). Además se encontraron 3 casos de TEM y una de OXA. En este caso las muestras fueron urinarias y genitales e incluyeron algunos pacientes enfermos, no sólo portadores (229).

En nuestro estudio hallamos una prevalencia de un 6.8% en el momento del parto mayoritariamente debido a enzimas del grupo CTX-M y dentro de este a CTX-M-14. Es de resaltar, a pesar de que CTX-M-14 y CTX-M-1 suponen la mayoría, que encontramos un amplio número de enzimas distintas (CTX-M-1, CTX-M-32, CTX-M-24, CTX-M-27 e incluso CTX-M-3 si incluimos a una de las pacientes cribadas en semana 35-37). Además la cifra de enzimas del grupo SHV supone más de la quinta parte del total de las BLEE encontradas en el momento del parto. Además el hecho de que salvo las 4 del brote nosocomial que eran SHV-2, todas sean SHV-12 también está en consonancia con los estudios anteriores realizados en nuestro área (122). Es destacable el hecho que entre los seis aislados de *E. coli* maternos periparto del filogrupo B2 ninguno fue CTX-M-15. Asimismo no se hallaron carbapenemasas.

Tabla 29: Comparativa entre los principales estudios sobre prevalencia de BLEE en embarazadas

| Estudio | País | Año | Embarazadas | Prevalencia | BLEE |
|-------------------|-----------|---------|---|--|---|
| <i>Birgy</i> | Francia | 2006-10 | Madres y niños parto | 2.46% (global) | CTX-M-14 (29.7%), CTX-M-1 (26.5%) y CTX-M-15 (18.8%) Otros: CTX-M-2, CTX-M-3, CTX-M-57, CTX-M-27, TEM-52, SHV-12, SHV-2a |
| <i>Denkel</i> | Alemania | 2013-14 | Madres parto y neonatos UCIN | 11.1% madres 5.7% neonatos | No disponible |
| <i>Pathak</i> | India | 2007-09 | Madres anteparto | 15% | CTX-M-15, TEM, OXA |
| <i>Rettedal</i> | Noruega | 2012 | Madres anteparto | 2.56% | Grupo CTX-M-1 (52%) Grupo CTX-M-9 (44%) SHV (4%) |
| <i>Al-Mayahie</i> | Irak | 2008-10 | Gestantes-no gestantes con <i>E. coli</i> vaginal | 73.9% gestantes vs 60.5% no gestantes | Gestantes mayoría CTX-M No gestantes SHV |
| <i>Villar</i> | Argentina | 2012 | Embarazadas | 5.4% | No disponible |
| <i>Dubois</i> | Francia | 2007-08 | Madres y neonatos portadores o enfermos | 4% para CTX-M | CTX-M-1, CTX-M-14, CTX-M-32, CTX-M-28, TEM, OXA |
| <i>Jiménez</i> | España | 2012-13 | Madres y neonatos | Madres 6.8% Neonatos 1.6% | Madres CTX-M-1, CTX-M-15, CTX-M-32, CTX-M-14, CTX-M-24, CTX-M-27, SHV-12, TEM-52. Neonatos SHV-12, CTX-M-14, CTX-M-15, CTX-M-1 |

5.2 Brote nosocomial.

Hasta donde sabemos, el brote ocurrido en 4 madres que parieron en un lapso de 24 horas y en las que se identificó *K. pneumoniae* productor de SHV-2 puede ser el primer caso descrito en la literatura de estas características. Se catalogó como brote dada la relación temporo-espacial de los casos de colonización y la caracterización molecular de los aislados. Nuestra hipótesis es que la transmisión se pudo producir bien mediante transmisión cruzada a través de las manos del personal sanitario que las atendió durante el parto (en cualquiera de sus fases), o bien a través de la exposición común a un reservorio ambiental; sin embargo, el hecho de que no hubiera más casos en otros días va en contra de esta última hipótesis a no ser que el reservorio hubiera sido eliminado con los procedimientos habituales de limpieza. Afortunadamente la transmisión no se tradujo en casos de infección, pero es evidente que las salas de paritorio pueden ser el origen de brotes en unidades neonatales si alguno de los recién nacidos adquiere el microorganismo y es ingresado en dicha unidad. Este hecho pone de manifiesto la importancia de incidir en las estrategias para minimizar la propagación de este tipo de microorganismos, en especial una rigurosa higiene de manos.

5.3 Factores de riesgo para la colonización en el parto

En nuestro estudio hemos identificado la existencia de complicaciones en partos anteriores, el haber sufrido más de un episodio de infección urinaria durante el embarazo actual, la raza no caucásica y realizar la comida principal fuera del domicilio habitual con frecuencia como los factores asociados de manera independiente con la colonización por enterobacterias productoras de BLEE en embarazadas.

Así como sí son varios los estudios publicados que investigan los factores de riesgo para el estado de portador en pacientes sanos, no existían antes del inicio del estudio ninguno que incidiera sobre los factores de riesgo en la mujer gestante. Con posterioridad han aparecido los trabajos de Rettedal y Pathak (221,225). El primero de ellos, realizado en Noruega, se asemeja lo suficiente al nuestro como para poder ser comparados, fundamentalmente porque es el único en incluir todas las

enterobacterias y no solo *E. coli*. Estos autores observaron que las pacientes de origen africano o asiático tenían más riesgo para ser portadoras, lo que parece ir en parte en consonancia con nuestros resultados ya que nosotros hemos observado la existencia de diferencias significativas a favor de las razas no caucásicas (se agruparon así dado el pequeño porcentaje de mujeres de otras razas).

En este estudio y en el nuestro se estudió el hecho de haber viajado al extranjero, dado que es una variable asociada a la colonización por BLEE en diversos estudios en población general. Pues bien, no se encontró que fuera un factor de riesgo; esto probablemente se debe a que en el embarazo y sobre todo en los últimos meses, suelen restringirse los viajes (221).

En el estudio de Pathak y cols., realizado en India, hay que distinguir los factores asociados a la presencia de *E. coli* multirresistentes y los específicos para la existencia de *E. coli* BLEE. Para el primer caso los factores con asociación significativa fueron “nivel de estudios graduado o postgraduado”, “empleo por cuenta propia” (protector), “familia con diez o más miembros”, “uso de antibióticos en las últimas 4 semanas” e “historia de hospitalización en las últimas cuatro semanas”. Para el caso de portador de BLEE sólo fueron significativos los dos últimos. Refieren un modelo con una buena capacidad de predicción para el caso de bacterias multirresistentes con una curva COR cuyo valor es 0.944. No realizaron la curva para el modelo de portador de BLEE (225). Estos resultados probablemente son poco extrapolables a nuestra situación; por ejemplo, en nuestro caso no llegamos a tener ninguna familia con más de diez miembros. Sin embargo, exceptuando el tipo de trabajo que no se analizó en nuestro caso, el nivel de estudios, la historia de hospitalización y el uso de antibióticos también fue analizado en nuestro trabajo con resultados no significativos para nuestro caso.

Pathak y cols. encuentran diferencias significativas en mujeres que hayan estado ingresadas o tomado antibióticos en las últimas cuatro semanas. Nosotros no encontramos diferencias para mujeres que hayan estado ingresadas o tomado antibióticos, lo que puede traducir la menor frecuencia de transmisión hospitalaria en nuestro medio. Además, la duración de estos ingresos que en el caso de Pathak no se especifica. En nuestro centro existe una unidad de hospitalización de día que

minimiza la necesidad de ingreso hospitalario con el consiguiente beneficio de poder realizar controles ambulatorios a las pacientes que lo requieran.

Es reseñable que no se ha identificado el uso de antibióticos como factor de riesgo para el estado de portador como viene siendo habitual en estudios previos de portadores sanos en población general (126) y también como describieron Pathak y cols. en embarazadas (225). El uso de antibióticos durante el embarazo está bastante restringido por los potenciales efectos adversos sobre el feto. Tanto es así que en durante la realización del estudio hemos visto mujeres con ITU a las que su médico de cabecera no le pautaba antibiótico alguno, con el consiguiente riesgo de complicaciones. Así las mujeres que tomaron antibióticos durante el embarazo o en los últimos seis meses lo hicieron en la mayoría de ocasiones por infecciones urinarias, siendo el ATB de elección la fosfomicina por su fácil cumplimiento, o amoxicilina con o sin clavulánico. Aún así se ha detectado una tasa de uso de antibióticos bastante elevada (20.96%).

En cuanto al uso de antibióticos intraparto, llama la atención el elevado porcentaje de mujeres que los recibieron (44.63%). El más usado fue la penicilina, que se usa para la profilaxis frente al *S. agalactiae*, seguido de ampicilina (que en nuestro centro es el antibiótico de elección para la rotura prematura de membranas), cefazolina (que forma parte de la profilaxis para las cesáreas) y por último clindamicina (que se usa como segunda línea en alérgicas a penicilinas para el *S. agalactiae*). Estos datos obligan a plantearse posibles medidas como una auditoría sobre la correcta utilización de los antibióticos dado que nos parece un porcentaje muy elevado que no tiene relación con las cifras de prevalencia para *S. agalactiae* o la tasa de rotura prematura de membranas y las horas de bolsa rota (los motivos mayoritarios con diferencia para el uso de antibióticos intraparto) que presentaba la muestra del estudio. Sin embargo el uso de antibióticos por desgarro vaginal, protocolizado, no se realizó en el total de mujeres que lo necesitaron: de un total de 23 mujeres subsidiarias de tratamiento antibiótico por desgarro de grado III-IV solo 16 lo recibieron en la sala de partos.

En nuestro estudio se identificaron como factores de riesgo para el estado de portador la presencia de complicaciones en embarazos anteriores, la existencia de más de un episodio de infección del tracto urinario durante la gestación, la raza no

caucásica y el hecho de comer fuera de casa la comida principal del día más de 15 días en el último mes de embarazo. Para la primera de las variables citadas, no hemos encontrado en la literatura otros estudios en que se haya considerado; se trata de una variable que incluye condiciones heterogéneas como oligoamnios, embarazo ectópico o muerte fetal anteparto; consideramos que probablemente es un marcador surrogado de otras variables como un mayor y más frecuente contacto con la asistencia sanitaria, entre otros.

Para la raza no caucásica, consideramos que refleja la mayor frecuencia de colonización en personas procedentes de otros países de mayor prevalencia de BLEE, similar a lo encontrado por Rettedal y cols., que evaluaron no la raza sino la procedencia (221). Creemos que este hecho debe tener más relación con esto que con las posibles características fisiológicas inherentes a cada raza.

En cuanto al hecho de haber sufrido infecciones urinarias, debemos destacar que las pacientes que habían sufrido una ITU tenían más riesgo, sin embargo se utilizaron para el análisis estadístico aquellas que habían sufrido más de un episodio durante la gestación dado que la asociación significativamente era más fuerte. Es difícil conocer si la asociación de esta variable se debe a sí misma o al uso de antibióticos, como parecería más razonable, aunque ya hemos comentado que cuando se consideró la exposición a antibióticos como tal no mostró asociación. Una opción es que la infección urinaria pudiera ser causada precisamente por cepas productoras de BLEE pero no disponemos de esa información, y nos parece poco probable. Es necesario realizar estudios específicos al respecto.

Por último con respecto a la ingesta de la comida principal fuera de la residencia familiar debemos apuntar también que la asociación fue más fuerte en tanto que esta se realizara fuera de casa con mayor frecuencia. En un estudio que realizamos en población general, el comer fuera de casa fue un factor protector (245), lo que se interpretó como una menor exposición a alimentos contaminados en el ambiente domiciliario, sobre todo al cocinarlos. En este caso, las embarazadas referían comer frecuentemente no en establecimientos públicos sino en casa de sus padres, con lo que no podemos conocer si cocinaban los alimentos o si este hecho se correlaciona con otras variables de exposición.

Es importante valorar el hecho de que el modelo de factores de riesgo encontrado en nuestro estudio no mostró un importante poder predictivo sobre los datos observados. Esto contrasta con el estudio de Pathak y cols. en el que encontraron un modelo altamente predictivo, aunque para *E. coli* multirresistente (no específicamente enterobacteriasproductoras de BLEE), para unas prevalencias similares en las poblaciones estudiadas (mujeres gestantes) (225). Es posible que las diferencias epidemiológicas entre India y España expliquen en parte esta cuestión. Que en nuestro estudio no hayamos podido encontrar más factores de riesgo puede ser debido a que verdaderamente la colonización sea producto de factores azarosos, a una muestra insuficiente o a que no hayamos recogido variables relevantes; sin embargo, las variables incluidas son las que, en base a estudios previos y los conocimientos epidemiológicos actuales parecen más razonables. El hecho de que el poder predictivo del modelo multivariante final sea bajo impide hacer recomendaciones basadas en características de las mujeres acerca de la necesidad de realizar cultivos de cribado en las mismas. Es evidente que se precisan más estudios centrados en algunos aspectos específicos de las variables estudiadas para profundizar en el conocimiento de los factores de riesgo.

Hablando sobre un posible cribado Denkel y cols. consideran conveniente cribar a las madres de los recién nacidos pretérmino (los que con más seguridad suelen acabar en UCI neonatales) para conocer la posibilidad de colonización en las madres y si posibilidad de transmisión al recién nacido, y así disminuir el tiempo a la hora de elegir un antibiótico apropiado en el caso de desarrollarse una infección sistémica (222).

5.4 Prevalencia de colonización en neonatos. Transmisión vertical.

Existen diversos estudios que han evaluado la prevalencia de colonización en neonatos, aunque son más frecuentes los realizados en el contexto de brotes en UCI neonatales.

Duman y cols. publicaron en 2005 un estudio llevado a cabo entre 1997 y 1998 en Turquía sobre neonatos portadores de bacterias productoras de BLEE en tres grupos; ingresados en UCI neonatal, en unidad de neonatos y un grupo control de neonatos sin necesidad de ingreso en ninguna de las dos unidades anteriores. Se

aislaron bacterias productoras de BLEE en el 33.7% de las muestras repartiéndose de manera similar en los tres grupos aunque la tasa más baja se dio en el grupo de UCI. No se determinaron los tipos de BLEE sino solo su presencia. Es interesante el seguimiento que hacen tras el alta de los neonatos ya que observan una menor tasa tras el alta que durante el periodo de hospitalización aunque no dicen cuanto tiempo después de ésta se tomaron las muestras (246).

Ya vimos que en el estudio de Birgy y cols. (231) se observó una tasa global para muestras maternas y neonatales del 2.46% (ver más arriba) y en el de Dubois y cols., del 4% (229). En el estudio de Denkel y cols. que es el de mayor interés de los revisados sobre prevalencia en neonatos, encuentran una tasa de portadores del 5.7% con una amplia variedad de microorganismos (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. cloacae* y *S. marcescens*). Hay que recordar que son neonatos de muy bajo peso al nacer y se lleva a cabo en una UCI neonatal (223).

En nuestro caso es destacable que todos los neonatos fueron colonizados por *E. coli* (uno también era portador además de *K. pneumoniae*) repartiéndose entre los grupos de BLEE SHV y CTX-M, no habiendo ningún aislado productor de TEM ni de OXA. El hecho de que tres neonatos tuvieran madres negativas nos hace pensar, viendo la asociación clara entre el estado de portador en neonato y la positividad de la madre, que estos casos pudieran tratarse de falsos negativos maternos como una hipótesis muy plausible.

En cuanto a la transmisión vertical y como pone de manifiesto la revisión sistemática de Seale y Millar de 2014, hay una ausencia de investigación en lo que a transmisión vertical de bacterias resistentes a los antibióticos se refiere a pesar de la importancia de las posibles implicaciones que pudiera tener este hecho, tanto para la transmisión a otros pacientes como para el desarrollo de infecciones en el neonato colonizado (235). En concreto sobre bacterias productoras de BLEE, investigadores de nuestro grupo ya pusieron de manifiesto el que posiblemente fuera el primer caso de sepsis por transmisión materno-fetal de una enterobacteria productora de BLEE, en 2008 (230).

Desde entonces más estudios han puesto de manifiesto tal posibilidad. Así Denkel y cols. demostraron una posible transmisión en tres casos, uno de ellos tras

un parto múltiple de trillizos, comprobándose con técnicas moleculares (223). Dubois y cols. hicieron lo propio con dos parejas madre hijo (229). Incluso se han descrito brotes debido a este tipo de transmisión. Así, Tschudin-Sutter (234) describió el caso de una paciente con una gestación gemelar que ingresó a las 32 semanas por rotura prematura de membranas y parió finalmente cinco semanas después después de maduración pulmonar fetal, tocolisis y tratamiento antibiótico profiláctico, que dos días antes del parto desarrolló una bacteriuria asintomática por *E. coli* productor de BLEE. Este microorganismo fue hallado posteriormente colonizando a un trabajador de la unidad de neonatos y en otros pacientes ingresados en la misma (234). Recientemente se ha descrito un brote en una UCI neonatal irlandesa tras la entrada de un aislado de *E. coli* ST131 productor de CTX-M-15 y OXA-1 poniéndose de manifiesto que la misma fue debida al ingreso de un neonato colonizado por un espécimen materno (247).

Rettedal y cols. encontraron una tasa de transmisión del 35.7% (5 neonatos de 26 madres positivas vaginales en el parto) aunque no realizaron un estudio de factores de riesgo para el estado de portador de neonato; hay que destacar que las madres estaban identificadas como positivas antes del parto por lo que se puede descartar una transmisión del neonato a la madre (221).

En nuestro caso comprobamos una transmisión vertical en ocho casos; la tasa de transmisión fue del 17.39% de mujeres colonizadas (8 casos de transmisión “verdadera” en 46 partos vaginales de madres colonizadas) lo cual es aproximadamente la mitad de lo obtenido en dicho estudio, aunque es también una tasa más que considerable. Si tenemos en cuenta las madres colonizadas del total de parejas madre neonato, no sólo las que parieron vía vaginal, obtendríamos una tasa de transmisión del 14% (8 casos de 57 madres colonizadas con neonato estudiado). Y si la calculamos para el total parejas madres-hijo estudiado resulta del 1% (8 casos de 800 madres con neonato estudiado).

Dada la baja prevalencia de transmisión no nos fue posible establecer los factores que favorezcan la transmisión de cada grupo de enzimas.

5.5 Factores de riesgo para la colonización en neonato, global y en mujeres con parto vaginal.

Como se ha comentado, casi todos los estudios que evalúan la colonización neonatal por BLEE se refieren casi siempre a *K. pneumoniae* y se circunscriben al ámbito de UCI neonatales o unidades especializadas de neonatos, en muchos casos describiendo brotes. Nuestro estudio sin embargo recoge neonatos ingresados con sus madres en una planta normal de maternidad. Es por ello que factores conocidos para la colonización o infección nosocomial no aparecen como significativos o ni siquiera están recogidos en el estudio, como por ejemplo, bajo peso, parto pretérmino, ventilación mecánica prologada, duración de la hospitalización y uso de antibióticos en el neonato, este último, factor más importante para la colonización del recién nacido en estudios de transmisión nosocomial (223).

En nuestro estudio debemos destacar que para la colonización neonatal sólo encontramos un factor de riesgo pero con una importantísima asociación, que fue el hecho de que la madre estuviera previamente colonizada. No menos importante, según nuestro punto de vista, es el hecho de que todos los neonatos colonizados, incluidos aquellos en que se demostró transmisión vertical, habían nacido por vía vaginal.

En el estudio ya citado de Duman y cols., que incluyó escasas variables de la madre, encontraron como factores de riesgo para la colonización el peso muy bajo al nacer, el parto vaginal, el uso de antibióticos en los bebés, el uso de antibióticos maternos, el sexo masculino y la rotura prematura de membranas, mientras que la alimentación con sonda nasogástrica se identificó como un factor de protección. Con los cultivos posteriores al alta determinaron que la ausencia de lactancia materna era el único factor de riesgo tras la salida del hospital (246). Denkel y cols. encontraron una asociación parecida a la encontrada en nuestro trabajo con la colonización materna, ya que la incidencia de colonización era seis veces mayor en aquellos neonatos con madre positiva frente a aquellos con madre negativa aunque la principal diferencia es que más del 90% de los nacimientos fueron mediante cesárea (223).

5.5 Limitaciones y fortalezas del presente trabajo

Nuestro estudio presenta diversas limitaciones que deben tenerse en cuenta a la hora de interpretar sus resultados. En primer lugar, el trabajo se realizó en un solo centro, por lo que los datos pueden ser solo representativos de la población de referencia del mismo, y podrían no ser extrapolables a áreas con una epidemiología diferente. Igualmente, debido a que no todas las madres ni todos los neonatos fueron cribados durante el tiempo que duró el estudio, puede existir algún sesgo de selección; el hecho de que el porcentaje de cesáreas encontradas en el estudio fuera ligeramente inferior a la esperada podría ser debido a que fue más fácil incluir a mujeres con más facilidad para la movilización; en cualquier caso, al ser el parto vaginal clave para la transmisión, nos parece que este hecho tiene una trascendencia muy baja.

Otra limitación podría ser que no se hayan incluido determinados factores de riesgo relevantes; para evitarlo se realizó previamente una revisión de la literatura, además del conocimiento del grupo de investigación sobre la epidemiología de estas bacterias. Asimismo, el tamaño muestral pudo ser limitado para identificar determinados factores. Por otro lado, la sensibilidad de las técnicas de detección de portadores mediante técnicas fenotípicas tiene es limitada. A ello se suma el efecto que haya podido tener una autotoma de muestras no adecuada. Finalmente, aunque hemos realizado análisis multivariantes, es posible que el control de la confusión haya sido incompleto.

Algunas de las fortalezas del trabajo incluyen la formación de un equipo investigador multidisciplinar, con miembros expertos en Microbiología y Resistencia Antimicrobiana, Epidemiología y Obstetricia. Asimismo, se ha intentado ofrecer una visión integral del problema de la colonización en las madres y la transmisión vertical de las enterobacterias productoras de BLEE.

En resumen creemos que nuestro estudio aporta algo de luz a un tema donde la producción científica hasta ahora ha sido escasa, como es la colonización por enterobacterias productoras de BLEE en embarazadas y la posibilidad de transmisión vertical, siendo ambos hechos de especial interés ya que pueden conllevar unas implicaciones importantes tanto clínicas, por el tipo de pacientes,

como epidemiológicas. Por ello creemos necesario seguir investigando sobre factores de riesgo que permitan llevar a cabo protocolos de vigilancia para establecer grupos sobre los que centrar la atención en un futuro.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. La prevalencia de colonización en embarazadas por enterobacterias productoras de BLEE en el momento del parto es similar a la de la población general. La prevalencia de colonización por enterobacterias productoras de AmpC y carbapenemasas es muy baja.
2. La enzimas BLEE identificadas más frecuentemente en las enterobacterias aisladas de madres fueron CTX-M-14, seguida de SHV-12 y CTX-M-1.
3. Los aislados de enterobacterias BLEE maternos no estaban relacionados clonalmente excepto en el caso de un brote nosocomial.
4. Los factores identificados para la colonización por enterobacterias productoras de BLEE en el momento del parto fueron: haber tenido más de un episodio de ITU durante el embarazo, haber comido fuera de casa la comida principal del día en el último mes de embarazo más de 15 veces, haber sufrido complicaciones en gestaciones anteriores y pertenecer a una raza no caucásica.
5. La prevalencia de colonización en el neonato por enterobacterias productoras de BLEE fue del 1.6%.
6. El hecho de que la madre esté colonizada supone un factor de riesgo significativo para la colonización neonatal.
7. El parto por vía vaginal, frente a la cesárea, debe tener un papel importante en la transmisión vertical intraparto de enterobacterias productoras de BLEE.
8. La transmisión cruzada y la producción de brotes nosocomiales durante el parto por enterobacterias productoras de BLEE son posibles.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Icaza-Chávez ME. Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. *Rev Gastroenterol México*. 2013;78(199):240–8.
2. Collado MC, Cernada M, Bäuerl C, Vento M, Pérez-Martínez G. Microbial ecology and host-microbiota interactions during early life stages. *Gut Microbes*. 2012;3(4):352–65.
3. Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev*. 2010 Jul;90(3):859–904.
4. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature*. 2007 Oct;449(7164):804–10.
5. Brunser T O. El desarrollo de la microbiota intestinal humana, el concepto de probiótico y su relación con la salud humana. *Rev Chil Nutr [Internet]*. 2014;40:283–9.
6. Groer MW, Luciano A a, Dishaw LJ, Ashmeade TL, Miller E, Gilbert J a. Development of the preterm infant gut microbiome: a research priority. 2014;2(1):1–8.
7. Hartz LE, Bradshaw W, Brandon DH. Potential NICU Environmental Influences on the Neonate’s Microbiome. *Adv Neonatal Care [Internet]*. 2015;15(5):324–35.
8. Rodríguez JM, Jiménez E, Merino V, Maldonado A, Marín ML, Fernández L, et al. Microbiota de la leche humana en condiciones fisiológicas. *Acta Pediatr Esp*. 2008;66(2):77–82.
9. Dominguez-Bello MG, Blaser MJ, Ley RE, Knight R. Development of the human gastrointestinal microbiota and insights from high-throughput sequencing. *Gastroenterology [Internet]*. 2011;140(6):1713–9.
10. Karlsson CLJ, Molin G, Cilio CM, Ahrné S. The pioneer gut microbiota in human neonates vaginally born at term-A pilot study. *Pediatr Res*. 2011;70(3):282–

- 6.
11. Le Doare K, Heath PT. An overview of global GBS epidemiology. *Vaccine* [Internet]. 2013 Aug 28 [cited 2015 Jan 5];31 Suppl 4:D7-12.
12. Neu J, Lorca G, Kingma SDK, Triplett EW. The intestinal microbiome: relationship to type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2010 Sep;39(3):563-71.
13. Schwartz A, Taras D, Schafer K, Beijer S, Bos NA, Donus C, et al. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity (Silver Spring)*. 2010 Jan;18(1):190-5.
14. Alarcón Caverro T, D'Auria G, Delgado Palacio S, Del Campo Moreno R, Ferrer Martínez M. *Procedimientos Microbiología. Microbiota*. 2016. Seimc. 2016.
15. Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med*. 2014 May;6(237):237ra65.
16. Bowen JM, Chamley L, Keelan JA, Mitchell MD. Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: roles and regulation during human pregnancy and parturition. *Placenta*. 2002 Apr;23(4):257-73.
17. Salafia CM, Vogel CA, Vintzileos AM, Bantham KF, Pezzullo J, Silberman L. Placental pathologic findings in preterm birth. *Am J Obstet Gynecol*. 1991 Oct;165(4 Pt 1):934-8.
18. Hemsell DL, Obregon VL, Heard MC, Nobles BJ. Endometrial bacteria in asymptomatic, nonpregnant women. *J Reprod Med*. 1989 Nov;34(11):872-4.
19. Jimenez E, Marin ML, Martin R, Odriozola JM, Olivares M, Xaus J, et al. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res Microbiol*. 2008 Apr;159(3):187-93.
20. Satokari R, Gronroos T, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E. Bifidobacterium and Lactobacillus DNA in the human placenta. *Lett Appl Microbiol*. 2009 Jan;48(1):8-12.
21. Mshvildadze M, Neu J, Shuster J, Theriaque D, Li N, Mai V. Intestinal microbial ecology in premature infants assessed with non-culture-based techniques. *J*

-
- Pediatr. 2010 Jan;156(1):20–5.
22. Han YW, Shen T, Chung P, Buhimschi IA, Buhimschi CS. Uncultivated bacteria as etiologic agents of intra-amniotic inflammation leading to preterm birth. *J Clin Microbiol.* 2009 Jan;47(1):38–47.
 23. Ardisson AN, de la Cruz DM, Davis-Richardson AG, Rechcigl KT, Li N, Drew JC, et al. Meconium microbiome analysis identifies bacteria correlated with premature birth. *PLoS One.* 2014;9(3):e90784.
 24. Wassenaar TM, Panigrahi P. Is a foetus developing in a sterile environment? *Lett Appl Microbiol [Internet].* 2014;59:572–9.
 25. Klebanoff M, Searle K. The role of inflammation in preterm birth--focus on periodontitis. *BJOG.* 2006 Dec;113 Suppl:43–5.
 26. Stout MJ, Conlon B, Landeau M, Lee I, Bower C, Zhao Q, et al. Identification of intracellular bacteria in the basal plate of the human placenta in term and preterm gestations. *Am J Obstet Gynecol.* 2013 Mar;208(3):226.e1-7.
 27. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SSK, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Mar;108 Suppl:4680–7.
 28. Neu J, Rushing J. Cesarean versus vaginal delivery: long-term infant outcomes and the hygiene hypothesis. *Clin Perinatol.* 2011 Jun;38(2):321–31.
 29. Huang B, Fettweis JM, Brooks JP, Jefferson KK, Buck GA. The changing landscape of the vaginal microbiome. *Clin Lab Med.* 2014 Dec;34(4):747–61.
 30. Romero R, Hassan SS, Gajer P, Tarca AL, Fadrosch DW, Nikita L, et al. The composition and stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of non-pregnant women. *Microbiome.* 2014;2(1):4.
 31. Prince AL, Antony KM, Ma J, Aagaard KM. The microbiome and development: a mother's perspective. *Semin Reprod Med.* 2014 Jan;32(1):14–22.
 32. Prince AL, Antony KM, Chu DM, Aagaard KM. The microbiome, parturition, and timing of birth: more questions than answers. *J Reprod Immunol.* 2014
-

- Oct;104–105:12–9.
33. Aagaard K, Riehle K, Ma J, Segata N, Mistretta T-A, Coarfa C, et al. A metagenomic approach to characterization of the vaginal microbiome signature in pregnancy. *PLoS One*. 2012;7(6):e36466.
 34. Caughey AB, Cahill AG, Guise J-M, Rouse DJ. Safe prevention of the primary cesarean delivery. *Am J Obstet Gynecol*. 2014 Mar;210(3):179–93.
 35. Sanidad MDE, Igualdad SSE. Evolución de la Tasa de Cesáreas en los Hospitales Generales del Sistema Nacional de Salud: Años 2001 – 2011. 2013;1–5.
 36. Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr*. 1999 May;69(5):1035S–1045S.
 37. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jun;107(26):11971–5.
 38. Gronlund MM, Lehtonen OP, Eerola E, Kero P. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1999 Jan;28(1):19–25.
 39. Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*. 2006 Aug;118(2):511–21.
 40. Penders J, Thijs C, van den Brandt PA, Kummeling I, Snijders B, Stelma F, et al. Gut microbiota composition and development of atopic manifestations in infancy: the KOALA Birth Cohort Study. *Gut*. 2007 May;56(5):661–7.
 41. Penders J, Stobberingh EE, van den Brandt PA, Thijs C. The role of the intestinal microbiota in the development of atopic disorders. *Allergy*. 2007 Nov;62(11):1223–36.
 42. Martin R, Heilig HGJ, Zoetendal EG, Jimenez E, Fernandez L, Smidt H, et al. Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk

-
- among healthy women. *Res Microbiol.* 2007;158(1):31–7.
43. Favier CF, Vaughan EE, De Vos WM, Akkermans ADL. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol.* 2002 Jan;68(1):219–26.
44. Hall MA, Cole CB, Smith SL, Fuller R, Rolles CJ. Factors influencing the presence of faecal lactobacilli in early infancy. *Arch Dis Child.* 1990 Feb;65(2):185–8.
45. Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, Wagendorp AA, Klijn N, Bindels JG, et al. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2000 Jan;30(1):61–7.
46. Martin R, Langa S, Reviriego C, Jiminez E, Marin ML, Xaus J, et al. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr.* 2003 Dec;143(6):754–8.
47. Ahrne S, Lonnermark E, Wold AE, Aberg N, Hesselmar B, Saalman R, et al. Lactobacilli in the intestinal microbiota of Swedish infants. *Microbes Infect.* 2005;7(11–12):1256–62.
48. Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr Suppl.* 2003 Sep;91(441):48–55.
49. Matsumiya Y, Kato N, Watanabe K, Kato H. Molecular epidemiological study of vertical transmission of vaginal *Lactobacillus* species from mothers to newborn infants in Japanese, by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *J Infect Chemother Off J Japan Soc Chemother.* 2002 Mar;8(1):43–9.
50. Tannock GW, Fuller R, Smith SL, Hall MA. Plasmid profiling of members of the family Enterobacteriaceae, lactobacilli, and bifidobacteria to study the transmission of bacteria from mother to infant. *J Clin Microbiol.* 1990 Jun;28(6):1225–8.
51. Schultz M, Gottl C, Young RJ, Iwen P, Vanderhoof JA. Administration of oral probiotic bacteria to pregnant women causes temporary infantile colonization. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2004 Mar;38(3):293–7.
-

52. Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Baumler AJ, Falkow S, Valdivia R, Brown W, et al. Extraintestinal dissemination of Salmonella by CD18-expressing phagocytes. *Nature*. 1999 Oct;401(6755):804–8.
53. Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol*. 2001 Apr;2(4):361–7.
54. Bertotto A, Gerli R, Castellucci G, Scalise F, Vaccaro R. Human milk lymphocytes bearing the gamma/delta T-cell receptor are mostly delta TCS1-positive cells. *Immunology*. 1991 Oct;74(2):360–1.
55. Brunser O. Desarrollo de la flora intestinal normal. Vol. Sept; 5, Medwave. 2005.
56. Gronlund M-M, Gueimonde M, Laitinen K, Kociubinski G, Gronroos T, Salminen S, et al. Maternal breast-milk and intestinal bifidobacteria guide the compositional development of the Bifidobacterium microbiota in infants at risk of allergic disease. *Clin Exp Allergy*. 2007 Dec;37(12):1764–72.
57. Marques TM, Wall R, Ross RP, Fitzgerald GF, Ryan CA, Stanton C. Programming infant gut microbiota: influence of dietary and environmental factors. *Curr Opin Biotechnol*. 2010 Apr;21(2):149–56.
58. Adlerberth I, Strachan DP, Matricardi PM, Ahrne S, Orfei L, Aberg N, et al. Gut microbiota and development of atopic eczema in 3 European birth cohorts. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Aug;120(2):343–50.
59. Fallani M, Young D, Scott J, Norin E, Amarri S, Adam R, et al. Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: geographic influence beyond delivery mode, breast-feeding, and antibiotics. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010 Jul;51(1):77–84.
60. Kalliomaki M, Salminen S, Poussa T, Isolauri E. Probiotics during the first 7 years of life: a cumulative risk reduction of eczema in a randomized, placebo-controlled trial. Vol. 119, *The Journal of allergy and clinical immunology*. United States; 2007. p. 1019–21.
61. Kalliomaki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E.

-
- Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* (London, England). 2001 Apr;357(9262):1076–9.
62. Collado MC, Isolauri E, Laitinen K, Salminen S. Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. *Am J Clin Nutr*. 2008 Oct;88(4):894–9.
63. Falagas ME, Betsi GI, Athanasiou S. Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis. *Clin Microbiol Infect*. 2007 Jul;13(7):657–64.
64. Critchfield JW, van Hemert S, Ash M, Mulder L, Ashwood P. The potential role of probiotics in the management of childhood autism spectrum disorders. *Gastroenterol Res Pract*. 2011;2011:161358.
65. Torrazza RM, Ukhanova M, Wang X, Sharma R, Hudak ML, Neu J, et al. Intestinal microbial ecology and environmental factors affecting necrotizing enterocolitis. *PLoS One*. 2013;8(12):e83304.
66. Claud EC, Keegan KP, Brulc JM, Lu L, Bartels D, Glass E, et al. Bacterial community structure and functional contributions to emergence of health or necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Microbiome*. 2013;1(1):20.
67. Ferraris L, Butel MJ, Campeotto F, Vodovar M, Roze JC, Aires J. Clostridia in premature neonates' gut: incidence, antibiotic susceptibility, and perinatal determinants influencing colonization. *PLoS One*. 2012;7(1):e30594.
68. Milisavljevic V, Garg M, Vuletic I, Miller JF, Kim L, Cunningham TD, et al. Prospective assessment of the gastroesophageal microbiome in VLBW neonates. *BMC Pediatr*. 2013;13:49.
69. Costello EK, Carlisle EM, Bik EM, Morowitz MJ, Relman DA. Microbiome assembly across multiple body sites in low-birthweight infants. *MBio*. 2013;4(6):e00782-13.
70. Cukrowska B, LodInova-Zadnlkova R, Enders C, Sonnenborn U, Schulze J, Tlaskalova-Hogenova H. Specific proliferative and antibody responses of premature infants to intestinal colonization with nonpathogenic probiotic *E. coli* strain Nissle 1917. *Scand J Immunol*. 2002 Feb;55(2):204–9.
71. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine

- Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med.* 1992 Jun;20(6):864-74.
72. Goldstein B, Giroir B, Randolph A. International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med.* 2005 Jan;6(1):2-8.
73. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Jama [Internet].* 2016;315(8):801-10.
74. Simonsen KA, Anderson-Berry AL, Delair SF, Dele Davies H. Early-onset neonatal sepsis. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27:21-47.
75. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med.* 2003;31(4):1250-6.
76. Shah BA, Padbury JF. Neonatal sepsis: an old problem with new insights. *Virulence [Internet].* 2014;5(5):170-8.
77. Sánchez García L, Elorza Fernández D. Recién nacido con riesgo infeccioso. Actitud diagnóstica. *An Pediatr Contin.* 2011;9(4):239-48.
78. Guilbert J, Levy C, Cohen R, Delacourt C, Renolleau S, Flamant C. Late and ultra late onset *Streptococcus B* meningitis: clinical and bacteriological data over 6 years in France. *Acta Paediatr.* 2010 Jan;99(1):47-51.
79. López-Sastre, J. Fernández-Colomer B. Sepsis en el recién nacido. *An Pediatr Contin.* 2005;3(1):18-27.
80. Chan GJ, Lee AC, Baqui AH, Tan J, Black RE. Risk of Early-Onset Neonatal Infection with Maternal Infection or Colonization: A Global Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Med.* 2013;10.
81. Shane AL, Stoll BJ. Neonatal sepsis: progress towards improved outcomes. *J Infect [Internet].* 2014 Jan [cited 2015 Jan 20];68 Suppl 1:S24-32.
82. Shane AL, Stoll BJ. Recent developments and current issues in the

-
- epidemiology, diagnosis, and management of bacterial and fungal neonatal sepsis. *Am J Perinatol.* 2013 Feb;30(2):131–41.
83. Hornik CP, Fort P, Clark RH, Watt K, Benjamin DKJ, Smith PB, et al. Early and late onset sepsis in very-low-birth-weight infants from a large group of neonatal intensive care units. *Early Hum Dev.* 2012 May;88 Suppl 2:S69-74.
84. Levine EM, Ghai V, Barton JJ, Strom CM. Intrapartum antibiotic prophylaxis increases the incidence of gram-negative neonatal sepsis. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 1999;7(4):210–3.
85. Xie Y, Kim KJ, Kim KS. Current concepts on Escherichia coli K1 translocation of the blood-brain barrier. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2004 Nov;42(3):271–9.
86. Huang SH, Stins MF, Kim KS. Bacterial penetration across the blood-brain barrier during the development of neonatal meningitis. *Microbes Infect.* 2000 Aug;2(10):1237–44.
87. Shah DK, Lavery S, Doyle LW, Wong C, McDougall P, Inder TE. Use of 2-channel bedside electroencephalogram monitoring in term-born encephalopathic infants related to cerebral injury defined by magnetic resonance imaging. *Pediatrics.* 2006 Jul;118(1):47–55.
88. Glass HC, Bonifacio SL, Chau V, Glidden D, Poskitt K, Barkovich AJ, et al. Recurrent postnatal infections are associated with progressive white matter injury in premature infants. *Pediatrics.* 2008 Aug;122(2):299–305.
89. Stoll BJ, Hansen NI, Adams-Chapman I, Fanaroff AA, Hintz SR, Vohr B, et al. Neurodevelopmental and growth impairment among extremely low-birth-weight infants with neonatal infection. *JAMA.* 2004 Nov;292(19):2357–65.
90. Pammi M, Abrams SA. Oral lactoferrin for the treatment of sepsis and necrotizing enterocolitis in neonates. *Cochrane database Syst Rev.* 2011;(10):CD007138.
91. Manzoni P, Rinaldi M, Cattani S, Pugni L, Romeo MG, Messner H, et al. Bovine lactoferrin supplementation for prevention of late-onset sepsis in very low-birth-weight neonates: a randomized trial. *JAMA.* 2009 Oct;302(13):1421–8.
-

92. Frieden T. Antibiotic resistance threats. *Cdc*. 2013;22–50.
93. World Health Organization. The evolving threat of antimicrobial resistance: Options for action. WHO Publ [Internet]. 2014;1–119.
94. ECDC/EMA Joint Working Group. The bacterial challenge : time to react [Internet]. Vol. 6 July 2011, Reproduction. 2009.
95. Jeon J, Lee J, Lee J, Park K, Karim A, Lee C-R, et al. Structural Basis for Carbapenem-Hydrolyzing Mechanisms of Carbapenemases Conferring Antibiotic Resistance. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2015;16(5):9654–92.
96. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1980 May;289(1036):321–31.
97. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995 Jun;39(6):1211–33.
98. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Mar;54(3):969–76.
99. Rodríguez-Baño J, Pascual A. Clinical significance of extended-spectrum beta-lactamases. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2008;6:671–83.
100. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother*. 2007 Feb;59(2):165–74.
101. Canton R, Coque TM. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol*. 2006 Oct;9(5):466–75.
102. Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect*. 2008 Jan;14 Suppl 1:33–41.
103. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Genetic support of extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect*. 2008 Jan;14 Suppl 1:75–81.
104. Bonnet R, Recule C, Baraduc R, Chanal C, Sirot D, De Champs C, et al. Effect of D240G substitution in a novel ESBL CTX-M-27. *J Antimicrob Chemother*. 2003

-
- Jul;52(1):29–35.
105. Karim A, Poirel L, Nagarajan S, Nordmann P. Plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence ISEcp1. *FEMS Microbiol Lett.* 2001 Jul;201(2):237–41.
 106. Canton R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, et al. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2008 Jan;14 Suppl 1:144–53.
 107. Dolejska M, Frolkova P, Florek M, Jamborova I, Purgertova M, Kutilova I, et al. CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone B2-O25b-ST131 and *Klebsiella* spp. isolates in municipal wastewater treatment plant effluents. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Dec;66(12):2784–90.
 108. Hiroi M, Yamazaki F, Harada T, Takahashi N, Iida N, Noda Y, et al. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in food-producing animals. *J Vet Med Sci.* 2012 Feb;74(2):189–95.
 109. Poirel L, Gniadkowski M, Nordmann P. Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 and of its structurally related beta-lactamase CTX-M-3. *J Antimicrob Chemother.* 2002 Dec;50(6):1031–4.
 110. Lavollay M, Mamlouk K, Frank T, Akpabie A, Burghoffer B, Ben Redjeb S, et al. Clonal dissemination of a CTX-M-15 beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strain in the Paris area, Tunis, and Bangui. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Jul;50(7):2433–8.
 111. Nicolas-Chanoine M-H, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MP, Canica MM, et al. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother.* 2008 Feb;61(2):273–81.
 112. Rogers BA, Sidjabat HE, Paterson DL. *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J Antimicrob*

- Chemother. 2011 Jan;66(1):1–14.
113. Coque TM, Novais A, Carattoli A, Poirel L, Pitout J, Peixe L, et al. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis*. 2008 Feb;14(2):195–200.
114. Clermont O, Lavollay M, Vimont S, Deschamps C, Forestier C, Branger C, et al. The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup. *J Antimicrob Chemother*. 2008 May;61(5):1024–8.
115. Lahlaoui H, Ben Haj Khalifa A, Ben Moussa M. Epidemiology of Enterobacteriaceae producing CTX-M type extended spectrum β -lactamase (ESBL). *Médecine Mal Infect [Internet]*. 2014;44(9):400–4.
116. Rodriguez-Baño J, Paterson DL. A change in the epidemiology of infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms. Vol. 42, *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. United States; 2006. p. 935–7.
117. Romero L, Lopez L, Rodriguez-Baño J, Ramon Hernandez J, Martinez-Martinez L, Pascual A. Long-term study of the frequency of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect*. 2005 Aug;11(8):625–31.
118. Lopez-Cerero L, Bellido M del M, Serrano L, Liro J, Cisneros JM, Rodriguez-Bano J, et al. *Escherichia coli* O25b:H4/ST131 are prevalent in Spain and are often not associated with ESBL or quinolone resistance. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013;31(6):385–8.
119. Rodriguez-Bano J, Navarro MD, Romero L, Martinez-Martinez L, Muniain MA, Perea EJ, et al. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. *J Clin Microbiol*. 2004 Mar;42(3):1089–94.
120. Rodriguez-Baño J, Alcalá JC, Cisneros JM, Grill F, Oliver A, Horcajada JP, et al. Community infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Arch Intern Med*. 2008 Sep;168(17):1897–902.

-
121. Ben-Ami R, Rodriguez-Bano J, Arslan H, Pitout JDD, Quentin C, Calbo ES, et al. A multinational survey of risk factors for infection with extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae in nonhospitalized patients. *Clin Infect Dis*. 2009 Sep;49(5):682–90.
 122. Rodriguez-Bano J, Picon E, Gijon P, Hernandez JR, Ruiz M, Pena C, et al. Community-onset bacteremia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: risk factors and prognosis. *Clin Infect Dis*. 2010 Jan;50(1):40–8.
 123. Mirelis B, Navarro F, Miro E, Mesa RJ, Coll P, Prats G. Community transmission of extended-spectrum beta-lactamase. Vol. 9, Emerging infectious diseases. United States; 2003. p. 1024–5.
 124. Franiczek R, Sobieszczanska B, Grabowski M, Mowszet K, Pytrus T. Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases among *Escherichia coli* isolates from hospitalized and healthy children. *Folia Microbiol (Praha)*. 2003;48(2):243–7.
 125. Rodríguez-Baño J, López-Cerero L, Navarro MD, de Alba PD, Pascual A. Faecal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*: Prevalence, risk factors and molecular epidemiology. *J Antimicrob Chemother*. 2008;62(July):1142–9.
 126. Karanika S, Karantanos T, Arvanitis M, Grigoras C, Mylonakis E. Fecal Colonization with Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae and Risk Factors among Healthy Individuals: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2016;63:ciw283-.
 127. Lo W-U, Ho P-L, Chow K-H, Lai EL, Yeung F, Chiu SS. Fecal carriage of CTXM type extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms by children and their household contacts. *J Infect*. 2010 Apr;60(4):286–92.
 128. Woerther P-L, Burdet C, Chachaty E, Andremont A. Trends in Human Fecal Carriage of Extended-Spectrum Beta-Lactamases in the Community: Toward the Globalization of CTX-M. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2013;26(4):744–58.

129. Lu S-Y, Zhang Y-L, Geng S-N, Li T-Y, Ye Z-M, Zhang D-S, et al. High diversity of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in an urban river sediment habitat. *Appl Environ Microbiol.* 2010 Sep;76(17):5972–6.
130. De Boeck H, Lunguya O, Muyembe J-J, Glupczynski Y, Jacobs J. Presence of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in waste waters, Kinshasa, the Democratic Republic of the Congo. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012 Nov;31(11):3085–8.
131. Aubron C, Poirel L, Ash RJ, Nordmann P. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, U.S. rivers. *Emerg Infect Dis.* 2005 Feb;11(2):260–4.
132. Dhanji H, Murphy NM, Akhigbe C, Doumith M, Hope R, Livermore DM, et al. Isolation of fluoroquinolone-resistant O25b:H4-ST131 *Escherichia coli* with CTX-M-14 extended-spectrum beta-lactamase from UK river water. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Mar;66(3):512–6.
133. Zurfluh K, Hachler H, Nuesch-Inderbinen M, Stephan R. Characteristics of extended-spectrum beta-lactamase- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Isolates from rivers and lakes in Switzerland. *Appl Environ Microbiol.* 2013 May;79(9):3021–6.
134. Amaya E, Reyes D, Paniagua M, Calderon S, Rashid M-U, Colque P, et al. Antibiotic resistance patterns of *Escherichia coli* isolates from different aquatic environmental sources in Leon, Nicaragua. *Clin Microbiol Infect.* 2012 Sep;18(9):E347-54.
135. Alouache S, Kada M, Messai Y, Estepa V, Torres C, Bakour R. Antibiotic resistance and extended-spectrum beta-lactamases in isolated bacteria from seawater of Algiers beaches (Algeria). *Microbes Environ.* 2012;27(1):80–6.
136. Hernandez J, Stedt J, Bonnedahl J, Molin Y, Drobni M, Calisto-Ulloa N, et al. Human-associated extended-spectrum beta-lactamase in the Antarctic. *Appl Environ Microbiol.* 2012 Mar;78(6):2056–8.
137. Guo Y, Zhou H, Qin L, Pang Z, Qin T, Ren H, et al. Frequency, antimicrobial resistance and genetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* in food samples. *PLoS One.* 2016;11(4):1–13.

-
138. Matsumoto Y, Kitazume H, Yamada M, Ishiguro Y, Muto T, Izumiya H, et al. CTX-M-14 type beta-lactamase producing *Salmonella enterica* serovar enteritidis isolated from imported chicken meat. *Jpn J Infect Dis.* 2007 Jul;60(4):236–8.
139. Dhanji H, Murphy NM, Doumith M, Durmus S, Lee SS, Hope R, et al. Cephalosporin resistance mechanisms in *Escherichia coli* isolated from raw chicken imported into the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Dec;65(12):2534–7.
140. Doi Y, Paterson DL, Egea P, Pascual A, Lopez-Cerero L, Navarro MD, et al. Extended-spectrum and CMY-type beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in clinical samples and retail meat from Pittsburgh, USA and Seville, Spain. *Clin Microbiol Infect.* 2010 Jan;16(1):33–8.
141. Kluytmans JAJW, Overdeest ITMA, Willemsen I, Kluytmans-Van Den Bergh MFQ, Van Der Zwaluw K, Heck M, et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from retail chicken meat and humans: Comparison of strains, plasmids, resistance genes, and virulence factors. *Clin Infect Dis.* 2013;56(4):478–87.
142. Leverstein-van Hall MA, Dierikx CM, Cohen Stuart J, Voets GM, van den Munckhof MP, van Essen-Zandbergen A, et al. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clin Microbiol Infect.* 2011 Jun;17(6):873–80.
143. Day MJ, Rodríguez I, van Essen-Zandbergen A, Dierikx C, Kadlec K, Schink A-K, et al. Diversity of STs, plasmids and ESBL genes among *Escherichia coli* from humans, animals and food in Germany, the Netherlands and the UK. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2016;2009:dkv485.
144. Damborg P, Morsing MK, Petersen T, Bortolaia V, Guardabassi L. CTX-M-1 and CTX-M-15-producing *Escherichia coli* in dog faeces from public gardens. *Acta Vet Scand* [Internet]. 2015;57(1):83.
145. Carvalho AC, Barbosa A V., Arais LR, Ribeiro PF, Carneiro VC, Cerqueira AMF. Resistance patterns, ESBL genes, and genetic relatedness of *Escherichia coli* from dogs and owners. *Brazilian J Microbiol* [Internet]. 2016;47(1):150–8.
-

146. Liao X-P, Liu B-T, Yang Q-E, Sun J, Li L, Fang L-X, et al. Comparison of plasmids coharboring 16s rRNA methylase and extended-spectrum beta-lactamase genes among *Escherichia coli* isolates from pets and poultry. *J Food Prot.* 2013 Dec;76(12):2018–23.
147. Meyer E, Gastmeier P, Kola A, Schwab F. Pet animals and foreign travel are risk factors for colonisation with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Infection.* 2012 Dec;40(6):685–7.
148. Sallem R Ben, Gharsa H, Slama K Ben, Rojo-Bezares B, Estepa V, Porres-Osante N, et al. First detection of CTX-M-1, CMY-2, and QnrB19 resistance mechanisms in fecal *Escherichia coli* isolates from healthy pets in Tunisia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2013 Feb;13(2):98–102.
149. Reuland EA, Al Naiemi N, Kaiser AM, Heck M, Kluytmans JAJW, Savelkoul PHM, et al. Prevalence and risk factors for carriage of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Amsterdam. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(4):1076–82.
150. Tham J, Odenholt I, Walder M, Brolund A, Ahl J, Melander E. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in patients with travellers' diarrhoea. *Scand J Infect Dis.* 2010 Apr;42(4):275–80.
151. Dhanji H, Patel R, Wall R, Doumith M, Patel B, Hope R, et al. Variation in the genetic environments of bla(CTX-M-15) in *Escherichia coli* from the faeces of travellers returning to the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother.* 2011 May;66(5):1005–12.
152. Tangden T, Cars O, Melhus A, Lowdin E. Foreign travel is a major risk factor for colonization with *Escherichia coli* producing CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases: a prospective study with Swedish volunteers. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Sep;54(9):3564–8.
153. Peirano G, Laupland KB, Gregson DB, Pitout JDD. Colonization of returning travelers with CTX-M-producing *Escherichia coli*. *J Travel Med.* 2011;18(5):299–303.
154. Rogers BA, Kennedy KJ, Sidjabat HE, Jones M, Collignon P, Paterson DL.

-
- Prolonged carriage of resistant *E. coli* by returned travellers: clonality, risk factors and bacterial characteristics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012 Sep;31(9):2413–20.
155. Tham J, Walder M, Melander E, Odenholt I. Duration of colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in patients with travellers' diarrhoea. *Scand J Infect Dis*. 2012 Aug;44(8):573–7.
156. Tande D, Boisrame-Gastrin S, Munck MR, Hery-Arnaud G, Gouriou S, Jallot N, et al. Intrafamilial transmission of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Babelsberg among the families of internationally adopted children. *J Antimicrob Chemother*. 2010 May;65(5):859–65.
157. Birgand G, Armand-Lefevre L, Lolom I, Ruppe E, Andremont A, Lucet J-C. Duration of colonization by extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae after hospital discharge. *Am J Infect Control*. 2013 May;41(5):443–7.
158. Birgy A, Levy C, Bidet P, Thollot F, Derkx V, Béchet S, et al. ESBL-producing *Escherichia coli* ST131 versus non-ST131: evolution and risk factors of carriage among French children in the community between 2010 and 2015. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2016;1–8.
159. Fernández-Reyes M, Vicente D, Gomariz M, Esnal O, Landa J, Oñate E, et al. High rate of fecal carriage of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in healthy children in Gipuzkoa, northern Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(3):1822–4.
160. Hendrik TC, Voor in 't holt AF, Vos MC. Clinical and Molecular Epidemiology of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella* spp.: A Systematic Review and Meta-Analyses. *PLoS One* [Internet]. 2015;10(10):e0140754.
161. Tschudin-Sutter S, Frei R, Dangel M, Stranden A, Widmer AF. Rate of transmission of extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae without contact isolation. *Clin Infect Dis*. 2012 Dec;55(11):1505–11.
-

162. Tacconelli E, Cataldo MA, Dancer SJ, De Angelis G, Falcone M, Frank U, et al. ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2014 Jan [cited 2015 Jan 30];20 Suppl 1:1–55.
163. Rodríguez-Bano J, Cisneros JM, Cobos-Trigueros N, Fresco G, Navarro-San Francisco C, Gudiol C, et al. Diagnosis and antimicrobial treatment of invasive infections due to multidrug-resistant Enterobacteriaceae. Guidelines of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015 May;33(5):337.e1-337.e21.
164. Rodríguez-Baño J, Miró E, Villar M, Coelho A, Gozalo M, Borrell N, et al. Colonisation and infection due to Enterobacteriaceae producing plasmid-mediated AmpC β -lactamases. *J Infect*. 2012;64(2):176–83.
165. Seral C, Gude MJ. Emergencia de β -lactamasas AmpC plasmídicas (pAmpC ó cefamicinasas): origen , importancia , detección y alternativas terapéuticas. *Rev Esp Quim*. 2012;25(2):89–99.
166. Bou G, Oliver A, Ojeda M, Monzon C, Martinez-Beltran J. Molecular characterization of FOX-4, a new AmpC-type plasmid-mediated beta-lactamase from an Escherichia coli strain isolated in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Sep;44(9):2549–53.
167. Jacoby G a. AmpC β -Lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(1):161–82.
168. Black JA, Moland ES, Thomson KS. AmpC disk test for detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in Enterobacteriaceae lacking chromosomal AmpC beta-lactamases. *J Clin Microbiol*. 2005 Jul;43(7):3110–3.
169. Thomson KS, Sanders CC. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: comparison of the double-disk and three-dimensional tests. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992 Sep;36(9):1877–82.
170. Coudron PE, Moland ES, Thomson KS. Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, and Proteus

-
- mirabilis isolates at a veterans medical center. *J Clin Microbiol.* 2000 May;38(5):1791–6.
171. Black JA, Thomson KS, Buynak JD, Pitout JDD. Evaluation of beta-lactamase inhibitors in disk tests for detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in well-characterized clinical strains of *Klebsiella* spp. *J Clin Microbiol.* 2005 Aug;43(8):4168–71.
172. Black JA, Thomson KS, Pitout JDD. Use of beta-lactamase inhibitors in disk tests to detect plasmid-mediated AmpC beta-lactamases. *J Clin Microbiol.* 2004 May;42(5):2203–6.
173. Pitout JDD, Le PG, Moore KL, Church DL, Gregson DB. Detection of AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp. and *Proteus mirabilis* in a regional clinical microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect.* 2010 Feb;16(2):165–70.
174. Tsakris A, Kristo I, Poulou A, Themeli-Digalaki K, Ikonomidis A, Petropoulou D, et al. Evaluation of boronic acid disk tests for differentiating KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 2009 Feb;47(2):362–7.
175. Pournaras S, Poulou A, Tsakris A. Inhibitor-based methods for the detection of KPC carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in clinical practice by using boronic acid compounds. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Jul;65(7):1319–21.
176. Giske CG, Gezelius L, Samuelsen O, Warner M, Sundsfjord A, Woodford N. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo-beta-lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clin Microbiol Infect.* 2011 Apr;17(4):552–6.
177. Mirelis B, Rivera A, Miro E, Mesa RJ, Navarro F, Coll P. A simple phenotypic method for differentiation between acquired and chromosomal AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006;24(6):370–2.
-

178. Lee W, Jung B, Hong SG, Song W, Jeong SH, Lee K, et al. Comparison of 3 phenotypic-detection methods for identifying plasmid-mediated AmpC beta-lactamase-producing *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* strains. *Korean J Lab Med*. 2009 Oct;29(5):448–54.
179. Perez-Perez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 2002 Jun;40(6):2153–62.
180. Tängdén T, Giske CG. Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: clinical perspectives on detection, treatment and infection control. *J Intern Med* [Internet]. 2015;277(5):501–12.
181. Walther-Rasmussen J, Hoiby N. Class A carbapenemases. *J Antimicrob Chemother*. 2007 Sep;60(3):470–82.
182. Marchaim D, Navon-Venezia S, Schwaber MJ, Carmeli Y. Isolation of imipenem-resistant *Enterobacter* species: emergence of KPC-2 carbapenemase, molecular characterization, epidemiology, and outcomes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Apr;52(4):1413–8.
183. Castanheira M, Deshpande LM, Farrell SE, Shetye S, Shah N, Jones RN. Update on the prevalence and genetic characterization of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in Indian hospitals during 2010. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013 Feb;75(2):210–3.
184. Drawz SM, Bonomo RA. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev*. 2010 Jan;23(1):160–201.
185. Stachyra T, Pechereau M-C, Bruneau J-M, Claudon M, Frere J-M, Miossec C, et al. Mechanistic studies of the inactivation of TEM-1 and P99 by NXL104, a novel non-beta-lactam beta-lactamase inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Dec;54(12):5132–8.
186. Perez-Llarena FJ, Bou G. Beta-lactamase inhibitors: the story so far. *Curr Med Chem*. 2009;16(28):3740–65.
187. Zowawi HM, Balkhy HH, Walsh TR, Paterson DL. beta-Lactamase production

-
- in key gram-negative pathogen isolates from the Arabian Peninsula. *Clin Microbiol Rev.* 2013 Jul;26(3):361–80.
188. Meletis G, Oustas E, Bagkeri M. Carbapenemase reports from the Balkans: a systematic review. *Infez Med.* 2014 Jun;22(2):85–106.
189. Doi Y, Paterson DL. Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *Semin Respir Crit Care Med.* 2015;36(212):74–84.
190. Rahman M, Shukla SK, Prasad KN, Ovejero CM, Pati BK, Tripathi A, et al. Prevalence and molecular characterisation of New Delhi metallo-beta-lactamases NDM-1, NDM-5, NDM-6 and NDM-7 in multidrug-resistant Enterobacteriaceae from India. *Int J Antimicrob Agents.* 2014 Jul;44(1):30–7.
191. Nordmann P, Boulanger AE, Poirel L. NDM-4 metallo-beta-lactamase with increased carbapenemase activity from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Apr;56(4):2184–6.
192. Kim JY, Jung H Il, An YJ, Lee JH, Kim SJ, Jeong SH, et al. Structural basis for the extended substrate spectrum of CMY-10, a plasmid-encoded class C beta-lactamase. *Mol Microbiol.* 2006 May;60(4):907–16.
193. Jeon JH, Hong MK, Lee JH, Lee JJ, Park KS, Karim AM, et al. Structure of ADC-68, a novel carbapenem-hydrolyzing class C extended-spectrum beta-lactamase isolated from *Acinetobacter baumannii*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2014 Nov;70(Pt 11):2924–36.
194. The Lahey Clinic Database. β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV, and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes [Internet].
195. Evans BA, Amyes SGB. OXA beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2014 Apr;27(2):241–63.
196. Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Jan;48(1):15–22.
197. Viau R, Frank KM, Jacobs MR, Wilson B, Kaye K, Donskey CJ, et al. Intestinal carriage of Carbapenemase-producing organisms: Current status of

- surveillance methods. *Clin Microbiol Rev.* 2016;29(1):1–27.
198. Cercenado E. Detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas en la rutina del laboratorio. *Rev Esp Quim.* 2015;28:8–11.
199. Samra Z, Ofir O, Lishtzinsky Y, Madar-Shapiro L, Bishara J. Outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-3 in a tertiary medical centre in Israel. *Int J Antimicrob Agents.* 2007 Dec;30(6):525–9.
200. Agodi A, Voulgari E, Barchitta M, Politi L, Koumaki V, Spanakis N, et al. Containment of an outbreak of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy. *J Clin Microbiol.* 2011 Nov;49(11):3986–9.
201. Maltezou HC, Giakkoupi P, Maragos A, Bolikas M, Raftopoulos V, Papahatzaki H, et al. Outbreak of infections due to KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in Crete (Greece). *J Infect.* 2009 Mar;58(3):213–9.
202. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis.* 2013 Sep;13(9):785–96.
203. Balm MND, Ngan G, Jureen R, Lin RTP, Teo JWP. OXA-181-producing *Klebsiella pneumoniae* establishing in Singapore. *BMC Infect Dis.* 2013;13:58.
204. Dash N, Panigrahi D, Zarouni M Al, Darwish D, Ghazawi A, Sonnevend A, et al. High incidence of New Delhi metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Sharjah, United Arab Emirates. *Microb Drug Resist.* 2014 Feb;20(1):52–6.
205. Day KM, Salman M, Kazi B, Sidjabat HE, Silvey A, Lanyon C V, et al. Prevalence of NDM-1 carbapenemase in patients with diarrhoea in Pakistan and evaluation of two chromogenic culture media. *J Appl Microbiol.* 2013 Jun;114(6):1810–6.
206. Hu L, Zhong Q, Shang Y, Wang H, Ning C, Li Y, et al. The prevalence of carbapenemase genes and plasmid-mediated quinolone resistance determinants in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae from five teaching hospitals in central China. *Epidemiol Infect.* 2014 Sep;142(9):1972–7.
207. Jean S-S, Lee W-S, Hsueh P-R. Nationwide spread of *Klebsiella pneumoniae*

-
- carbapenemase-2-producing *K. pneumoniae* sequence type 11 in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect.* 2013 Oct;46(5):317–9.
208. Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB, 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 Aug;53(8):3365–70.
209. Warburg G, Hidalgo-Grass C, Partridge SR, Tolmasky ME, Temper V, Moses AE, et al. A carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* epidemic clone in Jerusalem: sequence type 512 carrying a plasmid encoding aac(6')-Ib. *J Antimicrob Chemother.* 2012 Apr;67(4):898–901.
210. Capone A, Giannella M, Fortini D, Giordano A, Meledandri M, Ballardini M, et al. High rate of colistin resistance among patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection accounts for an excess of mortality. *Clin Microbiol Infect.* 2013 Jan;19(1):E23-30.
211. 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 Feb;66(2):307–12.
212. Pereira PS, de Araujo CFM, Seki LM, Zahner V, Carvalho-Assef APD, 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 Feb;68(2):312–6.
213. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clin Microbiol Infect.* 2014 Sep;20(9):821–30.
214. Palacios-Baena ZR, Oteo J, Conejo C, Larrosa MN, Bou G, Fernández-Martínez M, et al. Comprehensive clinical and epidemiological assessment of colonisation and infection due to carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Spain. *J Infect [Internet].* 2015;(November):1–9.
215. Ortega A, Sáez D, Bautista V, Fernández-Romero S, Lara N, Aracil B, et al. Carbapenemase-producing *Escherichia coli* is becoming more prevalent in

- Spain mainly because of the polyclonal dissemination of OXA-48. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2016;dkw148.
216. Giske CG, Martinez L, Cantòn R, Stefani S, Skov R, Glupczynski Y, et al. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and / or epidemiological importance. *Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2013;(December):1–40.
217. Dortet L, Agathine A, Naas T, Cuzon G, Poirel L, Nordmann P. Evaluation of the RAPIDEC(R) CARBA NP, the Rapid CARB Screen® and the Carba NP test for biochemical detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*. 2015 Nov;70(11):3014–22.
218. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis*. 2012 Sep;18(9):1503–7.
219. Guiral E, Bosch J, Vila J, Soto SM. Prevalence of *Escherichia coli* among samples collected from the genital tract in pregnant and nonpregnant women: Relationship with virulence. *FEMS Microbiol Lett*. 2011 Jan;314(2):170–3.
220. Devi U, Barman N, Barua P, Malik V, Das JK et al. Vaginal Carriage of Antibiotic Resistant *Escherichia coli* by Pregnant Women: A Concern for the Neonate. *Clin Microbiol Open Access* [Internet]. 2014;3(4):3–6.
221. Rettedal S, Löhr IH, Bernhoff E, Natås OB, Sundsfjord A, Øymar K. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae among pregnant women in Norway: prevalence and maternal-neonatal transmission. *J Perinatol* [Internet]. 2015;35(11):907–12.
222. Denkel LA, Gastmeier P, Piening B. To screen or not to screen mothers of preterm infants for extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae (ESBL-E). *J Perinatol* [Internet]. 2015;35(11):893–4.
223. Denkel LA, Schwab F, Kola A, Leistner R, Garten L, von Weizsacker K, et al. The mother as most important risk factor for colonization of very low birth weight (VLBW) infants with extended-spectrum b-lactamase-producing Enterobacteriaceae (ESBL-E). *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2014;69(8):2230–7.

-
224. Villar HE, Aubert V, Baserni MN, Jugo MB. Maternal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates in Argentina. *J Chemother* [Internet]. 2013;25(6):324–7.
225. Pathak A, Chandran SP, Mahadik K, Macaden R, Lundborg CS. Frequency and factors associated with carriage of multi-drug resistant commensal *Escherichia coli* among women attending antenatal clinics in central India. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2013;13:199.
226. Blanco VM, Maya JJ, Correa A, Perenguez M, Muñoz JS, Motoa G, et al. Prevalencia y factores de riesgo para infecciones del tracto urinario de inicio en la comunidad causadas por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido en Colombia. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2016;(xx).
227. Eppes CS, Clark SL. Extended-spectrum β -lactamase infections during pregnancy: a growing threat. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2015;213(5):650–2.
228. Al-Mayahie SMG. Phenotypic and genotypic comparison of ESBL production by vaginal *Escherichia coli* isolates from pregnant and non-pregnant women. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* [Internet]. 2013;12:7.
229. Dubois V, De Barbeyrac B, Rogues A-M, Arpin C, Coulange L, Andre C, et al. CTX-M-producing *Escherichia coli* in a maternity ward: a likely community importation and evidence of mother-to-neonate transmission. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2010;65(7):1368–71.
230. López-Cerero L, De Cueto M, Saenz C, Navarro D, Velasco C, Rodríguez-Baño J, et al. Neonatal sepsis caused by a CTX-M-32-producing *Escherichia coli* isolate. *J Med Microbiol*. 2008;57:1303–5.
231. Birgy A, Mariani-Kurkdjian P, Bidet P, Doit C, Genel N, Courroux C, et al. Characterization of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains involved in maternal-fetal colonization: Prevalence of *E. coli* ST131. *J Clin Microbiol*. 2013;51(6):1727–32.
232. Abdel-Hady H, Hawas S, El-Daker M, El-Kady R. Extended-spectrum beta-

- lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in neonatal intensive care unit. *J Perinatol*. 2008;28(10):685–90.
233. Cassettari VC, da Silveira IR, Dropa M, Lincopan N, Mamizuka EM, Matt?? MH, et al. Risk factors for colonisation of newborn infants during an outbreak of extended-spectrum ??-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in an intermediate-risk neonatal unit. *J Hosp Infect [Internet]*. 2009;71(4):340–7.
234. Tschudin-Sutter S, Frei R, Battegay M, Hoesli I, Widmer AF. Extended Spectrum β -Lactamase-producing *Escherichia coli* in Neonatal Care Unit. *Emerg Infect Dis [Internet]*. 2010;16(11):1758–60.
235. Seale J, Millar M. Perinatal vertical transmission of antibiotic-resistant bacteria: A systematic review and proposed research strategy. Vol. 121, *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2014. p. 923–8.
236. Lohr IH, Rettedal S, Natas OB, Naseer U, Oymar K, Sundsfjord A. Long-term faecal carriage in infants and intra-household transmission of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* following a nosocomial outbreak. *J Antimicrob Chemother*. 2013 May;68(5):1043–8.
237. Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-fourth informational supplement. CLSI Document M100-S24. 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania, 19087 USA: Clinical and Laboratory Standard Institute; 2014.
238. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods*. 2005;63(3):219–28.
239. Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep*. 2013;5(1):58–65.
240. Branger C, Zamfir O, Geoffroy S, Laurans G, Arlet G, Thien HV, et al. Genetic background of *Escherichia coli* and extended-spectrum beta-lactamase type. *Emerg Infect Dis*. 2005 Jan;11(1):54–61.

-
241. Tenover FC, Arbeit RD, Goering R V, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995 Sep;33(9):2233–9.
 242. Valverde A, Coque TM, Sánchez-Moreno MP, Rollán A, Baquero F, Cantón R. Dramatic Increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae during nonoutbreak situations in Spain. *J Clin Microbiol.* 2004;42(10):4769–75.
 243. Castillo García FJ, Seral García C, De La Gandara MP, Millán Lou MI, Pitart Ferré C. Prevalence of fecal carriage of ESBL-producing Enterobacteriaceae in hospitalized and ambulatory patients during two non-outbreak periods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2007;26(1):77–8.
 244. Pallecchi L, Bartoloni A, Fiorelli C, Mantella A, Di Maggio T, Gamboa H, et al. Rapid dissemination and diversity of CTX-M extended-spectrum β -lactamase genes in commensal *Escherichia coli* isolates from healthy children from low-resource settings in Latin America. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(8):2720–5.
 245. Rodríguez-Baño J, Lopez-Cerero L, Navarro MD, Diaz de Alba P, Pascual A. Faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: prevalence, risk factors and molecular epidemiology. *J Antimicrob Chemother.* 2008 Nov;62(5):1142–9.
 246. Duman M, Abacioglu H, Karaman M, Duman N, Özkan H. B-Lactam Antibiotic Resistance in Aerobic Commensal Fecal Flora of Newborns. *Pediatr Int.* 2005;47(3):267–73.
 247. O'Connor C, Philip RK, Kelleher J, Powell J, O'Gorman A, Slevin B, et al. The first occurrence of a CTX-M ESBL-producing *Escherichia coli* outbreak mediated by mother to neonate transmission in an Irish neonatal intensive care unit. *BMC Infect Dis [Internet].* 2017;17(1):16.

8. ANEXOS

8. ANEXOS

Anexo 1: Hoja de información para embarazadas

HOJA DE INFORMACIÓN A LA PACIENTE

Observación sobre el comportamiento de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido y carbapenemasas en la mujer embarazada y el neonato . Código: ESTUDIO OBLEA

Le proponemos participar en un estudio de investigación cuyo objetivo es la observación de la prevalencia (proporción de personas con una determinada característica con respecto al total de la población) de colonización en la mujer embarazada de unos microorganismos multirresistentes denominados enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido y carbapenemasas.

La resistencia a los antibióticos por parte de las bacterias es un problema mundialmente extendido que hace que la vigilancia ante ellos de manera activa deba ser constante, con, entre otros medios, la investigación y el descubrimiento de nuevos fármacos para hacerles frente.

Cuando se detecta una infección se suele administrar un tratamiento antibiótico empírico (“a ciegas”) teniendo en cuenta las infecciones más frecuentes en la población a la que pertenece el enfermo. Pero cuando la infección la produce un organismo multirresistente pueden pasar varios días hasta que se aísla, se identifique y se pauten un tratamiento efectivo. Este tiempo puede a veces ser demasiado.

El objeto de nuestro estudio son unos microorganismos mundialmente extendidos, muy frecuentes en la raza humana y varias razas animales, que en los últimos veinte años aproximadamente, han logrado crear resistencias a los antibióticos más comúnmente usados, sobre todo a nivel hospitalario.

Se ha demostrado que el ser humano, en diferentes proporciones según la población estudiada (en nuestro medio aproximadamente un 7%), puede ser colonizado por dichos microorganismos y entonces convertirse en portador, es decir, “transporta” pero sin sufrir infección.

Los objetivos establecidos de nuestro estudio son los siguientes:

- 1.1 Conocer la prevalencia de portadores de enterobacterias productoras de BLEE y carbapenemasas en mujeres embarazadas.
- 1.2 Conocer la dinámica (cambios) del estado de portador en mujeres durante el tercer trimestre del embarazo.
- 1.3 Conocer la frecuencia de transmisión vertical (madre-hijo) de enterobacterias productoras de BLEE y carbapenemasas.
- 1.4 Conocer los factores de riesgo asociados con la colonización por enterobacterias productoras de BLEE y carbapenemasas en mujeres embarazadas.
- 1.5 Conocer el impacto del parto natural en la transmisión de enterobacterias productoras de BLEE y carbapenemasas y los factores de riesgo para la transmisión.
- 1.6 Conocer la dinámica del estado de portador en neonatos.

No sabemos todo lo que quisiéramos saber sobre estos microorganismos que pudieran ser perniciosos tanto para su salud y la de su hijo como para la población en general. La única manera de saberlo es realizar estudios como éste. Aunque puede que usted no obtenga un beneficio individual directo de los conocimientos obtenidos como resultado de este estudio, ya que lo más probable es que ni usted ni su hijo se hallen colonizados por estas bacterias se beneficiarán en el futuro otras mujeres o usted misma en futuros embarazos. Gracias a su participación podremos conocer más acerca de la cantidad de mujeres embarazadas que hay en nuestro medio colonizadas por dichas bacterias, acerca de la posible transmisión al neonato durante el parto y si en un futuro sería recomendable emprender estrategias de cribado sistemático y uso de antibióticos en las mujeres con riesgo de infección o en todas las mujeres en general durante el embarazo, como por ejemplo se realizan para la detección del estreptococo agalactiae.

Se le propone este estudio porque:

A- Está entre las semanas 35 y 37 de su embarazo y ha de recoger la muestra del cribado del estreptococo del grupo beta (EGB), cribado universal (para todas las mujeres embarazadas incluidas en el Proceso Asistencial de Embarazo, Parto y Puerperio del S.A.S.) en nuestra comunidad autónoma. Dicha muestra, en el caso de aceptar la participación en el estudio, se aprovechará para la realización del cribado mencionado, para la detección de los microorganismos de nuestro estudio. El hecho de aceptar o no no variaría en ningún caso la realización del cribado de EGB.

B- Ha ingresado de parto o ha parido en el Hospital Universitario Virgen Macarena, lugar donde se va a llevar a cabo el estudio durante los próximos meses.

Para participar debe leer atentamente el impreso de consentimiento informado que el médico o matrona le ha dado y, una vez comprendido lo que supone su participación y si usted está de acuerdo, firmarlo y fecharlo después en la última página.

En todo momento puede solicitar explicaciones a su médico sobre el desarrollo del estudio. Y después, sólo si está de acuerdo con lo que se le propone, será incluido en el estudio.

A partir de su aceptación del estudio haremos lo siguiente:

A) En TODAS las participantes, se recogerá una encuesta con los datos socioculturales y una pequeña encuesta con los factores de riesgo probables o establecidos para la colonización por parte de los microorganismos estudiados.

B) En mujeres que entren en el estudio en la semana 35-37 con la muestra recogida para el cribado de EGB:

Se usará dicha muestra para el cribado de EGB y posteriormente para el cribado de las bacterias estudiadas. Se les avisará en el caso de que el cultivo haya sido

positivo (en ningún caso cuando sea negativo) para alguno de los microorganismos estudiados para hacer un control más exhaustivo de su embarazo y parto.

C) En mujeres que hayan entrado en el estudio tanto en semana 35-37 como en el momento del parto:

- a. Durante el parto o la estancia en la sala de puérperas (previa al alta hospitalaria) se tomará otra muestra igual que la del cribado de EGB (exudado vagino-rectal)
- b. Se tomará una muestra para cultivo, exclusivamente rectal al neonato (este procedimiento consta de un consentimiento informado diferente, en tanto que el objeto del estudio en este caso es otra persona y debería firmarlo usted como madre y/o su padre o tutor, ya que la misma será menor de edad).

D) En el caso de que el neonato esté colonizado por alguno de los microorganismos estudiados se realizará un seguimiento con una nueva determinación en el tiempo que lo estimen convenientes tanto los servicios de Neonatología como de Enfermedades Infecciosas y Microbiología del Hospital Universitario Virgen Macarena.

Este estudio es observacional, es decir, nos limitaremos a recoger datos objetivos sin poner nunca en riesgo ni a usted ni su embarazo, así como al neonato tras el parto. La toma de muestras es completamente inocua, es decir, no conlleva ningún riesgo, y junto con la encuesta es el único acto a realizar por su parte.

También es posible que contactemos con usted más adelante para preguntarle sobre su evolución y/o la de su bebé.

Tiene que saber que la participación en el estudio es voluntaria y que, si decide participar, tiene la posibilidad de revocar su consentimiento en cualquier momento

sin perjuicio alguno, sin tener que dar explicaciones, y sin que ello afecte a su relación con su/s médico/s o a futuros tratamientos.

Si durante el transcurso de este estudio se obtuvieran nuevos datos sobre los microorganismos estudiados le informaremos para que pueda tomar las decisiones que crea oportunas.

Los datos del estudio son confidenciales y sólo tendrán acceso a ellos los investigadores y el personal encargado de garantizar la calidad de los datos. Las autoridades sanitarias pueden, eventualmente, acceder a los mismos durante una inspección. Los nombres de los participantes no aparecerán en ninguna información o publicación de los datos del estudio. Su información personal no estará disponible al público, cumpliendo lo establecido en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal.

En caso de que sufriera algún perjuicio por la participación en el estudio, se pondrá a su disposición todos los medios disponibles y compensación de daños para subsanarlo.

La firma de la hoja de consentimiento no supone la renuncia a ningún derecho.

El investigador responsable del estudio es el Dr. Jiménez Rámila que le responderá a cualquier duda que tenga sobre el estudio, y con el que puede contactar en el Teléfono 955008426.

Este estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de este Hospital y por las autoridades sanitarias españolas.

Anexo 2: Consentimiento informado para mujeres embarazadas en tercer trimestre y parto

CONSENTIMIENTO INFORMADO

TÍTULO DEL ESTUDIO: Observación sobre el comportamiento de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en la mujer embarazada y el neonato . Código: ESTUDIO OBLEA

Yo _____

(Nombre y apellidos)

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con el Dr. Jiménez Rámila o alguno de los colobaradores

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1. Cuando quiera.
2. Sin tener que dar explicaciones.
3. Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos y los de mi hijo.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Firma de la participante Fecha

DNI:

Firma del investigador Fecha

Anexo 3: Consentimiento informado para neonatos

CONSENTIMIENTO INFORMADO NEONATOS

TÍTULO DEL ESTUDIO: Observación sobre el comportamiento de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en la mujer embarazada y el neonato . Código: ESTUDIO OBLEA

Yo _____ como progenitor / tutor del recién nacido _____

(Nombre y apellidos)

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con el Dr.Jiménez Rámila o alguno de los colaboradores del estudio

Comprendo que la participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirar al recién nacido del estudio:

1. Cuando quiera.
2. Sin tener que dar explicaciones.
3. Sin que esto repercuta en los cuidados médicos del menor.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Firma de la participante Fecha

DNI:

Anexo 4: Hoja de instrucciones para la toma de muestras

Instrucciones para la correcta recogida de muestras de exudado vagino rectal para el cribado de estreptococo agalactiae y determinación de enterobacterias productoras de BLEE.

- A. Material necesario:
 - a. Guantes de goma
 - b. Torunda facilitada para dicho uso

- B. Obtención de la muestra
 - a. Se introducirá la torunda en la vagina dejándola entre diez y treinta segundos.
 - b. Acto seguido se repetirá el procedimiento **CON LA MISMA TORUNDA** a través del esfínter anal. Para que la muestra sea válida, ésta debe salir **manchada con heces**.

- C. Conservación
 - a. Si no se entrega inmediatamente, debe hacerse en el plazo de 24 horas, manteniendo mientras tanto la muestra refrigerada a 4°C (refrigerador doméstico).

Anexo 5: Formulario para la recogida de muestras en semana 35-37

(ESPACIO PARA PEGATINA IDENTIFICATIVA, en su defecto rellenar)

Nombre y apellidos: _____

NUHSA: _____

Tfnos de rápida localización: _____

Fecha de consulta: ___ / ___ / ___

Datos sociodemográficos:

- Edad _____
- Raza _____
- Tiempo de residencia en España _____ meses (a rellenar si la paciente lleva menos de 2 años en España)
- Nivel educativo
 - Sin estudios
 - Primarios
 - Secundarios
 - Universitarios
- Número de convivientes en el domicilio habitual _____
- ¿Cuidador de enfermo? Sí / NO
- Viajes al extranjero en el último año Sí / NO
 - ¿Dónde?
- ¿Cuántas veces ha realizado la comida principal del día fuera de casa en el último mes?
 - Menos de 7 veces - Entre 7 y 15 veces - Más de 15 veces

Antecedentes gineco-obstétricos

- G ___ P ___ A ___ C ___

Complicaciones en partos anteriores:

- Colonización por EGB durante este embarazo (Urocultivo positivo)
SÍ / NO
- Gestación única / múltiple (2 / 3 / más fetos)
- Gestación:
 - o Espontánea - Inseminación - FIV/ICSI

Antecedentes personales

- Hipertensión
 - o Pregestacional Sí / NO
 - o Gestacional Sí / NO
- Diabetes
 - o Pregestacional Sí / NO
 - o Gestacional Sí / NO Controlada con
dieta y ejercicio / Necesario uso de insulina
- Insuficiencia renal Sí / NO
- Cardiopatía Sí / NO ¿Cuál?

- Enfermedad hepática Sí / NO ¿Cuál?

- Uso de fármacos inmunosupresores Sí / NO ¿Cuál/es?

- Infecciones urinarias de repetición Sí / NO
¿Tratamiento realizado? _____
- Uso de antibióticos en los últimos 6 meses Sí / NO ¿Cuál/es?
¿Motivo/s? _____
- Ingresos hospitalarios durante el embarazo Sí / NO ¿Cuántos?

 - o Trimestre: Primero Segundo Tercero
 - o Motivo:

 - o Duración de la estancia: _____ días

Anexo 6: Formulario para la recogida de muestras periparto
Formulario para las pacientes con muestra extraída tras el parto

(ESPACIO PARA PEGATINA IDENTIFICATIVA, en su defecto rellenar)

Nombre y apellidos: _____

NUHSA: _____

Tfnos de rápida localización: _____

Fecha del parto: ___ / ___ / ___

Datos sociodemográficos:

- Edad _____
- Raza _____
- Tiempo de residencia en España _____ meses (a rellenar si la paciente lleva menos de 2 años en España)
- Nivel educativo
 - Sin estudios
 - Primarios
 - Secundarios
 - Universitarios
- Número de convivientes en el domicilio habitual _____
- ¿Cuidador de enfermo? Sí/No
- Viajes al extranjero en el último año Sí / NO
 - ¿Dónde?
- ¿Cuántas veces ha realizado la comida principal del día fuera de casa en el último mes?
 - Menos de 7 veces - Entre 7 y 15 veces - Más de 15 veces

Antecedentes gineco-obstétricos

- G ____ P ____ A ____ C ____
- Complicaciones en partos anteriores:

- Colonización por EGB durante este embarazo SÍ / NO
 - Cultivo vagino_rectal
 - Urocultivo
- Gestación única / múltiple (2 / 3 / más fetos)
- Gestación:
 - Espontánea
 - Inseminación
 - FIV/ICSI

Antecedentes personales

- Hipertensión
 - Pregestacional Sí / NO
 - Gestacional Sí / NO
- Diabetes
 - Pregestacional Sí / NO
 - Gestacional Sí / NO
 - Controlada con dieta y ejercicio / Necesario uso de insulina
- Insuficiencia renal Sí / NO
- Cardiopatía Sí / NO ¿Cuál?

- Enfermedad hepática Sí / NO ¿Cuál?

- Uso de fármacos inmunosupresores Sí / NO ¿Cuál/es?

- Infecciones urinarias de repetición Sí / NO ¿Tratamiento
realizado? _____
- Uso de antibióticos en los últimos 6 meses Sí / NO ¿Cuál/es?
¿Motivo/s? _____
- Ingresos hospitalarios durante el embarazo Sí / NO ¿Cuántos?

 - Trimestre: Primero Segundo Tercero

-
- Motivo:

- Duración de la estancia: _____ días

Datos del parto

- Edad gestacional _____ días
- Rotura prematura de membranas Sí / NO
_____ horas
- EGB Positivo / Negativo
- BLEA positivo en tercer trimestre (rellenar solo si se tiene acceso a los datos)
- Uso de antibióticos intraparto
 - Sí / NO ¿Cuál/es?_____
- Horas de duración del parto (a partir de dos cms de dilatación)
_____ horas
- Epidural Sí / NO
- Enema Sí / NO
- Sondaje uretral Sí / NO
- Parto
 - Espontáneo / Estimulado / Inducido
 - Vía de finalización
 - Parto
 - Espontáneo
 - Instrumental
 - Ventosa
 - Fórceps
 - Espátulas
 - Cesárea
 - Urgente
 - Electiva

- Episiotomía Sí / NO
 - Media
 - Mediolateral
- Desgarro
 - D I
 - D II
 - D III
 - Parcial
 - Completo
 - D IV
 - Vaginal (paredes laterales)
 - Uso de antibióticos con el desgarro (obligatorio en D III y IV)
 - Sí / NO
 - ¿Cuál/es?_____
 - _____

Anexo 7: Formulario para la recogida de muestras neonatales

(ESPACIO PARA PEGATINA IDENTIFICATIVA, en su defecto rellenar) **NEONATO**

Nombre y apellidos: _____

NUHSA: _____

Tfnos de rápida localización: _____

(ESPACIO PARA PEGATINA IDENTIFICATIVA, en su defecto rellenar) **MADRE**

Nombre y apellidos: _____

NUHSA: _____

Tfnos de rápida localización: _____

DATOS DEL RN

- Fecha del parto: ____ / ____ / ____
- Peso: _____
- Sexo: H / M
- Apgar: _____
- Aspiración de secreciones: _____
- Lavado de estómago: _____
- Ingreso en Neonatología
 - Sí / No
 - Motivo:

 - Duración de la estancia: _____ días

9. ABREVIATURAS

9. ABREVIATURAS

Relación de abreviaturas usadas en esta tesis

ADN: Ácido desoxirribonucleico

BLEE: Betalactamasas de espectro extendido

BLEE-E: Enterobacteria productora de betalactamasas

CLSI: *Clinical & Laboratory Standards Institute*

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

COR: Característica Operativa del Receptor

DE: Desviación estándar

dNTPs: Desoxinucleótidos trifosfato

ECDC: *European Center for Disease Control and Prevention*

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EPC: Enterobacteria productora de carbapenemasa

EUCAST: *European committee on antimicrobial susceptibility testing*

FIV: Fecundación *in vitro*

FOS: Fosfomicina

GALT: *Gut-Associated Lymphoid Tissue*

HTA: Hipertensión arterial

IC: intervalo de confianza

ICSI: Inyección intracitoplasmática de espermatozoides

IgA: Inmunoglobulina de clase A

ITU: Infección del tracto urinario

MALDI: *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*

MHA: *Mueller-Hinton Agar*

OMS: Organización Mundial de la Salud

OR: Odds Ratio

PFGE: *Pulsed-field Gel Electrophoresis*

PBP: *Penicilin binding proteins* (Proteínas fijadoras de penicilinas)

PCR: *Polimerase Chain Reaction* (reacción en cadena de la polimerasa)

PELOD: *Pediatric Logistic Organ Dysfunction*

RN: Recién nacido

RR: Riesgo relativo

RT-PCR: *Real Time Polimerase Chain Reaction*

SEIMC: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

SRIS: Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica

SSPA: Sistema Sanitario Público de Andalucía

TH2: Linfocito de tipo T *Helper 2*

TSI: Triple Sugar Iron Agar

UCI: Unidad de cuidados intensivos

UCIN: Unidad de cuidados intensivos neonatales

*Esta tesis doctoral
terminó de redactarse
el día 18 de abril de 2017*