



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
Facultad de Medicina
Departamento de Microbiología

TESIS DOCTORAL

Estudio multicéntrico de bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido: factores de riesgo, características microbiológicas e impacto clínico.

Trabajo realizado para alcanzar el grado de Doctor por la Licenciada en Farmacia D^a. Encarnación Picón Toro

Sevilla, diciembre de 2013



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 "Estudio multicéntrico de bacteriemias *por Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido: factores de riesgo, características microbiológicas e impacto clínico" ha sido realizada por Dña. Encarnación Picón Toro 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 3 de diciembre 2013.

Fdo. Dr. D. Álvaro Pascual Hernández

Dr. D. Jesús Rodríguez Baño

AGRADECIMIENTOS

Una vez terminado este proyecto, quiero agradecer en primer lugar al Dr. Álvaro Pascual por haberme contratado y dado la oportunidad de trabajar en investigación, cosa que ya había descartado poder hacer, y por supuesto, agradecerle el poder plasmarlo después en esta tesis doctoral. Darle las gracias de nuevo al Dr. Álvaro junto al Dr. Jesús Rodríguez Baño por haber sido mis directores, y por haber tenido paciencia y tiempo para la tesis, y para mí.

Agradezco al Dr. Javier Aznar que fuera mi tutor en el Programa de Doctorado y así poder finalizar todo el trabajo en forma de esta tesis.

Al Dr. Evelio J. Perea le agradezco que me acogiera en el Departamento de Microbiología como doctorando. Le doy las gracias a la Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI) por haber proyectado y financiado este trabajo.

Tengo que agradecer a los compañeros del laboratorio. Al Dr. José Ramón el primero de ellos, por iniciarme en el trabajo experimental de esta tesis, y a todos los demás por haberme ayudado y colaborado de una u otra manera: Dr. José Manuel Rodríguez, Dra. Lorena López, Dra. Isabel Luque, Dra. Sofía Ballesta, Dra. Carmen Conejo, Dr. Felipe Fernández y D. Juan Alcalá. Gracias a Conce, por echarme una mano en el laboratorio cuando se lo pedí y ser amiga además de compañera de trabajo. A Paula y Lara, que repitieron unos ensayos de confirmación una vez que ya me había ido. A Pilar, por ayudarme con "el papeleo" y ser amiga y compartir los momentos de decaimiento y, por supuesto, agradecer a la Dra. Carmen Velasco que entre otras cosas me ayudó a diseñar los cebadores aportados a esta tesis.

No quiero olvidarme de dar las gracias al Dr. Miguel Ángel Caviedes, profesor que en la carrera me acogió como alumna interna en su departamento y fue quien me inició en el mundo de la investigación e hizo que me entrara ese "gusanillo".

También tengo que agradecerle a mi familia, a mis amigos y a mis compañeros de trabajo el que me hayan estado apoyando y dando ánimos para que continuara con la tesis, a pesar de estar alejada ya del mundo de la universidad y de la investigación, incluso de la ciudad, hechos que a veces hacían que quisiera abandonar. A Ionel le agradezco que estuviera ahí para apoyarme, y por tener paciencia, soportar los momentos de estrés y nervios estoicamente aún cuando no he podido dedicarle mucho tiempo en los dos últimos años.

A todos ellos les doy las gracias y les dedico esta tesis.

ÍNDICE

ÍNDICE	13
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	19
1.1. Tablas	21
1.2. Figuras	23
1. INTRODUCCIÓN	27
1.1. Bacteriemia	29
1.1.1. Bacteriemia y sepsis	29
1.1.2. Epidemiología de la bacteriemia y la sepsis	32
1.1.3. Origen y etiología de las bacteriemias en función de la adquisición	33
1.1.3.1. Bacteriemias de adquisición estrictamente comunitaria	35
1.1.3.2. Bacteriemias relacionadas con los cuidados sanitarios	36
1.1.3.3. Bacteriemias de origen nosocomial	36
1.1.4. Tratamiento de la bacteriemia	38
1.2. Bacteriemias por bacilos gramnegativos	40
1.2.1. Epidemiología	40
1.2.2. Factores de riesgo	40
1.2.3. Origen de la infección	41
1.2.4. Patogenia	41
1.2.5. Manifestaciones clínicas	42
1.3. Bacteriemias por <i>Escherichia coli</i>	43
1.3.1. Epidemiología	43
1.3.2. Origen de las bacteriemias por <i>E. coli</i>	43
1.3.3. Pronóstico	44
1.4. Antibióticos betalactámicos	44
1.5. Mecanismos de resistencia a betalactámicos	45
1.5.1. Betalactamasas	46
1.5.2. Betalactamasas de espectro extendido (BLEE)	52
1.5.2.1. BLEE tipo TEM	53
1.5.2.2. BLEE tipo SHV	54
1.5.2.3. BLEE tipo CTX-M	55

1.5.2.4. BLEE tipo OXA _____	59
1.5.2.5. Otras BLEE _____	59
1.6. Métodos de detección de BLEE _____	60
1.7. Epidemiología de las cepas productoras de BLEE _____	62
1.7.1. Enterobacterias productoras de BLEE de adquisición comunitaria _	66
1.7.2. Enterobacterias productoras de BLEE de adquisición nosocomial __	67
1.8. Relevancia clínica y pronóstica de las infecciones causadas por microorganismos productores de BLEE _____	68
1.8.1. Bacteriemias por enterobacterias productoras de BLEE _____	69
1.8.2. Tratamiento de las infecciones causadas por microorganismos productores de BLEE _____	70
2. OBJETIVOS _____	75
3. MATERIAL Y MÉTODOS _____	81
3.1. Diseño del estudio _____	83
3.1.1. Distribución geográfica, hospitales y poblaciones referencia _____	83
3.1.1.1. Incidencias de casos _____	87
3.2. Protocolo de datos epidemiológicos. Definiciones y variables _____	88
3.2.1. Protocolo de datos epidemiológicos _____	88
3.2.2. Definiciones _____	88
3.2.3. Variables _____	89
3.3. Análisis estadístico _____	94
3.3.1. Tamaño muestral _____	94
3.3.2. Análisis de factores de riesgo _____	94
3.3.3. Análisis pronóstico _____	95
3.4. Aspectos éticos _____	95
3.5. Aislamiento e identificación bacteriana _____	96
3.5.1. Medios de cultivo y reactivos _____	96
3.5.2. Procedimiento _____	96
3.6. Confirmación de producción de BLEE _____	97
3.6.1. Material _____	97
3.6.2. Procedimiento _____	97
3.7. Estudio de relación clonal _____	98
3.7.1. REP PCR _____	98

3.7.1.1. Material	98
3.7.1.2. Procedimiento	99
3.7.2. PFGE	100
3.7.2.1. Material	100
3.7.2.2. Procedimiento	102
3.8. Caracterización de BLEE	104
3.8.1. Conjugación	104
3.8.1.1. Material	104
3.8.1.2. Procedimiento	105
3.8.2. Determinación de sensibilidad a antimicrobianos	106
3.8.2.1. Material	106
3.8.2.2. Procedimiento	107
3.8.3. Isoelectroenfoque (IEF)	108
3.8.3.1. Material	108
3.8.3.2. Procedimiento	109
3.8.4. PCR	110
3.8.4.1. Material	110
3.8.4.2. Procedimiento	111
3.8.5. Secuenciación de los genes que codifican BLEE	112
3.8.5.1. Material	112
3.8.5.2. Procedimiento	113
3.8.5.3. Otros equipos	113
4. RESULTADOS	117
4.1. Incidencias	119
4.2. Clasificación en función de la adquisición	125
4.3. Estudio microbiológico	127
4.3.1. Identificación bacteriana	127
4.3.2. Confirmación de la producción de BLEE	127
4.3.3. Estudio de la relación clonal	127
4.3.4. Caracterización de las BLEE	131
4.3.4.1. Conjugación	131
4.3.4.2. Determinación de sensibilidad a antimicrobianos	131
4.3.4.3. Isoelectroenfoque	132
4.3.4.4. Caracterización de BLEE mediante PCR	133

4.3.4.5. Secuenciación de los genes codificantes de BLEE _____	133
4.3.4.6. Sensibilidad a antimicrobianos en función del grupo de BLEE producida _____	135
4.4. Análisis de potenciales diferencias clínico-epidemiológicas en función de la BLEE producida _____	137
4.4.1. Adquisición _____	138
4.4.2. Factores predisponentes _____	139
4.4.3. Origen de la bacteriemia _____	143
4.4.4. Tratamiento, gravedad y pronóstico _____	143
4.5. Estudio descriptivo de la cohorte de casos _____	144
4.5.1. Variables demográficas _____	144
4.5.1.1. Enfermedades de base _____	151
4.5.1.2. Utilización de procedimientos invasivos _____	152
4.5.1.3. Utilización de antimicrobianos previos _____	152
4.5.2. Clínica _____	153
4.5.2.1. Origen de la bacteriemia _____	153
4.5.2.2. Gravedad en la presentación _____	154
4.5.3. Terapia antimicrobiana _____	155
4.5.3.1. Tratamiento antimicrobiano empírico y dirigido _____	155
4.6. Factores de riesgo _____	160
4.6.1. Bacteriemias de adquisición comunitaria _____	160
4.6.1.1. Análisis univariante _____	160
4.6.1.2. Análisis multivariante _____	160
4.6.2. Bacteriemias de adquisición nosocomial _____	165
4.6.2.1. Análisis univariante _____	165
4.6.2.2. Análisis multivariante _____	166
4.7. Análisis pronóstico _____	170
4.7.1. Mortalidad global _____	170
4.7.2. Análisis de mortalidad en bacteriemias de adquisición comunitaria	173
4.7.3. Bacteriemias de adquisición nosocomial _____	175
5. DISCUSIÓN _____	181
6. CONCLUSIONES _____	197
7. BIBLIOGRAFÍA _____	203
8. ANEXOS _____	235

8.1.	Anexo I: Protocolo de datos generales de hospital	237
8.2.	Anexo II: Protocolo de recogida de datos	238
8.3.	Anexo III: Documento de consentimiento informado.	239
8.4.	Anexo IV: Índice APACHE II	240
8.5.	Anexo V: Índice de CHARLSON	242
8.6.	Anexo VI: Score de Pitt de bacteriemia	243
8.7.	Anexo VII: Relación de antibióticos con código en el estudio	244
9.	PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	247

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

1.1. Tablas

- Tabla 1.** Criterios de diagnóstico de SRIS, sepsis, sepsis grave y shock séptico (Pág. 31).
- Tabla 2.** Condiciones subyacentes, origen y mortalidad cruda según la adquisición (Pág. 33).
- Tabla 3.** Etiología y origen de las bacteriemias dependiendo de la adquisición (Pág. 35).
- Tabla 4.** Bacteriemias de adquisición nosocomial en diferentes grupos de pacientes (Pág. 37).
- Tabla 5.** Recomendaciones para el tratamiento empírico del paciente con sospecha de bacteriemia de origen desconocido (Pág. 39).
- Tabla 6.** Principales grupos antibióticos betalactámicos (Pág. 48).
- Tabla 7.** Clasificación y propiedades de las betalactamasas según Bush, Jacoby y Medeiros (Pág. 50).
- Tabla 8.** Clasificación de las BLEE tipo CTX-M en función del grupo al que pertenecen en base a su secuencia aminoacídica (Pág. 57).
- Tabla 9.** Nombre de los hospitales participantes, abreviaturas empleadas, ciudad y comunidad autónoma de ubicación de los mismos (Pág. 84).
- Tabla 10.** Áreas de los servicios hospitalarios para los casos nosocomiales (Pág. 86).
- Tabla 11.** Características de las fases de cada ciclo de PCR para cada tipo de familia de BLEE, tras desnaturalización previa de 95 °C durante 3' (Pág. 112).
- Tabla 12.** Incidencias globales de las bacteriemias nosocomiales y comunitarias en el periodo estudiado e incidencia global poblacional (Pág. 120).
- Tabla 13.** Características, datos globales, distribución de casos totales incluidos en el estudio y en función del tipo de adquisición, comunitaria y nosocomial, e incidencias por hospital. Los datos de bacteriemias *E. coli* BLEE se expresan como N (%) (Pág. 121).
- Tabla 14.** Valores de CMI₅₀, CMI₉₀ y categoría clínica de diferentes antimicrobianos (Pág. 132).
- Tabla 15.** Distribución de enzimas BLEE producidas por los aislados del estudio según la familia y grupo de enzima al que pertenecen, N° (%) (Pág. 134).
- Tabla 16.** Sensibilidad de los aislados de *E. coli* BLEE a los antimicrobianos más relevantes, según los criterios del CLSI 2009, CLSI 2010 y EUCAST 2011, y por el grupo de BLEE producido. Datos expresados como número de aislados (%). Todos los aislados están incluidos en los totales, los 191. De los grupos CTX-M-9, CTX-M-1 y SHV se incluyeron los aislados que sólo produjeron una BLEE (116, 38 y 29 aislados respectivamente) (Pág. 136).
- Tabla 17.** Características clínicas y epidemiológicas de los pacientes cuyos aislados produjeron las enzimas mayoritarias de cada familia de enzimas y por grupo de familia de BLEE, N (%) (Pág. 140).
- Tabla 18.** Características demográficas y factores predisponentes de los pacientes con bacteriemia por *E. coli* BLEE globales y en función de la adquisición de la infección. Los datos se expresan como N° (%), excepto donde se especifica (Pág. 145).
- Tabla 19.** Características clínicas y pronósticas de los pacientes con bacteriemia por *E. coli* BLEE globales y en función de la adquisición de la infección, datos expresados en N° (%), excepto donde se indica (Pág. 147).
- Tabla 20.** Número y porcentaje de pacientes que recibieron tratamiento antimicrobiano empírico, datos globales y en función de la adquisición de la infección, N° (%) (Pág. 157).
- Tabla 21.** Número y porcentaje de pacientes que recibieron tratamiento antimicrobiano dirigido, datos globales y en función de la adquisición de la infección, N° (%) (Pág. 159).

- Tabla 22.** Análisis univariante de factores de riesgo de pacientes caso con bacteriemias de adquisición comunitaria producidas por *E. coli* BLEE comparado con pacientes con sepsis de adquisición comunitaria (Control A) y con pacientes con bacteriemias de adquisición comunitaria producidas por *E. coli* no-BLEE (Control B), N° (%) (Pág. 162).
- Tabla 23.** Origen de las bacteriemias de adquisición comunitaria causadas por *E. coli* BLEE y *E. coli* no BLEE (Control B), N° (%) (Pág. 164).
- Tabla 24.** Análisis multivariante de los factores de riesgo para las bacteriemias comunitarias causadas por *E. coli* BLEE (Pág. 164).
- Tabla 25.** Análisis univariante de factores de riesgo de pacientes caso con bacteriemias de adquisición nosocomial producidas por *E. coli* BLEE comparado con pacientes con sepsis de adquisición nosocomial (Control A) y con pacientes con bacteriemias de adquisición nosocomial producidas por *E. coli* no BLEE (Control B), N° (%) (Pág. 167).
- Tabla 26.** Origen de las bacteriemias nosocomiales causadas por *E. coli* BLEE comparado con pacientes con bacteriemias de adquisición nosocomial producidas por *E. coli* no BLEE (Control B), N° (%) (Pág. 169).
- Tabla 27.** Análisis multivariante de los factores de riesgo para bacteriemias de adquisición nosocomial producidas por *E. coli* BLEE (Pág. 169).
- Tabla 28.** Mortalidad según CMI del antimicrobiano utilizado empíricamente (sólo o combinado). Los datos se muestran como el número de pacientes que fueron éxitos para cada CMI del antimicrobiano que recibieron de forma empírica/el número de tratados (Pág. 172).
- Tabla 29.** Factores clínicos y pronóstico de pacientes con bacteriemias de adquisición comunitaria causadas por *E. coli* BLEE y *E. coli* no BLEE (Control B), N° (%) (Pág. 173).
- Tabla 30.** Análisis univariante y multivariante de las variables asociadas a la mortalidad entre los 282* pacientes (95 casos y 188 controles B) con bacteriemias de adquisición comunitaria por *E. coli* (Pág. 174).
- Tabla 31.** Análisis univariante y multivariante de los factores de riesgo asociados a la mortalidad a día 14 (A) y día 30 (B) de pacientes con bacteriemias de adquisición nosocomial producidas por *E. coli* BLEE (Pág. 176).

1.2. Figuras

- Figura 1.** Representación gráfica de la población base de estudio (Pág. 86).
- Figura 2.** Distribución de casos por centro hospitalario en función de la adquisición de la infección: comunitaria o nosocomial (Pág. 125).
- Figura 3.** Distribución por hospital del número de casos de bacteriemia de adquisición comunitaria según los criterios de Friedman: estrictamente comunitarias y relacionadas con los cuidados sanitarios (Pág. 126).
- Figura 4.** Patrones de PFGE de aislados relacionados clonalmente (Pág. 129).
- Figura 5.** Patrones de PFGE de aislados relacionados clonalmente del HGU Gregorio Marañón (Pág. 130).
- Figura 6.** Porcentaje de distribución de cada tipo de BLEE producida por cada uno de los centros hospitalarios participantes (Pág. 135).
- Figura 7.** Distribución de cada tipo de enzima BLEE producida en el estudio en función de la adquisición de la bacteriemia (Pág. 138).
- Figura 8.** Distribución del número de pacientes por edad en grupos de diez años en función de la adquisición de la bacteriemia (Pág. 144).
- Figura 9.** Porcentaje de casos nosocomiales en función del servicio hospitalario donde se encontraba el paciente cuando se detectó la bacteriemia (Pág. 149).
- Figura 10.** Número de casos ocurridos en cada mes del estudio en función del tipo de adquisición de la bacteriemia (Pág. 150).
- Figura 11.** Número de casos según el origen de la bacteriemia en función de la adquisición de la infección (Pág. 153).
- Figura 12.** Porcentaje de pacientes con bacteriemias por *E. coli* BLEE que padecieron características clínicas antes del tratamiento antimicrobiano y en las primeras 24 horas del mismo en función de la adquisición de la infección. (I.R.A.: Insuficiencia Renal Aguda, SDMO: Síndrome de Disfunción Multi Orgánico) (Pág. 155).
- Figura 13.** Porcentaje de casos éxitus en función de la adquisición de la infección y el periodo de tiempo en el que se produjo desde la toma del hemocultivo: a los 14 días y entre 0-30 días (Pág. 170).
- Figura 14.** Porcentaje de casos éxitus en función del origen de la infección y periodo de tiempo en el que se produjo desde la toma del hemocultivo: a los 14 días y entre 0-30 días (Pág. 171).

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Bacteriemia

1.1.1. Bacteriemia y sepsis

Del griego *bakthéria*, bacteria, y *haima*, sangre, bacteriemia significativa presencia de bacterias en la sangre; sepsis proviene del griego *sêpsis*, podredumbre. Ambos conceptos, bacteriemia y sepsis son eventos íntimamente relacionados, el primero es un concepto esencialmente microbiológico, y se define como la presencia de bacterias en el torrente circulatorio (fungemia en caso de hongos) demostrada mediante hemocultivo, mientras que sepsis es un concepto eminentemente clínico y consiste en el desarrollo de una respuesta sistémica a la infección ^[79].

Las bacteriemias pueden ser transitorias, continuas o intermitentes según la forma en que aparecen los microorganismos en la sangre; en las continuas las bacterias están llegando constantemente a la sangre mientras que en las intermitentes se encuentran en la sangre de forma discontinua y recurrente; y las transitorias, como su nombre indica, consiste en el paso por el torrente sanguíneo de forma pasajera, que puede durar sólo minutos y que no siempre está relacionado con un cuadro clínico.

La bacteriemia puede ser una complicación de infecciones localizadas como infección urinaria, infecciones respiratorias, etc., puede deberse a la irrupción directa de los microorganismos en el torrente cardiovascular como en el caso de pacientes adictos a drogas o las infecciones relacionadas con catéteres intravasculares, o bien la puerta de entrada puede no ser aparente, considerándose entonces como bacteriemias primarias. En algunos de estos casos, el origen puede estar en el fenómeno de traslocación bacteriana intestinal.

Anteriormente, el término septicemia se había considerado como sinónimo de bacteriemia hasta la celebración de una conferencia de consenso médico en 1992 ^[28], donde se recomendó evitar el uso de este término para evitar confusiones; el término septicemia se refería a la presencia de cualquier organismo patógeno en la sangre

(bacterias, virus, hongos, parásito, etc) aislado mediante cultivos de sangre o visto en un frotis de sangre.

En 1992 se publicó un consenso con las definiciones de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), sepsis, sepsis grave y *shock* séptico [28]. Se definió sepsis como el SRIS debido a una infección, que puede tener como foco inicial cualquier órgano o sistema; para el diagnóstico de SRIS se exige la presencia de dos o más de las siguientes alteraciones:

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

Asimismo, se definió la sepsis grave como aquella asociada a disfunción de uno o más órganos, signos de hipoperfusión (acidosis láctica, oliguria, alteración del estado mental) o hipotensión (presión arterial sistólica < 90 mmHg o reducción > 40 mmHg respecto a las cifras iniciales); y *shock* séptico cuando la hipotensión persiste a pesar de la reposición adecuada de fluidos, junto con signos de hipoperfusión o disfunción orgánica, y que no es atribuible a procesos distintos a la sepsis. Posteriormente, en 2001, fueron ampliados los signos y síntomas en base a los que sospechar sepsis [121], pero no fueron modificadas las definiciones (Tabla 1).

La bacteriemia, por su frecuencia y significado clínico, es uno de los grandes problemas clínico-microbiológicos en patología infecciosa. Las manifestaciones clínicas van desde cuadros de fiebre autolimitada de pocos minutos de duración hasta cuadros fulminantes con *shock* y muerte en pocas horas, y pueden ser similares para los diferentes agentes etiológicos. Por tanto, hay que considerar los conceptos de sepsis y de respuesta inflamatoria sistémica además de la bacteriemia, y es importante aclarar estos términos para poder establecer un diagnóstico precoz y según el estadio evolutivo del síndrome, y las diferentes pautas de tratamiento, encaminadas a disminuir la morbilidad y mortalidad de esta patología [26, 233].

Tabla 1. Criterios de diagnóstico de SRIS, sepsis, sepsis grave y shock séptico ^[121].

DEFINICIÓN DE SÍNDROME DE RESPUESTA INFLAMATORIA SISTÉMICA (SRIS): Presencia de alguna de las siguientes características
VARIABLES GENERALES:
<ul style="list-style-type: none"> - Hipertermia > 38 °C - Hipotermia < 36 °C - Taquicardia (> 90 latidos/minuto) - Taquipnea (> 20 respiraciones/minuto) o hiperventilación (PaCO₂ < 32 mmHg) - Alteración del estado mental - Edemas significativos o balance hídrico positivo (> 20 mL/kg en 24h) - Hiperglucemia (glucemia > 120 mg/dL en ausencia de diabetes mellitus)
VARIABLES INFLAMATORIAS:
<ul style="list-style-type: none"> - Leucocitosis (> 12.000/mm³) - Leucopenia (< 4.000/mm³) - Número de leucocitos normales con > 10% de células inmaduras - Proteína C reactiva en plasma > 2 desviaciones estándar (DE) del valor normal - Procalcitonina > 2 DE del valor normal
VARIABLES HEMODINÁMICAS:
<ul style="list-style-type: none"> - Hipotensión arterial (TA sistólica < 90 mmHg, TA media < 70 mmHg, o descenso > 40 mmHg en adultos o < 2DE de lo normal para la edad) - Saturación de oxígeno mixta venosa > 70% - Índice cardíaco > 3,5 L/min/m²
VARIABLES DE DISFUNCIÓN ORGÁNICA:
<ul style="list-style-type: none"> - Hipoxemia arterial (PaO₂/FiO₂ < 300) - Oliguria aguda (diuresis < 0,5 mL/Kg por hora) - Aumento de creatinina > 0,5 mg/dL - Alteración de la coagulación (INR > 1,5 ó TPTa > 60 s) - Íleo (ausencia de ruidos intestinales) - Trombocitopenia (> 100.000/μL) - Hiperbilirrubinemia (> 4 mg/dL)
VARIABLES DE PERFUSIÓN TISULAR:
<ul style="list-style-type: none"> - Hiperlactatemia > 1 mmol/L - Llenado capilar disminuido
DEFINICIÓN DE SEPSIS: Infección, documentada o sospechada y SRIS
DEFINICIÓN DE SEPSIS GRAVE: Sepsis asociada a algún dato de disfunción de órgano o alteraciones relacionadas con hipoperfusión de las siguientes:
<ul style="list-style-type: none"> - Acidosis metabólica - Hipoxemia arterial (PaO₂ < 75 mmHg o PaO₂/FiO₂ < 250) - Oliguria (< 0,03 L/h durante 3 h o < 0,7 L/h durante 24 h) - Coagulopatía (aumento en tiempo de protrombina o disminución de plaquetas del 50%, o < 100.000/ μL) - Encefalopatía (cifra < 14 en la escala de Glasgow)
DEFINICIÓN DE SHOCK SÉPTICO: Hipotensión persiste al menos 1 hora a pesar de la administración de fluidos, en asociación con signos de hipoperfusión o disfunción de órgano.

1.1.2. Epidemiología de la bacteriemia y la sepsis

En las últimas décadas se ha observado un incremento en la incidencia de bacteriemia en la población general. La incidencia depende de la población estudiada y oscila entre 5 y 30 casos por cada 1.000 pacientes hospitalizados. En un hospital terciario de referencia de Madrid la incidencia incrementó de 16 episodios por 1.000 ingresos en 1985 a 31,2 en 2006 ^[210], y en un estudio reciente realizado entre 2006-2007 en hospitales terciarios y hospitales comunitarios de Andalucía la mínima incidencia de bacteriemia estimada en la población base fue 109,2 casos por 100.000 habitantes y año o 14,7 episodios por 1.000 ingresos ^[208]. Se presenta a cualquier edad y están especialmente predispuestos a padecerla los pacientes con enfermedades de base graves y los sometidos a maniobras médicas que causan alteraciones de los mecanismos generales y locales de defensa frente a la infección ^[34].

Así, el aumento en la incidencia de bacteriemia ha venido parejo a los cambios producidos en la práctica médica, influida por una parte por los avances tecnológicos y por otro por el envejecimiento de la población. Hay grupos de pacientes que reciben con más frecuencia tratamientos agresivos e inmunosupresores así como mayor número de maniobras diagnósticas y terapéuticas complejas (Tabla 2). Este aumento de la incidencia además se ha visto acompañado de cambios en el patrón de las bacteriemias en cuanto a microorganismos aislados, origen de la infección, adquisición comunitaria o nosocomial y resistencia a los antimicrobianos, entre otros factores ^[147].

La incidencia de bacteriemia por microorganismos Gram positivos y Gram negativos ha sufrido variaciones a lo largo de las últimas décadas. En la era preantibiótica existía un claro predominio de los cocos Gram positivos, pero a partir de los años 60 los bacilos Gram negativos se convirtieron en los principales agentes causantes de bacteriemia. A finales de los años 80 y principios de los 90 se produjo un resurgimiento de las bacteriemias por microorganismos Gram positivos a expensas principalmente de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa* negativo, hecho que se ha atribuido al incremento de las manipulaciones instrumentales (vasculares, genitourinarias, respiratorias), a la administración de perfusiones endovenosas, a las intervenciones quirúrgicas cada vez más agresivas (prótesis, injertos vasculares, transplantes), al uso de materiales bioprotésicos, a las enfermedades asociadas a la adicción a drogas por vía parenteral, al SIDA y a la

masiva utilización de antibióticos de amplio espectro activos frente a microorganismos Gram negativos. Las bacterias Gram negativas más frecuentemente causantes de bacteriemia son las enterobacterias (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. y *Serratia* spp. sobre todo) y *Neisseria meningitidis*. En los pacientes hospitalizados se añade *Pseudomonas aeruginosa* y en determinados centros, *Acinetobacter baumannii* ^[210].

Tabla 2. Condiciones subyacentes, origen y mortalidad cruda según la adquisición ^[196].

CONDICIONES SUBYACENTES (%)	PROCEDIMIENTOS PREDISPONENTES (%)	ORIGEN (%)	TASA BRUTA MORTALIDAD (%)
ADQUISICIÓN ESTRICTAMENTE COMUNITARIA			
Enfermedad vascular (8-35) Diabetes mellitus (22-27) Cáncer (8-17) EPOC (11-17) Insuficiencia renal (11-22)	Catéter urinario (5-13) Endoscopia (0-1) Cirugía (0-1)	Tracto urinario (31-46) Tracto respiratorio (13-27) Intraabdominal (4-22) Desconocido (15)	10-19
ADQUISICIÓN COMUNITARIA ASOCIADA A CUIDADOS SANITARIOS			
Enfermedad vascular (12-43) Diabetes mellitus (30-31) Cáncer (10-39) EPOC (15) Insuficiencia renal (20-39)	Catéter urinario (13-22) Endoscopia (18-28) Cirugía (5-6) Endoscopia (1-2)	Tracto urinario (17-38) Tracto respiratorio (11-16) Intraabdominal (12-20) Catéter vascular (12-42) Desconocido (12-23)	14-27
ADQUISICIÓN NOSOCOMIAL			
Enfermedad vascular (11-43) Diabetes mellitus (20-27) Cáncer (9-35) EPOC (15-18) Insuficiencia renal (16-28)	Catéter urinario (50-60) Catéter central (45-54) Cirugía (22-32) Endoscopia (6-12)	Tracto urinario (15-19) Tracto respiratorio (7-16) Intraabdominal (13-14) Catéter vascular (24-52) Desconocido (15-27)	15-30

1.1.3. Origen y etiología de las bacteriemias en función de la adquisición

Las bacteriemias se han clasificado tradicionalmente en función de su adquisición en comunitarias y nosocomiales ^[81]. En los últimos años se ha recomendado subdividir las bacteriemias comunitarias en dos grupos: las

bacteriemias relacionadas con los cuidados sanitarios y las bacteriemias estrictamente comunitarias ^[77].

Se consideran bacteriemias nosocomiales aquellas que aparecen tras 48 horas de ingreso en el hospital (siempre que la infección no estuviera incubándose al ingreso) y comunitarias aquellas detectadas en pacientes no ingresados y hasta las primeras 48 horas de hospitalización. Como decíamos, en los últimos años y en relación con los cambios en los modelos de atención sanitaria (particularmente, el desarrollo del sistema de atención ambulatoria de pacientes que anteriormente hubiesen precisado hospitalización) se ha recomendado subdividir las bacteriemias adquiridas en la comunidad en bacteriemias relacionadas con los cuidados sanitarios y bacteriemias estrictamente comunitarias ^[77]. Los criterios más aceptados para considerar una bacteriemia como relacionada con los cuidados sanitarios son ^[77, 223]:

- ingreso en el último año en un centro hospitalario,
- haber recibido tratamiento intravenoso domiciliario o algún tipo de diálisis en los últimos 3 meses,
- haber recibido cuidados domiciliarios especializados en los últimos 3 meses
Y,
- ser residente en centro sociosanitario.

La importancia de esta nueva clasificación consiste en que las bacteriemias relacionadas con los cuidados sanitarios pueden asemejarse más a las nosocomiales que a las comunitarias en cuanto a la comorbilidad de los pacientes, etiología, orígenes y mortalidad ^[77, 223]. Debido a la reciente introducción de esta clasificación aún había escasa información diferenciada de las bacteriemias comunitarias, y en concreto sobre *E. coli*, cuando se inició este trabajo.

En cuanto a la etiología y el origen de las bacteriemias hay importantes diferencias en función de la adquisición de las mismas (Tabla 3).

1.1.3.1. Bacteriemias de adquisición estrictamente comunitaria

La frecuencia de las bacteriemias de adquisición estrictamente comunitaria en aquellos estudios que se ha tenido en cuenta esta diferenciación está entre el 28-50% del total de bacteriemias [66, 208, 223, 240].

Tabla 3. Etiología y origen de las bacteriemias dependiendo de la adquisición [50].

ADQUISICIÓN DE LA BACTERIEMIA	ETIOLOGÍA (%)		MICROORGANISMOS PRINCIPALES	ORIGEN (%)	MORTALIDAD (%)
	GRAM +	GRAM -			
COMUNITARIA	31	68	<i>E. coli</i> <i>S. pneumoniae</i> <i>S. aureus</i>	Urinario (46-53) Respiratorio (12-27) Desconocido (9)	11-16
RELACIONADA CON CUIDADOS SANITARIOS	32	64	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i> <i>K. pneumoniae</i>	Urinario (17-43) Catéter vascular (12-42) Desconocido (12)	20-34
NOSOCOMIAL	65	25	ECN <i>S. aureus</i> Enterococos	Catéter vascular (26-52) Urinario (18-33) Desconocido (16)	27-37

ECN: Estafilococos coagulasa negativo

La etiología de estas bacteriemias es debida principalmente a bacterias Gram negativas (alrededor de dos tercios de los casos). El microorganismo más frecuente en los estudios realizados es *E. coli* (49-53%), seguido de *Streptococcus pneumoniae* (9-11%) y *Staphylococcus aureus* (8%) [208, 223, 240]. La mortalidad cruda de este tipo de bacteriemia está entre el 11 y el 29% [77, 208, 223, 240]. La mortalidad está muy influenciada por la gravedad del SRIS que presenta el paciente, siendo el 78% en pacientes con shock séptico, el 32% con sepsis grave y el 4% en pacientes con sepsis [50].

El origen más frecuente de la bacteriemia estrictamente comunitaria es el tracto urinario (45-53%), en segundo lugar el tracto respiratorio (12-27%) y en tercer lugar las infecciones intraabdominales (4-9%). Entre el 7 y el 9% de estas bacteriemias son de origen desconocido [77, 208, 223, 240].

1.1.3.2. Bacteriemias relacionadas con los cuidados sanitarios

En el total del bacteriemias, el porcentaje que son relacionadas con los cuidados sanitarios oscila entre el 23 y el 37% [77, 208, 223, 240]. Los microorganismos más frecuentes productores de estas bacteriemias también son Gram negativos (67-68%) [223, 240]. En concreto los agentes etiológicos predominantes son *E. coli* (25%), *S. aureus* (15%) y *K. pneumoniae* (9%) [208, 223].

Dependiendo de las definiciones usadas y de las diferencias en los sistemas sanitarios los orígenes más frecuentes varían. En general suelen estar implicados los catéteres vesicales e intravenosos de pacientes sometidos a hemodiálisis crónica, tratamientos intravenosos ambulatorios y diálisis peritoneal entre otros. En los pacientes que provienen de centros de larga estancia o residencia de ancianos es particularmente frecuente *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) (19-32%) [77, 240]. Esto se debe a que en las residencias de larga estancia y residencia de ancianos puede haber un alto número de pacientes colonizados, con sonda urinaria y con úlcera de decúbito, siendo los orígenes más frecuentes de las bacteriemias en estos pacientes el tracto urinario y las infecciones de piel y partes blandas [223].

La mortalidad cruda de este tipo de bacteriemias está entre el 20 y 28% [77, 208, 240].

1.1.3.3. Bacteriemias de origen nosocomial

De manera global los microorganismos más frecuentes en este tipo de bacteriemias son los microorganismos Gram positivos (65%), fundamentalmente estafilococos coagulasa negativo (ECN) (31%), *S. aureus* (20%) y *Enterococcus* spp. (9%). Entre las bacterias Gram negativas la más frecuente es *E. coli* (6%), seguida de *Klebsiella* spp. (5%) y *P. aeruginosa* (4%) [208, 252].

De forma más concreta la etiología de este tipo de bacteriemias varía entre centros y específicamente dentro de cada centro puede variar según el área o servicio donde se encuentre ingresado el paciente. Así, puede hacerse una clasificación más concreta atendiendo a determinados criterios (Tabla 4). Por tanto,

es muy importante conocer bien en cada caso la epidemiología local y del centro donde se encuentra hospitalizado el paciente para poder establecer un tratamiento antibiótico empírico adecuado.

Tabla 4. Bacteriemias de adquisición nosocomial en diferentes grupos de pacientes ^[50].

POBLACIÓN DE PACIENTES	ETIOLOGÍA (%)		MICROORGANISMOS PRINCIPALES	ORIGEN (%)	MORTALIDAD (%)
	GRAM +	GRAM -			
CON CATÉTER VASCULAR	45-60	20-40	ECN <i>S. aureus</i> Enterobacterias	-	12-25
PACIENTES QUIRÚRGICOS	40-55	25-40	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i> <i>Enterococcus</i> spp.	Catéter v. central (35) Lecho qco. (29) Desconocido	10-15
CON CÁNCER Y NEUTROPENIA FEBRIL	69-76	14-31	ECN <i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	Catéter v. central (24) Respiratorio (7) Desconocido (56)	32
INGRESADOS EN CUIDADOS INTENSIVOS	60-70	20-35	ECN <i>S. aureus</i> <i>A. baumannii</i>	Catéter v. central (57) Respiratorio (21) Desconocido (34)	25
GRANDES QUEMADOS	60	32	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i> ECN	Quemadura (21-36) Respiratorio (14) Desconocido	3-6

En general, el origen más frecuente de las bacteriemias de origen nosocomial es el catéter vascular (14-52%), seguido de la infección del tracto urinario (18-39%), la neumonía (10-16%) y la infección intraabdominal (9-13%). En el 16% de los casos la bacteriemia es de origen desconocido ^[77].

La mortalidad global de estas bacteriemias es del 27-37% dependiendo de la etiología, teniendo las bacteriemias causadas por *P. aeruginosa* y *Cándida* spp. una mortalidad más alta (39%) y las causadas por ECN una mortalidad menor (21%) ^[77, 223, 252].

1.1.4. Tratamiento de la bacteriemia

El primer paso es realizar un diagnóstico precoz de sospecha para establecer la pauta de tratamiento empírico, que contribuirá a disminuir la morbilidad y mortalidad de esta patología [26, 28, 233].

En el tratamiento de la bacteriemia clínicamente significativa es importante iniciar un tratamiento sintomático y de soporte de las funciones vitales, y a la vez instaurar de forma precoz un tratamiento etiológico que puede tener varios objetivos: erradicar de la sangre al microorganismo responsable mediante el empleo de antimicrobianos y eliminar el foco de la sepsis [233].

La elección del tratamiento antimicrobiano empírico debe realizarse siempre de manera individualizada, teniendo en cuenta el foco de la sepsis, la presunción de los microorganismos probablemente implicados y la gravedad del cuadro. Aun así es posible hacer algunas recomendaciones generales, puesto que es sabido que el riesgo de que las bacterias implicadas sean resistentes a los antimicrobianos habituales es menor en la bacteriemia de origen estrictamente comunitario, en aquellos pacientes que no han recibido antimicrobianos recientemente y en aquellos que no tienen patología de base. Así como que los pacientes con bacteriemia nosocomial que han recibido tratamiento antimicrobiano previo durante varios días, en particular si padecen enfermedades debilitantes y han permanecido en el hospital durante más de cinco días, requieren en general un tratamiento antimicrobiano de mayor espectro.

Una vez identificado el microorganismo y su patrón de sensibilidad a los diferentes antimicrobianos, el tratamiento empírico debe revisarse y modificarse en el caso de ser necesario para instaurar un tratamiento antimicrobiano dirigido.

Debido a esto hay gran diversidad de guías sobre el tratamiento antimicrobiano, teniendo en cuenta la epidemiología de la zona y otros aspectos. La Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) publicó unas recomendaciones para el tratamiento empírico de los pacientes con sospecha de bacteriemia de origen desconocido (Tabla 5) y para pacientes con características específicas [50]. La SEIMC en colaboración con otras sociedades ha elaborado un documento consenso para desarrollar e implantar Programas de Optimización del uso de Antimicrobianos (PROA) en hospitales españoles, debido a la compleja situación que se está produciendo por el aumento de resistencias a los antimicrobianos [209]. Adicionalmente, cada centro puede elaborar sus

recomendaciones en función de la epidemiología local. En el caso del Hospital Universitario Virgen Macarena estas recomendaciones están disponibles en www.hospital-macarena.com/comunicados/antibioterapia/.

En concreto, antes de iniciarse este proyecto, la recomendación más frecuente para la sospecha de bacteriemia comunitaria por *E. coli* era el uso de cefalosporinas de tercera generación (cefotaxima, ceftriaxona); para las bacteriemias nosocomiales, dado que frecuentemente hay que considerar *P. aeruginosa* en estos casos, solían incluirse ceftazidima, cefepima, piperacilina-tazobactam ó carbapenemas.

Tabla 5. Recomendaciones para el tratamiento empírico del paciente con sospecha de bacteriemia de origen desconocido (Tomado de Guía para el diagnóstico y tratamiento del paciente con bacteriemia, SEIMC, 2006) ^[52].

SÍNDROME CLÍNICO	TRATAMIENTO RECOMENDADO
ADQUISICIÓN ESTRICTAMENTE COMUNITARIA	
Con sepsis Con sepsis grave/shock séptico	Amoxicilina-clavulánico Ertapenem, ceftriaxona
ADQUISICIÓN RELACIONADA CON CUIDADOS SANITARIOS	
Con sepsis Con sepsis grave/shock séptico	Amoxicilina-clavulánico o; ceftriaxona Ertapenem; o imipenem, meropenem o piperacilina-tazobactam + vancomicina
ADQUISICIÓN NOSOCOMIAL	
Con sepsis Con sospecha SARM Con sepsis grave/shock séptico	Ceftriaxona, o cefepima, o imipenem, meropenem o piperacilina-tazobactam ± Vancomicina Imipenem, meropenem o piperacilina-tazobactam + vancomicina ± antifúngico

1.2. Bacteriemias por bacilos gramnegativos

1.2.1. Epidemiología

Como se ha explicado, los bacilos Gram negativos fueron los microorganismos predominantes causantes de las bacteriemias nosocomiales en EE.UU. hasta los años 80. En los años 90 aumentó la proporción de organismos Gram positivos pasando a ser los más frecuentes en la mayoría de centros. En América Latina y algunas áreas de Europa la proporción de bacteriemias causadas por bacilos Gram negativos es mayor que las identificadas en EE.UU. [21] como se aprecia en diversos estudios [82, 87, 129, 246]. En una revisión retrospectiva de 169 episodios de bacteriemias, el porcentaje de bacteriemias Gram negativas en pacientes de 65 años residentes en centros de larga estancia fue superior, del 59% [151].

En un estudio reciente en el sur de España el porcentaje de bacteriemias por Gram negativos fue 54%, de las cuales *E. coli* produjo el 27%. Clasificadas en función de la adquisición, los Gram negativos intervinieron mayoritariamente en las bacteriemias relacionadas con los cuidados sanitarios (64%), siendo el 58% producidas por *E. coli*. Asimismo los Gram negativos produjeron el 57% de las estrictamente comunitarias y el 50% de las nosocomiales, y fueron respectivamente por *E. coli* el 67 y el 41% [208]. En otro trabajo sobre bacteriemias realizado en Barcelona en pacientes hospitalizados con cáncer o transplantados con células hematopoyéticas el 25% se debieron a *E. coli* [88]. Javaloyas y cols. en un hospital pequeño de Barcelona obtuvieron datos algo superiores en cuanto a *E. coli* como responsable de las bacteriemias respecto a otros trabajos, explicando el hecho por el predominio de Gram positivos en grandes hospitales, donde hay mayor número de infecciones nosocomiales, pacientes en riesgo y unidades de cuidados intensivos [99].

1.2.2. Factores de riesgo

Los principales factores de riesgo identificados en pacientes con bacteriemia por Gram negativos han sido: insuficiencia hepática, hipoalbuminemia, transplante de

órgano sólido y de progenitores hematopoyéticos, diabetes mellitus, enfermedad pulmonar crónica, hemodiálisis, insuficiencia renal, enfermedad hematológica, tratamiento con corticosteroides, tratamiento previo con antimicrobianos, presencia de catéteres vasculares, catéteres urinarios, estancia larga de hospitalización y mayor de edad [86, 103, 123, 151, 173].

1.2.3. Origen de la infección

Hay trabajos sobre bacteriemias que investigan de forma global todos los microorganismos causantes de las mismas, siendo siempre predominante *E. coli* en el caso de los Gram negativos [49, 127, 210, 223, 240]. Entre estos estudios no hay grandes diferencias en los resultados en el origen de la infección por bacterias Gram negativas. En general los orígenes más frecuentes son urinario, desconocido e intraabdominal [58, 120]. En un estudio realizado por Ortega y cols. a lo largo de 18 años sobre bacteriemias por *E. coli* [160], el 55% tuvieron su origen en el tracto urinario, de las cuales el 84% eran de adquisición comunitaria. Los siguientes orígenes en frecuencia fueron el desconocido y la infección biliar, 14 y 13% respectivamente.

En las residencias de larga estancia, el origen más frecuente es el tracto urinario, seguido del tracto gastrointestinal y en tercer lugar el respiratorio; en las unidades de cuidados intensivos (UCI), los orígenes son por orden de mayor a menor frecuencia: tracto respiratorio, catéter venoso central e infección quirúrgica [227].

1.2.4. Patogenia

La principal manifestación clínica de las bacteriemias por Gram negativos es el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, que puede ser tan intenso como para causar sepsis grave ó shock [56].

El factor de virulencia clave en las bacterias Gram negativas influyente en el desarrollo del SRIS es el lipopolisacárido (LPS) de la pared bacteriana. Este es capaz de poner en marcha la liberación en cascada de los mediadores inflamatorios,

resultando ser un fuerte activador de las diversas respuestas inmunes, y estimulando los monocitos/macrófagos para liberar una variedad de citoquinas inflamatorias. También es sabido que la sobreproducción de factores inflamatorios en respuesta a infecciones bacterianas causa shock séptico, similar al inducido por LPS ^[124]. Un área de desarrollo actual es la diferente predisposición genética de los individuos al desarrollo de SRIS grave.

Entre otros diversos factores protectores, un factor importante que limita la invasión del huésped por la gran mayoría de los microorganismos Gram negativos que colonizan el tracto gastrointestinal es el sistema bacteriolítico sérico mediado por el complemento.

1.2.5. Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas de la bacteriemia por bacilos Gram negativos no son específicas para estos microorganismos, siendo frecuentemente indistinguibles de las causadas por Gram positivos y a veces por *Cándida*. Las manifestaciones frecuentes corresponden a las definidas en el SRIS, apareciendo algunas o todas y con mayor o menor gravedad. Lo más frecuente es la aparición de fiebre al comienzo del cuadro, así como los otros datos de sepsis ya mencionados (Tabla 1).

Además de los datos clínicos sistémicos, habitualmente se presentan síntomas y signos directamente relacionados con el origen de la bacteriemia; así en la neumonía suele haber presencia de tos, dolor torácico y disnea; en la pielonefritis, disuria, polaquiuria y dolor en flanco; en la colangitis, dolor en hipocondrio derecho e ictericia, etc. En general, los síntomas focales dependen del órgano afectado y no del microorganismo causante.

Sin embargo hay que tener en cuenta que no siempre están presente estos síntomas focales indicativos del origen de la bacteriemia, como es el caso frecuentemente de la infección de orina en pacientes sondados. En bacteriemias asociadas a catéteres vasculares puede que se presente sepsis sin focalidad, con signos inflamatorios en el punto de inserción o no. Asimismo puede que sí existan pero no sean evidentes o no se puedan valorar fácilmente como ocurre en ancianos, diabéticos, inmunodeprimidos o, en el caso de los síntomas respiratorios, en pacientes con neumonía relacionada con la ventilación mecánica.

1.3. Bacteriemias por *Escherichia coli*

1.3.1. Epidemiología

E. coli es el bacilo Gram negativo que con más frecuencia causa infecciones en el ser humano, además de ser el causante de la mayor parte de las bacteriemias de adquisición comunitaria, tanto de las estrictamente comunitarias como de las relacionadas con los cuidados sanitarios. Frecuentemente es, además, la principal bacteria Gram negativa causante de las bacteriemias de adquisición nosocomial, en torno al 20% ^[208, 240], aunque no siempre es así ^[76].

La mayor parte de los estudios realizados proceden de hospitales terciarios y universitarios, la información de los hospitales de pequeño tamaño es escasa. En estudios españoles realizados en centros pequeños también es la etiología más habitual, su origen más frecuente es la vía urinaria y la adquisición predominante es comunitaria; afectando sobre todo a personas sin enfermedades de base o con enfermedades crónicas de larga evolución ^[99].

1.3.2. Origen de las bacteriemias por *E. coli*

El principal origen de las bacteriemias causadas por *E. coli* es, con mucho, la infección de las vías urinarias, seguida de las infecciones biliares y otras infecciones intraabdominales. Hay otros focos menos frecuentes pero que pueden ocasionar cuadros muy graves como son las infecciones de piel y partes blandas, osteoarticulares, respiratorias, meníngeas, etc. ^[99, 134, 176] Cuando se aísla en hemocultivos *E. coli* en pacientes con infecciones intraabdominales (con la excepción de las biliares) debe considerarse la alta probabilidad de que la infección sea en realidad polimicrobiana.

1.3.3. Pronóstico

Algunos estudios determinan que la mortalidad asociada a las bacteriemias por *E. coli* no es muy elevada, pudiendo deberse a que el origen más frecuente de las mismas es el urinario y éste lleva asociado mejor pronóstico que otros orígenes de bacteriemia [96]. Hay otros factores que pueden contribuir a este bajo índice de mortalidad, como es la baja incidencia de comorbilidades y la baja proporción de pacientes con shock séptico cuando se incluyen personas sanas con infecciones comunitarias bacteriémicas.

Diferentes autores han encontrado numerosas variables asociadas a la mortalidad como son: mayor edad, gravedad de la patología crónica subyacente, inmunosupresión, presentación como sepsis grave ó shock séptico, elevado índice de Pitt, origen no urinario de la bacteriemia, peritonitis, neumonía, hospitalización previa al episodio, neutropenia, tratamiento empírico inadecuado, tratamiento definitivo inadecuado y retraso en el inicio del tratamiento definitivo adecuado [120, 134, 160, 176]. Los distintos estudios realizados no siempre han mostrado resultados homogéneos; los motivos son diversos, incluyendo diferencias en el diseño de los mismos (carácter retrospectivo ó prospectivo, uno ó varios centros de estudio, el tipo de centro, tamaño muestral, criterios de selección de casos y/o controles), tipos y factores del huésped analizados, factores de las bacterias analizados, etc.

1.4. Antibióticos betalactámicos

Los antimicrobianos betalactámicos son agentes bacteriolíticos que ejercen su acción a nivel de la pared celular bacteriana (membrana externa y espacio periplásmico) en formación. Son moléculas análogas al aminoácido terminal de las subunidades peptídicas precursoras de la pared de peptidoglicano constituyentes de la pared celular de las bacterias, el D-alanil-D-alanina. En la transpeptidación, paso final de la síntesis de los peptidoglicanos, intervienen unas proteínas transpeptidasas conocidas como "penicillin binding proteins" (PBPs, proteínas de anclaje o de unión de penicilinas). La analogía estructural que existe entre los antibióticos betalactámicos y la D-alanil-D-alanina facilita el anclaje de los mismos al sitio activo de las PBPs en lugar del aminoácido. De forma que el núcleo betalactámico de la

molécula de antibiótico se une irreversiblemente a la PBP, evitando así el paso final (la transpeptidación) de la formación de la capa de peptidoglicanos e interrumpiendo así la síntesis de la pared celular.

A partir del descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1929 se inició el desarrollo de los antibióticos, entre ellos los antibióticos betalactámicos, naturales y derivados semisintéticos, que derivan de la penicilina. Esta familia de antimicrobianos es la más utilizada en el tratamiento de las enfermedades infecciosas causadas por enterobacterias. Hay cuatro grandes grupos de antibióticos betalactámicos: las penicilinas, las cefalosporinas, las monobactamas y las carbapenemas. Dentro de cada uno hay subgrupos en función de su naturaleza, la resistencia que ofrecen, la estructura química etc. (Tabla 6); teniendo todos ellos en común el anillo penicilínico (6- α -penicilánico).

Por otra parte, los denominados inhibidores de betalactamasas, que pueden ser betalactámicos o no, actúan inhibiendo la acción de estas enzimas, entre los que se encuentran el ácido clavulánico (núcleo similar al del ácido penicilánico pero con diferentes radicales) el sulbactam y el tazobactam (ambos sulfonas del ácido penicilánico).

1.5. Mecanismos de resistencia a betalactámicos

Poco después de la introducción de los antimicrobianos en el arsenal terapéutico empezaron a describirse microorganismos resistentes a éstos. En 1940 se comunicó la existencia del primer aislamiento de una bacteria (*Bacterium coli*) resistente a penicilina ^[1]. Los determinantes de resistencia se pueden encontrar localizados en el cromosoma o en elementos genéticos extracromosómicos. En el caso que dichos determinantes sean codificados en plásmidos, transposones e integrones pueden transferirse incluso entre distintas especies bacterianas, principalmente por conjugación.

La resistencia a betalactámicos está mediada por una serie de mecanismos que incluyen:

- Alteración de la permeabilidad de la membrana externa: normalmente provocada por mutaciones en las proteínas que forman canales en la membrana.

- Alteraciones en las bombas de expulsión: mutaciones en las proteínas transmembrana que actúan como bombas de expulsión, pudiendo provocar que aumente el espectro de moléculas que dichas bombas sean capaces de reconocer y expulsar de la bacteria.
- Alteraciones en la diana del antimicrobiano: a consecuencia de las mutaciones que afectan a su estructura terciaria las PBPs pueden sufrir pérdidas de afinidad por los betalactámicos.
- Alteración enzimática del antimicrobiano: como es el caso de las betalactamasas, que trataremos con más detalle.

1.5.1. Betalactamasas

Desde la descripción de la primera betalactamasa se ha producido de forma alarmante un gran aumento tanto en su número como en su diversidad, presumiblemente debido a la presión antibiótica ejercida por los nuevos antimicrobianos.

La producción de betalactamasas es el mecanismo principal de resistencia a los betalactámicos en microorganismos Gram negativos. Las betalactamasas son enzimas de naturaleza proteica de masa molecular de aproximadamente 29 kDa. Al igual que las PBPs pertenecen a una familia de proteasas que se unen a los betalactámicos formando un complejo acil-enzima. El mecanismo de acción depende de la presencia en el centro activo de un residuo de serina ó de zinc, dependiendo del tipo de enzima, gracias a los cuales reaccionan con el anillo betalactámico del antibiótico. A diferencia de las PBPs esta unión es reversible (no covalente). Debido a la participación de una molécula de agua se produce la rotura (hidrólisis) del enlace amídico del anillo betalactámico, dando lugar a la liberación de compuestos sin actividad antibacteriana.

Las betalactamasas en las bacterias Gram negativas se encuentran en el espacio periplásmico, entre la pared celular y la membrana externa, donde actúan como una barrera protectora de las PBPs, mientras que en las Gram positivas son excretadas al espacio extracelular de la bacteria.

La producción de betalactamasas puede ser codificada por genes *bla* cromosómicos o plasmídicos, y en ocasiones incluidos en transposones/integrones, lo

que posibilita la movilidad de dichos genes. Las betalactamasas cromosómicas pueden expresarse de manera constitutiva (se producen siempre) o ser inducibles (existe un mecanismo regulador que hace que se produzcan cuando está presente un betalactámico inductor). La gran mayoría de las betalactamasas plasmídicas son constitutivas en los microorganismos Gram negativos y su grado de producción depende del número de copias del plásmido.

El nivel de resistencia que generan las betalactamasas está directamente relacionado con sus propiedades hidrolíticas, el grado de afinidad por el betalactámico concreto y la concentración de las mismas. A su vez, la concentración puede estar condicionada por el número de copias del plásmido codificante, en el caso de que el gen *bla* no sea de localización cromosómica.

En la actualidad se utilizan mayoritariamente dos esquemas para clasificar las betalactamasas: la clasificación molecular de Ambler ^[5] y la clasificación funcional de Bush, Jacoby y Medeiros. La clasificación de Ambler agrupa las betalactamasas en las clases A, B, C y D basándose en las similitudes de su secuencia de aminoácidos. Las pertenecientes a las clases A, C y D son denominadas las serina-betalactamasas y las de la clase B son metalo-betalactamasas.

La clasificación funcional de Bush, Jacoby y Medeiros divide a las betalactamasas en cuatro grupos (y algunos subgrupos) en base a características funcionales de estas enzimas, con la particularidad de aunar criterios de clasificaciones anteriores (Tabla 7).

Tabla 6. Principales grupos antibióticos betalactámicos. Modificado de "Manual of clinical microbiology (9th Edition) [150].

GRUPO BETALACTÁMICO	RESISTENCIA	SUBGRUPO BETALACTÁMICO	ANTIBIÓTICOS
PENICILINAS			
NATURALES			Bencilpenicilina (penicilina G) Fenoximetilpenicilina (penicilina V)
SEMISINTÉTICAS	RESISTENTES A PENICILINASAS		Meticilina Nafcilina Cloxacilina Dicloxacilina Oxacilina
	DE ESPECTRO EXTENDIDO	AMINOPENICILINAS	Ampicilina Amoxicilina Bacampicilina Pivampicilina
		CARBOXIPENICILINAS	Carbencilina Ticarcilina
		UREIDOPENICILINAS	Azlocilina Mezlocilina Piperacilina
		COMBINACIÓN PENICILINA+INHIBIDOR 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	Cefdinir Cefditoren Cefixime Cefoperazona Cefotaxima Cefpodoxima Ceftazidima Ceftibuten Ceftizoxima Ceftriaxona
CUARTA GENERACIÓN	Cefepima Cefpiroma Cefelidina Cefaclidina

Tabla 7. Clasificación y propiedades de las betalactamasas según Bush, Jacoby y Medeiros (modificado).

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 restringido 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
2a	A	Serina	Penicilinas	Penicilinas	+	-	Penicilinas de bacterias Gram positivas
2b	A	Serina	Betalactamasas de espectro ampliado	Penicilinas Cefalosporinas 1ª gen.	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Serina	Betalactamasas de espectro extendido	Penicilinas Cefalosporinas 1ª-3ª gen. Monobactamas	+	-	Numerosas variantes de SHV y TEM, CTX-M, PER, VEB, GES-1, IBC-1
2br	A	Serina	Betalactamasas de espectro extendido resistentes a los inhibidores	Penicilinas, Cefalosporinas de 1ª, 2ª y 3ª G (bajo nivel)	-	-	TEM-50 (CMT-1), TEM-68 (CMT-2), TEM-89 (CMT-3)
2c	A	Serina	Penicilinas y Carbenicilinas	Penicilinas, Carbenicilina	+	-	PSE-1, PSE-3 a 5
		Serina	Penicilinas de espectro reducido	Penicilinas y Cloxacilina	+/-	-	Numerosas variantes OXA
2d	D	Serina	Betalactamasas de espectro extendido	Penicilinas, Cloxacilina, Betalactámicos de espectro extendido, a veces Monobactamas ó Cefalosporinas 3ª gen.	+/-	-	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
2e	A	Serina	Penicilinas y Cefalosporinas	Penicilinas y Cefalosporinas 1 ^a -3 ^a gen.	+	-	Betalactamasa cromosómica de <i>B.</i> <i>fragilis</i> , <i>B.</i> <i>uniformis</i> , <i>B.</i> <i>vulgatus</i> , <i>C.</i> <i>diversus</i> , <i>P.</i> <i>mirabilis</i> , <i>Y.</i> <i>enterocolitica</i> , <i>C.</i> <i>koseri</i> y <i>C. sedlakii</i>
2f	A	Serina	Carbapenemasa	Penicilinas, Cefalosporinas 1 ^a -4 ^a gen., Carbapenemas	+	-	NMC-A, SME-1 a 3, IMI-1, KPC-1 a 3, GES-2
3	B	Zinc	Carbapenemasa	Penicilinas, Cefalosporinas 1 ^a -4 ^a gen. y Carbapenemas	-	+	IMP-1 a 13, VIM-1 a 7, SPM-1, algunas enzimas cromosómicas de bacterias Gram negativas (AmpC)
4	NI*	Serina	Penicilinas	Penicilinas	-	-	Enzima cromosómica de <i>Burkholderia</i> <i>cepacia</i>

*NI: No incluido

CLA: ácido clavulánico

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

Las dos betalactamasas más frecuentemente encontradas en las enterobacterias son las penicilinasas TEM-1 y SHV-1. La enzima TEM-1 está presente en más del 40% de los aislamientos de *E. coli*, y es responsable de más del 90% de la resistencia a ampicilina en este microorganismo. Debido a que se encuentra en plásmidos y en transposones se ha facilitado su diseminación a otras especies y se ha extendido por todo el mundo en numerosas especies bacterianas como *P. aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoea*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, etc. [36]. SHV-1 está codificada en el cromosoma de la mayoría de aislamientos de *K. pneumoniae* [10, 48], aunque también puede ser de origen plasmídico. Ambas enzimas son capaces de hidrolizar las penicilinas y tienen poca actividad sobre las cefalosporinas [193, 224].

El amplio uso de cefalosporinas de tercera generación desde mediados de los años 80 ha ejercido una gran presión antibiótica que ha provocado la producción de mutaciones puntuales en los genes que codifican estas betalactamasas. En general

las posiciones en las que se producen las mutaciones dando lugar a una nueva betalactamasa son limitadas, existen posiciones en las que ocurren con mayor frecuencia. Dichas mutaciones dan lugar a modificaciones en la secuencia de aminoácidos, con la consiguiente redistribución y cambios en la estructura terciaria de la enzima (estructura tridimensional), que afectan a su centro activo y, por tanto, a su perfil de sustrato y a su punto isoeléctrico.

Estas mutaciones, que afectan de uno a seis aminoácidos de la secuencia de la betalactamasa, pueden determinar que ésta aumente su espectro y sea capaz de hidrolizar penicilinas y betalactámicos de amplio espectro, como cefalosporinas de tercera generación, monobactamas y cefalosporinas de cuarta generación, aunque no afecta a cefamicinas ni a carbapenemas. Todas estas características unidas a la inactivación por inhibidores de las serina-betalactamasas, como el ácido clavulánico, han determinado la denominación de estas betalactamasas como betalactamasas de espectro extendido (BLEE) ^[167]. Además de estas BLEE surgidas mediante la aparición de mutaciones en betalactamasas de menor espectro, otras BLEE han surgido de manera independiente.

1.5.2. Betalactamasas de espectro extendido (BLEE)

Las BLEE son betalactamasas plasmídicas que se denominan así debido a su capacidad de hidrolizar un rango de antibióticos betalactámicos más amplio que las denominadas de espectro ampliado (TEM-1, TEM-2 y SHV-1), en concreto los antibióticos oxi-imino- β -lactámicos (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima) y aztreonam ^[36]. No son activas frente a las cefamicinas y son inhibidas también por los inhibidores de las betalactamasas (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam). Son producidas con mayor frecuencia por enterobacterias ^[168] y son estructuralmente diferentes de las betalactamasas tipo AmpC cromosómicas inducibles producidas por otros microorganismos como *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp. y *P. aeruginosa*, que no se inhiben por los inhibidores de betalactamasas, y además son activas frente a cefamicinas.

Se describieron inicialmente en Europa a principio de los años 80, extendiéndose posteriormente por todo el mundo, fundamentalmente producidas inicialmente por cepas de *K. pneumoniae* ^[40, 251]. La primera BLEE, SHV-2, fue

descrita en Alemania en 1983 en una cepa de *Klebsiella ozaenae* aislada en el Hospital Universitario de Frankfurt ^[111]. En España, la primera cepa productora de BLEE se identificó en 1988 en un aislado de *E. coli* de la UCI infantil del Hospital Ramón y Cajal de Madrid. Desde entonces el número de nuevas BLEE descritas ha ido aumentando paulatinamente y actualmente existen más de 170 betalactamasas tipo TEM, más de 120 betalactamasas tipo SHV y más de 65 tipo CTX-M; en general en la actualidad existen más de 300 BLEE descritas.

En la última década y prácticamente en todo el mundo, se ha producido un incremento de infecciones producidas por *E. coli* productor de BLEE, productor mayoritariamente de enzimas tipo CTX-M ^[29, 185, 211], como después se explica con más detalle. Asimismo, en los últimos años han aumentado las cepas productoras de BLEE de otras enterobacterias, como *Enterobacter*, *Salmonella*, etc. ^[167]

Los organismos productores de BLEE suelen ser microorganismos multirresistentes, por asociar frecuentemente resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol y aminoglucósidos ^[167], debido a que con frecuencia, los plásmidos que vehiculizan los genes *bla* pueden incluir determinantes de resistencia para otros antibióticos. Además, con frecuencia son resistentes a quinolonas. En el caso de *E. coli* productor de BLEE es aún más relevante ya que muchas de estas cepas son frecuentemente resistentes a la mayoría de antimicrobianos recomendados para el tratamiento de infecciones de adquisición en la comunidad causadas por esta bacteria.

Bush y Jacoby recogen todas las betalactamasas descritas en un registro web que se actualiza periódicamente (<http://www.lahey.org/Studies/>), agrupadas por familias y mostrando las mutaciones con respecto a la betalactamasa de la que derivan, así como su punto isoeléctrico.

1.5.2.1. BLEE tipo TEM

Las BLEE tipo TEM se originan por mutaciones en la secuencia de las betalactamasas TEM-1 y TEM-2 (que son betalactamasas que confieren resistencia a ampicilina, pero no a cefalosporinas de tercera generación). Estas betalactamasas están compuestas por 286 aminoácidos, las sustituciones más frecuentemente descritas hasta ahora ocurren en las posiciones 21, 39, 104, 164, 238, 240 y 265.

Dichas sustituciones conducen a un fenotipo de BLEE, las producidas en las posiciones 104, 238 y 240 son particularmente importantes en la modificación del espectro de la actividad de la enzima ^[101]. El punto isoeléctrico (pI) de las BLEE tipo TEM, determinado por el cambio estructural de la enzima que causan las mutaciones en la secuencia de estas betalactamasas, oscila entre 5,2 y 6,5.

La primera BLEE tipo TEM descrita fue TEM-3 en 1984 en Francia ^[225], que se diferencia de TEM-2 por los cambios Glu104Lys y Gly238Ser, que elevan el pI a 6,3 y favorecen la hidrólisis de cefalosporinas de amplio espectro. Una de las BLEE tipo TEM más estudiada es TEM-24, ha estado implicada en importantes brotes en Francia ^[20, 59], Italia ^[178] y España ^[219]. Otra BLEE tipo TEM ampliamente descrita en los últimos años y en diferentes partes del mundo es TEM-52 ^[59, 100, 178], tiene la peculiaridad de hidrolizar moxalactam. Las BLEE tipo TEM, junto con las SHV, hasta hace unos años eran las más frecuentes, tanto en EE.UU. como en el resto del mundo ^[101].

Otras variantes de TEM son las IRTs (Inhibitor Resistant TEM, TEM resistente a inhibidores de betalactamasas), que no se inactivan con clavulánico ni sulbactam y por tanto, no son consideradas BLEE. También se han descrito cinco enzimas derivadas de TEM-1 no consideradas BLEE, que comparten características de BLEE y de IRT (TEM-50, TEM-68, TEM-89, TEM-121 y TEM-125) y que han sido denominadas complejo de enzimas mutantes (Complex Mutant Enzymes, CME).

1.5.2.2. BLEE tipo SHV

El gen *bla* que codifica la betalactamasa SHV-1, de la que derivan las BLEE tipo SHV, se encuentra en el cromosoma de más del 90% de las cepas de *K. pneumoniae* ^[10, 48, 126] y en bajo porcentaje en los plásmidos que codifican resistencia a betalactámicos en enterobacterias ^[67, 143].

Existe un número menor de BLEE tipo SHV. La mutación más común en las BLEE derivadas de SHV-1 se produce en las posiciones 238 y 240, los cambios de aminoácidos en estas dos posiciones son críticos para una hidrólisis eficaz de ceftazidima y cefotaxima respectivamente.

SHV-2 tiene una única sustitución con respecto a SHV-1 que no altera su pI pero que produce un aumento en la capacidad de hidrolizar ceftazidima. Esta enzima

fue la primera BLEE que se describió en España ^[12] y la implicada en la primera epidemia española de resistencia a cefalosporinas de tercera generación ^[75].

SHV-5 fue identificada en Chile en un paciente con una bacteriemia por *K. pneumoniae* en 1987 ^[89], desde entonces esta enzima se ha diseminado por todo el mundo ^[16, 38, 71, 152, 187, 238] incluida España; donde Briñas y cols. ^[38] describieron un brote causado por *K. pneumoniae* productor de SHV-5 en una UCI neonatal durante un año.

Una de las BLEE más extendida en la actualidad derivada de SHV-1 es SHV-12, con el cambio de aminoácido en la posición 35 y un pI de 8,2. Esta enzima fue descrita por Nuesch-Inderbinen y cols. ^[158] en un estudio multicéntrico realizado en Suiza durante 2 años (1993-1995). Durante años, tanto en la cuenca Mediterránea como en países asiáticos, a orillas del Pacífico, la BLEE hallada más frecuentemente fue SHV-12 ^[19, 46, 114, 118, 156, 249, 258]. En Canadá se realizó un estudio multicéntrico ^[148] donde encontraron que SHV-12 era la BLEE más frecuente en aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae* en todos los hospitales participantes, supuso el 39% de todas las BLEE detectadas.

En España SHV-12 se había descrito fundamentalmente en cepas de *E. coli* que producían infecciones en animales ^[39, 231], y posteriormente ha ido hallándose en pacientes. En un estudio multicéntrico realizado en España en el año 2000 la enzima SHV-12 fue la segunda BLEE más frecuentemente hallada, aisladas de 16 hospitales distintos localizados en nueve comunidades autónomas diferentes ^[93]. Asimismo, empezaron a describirse casos en los que un aislado producía dos tipos de BLEE, siendo comúnmente una de esas enzimas SHV-12 ^[41, 63, 93, 202, 203, 205].

También se ha descrito una variante de SHV-1 resistente a inhibidores (SHV-10), activa frente a penicilinas y considerablemente reducida actividad sobre cefalosporinas.

1.5.2.3. BLEE tipo CTX-M

Parece ser que los genes que codifican la betalactamasa CTX-M habrían "saltado" del cromosoma de *Kluyvera* a uno o varios plásmidos, y posteriormente una vez integrados en éstos habrían diseminado a otras especies ^[29].

Los aminoácidos más importantes para la actividad tipo BLEE se encuentran en las posiciones 237 (serina) y 276 (arginina); el pI de esta familia de enzimas oscila entre 7,5 y 9. Se inhiben mejor con tazobactam que con clavulánico o sulbactam, a diferencia de las betalactamasas de las familias TEM y SHV, con las que tienen solamente un 40% de homología en su secuencia. Sin embargo se ha encontrado una homología superior al 90% entre los genes *bla*_{CTX-M} de las enzimas plasmídicas de CTX-M y determinados genes presentes en el cromosoma de especies de *Kluyvera*.

La primera betalactamasa tipo CTX-M se describió en 1989, cuando Bauernfeind y cols. ^[15] informaron de una cepa de *E. coli* que producía una BLEE que no era TEM ni SHV, a la que llamaron CTX-M-1 ya que hidrolizaba cefotaxima. Antes, en 1986 Matsumoto había descrito en Japón ^[137] una BLEE que no era de los tipos TEM ni SHV y que fue denominada FEC-1, posteriormente se vio que la secuencia de dicha enzima era prácticamente igual a otra denominada CTX-M-3. En 1998 se reconoció a las enzimas CTX-M como una familia independiente de BLEE ^[85]. Desde entonces han tenido una rápida diseminación por el mundo entre una gran variedad de enterobacterias, hecho favorecido por la existencia de elementos genéticos, como es el caso de secuencias de inserción en el entorno del gen que codifica CTX-M ^[186]. Las BLEE tipo CTX-M se caracterizan por hidrolizar más intensamente cefotaxima (de ahí su nombre, cefotaximasas) que ceftazidima; sin embargo, han ido surgiendo variantes con mutaciones puntuales que les conferían mayor capacidad de hidrólisis sobre ceftazidima que las enzimas de las que derivaban ^[29].

Las BLEE de la familia CTX-M se han dividido en 6 grupos filogenéticos de acuerdo con la similitud de sus secuencias de aminoácidos (los integrantes de cada grupo tienen más del 94% de similitud entre ellos y menos del 90% con las demás enzimas CTX-M). Cada grupo parece tener orígenes filogenéticos diferentes; debido a los hallazgos de genes en diferentes especies de *Kluyvera* hasta el momento se piensa que el grupo CTX-M-1 procede de la betalactamasa cromosómica de clase A de *Kluyvera ascorbata*, el grupo CTX-M-2 de la de *K. cryocrescens*, el grupo CTX-M-8 de *K. georgiana* y el grupo CTX-M-9 podría proceder también de *K. georgiana* ^[159]. Los orígenes de CTX-M-25 y CTX-M-45 aún permanecen sin identificar, pero probablemente sean otros miembros del género *Kluyvera* ^[213]. Las similitudes en dichas secuencias son desde un 80 al 100% de homología (Tabla 8).

Tabla 8. Clasificación de las BLEE tipo CTX-M en función del grupo al que pertenecen en base a su secuencia aminoacídica ^[213].

GRUPO	ENZIMAS INTEGRANTES
CTX-M-1	CTX-M-1, -3, -10, -11, -12, -15, -22, -23, -28, -29, -30, -32, -33, -34, -36, -37, -42, -52, -53, -54, -57, -58, -60, y -61
CTX-M-2	CTX-M-2, -4, -5, -6, -7, -20, -31, -35, -43 y -44
CTX-M-25	CTX-M-25, -26, -39 y -41
CTX-M-8	CTX-M-8, -40 y -63
CTX-M-9	CTX-M-9, -13, -14, 16, -17, -18, -19, -21, -24, -27, -38, -46, -47, -48, -49, -50, -51, -55 y -65
CTX-M-45	CTX-M-45

CTX-M-2 y CTX-M-3, son las que se han descrito en más especies distintas de enterobacterias: *Salmonella*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *V. cholerae*, *P. mirabilis*, *Enterobacter*, *C. freundii*, *S. marcescens*, *M. morgani*, *K. oxytoca*, *Aeromonas* y *Shigella*.

CTX-M-9 fue identificada por Sabaté y cols. ^[215] en España en 1996 en una cepa de *E. coli* resistente a cefotaxima. Esta enzima se diseminó rápidamente, encontrándose en otros países como Brasil, Francia, Reino Unido, China y otros países asiáticos ^[14, 30, 45, 218]. El gen que codifica CTX-M-9 se ha detectado formando parte de integrones que facilitarían esta diseminación ^[226]. Una enzima del grupo CTX-M-9 muy extendida es CTX-M-14; se trata de una variante de CTX-M-9 que se diferencia por la sustitución Ala231Val. Se describió prácticamente de forma simultánea en Corea ^[164], Francia ^[69], China ^[45] y Japón ^[131] en aislamientos de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* y *S. sonnei*. En algunos países es la BLEE más frecuente del grupo de las CTX-M. En estudios de China y Calgary (Canadá) el 50% o más de las BLEE CTX-M producidas por enterobacterias eran CTX-M-14 a finales de los años noventa y principios del nuevo siglo ^[149]. En España Bou y cols. ^[33] identificaron esta enzima en cepas de *E. coli* no relacionadas clonalmente y causantes principalmente de infecciones del tracto urinario. En 2004, Romero y cols. ^[212], describieron la primera cepa de *S. enteritidis* productora de CTX-M-14 en España. La

cepa se aisló de una paciente pediátrica ingresada por un cuadro diarreico producido por una cepa de *S. enteritidis* sensible a cefalosporinas, siendo tratada con ceftriaxona. Posteriormente, tras el tratamiento antibiótico se aisló *S. enteritidis* resistente a cefotaxima, y en otra muestra posterior fue aislada la misma cepa junto a un aislamiento de *E. coli* resistente a cefotaxima. Los 3 aislamientos resistentes producían una enzima BLEE CTX-M-14, pero en el caso de *E. coli* el gen se encontraba en un plásmido distinto al de las cepas de *Salmonella*. En España al inicio de las investigaciones sobre BLEE, la enzima mayoritaria de la familia CTX-M era CTX-M-9, posteriormente pasó a ser CTX-M-14.

En el estudio multicéntrico nacional en el que participaron 40 hospitales del grupo GEIH-BLEE realizado en el año 2000 durante 4 meses ^[93], el 71% de las bacterias productoras de betalactamasas eran *E. coli* y el 29% restante *K. pneumoniae*. El porcentaje de cepas de *E. coli* que eran productoras de BLEE fue 65%, y en el caso de *K. pneumoniae* fue el 86%, aunque en valores absolutos el número de *E. coli* fue muy superior (170 de 262 frente a 70 de 81). En el primer microorganismo, las enzimas de tipo CTX-M representaron el 27% del total de las BLEE producidas, siendo mayoritarias las enzimas CTX-M-9 (27%), seguidas de CTX-M-14 (21%) y CTX-M-10 (5%). En el caso de *Klebsiella*, las enzimas CTX-M fueron todas CTX-M-10 (3 aislados, 13% de todas las cepas). En un estudio posterior realizado en el Hospital Virgen Macarena de Sevilla durante 4 años y 3 meses el porcentaje de cepas de *E. coli* productoras de BLEE tipo CTX-M fue el 70%, siendo el 65% del total de enzimas betalactamasas producidas CTX-M-14 y el 3% CTX-M-9 ^[202].

Sin embargo, en el resto del mundo, la BLEE tipo CTX-M más frecuente es CTX-M-15, perteneciente al grupo CTX-M-1, y que posee una actividad elevada sobre ceftazidima ^[107]. Esta BLEE fue descrita por primera vez en la India en 1999 ^[106], posteriormente ha sido descrita en países de varios continentes como Francia ^[119], Inglaterra ^[14], Canadá ^[35], Corea ^[109], Nigeria ^[228] y Colombia ^[239] entre otros. En España, en el estudio multicéntrico desarrollado por el grupo GEIH-BLEE de 2000 no se halló ninguna enzima CTX-M-15, ni en otro posterior realizado en Madrid sobre portadores fecales ^[242]. Tampoco hubo ninguna CTX-M-15 en un estudio desarrollado en Barcelona en 2001-2002, sin embargo sí hubo 4 aislados de *E. coli* productor de CTX-M-15 en el mismo periodo en Barcelona, también sobre portadores fecales ^[145]. El primer brote ocurrió durante casi dos años, 2004 y 2005, fue originado por *E. coli* productor de CTX-M-15 en la comunidad de Madrid ^[163]. Hubo 103 aislados relacionados clonalmente, pertenecían a un único cluster, fueron tanto de adquisición

comunitaria como nosocomial, 35 y 65% respectivamente. En un trabajo mixto (retrospectivo y prospectivo) realizado en Murcia sobre bacteriemias por *E. coli* entre 2006 y 2007 el 15% de cepas productoras de BLEE eran CTX-M-15 [78]. En la zona de Sevilla no se halló ninguna CTX-M-15 en una investigación sobre la infección y colonización nosocomial realizado durante año y medio (2001-2002). Tampoco en otro trabajo desarrollado durante 9 años (1995-2003) en pacientes tanto hospitalizados como no, ni en el estudio desarrollado durante algo más de 4 años (2001-2005) en pacientes con bacteriemias por *E. coli* BLEE [202, 203, 211]. En el segundo estudio multicéntrico del grupo GEIH-BLEE desarrollado durante dos meses en el año 2006 ya hubo 37 aislados productores de CTX-M-15 [61].

1.5.2.4. BLEE tipo OXA

Estas betalactamasas pertenecen a grupos distintos: a la clase molecular D y al grupo funcional 2d. Las betalactamasas tipo OXA confieren resistencia a ampicilina y cefalosporinas, se caracterizan por su alta capacidad hidrolítica de oxacilina y cloxacilina (a este hecho le deben su nombre). Es un grupo heterogéneo con más similitudes fenotípicas que genotípicas, se inhiben en grado variable con clavulánico. La mayor parte de las BLEE tipo OXA han sido descritas principalmente en *P. aeruginosa* y la mayoría de cepas con estas enzimas se han aislado en Turquía y Francia [36].

1.5.2.5. Otras BLEE

Aunque la mayoría de las BLEE de aislamientos clínicos pertenecen a las familias TEM, SHV y CTX-M, existen otras BLEE de menor trascendencia que poseen una epidemiología restringida a determinadas áreas y se agrupan en las clases moleculares A y D. Se incluyen las de tipo PER (*Pseudomonas extended resistant*), VEB (Vietnam Extended-spectrum betalactamase), CME (*Chryseobacterium meningosepticum*), TLA (Tlahuicas, tribu india), SFO (*Serratia fonticola*), BES (Brasil

Extended Spectrum) y la familia GES/IBC (Guyana Extended-Spectrum/ Integron Borne Cephalosporinase).

1.6. Métodos de detección de BLEE

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) presentadas por los microorganismos productores de BLEE pueden ser muy variables para las cefalosporinas, llegando incluso a valores considerados de sensibilidad para antimicrobianos a los cuales dichas enzimas se suponen resistentes. Por tanto hay que realizar una detección fiable de dichas enzimas y no guiarse simplemente de las CMI resultantes de técnicas *in vitro*, y en el caso de sospecharse su existencia por las CMI debe confirmarse con otra técnica.

Además, ante la sospecha de producción de BLEE por un microorganismo hay que tener en cuenta la epidemiología local y el patrón de resistencias que hay en la zona, puesto que dependiendo del método de detección microbiológico y el antibiótico que se emplee se puede pasar por alto determinado tipo de BLEE. Por ejemplo, puede deberse a que produzca solo un bajo grado de resistencia a un betalactámico o que afecte sólo a cefotaxima, que se produzca efecto inóculo o especificidad de sustrato, así como que coexista con la expresión de otra enzima tipo AmpC, hecho que puede enmascarar la presencia de una BLEE ^[36].

Las técnicas para confirmar la producción de una BLEE por un microorganismo pueden ser fenotípicas, mediante microdilución o difusión en agar, y moleculares. Las primeras se basan en la característica común a todas las BLEE de ser inactivadas por los inhibidores de betalactamasas. Existen varios métodos que se basan en este efecto. El primero propuesto fue el de doble disco ^[98], que consiste en realizar una siembra del microorganismo problema en una placa de agar Mueller Hinton, colocar un disco de amoxicilina o ticarcilina con clavulánico en el centro de la placa y, alrededor de éste, a 30 milímetros de distancia (de centro a centro) situar discos que contengan oxi-imino- β -lactámicos (OIBL). Una distorsión o agrandamiento del halo de inhibición de crecimiento de alguno de estos últimos discos indicaría la producción de BLEE. Es fácil de realizar y de interpretar, para aumentar su sensibilidad se han propuesto modificaciones como acercar los discos a 20 mm o añadir al test un disco de cefpodoxima.

Un método similar es el de añadir a los discos de OIBL sulbactam o clavulánico y comparar los halos de inhibición: un incremento en el diámetro de 5 mm en el disco con inhibidor de betalactamasas comparado con el de betalactámico solo indica la presencia de una BLEE. Este método es el considerado de referencia por el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), anteriormente National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).

Otra técnica de detección de BLEE es la tridimensional de Thomson y Sanders, esta técnica es muy sensible, pero más laboriosa y se utiliza bastante menos que las otras.

También se puede detectar una BLEE mediante E-test con tiras en las que en una mitad hay una cefalosporina sola (ceftazidima, cefotaxima o cefepima) y en la otra mitad está la misma cefalosporina junto con clavulánico. Si la CMI de la cefalosporina sola es ≥ 8 veces que con clavulánico indica que el microorganismo produce una BLEE.

Otro método es la dilución en caldo; se determina la CMI de OIBL solos y en combinación con clavulánico a una concentración fija de este último (el CLSI recomienda usar 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Una disminución de la CMI de tres o más diluciones indica la presencia de una BLEE. Este método existe totalmente automatizado, siendo la forma habitual de desarrollar la técnica.

El isoelectroenfoque es una técnica útil para la caracterización preliminar de betalactamasas. En la actualidad no tiene mucha utilidad debido a la gran cantidad de betalactamasas distintas descritas y que aún siguen describiéndose. Con este método se separan las proteínas según su pI en un gradiente de pH producido electroforéticamente, alineándose en forma de bandas definidas. Esta técnica presenta como ventaja principal el poder identificar más de una BLEE, pero posee varias limitaciones, además del inconveniente comentado, por lo que en la actualidad no es muy utilizada.

Mediante los métodos genotípicos de detección molecular se puede determinar con certeza la producción de una BLEE, se puede establecer el tipo de BLEE y la denominación exacta mediante el estudio de su secuencia. Basándose en la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) se han desarrollado diversas técnicas para diferenciar las distintas BLEE pertenecientes a una misma familia. Algunas de las técnicas son el oligotipado, las técnicas de polimorfismos de fragmentos de restricción (PCR-RFLP), la reacción en cadena de la ligasa (LCR) y PCR seguida de restricción con endonucleasas entre otras.

Para la identificación definitiva del gen que codifica una BLEE se realiza la secuenciación. A partir de la purificación del producto de una PCR con cebadores específicos se puede determinar la secuencia de nucleótidos del gen que codifica una BLEE (*genbla*) y compararla con las existentes en bases de datos (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank) y así establecer su tipo y denominación. Este es el método de referencia para caracterizar una BLEE.

1.7. Epidemiología de las cepas productoras de BLEE

La epidemiología de las betalactamasas de espectro extendido es compleja puesto que influyen numerosos factores: características epidemiológicas de los pacientes, características de los microorganismos y características de los elementos genéticos móviles (plásmidos, transposones, integrones y secuencias de inserción) que portan los genes *bla*. Todos los factores en conjunto han llevado a que la presencia de estas enzimas sea global, en numerosas especies microbianas y tanto en el medioambiente como en los animales y las personas.

La aparición y diseminación de las betalactamasas se ha relacionado con el uso masivo de antimicrobianos betalactámicos [36, 84, 92, 125] debido a la presión antibiótica ejercida por las cefalosporinas de amplio espectro, ya que éstas se introdujeron para el uso clínico en la década de 1980. Dicha presión antibiótica induce la selección de mutaciones en los genes codificantes de betalactamasas que pueden producir un aumento en el espectro de acción de la nueva enzima, puede afectar a los promotores del gen, al número de copias de éste o a otros genes [84]. En esta diseminación también ha influido la resistencia a otros tipos de antimicrobianos, como es el caso de las fluorquinolonas, en las que la existencia del gen *qnrA* está asociada a genes de CTX-M-9 y CTX-M-14, y *qnrB* a CTX-M-15 y SHV-12.

La rápida dispersión mundial de *E. coli* productora de BLEE en la comunidad, constituye uno de los cambios epidemiológicos más significativos ocurridos recientemente en las enfermedades infecciosas [18, 180, 247]. Este aumento se ha producido sobre todo desde que surgieron las BLEE de la familia CTX-M, ya que dicho aumento en general de las BLEE es a expensas de cepas productoras de enzimas de esta familia [33, 63, 183, 202, 204]. La diseminación se ha producido a través de la transmisión entre diversos clones de plásmidos portadores de enzimas CTX-M [245] y a

través de la diseminación clonal en la comunidad y centros sanitarios de determinados clones productores de CTX-M-15 principalmente ^[55]. Con la excepción de la clonalidad asociada a ST131, hasta la fecha hay descritos pocos brotes nosocomiales extensos causados por *E. coli* productor de BLEE ^[131, 148, 155, 165, 169, 250].

Los reservorios de estas enzimas pueden ser de tipo ambiental, animal y humano. En humanos, los portadores intestinales son importantes desde el punto de vista epidemiológico ^[197], dado que el tracto digestivo es el principal reservorio de *E. coli* BLEE ^[80]. Es muy relevante señalar que en áreas endémicas, la prevalencia de colonización fecal en la población no relacionada con el sistema sanitario se ha incrementado en los últimos años de manera muy importante ^[197, 242].

En cuanto a los reservorios animales, se han estudiado animales de granja, de compañía y salvajes. En España, en un estudio de muestras fecales de pollos en 2001 se detectaron en el 1,6% de los aislados analizados, *E. coli* productores de SHV-12 o CTX-M-14 ^[27]. En 2003 los mismos autores repitieron el muestreo hallando un incremento del porcentaje (5%) y de la diversidad de enzimas (CTX-M-14, CTX-M-9 y SHV-12) ^[238]. En Cataluña se llevó a cabo un estudio de cepas de *E. coli* productor de BLEE obtenidas en granjas de pollos, cerdos y conejos. Se detectó un mayor número y más variedad de BLEE entre las cepas de *E. coli* aisladas de pollos (CTX-M-1, CTX-M-14, CTX-M-9, CTX-M-32, SHV-12, SHV-2, SHV-5 y TEM-52) y un menor número y variedad entre las cepas aisladas de cerdos (CTX-M-1, SHV-12 y SHV-5) y de conejos (CTX-M-14 y CTX-M-9) ^[24, 140]. También se ha estudiado la colonización en animales salvajes como es el caso de aves acuáticas, encontrándose en algunas de ellas ^[229].

Se han hallado diferentes posibles reservorios ambientales de estas enzimas, como es el caso de los fómites en los hospitales o residencias de ancianos, aguas residuales, etc. En un trabajo reciente en la India se investigó la presencia de genes de resistencia a antibióticos en *E. coli* en las aguas residuales de un hospital, hallándose diferentes genes, entre ellos genes de BLEE ^[64].

En cuanto a la transmisión, hay pocos estudios que hayan estudiado la transmisión por contacto de cepas de *E. coli* productor de BLEE; esta se ha sugerido más que demostrado ^[62, 194]. En cuanto a la transmisión alimentaria, Mesa y cols. publicaron un trabajo en el que incluían muestras de ensalada y alimentos cocinados, entre otras, de las que habían recuperado *E. coli* BLEE y *K. pneumoniae* BLEE ^[140]. Por otra parte, aquellos animales que sirven como alimento pueden ser reservorios de estas enzimas y a través de los alimentos originados a partir de ellos pueden

llegar a los humanos. Entre ellos se han estudiado y encontrado en aves de corral [248], en nuestro medio se ha encontrado *E. coli* BLEE en el 67% de muestras de carne de pollo [65]. En Dinamarca en 2009 se investigó la prevalencia de *E. coli* productora de cefalosporinas de espectro extendido tanto en cerdos de matadero daneses como en carnes de venta al por menor, de origen danés e importada, concluyendo que el uso de cefalosporinas en los cerdos puede incrementar la prevalencia de *E. coli* con cefalosporinas en cerdos [2].

Finalmente, en cuanto a las características de los pacientes, la mayor edad, que a su vez conlleva más enfermedades de base, con más atención hospitalaria y más cuidados que conducen a la exposición del paciente son factores que favorecen la adquisición de microorganismos productores de BLEE. Muchos de estos factores concurren en las residencias de ancianos o centros de cuidados de larga duración, además de otros factores como el reservorio intestinal, los fómites etc; convirtiendo a estas instituciones por sí mismas en un reservorio importante de BLEE que conlleva la reintroducción de la bacteria en los hospitales [31, 32, 37, 220, 250]. Un factor de riesgo importante, sobre todo en áreas no endémicas, es el hecho de viajar a otros países que sí lo son [179].

Ya hemos comentado que los primeros microorganismos productores de BLEE en España se describieron en 1988 en una paciente de la UCI pediátrica del Hospital Ramón y Cajal, que tuvo dos aislamientos de *E. coli* productor de SHV-2 [12]. Posteriormente en un estudio retrospectivo de la Clínica Puerta de Hierro de Madrid se halló una cepa de *K. pneumoniae* de 1985 y dos de *E. coli* en 1987 con fenotipo compatible con la producción de enzimas plasmídicas tipo BLEE. Asimismo, la primera epidemia por cepas productoras de BLEE en el país ocurrió en Madrid entre los años 1988 y 1990 en el Hospital Clínico San Carlos, incluyó 59 aislamientos en total de varias bacterias: *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *K. oxytoca* y *E. coli*. Todas las cepas expresaban una betalactamasa compatible con SHV-2 [75].

En un estudio posterior en el que se analizó la resistencia a cefalosporinas de amplio espectro en aislados de *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* y *E. coli* en un hospital de Barcelona entre 1994 y 1996, hallaron una prevalencia muy baja de producción de BLEE, 0,14% en *E. coli* (10 cepas) y 0,17% en *K. pneumoniae* (1 cepa). La BLEE expresada por mayor número de aislamientos fue CTX-M-9 (6 de 10) [216].

El incremento de producción de BLEE, la sustitución de *K. pneumoniae* por *E. coli* y de enzimas de la familia SHV y TEM por CTX-M se pudo comprobar en España y en nuestra zona mediante varios estudios. Diestra y cols. hallaron una alta

producción de enzimas BLEE de la familia CTX-M, el 80%, en un estudio multicéntrico en el primer trimestre de 2004, siendo predominante la CTX-M-14 (46%) seguida de CTX-M-9 (21%) y por último de SHV-12 (22%). Ninguna de las cepas producía enzimas de la familia TEM ni de otro tipo de SHV, asimismo había una gran diversidad de la familia mayoritaria ^[63].

En el área norte de Sevilla se investigó la presencia de aislados productores de BLEE en *E. coli* y *K. pneumoniae* a lo largo de 9 años, 1995-2003 ^[211]. El porcentaje de producción de BLEE aumentó en *E. coli* de 0,31% en 1995 a 4,8% en 2003 mientras que disminuyó en los aislados de *K. pneumoniae* de 7,2 a 2,5% respectivamente. El tipo de BLEE producido pasó de 100 a 66% de SHV para *Klebsiella* y del 100% de SHV al 61% de CTX-M para *E. coli*. Precisamente en nuestra zona la primera BLEE de la familia CTX-M (CTX-M-9) producida por *E. coli* fue detectada en 1999 en este trabajo. Asimismo se hallaron otras diferencias epidemiológicas entre las dos bacterias, las cepas de *E. coli* presentaron una gran diversidad clonal y entre las de *K. pneumoniae* se encontraron algunas cepas epidémicas predominantes. La mayoría de las cepas de *K. pneumoniae* se aislaron en pacientes ingresados, aproximadamente la mitad de *E. coli* se aislaron en este tipo de pacientes. Se hallaron datos similares en un estudio multicéntrico español realizado en el año 2000 ^[93]. En un centro hospitalario de Sevilla se investigó durante cuatro años la producción de BLEE en pacientes con bacteriemias por *E. coli*, donde el 70% de dichas enzimas fueron de tipo CTX-M ^[202].

En algunos trabajos se han encontrado diferentes características epidemiológicas según el tipo de BLEE; en un estudio realizado en el Hospital Universitario Virgen Macarena con cepas nosocomiales de *E. coli* productor de BLEE se apreció que los aislados productores de CTX-M no tenían relación clonal y probablemente habían sido importados de la comunidad, mientras que los aislados productores de BLEE tipo SHV y TEM sí eran clonales y de más clara adquisición nosocomial ^[203]. Los resultados con cepas comunitarias son contradictorios ^[41, 204].

1.7.1. Enterobacterias productoras de BLEE de adquisición comunitaria

Como hemos comentado, inicialmente prácticamente la totalidad de los aislamientos de microorganismos productores de BLEE eran de origen nosocomial, y fundamentalmente de *K. pneumoniae*. Posteriormente se produjo un aumento de enterobacterias BLEE positivas distintas a esta bacteria, sobre todo *E. coli*, y un incremento en los aislamientos de origen comunitario.

Las cepas de *E. coli* productora de BLEE, y particularmente las productoras de BLEE tipo CTX-M, están diseminadas por todo el mundo. De forma global aproximadamente la mitad de los casos de infección por *E. coli* productor de BLEE afectan a pacientes no hospitalizados [182, 185, 204, 211, 254]. En ellos, el tipo más frecuente de infección es la infección del tracto urinario [185, 204, 206].

Las bacteriemias causadas por *E. coli* productor de BLEE son la consecuencia clínicamente más grave de este problema [17, 180, 202, 208]. En nuestro área hospitalaria durante los primeros años de la década del 2000, el 12% de las infecciones causadas por *E. coli* productor de BLEE en pacientes no hospitalizados [204] y el 16% de las ocurridas en pacientes hospitalizados fueron bacteriémicas, respectivamente [203]. Esta situación supone un reto asistencial puesto que los antimicrobianos habitualmente recomendados como terapia empírica para el tratamiento de la sepsis comunitaria y nosocomial originadas en el tracto urinario, cefalosporinas y quinolonas, no son activos frente a la mayoría de estos aislados.

Se han realizado diversos estudios para identificar los factores de riesgo para infecciones por microorganismos productores de BLEE en pacientes no hospitalizados, y específicamente para las del tracto urinario. Los resultados hallados en uno de los primeros de estos estudios, realizado en Israel, fueron que haber estado ingresado en los tres meses previos, haber recibido tratamiento antibiótico en ese periodo, ser mayor de 60 años y varón, ser diabético, que la infección fuera por *K. pneumoniae* y haber sido tratado previamente con cefalosporinas de segunda o tercera generación, quinolonas y penicilina, predisponen a una infección por bacterias productoras de BLEE [54]. En estudios específicos para infecciones por *E. coli* productores de BLEE en la comunidad realizados en nuestro medio se encontró la diabetes mellitus, la infección relacionada con los cuidados sanitarios, la infección urinaria de repetición, y el haber recibido recientemente aminopencilinas, quinolonas o cefalosporinas eran factores de riesgo [41, 203, 204].

La colonización con cepas multirresistentes, incluyendo las productoras de BLEE, constituye un riesgo e incluso un prerrequisito para la infección por estos microorganismos ^[242]. En España se ha comprobado el aumento de portadores fecales de *E. coli* BLEE. En Barcelona analizaron a lo largo de tres periodos diferentes entre 2001 y 2002 la presencia de enterobacterias productoras de BLEE positivas en heces de pacientes no hospitalizados ^[144]. Hallaron un incremento en el porcentaje de portadores fecales de cepas productoras de BLEE del 2,1 al 7,5%. El mismo hecho se descubrió en Madrid donde analizaron la presencia de enterobacterias productoras de BLEE en muestras de heces recogidas de pacientes ingresados o no en los años 1991 y 2003 ^[242]. La prevalencia de portadores fecales de cepas BLEE en el primer periodo fue 0,7% en los pacientes ambulatorios y 0,3% en los hospitalizados. Mientras que en 2003 la prevalencia de los primeros fue 5,5% y de los segundos 11,8%, se había invertido según el origen del paciente, pero aumentado en general en número, así como en variedad de tipo de BLEE. Más recientemente en Sevilla se calculó la prevalencia de portadores fecales en pacientes con infecciones del tracto urinario por *E. coli* BLEE de adquisición comunitaria, siendo 67,9%. A su vez la investigaron en familiares convivientes de dichos pacientes y en familiares no convivientes, siendo las prevalencias 27,4 y 15,6% respectivamente. También hallaron una prevalencia del 7,4% en un grupo control de pacientes de urgencias no relacionados con los primeros. En dicho estudio se concluyó que tanto la adquisición común, debida tal vez a la alimentación o hábitos alimenticios, como la transmisión persona a persona pueden contribuir a la diseminación de las BLEE ^[197].

1.7.2. Enterobacterias productoras de BLEE de adquisición nosocomial

Los brotes nosocomiales de *K. pneumoniae* productor de BLEE pueden estar causados por la diseminación de un plásmido entre distintas especies de enterobacterias o más frecuentemente por la diseminación de un clon ^[133, 165, 170]. Las enzimas más frecuentemente producidas por estas cepas epidémicas habían sido TEM y SHV hasta los años 90, pero en la última década predominan los productores de enzimas CTX-M. El consumo elevado de cefalosporinas puede favorecer la selección de estos clones, algunos de los cuales se diseminan con particular facilidad en centros o servicios hospitalarios mediante transmisión cruzada entre pacientes de

riesgo [40, 142, 168, 175, 192, 250]. También se han descrito brotes de *Enterobacter* spp. productores de BLEE [42, 241], así como situaciones complejas producidas por *K. pneumoniae* multiclonal [241].

En el caso de *E. coli*, las infecciones nosocomiales han sido causadas principalmente por cepas no relacionadas clonalmente, pero también se han hallado en el medio hospitalario casos esporádicos, sugiriéndose que podrían haber sido importados de la comunidad al hospital [17, 91, 203], aunque en otros puede haber existido transmisión horizontal dentro del hospital y en centros de larga estancia [8, 203, 250].

Otro factor a tener en cuenta y que facilita la dispersión es que la estancia de estos pacientes en el hospital suele ser prolongada, hecho que aumenta la exposición a la flora nosocomial [97, 186]. El hecho de que el personal no cumpla estrictamente las medidas de higiene de manos entre distintos pacientes favorece la transmisión de estas bacterias entre enfermos ingresados a través de las manos del personal sanitario [4, 84].

Ante la aparición de brotes de microorganismos productores de BLEE en el hospital hay que poner en marcha medidas específicas de control, como la búsqueda activa de pacientes colonizados, la limpieza ambiental exhaustiva, la instauración de precauciones de contacto con los pacientes colonizados o infectados y la restricción del uso de cefalosporinas de tercera generación, como se ha demostrado en diversos trabajos [9, 36, 97, 175]; también se ha planteado la sustitución de cefalosporinas por betalactámicos con inhibidores de betalactamasas [171, 192].

1.8. Relevancia clínica y pronóstica de las infecciones causadas por microorganismos productores de BLEE

Como se ha comentado anteriormente, la producción de BLEE tiene implicaciones clínicas. Diferentes autores han estudiado el impacto de la producción de BLEE en el curso clínico de los pacientes con infecciones graves. La infección por enterobacterias productoras de BLEE conlleva un retraso significativo en el inicio del tratamiento antibiótico efectivo, la hospitalización es más prolongada y el coste hospitalario global es mayor [113, 115, 222].

Además, en dos meta-análisis se ha demostrado que sufrir una infección por un microorganismo productor de BLEE es un factor independiente asociado con la mortalidad en bacteriemias, como se explicará más adelante ^[214, 221].

1.8.1. Bacteriemias por enterobacterias productoras de BLEE

Como se ha comentado, los procesos bacteriémicos por enterobacterias productoras de BLEE son muy frecuentes en la actualidad, fundamentalmente los producidos por *E. coli* productor de enzimas de la familia CTX-M. Aunque se han realizado distintos trabajos epidemiológicos para estas infecciones ^[32, 68, 110, 220, 253], existen diferencias importantes en la epidemiología en función de la localización geográfica y en los criterios de inclusión de casos.

En los años en que se realizó este trabajo se publicaron algunos trabajos sobre bacteriemias productoras de BLEE en Turquía, China, Corea y el Reino Unido sobre bacteriemias por *E. coli* BLEE ^[22, 102, 139, 141]. En estos, los orígenes más frecuentes de las infecciones bacteriémicas fueron urinario, biliar y desconocido; la mortalidad cruda varió entre el 0 y el 61%, un rango muy amplio debido a las diferencias metodológicas de los estudios. Desde la perspectiva de la totalidad de las bacteriemias, un estudio multicéntrico realizado en Andalucía entre 2006 y 2007 mostró que, entre las bacteriemias por *E. coli*, las cepas productoras de BLEE fueron el 19% de las nosocomiales, el 8% de las relacionadas con los cuidados sanitarios y el 9% de las estrictamente comunitarias ^[208].

En trabajos específicos sobre los factores de riesgo para las bacteriemias causadas por *E. coli* productor de BLEE, había muy poca información cuando se publicaron los resultados de este trabajo. Así, en un estudio realizado en Hong Kong durante 3 años, la enfermedad de base grave, la infección nosocomial y el origen urinario fueron factores de riesgo ^[95]. En otro estudio realizado solo en nuestro hospital durante algo más de 4 años encontramos el seguimiento del paciente en consultas externas previo al episodio bacteriémico, el catéter urinario y la exposición a fluorquinolonas y OIBL ^[195].

Se ha analizado la implicación de la producción de BLEE en el pronóstico en pacientes con bacteriemia por enterobacterias. En 2007 se publicó un meta-análisis en el que se evaluó el pronóstico de las bacteriemias por organismos productores de

BLEE en comparación con los no productores de BLEE [221]. La bacteriemia por enterobacterias productoras de BLEE se asoció con una mayor mortalidad (RR=1,85; IC 95%: 1,39-2,47); asimismo se relacionó la producción de BLEE con retraso en el inicio de la terapia adecuada (RR = 5,56; IC 95%: 2,95-10,51), aunque sólo un estudio de los 16 analizados realizó análisis multivariante dando como resultado que la producción de BLEE era una variable asociada de manera independiente con la mortalidad [222]. Recientemente, otro meta-análisis ha mostrado resultados similares [214].

En un amplio estudio multicéntrico europeo se evaluó el impacto pronóstico de resistencia a cefalosporinas de tercera generación en bacteriemias por *E. coli*, de forma que se realizó la comparación de dos cohortes de casos con bacteriemias por *E. coli*, una de ellas con dicha resistencia y otra no, con controles sin bacteriemia. Concluyeron que las bacteriemias por *E. coli* resistentes a cefalosporinas conllevan un aumento en la mortalidad y en la estancia en el hospital, con el consiguiente aumento de gastos [60].

En Roma, en un estudio de cohortes retrospectivo de bacteriemias por enterobacterias productoras de BLEE los predictores de mortalidad fueron el tratamiento empírico inadecuado y la bacteriemia de origen desconocido [236].

1.8.2. Tratamiento de las infecciones causadas por microorganismos productores de BLEE

Las opciones terapéuticas para tratar estas infecciones son muy limitadas puesto que se trata con frecuencia de bacterias multirresistentes. Por otra parte hay que tener en cuenta que las tasas de resistencia a los diferentes antimicrobianos varían entre países, entre ciudades e incluso entre hospitales, por lo que las guías de tratamiento empírico deben elaborarse en función de estas características para cada zona geográfica.

En la actualidad el CLSI y EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) recomiendan en sus guías que las cepas productoras de BLEE sean informadas tal como resulten tras aplicar los puntos de corte establecidos en sus guías, sensible o resistentes. Anteriormente se recomendaba informarlas siempre

como resistentes a los OIBL en el momento que se detectase una enzima de este tipo, independientemente de los valores de CMI in vitro hallados ^[51, 72].

Las cefamicinas presentan actividad in vitro frente a estos microorganismos, pero su uso como tratamiento en infecciones por éstos puede producir selección de mutantes con alteración en la expresión de proteínas de membrana externa. Esto conlleva una disminución de la permeabilidad celular, que dificulta el acceso de los betalactámicos a la membrana citoplásmica y, por tanto, provoca la resistencia a su acción. Además, el uso de cefamicinas también puede provocar la aparición de resistencia mediada por AmpC plasmídica ^[135, 136].

Los antimicrobianos que muestran más frecuentemente actividad in vitro frente a enterobacterias productoras de BLEE son las carbapenemas y algunas combinaciones de betalactámicos con inhibidores de betalactamasas (BLIBL), particularmente piperacilina-tazobactam ^[33, 95, 204, 212]. Las carbapenemas son consideradas los fármacos de elección en el medio hospitalario para infecciones graves por enterobacterias BLEE debido a su estabilidad y actividad frente a estas betalactamasas. En cualquier caso, se plantea un importante dilema para el clínico, que puede verse en la necesidad de utilizar carbapenemas (antimicrobianos de muy amplio espectro habitualmente reservados para infecciones nosocomiales causadas por microorganismos multirresistentes) para el tratamiento de sepsis comunitarias y nosocomiales en las que pueda estar implicado *E. coli*, ante la incertidumbre de que este pueda ser productor de BLEE, situación que conduciría a una sobreutilización de estos antimicrobianos con consecuencias imprevisibles, como está ocurriendo, puesto que se están hallando cepas resistentes a carbapenemas y cepas productoras de carbapenemasas.

Las combinaciones de BLIBL son activas frente a microorganismos productores de BLEE. Sin embargo en el caso de que además hiperproduzca una betalactamasa cromosómica (SHV-1) o exista la producción simultánea de más de una BLEE, hecho cada vez más frecuente, puede aparecer resistencia a estos antimicrobianos. Además, piperacilina-tazobactam presenta efecto inóculo, como ocurre con las cefalosporinas ^[217], lo que no ocurre con amoxicilina-clavulánico ^[128]. En un estudio reciente de Rodríguez-Baño y cols. obtuvieron datos que refuerzan la utilización de combinaciones de BLIBL en el tratamiento de infecciones por *E. coli* productora de BLEE ^[199]. En infecciones no complicadas del tracto urinario producidas por estos microorganismos puede utilizarse amoxicilina-clavulánico como tratamiento de segunda elección en cepas sensibles in vitro ^[167, 206].

Fosfomicina es adecuada frente a muchos de estos microorganismos y es útil para las cistitis por *E. coli* BLEE [206]. Su uso ha ido aumentando. Desde 2004 a 2008 aumentó el consumo de fosfomicina en un 50% y ha comenzado a apreciarse un incremento de resistencia en los microorganismos productores de BLEE. La resistencia pasó de 2,2 a 21,7% en un estudio realizado en Madrid, siendo la mayoría de las BLEE de tipo CTX-M-15 [162]. Lo mismo ocurrió en un estudio multicéntrico realizado en España en el que la resistencia aumentó de 4,4 a 11,4% en 4 años (2005-2009) [161]. No existe experiencia publicada en el tratamiento de bacteriemias.

En un alto porcentaje estos microorganismos productores de BLEE también presentan resistencia a las quinolonas y aminoglucósidos [18]. Tumbarello y cols. comprobaron que 8 de 16 pacientes con bacteriemia por enterobacterias productoras de BLEE tratados con ciprofloxacino fallecieron [236]. Las CMI a este antibiótico fueron entre 0,5 y 1 µg/mL, es decir, estaban en el límite de sensibilidad. Otra opción para el tratamiento empírico de la sepsis urinaria es el uso de un aminoglucósido, amikacina fundamentalmente, ya que es el más activo frente a estas bacterias. Aunque esta recomendación depende de los patrones locales de sensibilidad del organismo productor de BLEE, y hay que tener en cuenta que no se recomienda la terapia prolongada de aminoglucósidos para pacientes de edad avanzada.

2. OBJETIVOS

1. Conocer la incidencia de la bacteriemia por *E. coli* productor de BLEE de adquisición comunitaria y nosocomial.
2. Investigar los factores de riesgo para las bacteriemias por *E. coli* productor de BLEE de manera que ayuden a identificar, entre los pacientes con sepsis, aquellos en los que es necesario indicar un tratamiento empírico con actividad frente a estos microorganismos.
3. Describir las características microbiológicas, epidemiológicas y clínicas de estas bacteriemias.
4. Evaluar el pronóstico de las mismas, así como de los factores asociados al mismo, y específicamente, la influencia del tratamiento antimicrobiano.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Diseño del estudio

Para investigar la incidencia y las características clínicas y pronósticas de la bacteriemia por *E. coli* productor de BLEE, así como el pronóstico (objetivos 1, 3 y 4) se realizó un estudio de cohortes multicéntrico prospectivo. Para investigar los factores de riesgo para la bacteriemia por *E. coli* BLEE (objetivo 2) se diseñó un estudio de casos (formado por los pacientes de la cohorte anterior) y dobles controles.

3.1.1. Distribución geográfica, hospitales y poblaciones referencia

El estudio fue de ámbito nacional, coordinado por la Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), en el que participaron trece hospitales pertenecientes a dicha red y un centro asociado.

El estudio no pretendía ser representativo del territorio nacional. Los centros participantes se distribuían en 5 áreas geográficas de España: norte, sur, este, centro y noroeste; siendo la comunidad catalana la más representada con 6 hospitales seguida de Madrid y Andalucía con 2 hospitales cada una (Tabla 9). El conjunto de hospitales atendía a una población superior a 7 millones de habitantes (Tabla 13). El periodo de estudio fue desde el 14 de octubre de 2004 al 17 de enero de 2006 (15 meses).

Casi la totalidad de los hospitales eran de tipo universitario y todos tenían unidad de cuidados intensivos. El número de camas por hospital fue desde 282 hasta 1.702, siendo la media de 955 camas. No había equivalencia entre número de camas y población atendida, puesto que en algunas áreas sanitarias hay centros concertados de forma que no toda la población adjudicada a estos hospitales acude a ellos, pasando estos hospitales participantes a realizar funciones de centros de referencia.

Tabla 9. Nombre de los hospitales participantes, abreviaturas empleadas, ciudad y comunidad autónoma de ubicación de los mismos.

HOSPITAL	ABREVIATURA	CIUDAD	COMUNIDAD AUTÓNOMA
Hospital Universitario Virgen Macarena	HUV Macarena	Sevilla	Andalucía
Hospitales Universitarios Virgen del Rocío	HHUUV Rocío	Sevilla	Andalucía
Hospital Universitari de Bellvitge	HU Bellvitge	Barcelona	Cataluña
Corporació Sanitària Clínic	CS Clínic	Barcelona	Cataluña
Corporació Sanitària Parc Taulí	CS Parc Taulí	Sabadell	Cataluña
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau	HSC Sant Pau	Barcelona	Cataluña
Hospital Universitari Germans Trias i Pujol	HUG Trias i Pujol	Badalona	Cataluña
Hospital Universitari Vall d'Hebron	HUV Hebron	Barcelona	Cataluña
Hospital Universitario de la Ribera*	HU Ribera	Alzira	Comunidad Valenciana
Hospital Universitari Son Espases	HU Son Espases	Palma de Mallorca	Islas Baleares
Hospital General Universitario Gregorio Marañón	HGU Gregorio Marañón	Madrid	Madrid
Hospital Universitario Ramón y Cajal	HU Ramón y Cajal	Madrid	Madrid
Hospital Universitario Marqués de Valdecilla	HUM Valdecilla	Santander	Cantabria

* En el periodo de estudio no era Universitario.

La detección de los casos y controles fue realizada mediante la revisión diaria de los hemocultivos en los laboratorios de microbiología. A partir de un posible caso se procedía a su confirmación microbiológica mediante las técnicas utilizadas en cada laboratorio, una vez confirmado se procedía a su inclusión en el estudio si tras revisar su historia clínica cumplía los requisitos de la definición de caso.

Una vez incluido un caso en el estudio se procedía a seleccionar de forma aleatoria cuatro controles en base a los criterios que se especificarán a continuación.

Los pacientes caso fueron reclutados de forma prospectiva por la revisión diaria de los resultados del cultivo de sangre de los centros participantes.

Caso:

Criterios de inclusión de casos: pacientes adultos (14 años ó más) con bacteriemia documentada por *E. coli* productor de BLEE clínicamente significativa.

Criterios de exclusión de casos: edad menor de 14 años; bacteriemia causada por *E. coli* no productor de BLEE (ver en sección de estudios microbiológicos); bacteriemia no clínicamente significativa (aislamiento en hemocultivo del

microorganismo sin presencia de signos ó síntomas de infección sistémica); recidiva (episodio causado por la misma cepa de *E. coli* productor de BLEE en función del estudio de epidemiología molecular que ocurre antes de 60 días desde que se suspendió el tratamiento antimicrobiano del episodio inicial).

Estos casos además formaron la cohorte prospectiva de pacientes para contestar a los objetivos 1, 3 y 4.

Controles:

Para la elección de los controles, se consideraron dos poblaciones base de estudio, una de pacientes con hemocultivos realizados (del que se obtuvieron los controles A) y que se denominó "población sepsis", y otro de pacientes con bacteriemias por *E. coli* (del que se obtuvieron los controles B) (Figura 1).

Controles A (2 por caso):

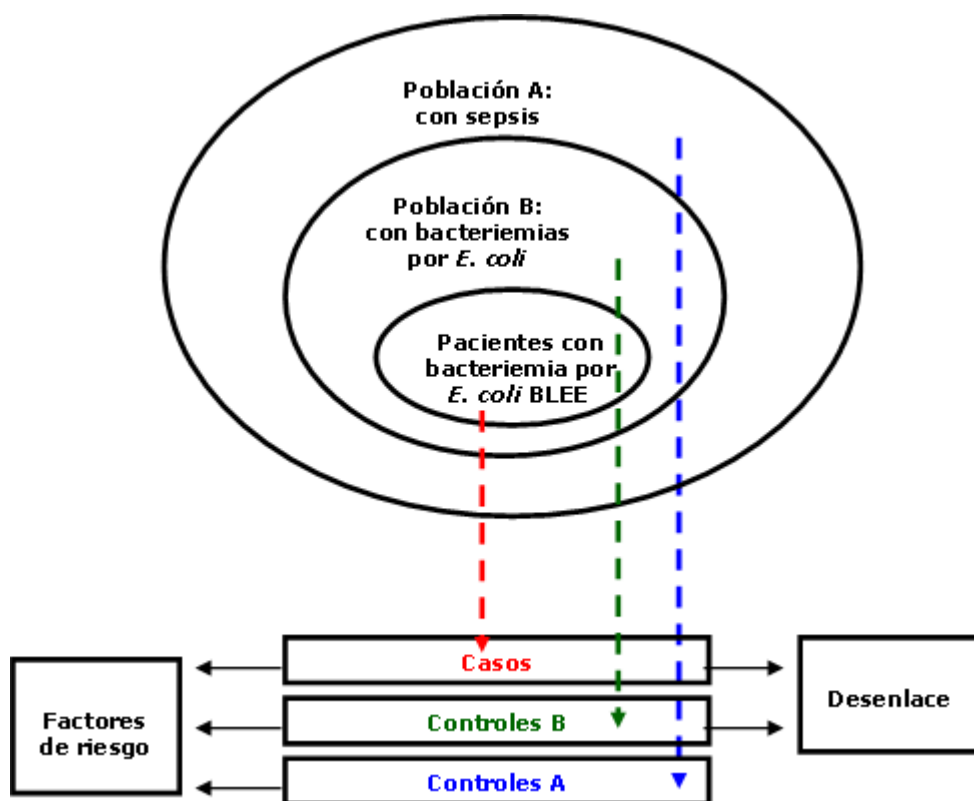
Pacientes de 14 ó más años, ingresados en el mismo tipo de servicio ó unidad asistencial que el caso correspondiente (Tabla 10), a los que se habían realizado hemocultivos por sospecha de sepsis (ver definiciones), en los cuales no se aisló *E. coli* productor de BLEE (podían ser positivos para otro microorganismo ó negativos).

Controles B (2 por caso):

Pacientes de 14 años ó más, ingresados en el mismo tipo de servicio ó unidad que el caso correspondiente, y con episodio de bacteriemia clínicamente significativa causado por *E. coli* no productor de BLEE. Para estos controles regían los mismos criterios de inclusión y exclusión que para los casos con la salvedad de la etiología de la bacteriemia.

Los pacientes control de ambas poblaciones fueron emparejados por frecuencia a los pacientes caso por hospital, tipo de servicio, adquisición (nosocomial ó comunitaria) y periodo de tiempo. Fueron seleccionados al azar de entre los pacientes elegibles por un método automatizado utilizando los números de registro de los cultivos de sangre en el laboratorio de microbiología de cada hospital participante.

Figura 1: Representación gráfica de la población base de estudio*.



*Extraído de: Jesús Rodríguez-Baño, Encarnación Picón, Paloma Gijón et al. Community-Onset Bacteremia Due to Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli*: Risk Factors and Prognosis. Clin Infect Dis 2010; 50; 40-48. ^[207]

Tabla 10: Áreas de los servicios hospitalarios para los casos nosocomiales.

TIPO DE SERVICIOS	ÁREAS
Médicos	Medicina Interna, Neurología, Nefrología, Gastroenterología, Neumología, Enfermedades Infecciosas, Oncología, Hematología, Reumatología, Alergología, Geriatria.
Quirúrgicos	Cirugía General y Digestiva, Neurocirugía, Oftalmología, Otorrinolaringología, Cirugía Maxilofacial, Dermatología, Cirugía Plástica, Unidades de quemados (salvo que se consideren como Intensivos), Cirugía de Tórax, Cirugía Cardíaca, Cirugía Vasculat, Traumatología.
Cuidados Intensivos	Unidades de Cuidados Intensivos generales, quirúrgicas, médicas, coronarias.

3.1.1.1. Incidencias de casos

Para el cálculo de incidencias y obtención de los denominadores de los mismos fue necesaria la recogida de datos globales de cada hospital. Estos datos fueron obtenidos a través de los servicios centrales de cada uno de los hospitales y registrados en un protocolo previamente definido (Anexo I).

Se realizaron los cálculos como sigue:

Incidencia de bacteriemias de presentación comunitaria por *E. coli*

BLEE se evaluó en base a las siguientes definiciones:

- (Nº de casos / Nº de pacientes atendidos en urgencias en el periodo estudiado) X 1.000
- (Nº de casos / Nº de bacteriemias de presentación comunitaria en el periodo estudiado) X 100
- (Nº de casos / Nº de casos de bacteriemias comunitarias por *E. coli* en el periodo estudiado) X 100

Incidencia de bacteriemias de presentación nosocomial por *E. coli*

BLEE se expresó como:

- (Nº de casos / Nº de ingresos en el periodo estudiado) X 100
- (Nº de casos / Nº de estancias en el periodo estudiado) X 1.000
- (Nº de casos / Nº de casos de bacteriemias nosocomiales por *E. coli* en el periodo estudiado) X 100

Incidencia poblacional: (Nº de casos totales / Nº población atendida) X 100.000 habitantes. Los datos se extrapolaron a un año.

Incidencia anual: (Nº de casos totales / año)

3.2. Protocolo de datos epidemiológicos. Definiciones y variables

3.2.1. Protocolo de datos epidemiológicos

Una vez seleccionados los casos y controles se procedió a cumplimentar un protocolo diseñado y estructurado previamente en el que quedaban recogidos los datos epidemiológicos (Anexo II). Datos como las características demográficas y factores predisponentes se obtuvieron por revisión de las historias clínicas y entrevistas a los pacientes o sus parientes cercanos. Los datos clínicos y pronósticos se recogieron prospectivamente. Los pacientes fueron seguidos durante 30 días o el fallecimiento, si éste ocurría antes.

Todos los protocolos una vez cumplimentados se trasladaron a una base de datos online de acceso restringido disponible sólo a los investigadores de cada centro del estudio, estando dicha base en la página web de la REIPI.

Una vez terminada la inclusión de datos en la base se procedió a su revisión por parte del hospital de referencia, realizándose las correcciones necesarias por los centros a los que les fue requerido.

3.2.2. Definiciones

- **Bacteriemia:** aislamiento del microorganismo en al menos una extracción sanguínea.
- **Bacteriemia clínicamente significativa:** bacteriemia que se produce en el contexto de síntomas y signos clínicos sugestivos de afectación sistémica ó síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (ver después).
- **Bacteriemia transitoria:** se considera como tal aquella bacteriemia cuya clínica desaparece de manera espontánea en menos de 12 horas.
- **Adquisición:** se utilizarán los criterios de Friedman ^[77]:
 - o *Bacteriemia de origen nosocomial:* aquella con hemocultivo positivo obtenido de un paciente que había sido hospitalizado durante 48 horas o más.

- *Bacteriemia de origen comunitario relacionado con los cuidados sanitarios:* aquella con un hemocultivo positivo obtenido de un paciente en el momento del ingreso en el hospital o dentro de las 48 horas del ingreso si el paciente cumple cualquiera de los siguientes criterios:
 - Recibió terapia intravenosa en el domicilio, recibió cuidado de las heridas o cuidados de enfermería especializada a través de agencia sanitaria, familia o amigos; o autoadministración de terapia médica intravenosa en los 30 días antes de la infección del torrente sanguíneo. Los pacientes cuyo tratamiento en el domicilio sólo fue el uso de oxígeno están excluidos.
 - Asistió a un hospital o clínica de hemodiálisis o recibió quimioterapia por vía intravenosa en los 30 días antes de la infección del torrente sanguíneo.
 - Fue hospitalizado en un hospital de cuidados intensivos durante 2 o más días en los 90 días antes de la infección del torrente sanguíneo.
 - Residía en un hogar de ancianos o centro de cuidados de larga duración.
- *Bacteriemia de origen estrictamente comunitario:* aquella con un hemocultivo positivo obtenido en el momento de la admisión en el hospital o dentro de las 48 horas del ingreso para los pacientes que no se ajustan a los criterios de bacteriemias relacionadas con los cuidados sanitarios.
- **Origen de la bacteriemia:** se utilizarán los criterios del CDC ^[81] para la localización de infecciones.

3.2.3. Variables

- **Demográficas:** edad en años, sexo.
- **Características intrínsecas:**
 - *Enfermedades de base:*
 - **Diabetes mellitus:** cuando conste en la historia, o cuando el paciente esté en tratamiento con antidiabéticos orales o insulina, o cuando se objetive glucemia igual o superior a 145 mg/dL en pacientes no

sometidos a fluidoterapia que pueda producir aumentos en las glucemias (en estos casos se consideran valores superiores a 200 mg/dL).

- **Enfermedad pulmonar crónica:** criterios clínicos de EPOC; enfermedad obstructiva, restrictiva o vascular pulmonar que induzca insuficiencia respiratoria que impida realizar tareas habituales, o datos analíticos de insuficiencia respiratoria; o hipertensión pulmonar (> 40 mmHg).
 - **Hepatopatía crónica:** con síntomas o signos de insuficiencia hepática crónica (encefalopatía, ascitis, hipertensión portal, hiperesplenismo).
 - **Insuficiencia renal:** con valores de creatinina superiores a 2,5 mg/dL en la analítica más reciente, o aclaramiento < a 50 mL/min.
 - **Insuficiencia cardíaca congestiva:** grados III y IV de la NYHA (New York Heart Association).
 - **Enfermedad neurológica discapacitante:** la que produce imposibilidad para la deambulación independiente.
 - **Neoplasia maligna sólida ó hematológica:** diagnóstico en los últimos 5 años.
 - **Inmunodeficiencia:** cuando haya sido diagnosticado de inmunodeficiencia primaria o secundaria. Entre otros, se incluirán leucemias linfáticas agudas y crónicas, linfoma Hodgkin y no Hodgkin, SIDA y pacientes con infección VIH con CD4 menor de 200.
 - **Úlcera crónica:** úlcera de más de 1 mes de evolución a pesar de tratamiento.
 - **Uropatía obstructiva:** Enfermedad urológica obstructiva: enfermedad del tracto urinario en el que existe obstrucción del mismo de manera que requiere de alguna medida terapéutica para evitarla o aliviarla: litiasis, malformación, neoplasia renal/vejiga/próstata, otras.
 - **Infecciones urinarias de repetición** (más de 2 en 6 meses).
 - **Enfermedad biliar:** obstrucción biliar benigna/maligna, otras.
 - **Patología intestinal crónica:** enfermedad inflamatoria, otras.
- Gravedad de la enfermedad de base
- **Índice de Charlson** ^[47] Ver Anexo V.
 - **Mc Cabe** ^[138]
 - Enfermedad de base no fatal: no enfermedad de base, ó de la que no se espera la muerte en al menos 5 años.

- Enfermedad de base últimamente fatal: es esperable la muerte como consecuencia de la enfermedad de base en menos de 5 años.
 - Enfermedad de base rápidamente fatal: es esperable la muerte como consecuencia de la enfermedad de base en los próximos 3 meses.
 - **Pacientes de UCI:** Índice APACHE II al ingreso ^[112] (Anexo IV).
- **Características extrínsecas (previas al día de referencia ó día de la bacteriemia en los casos y controles B, y al día de realización de hemocultivos por sospecha de sepsis en los controles A).**
- **Presencia ó ausencia y días** de catéteres venosos (centrales, reservorios, tunelizados, periféricos) el día de referencia; sonda urinaria vesical o uretral (permanente, transitoria), de nefrostomía ó nasogástrica durante la semana previa al día de referencia; cirugía mayor en el último mes, y tipo; uso de antimicrobianos durante el ingreso para los casos nosocomiales y durante los 2 meses previos al ingreso en los comunitarios (antimicrobiano, días y vía); necesidad de uso de más de 2 ciclos de antimicrobiano en el último año; uso de inmunosupresores (incluyendo prednisona, > 10 mg/d o equivalente durante más de 3 semanas) ó quimioterapia antineoplásica en el último mes; neutropenia (menos de 500 leucocitos polimorfonucleares/mm³) y úlcera de presión u otro tipo de úlcera crónica en el día de referencia.
 - **Índice APACHE II** en pacientes de UCI ^[112] (Anexo IV).
 - **Score de Pitt** ^[172] (Anexo VI): recogido en el día de referencia ó en las 48 horas previas; recoger la puntuación más alta durante ese periodo.
 - Fiebre: $\leq 35^{\circ}\text{C}$ ó ≥ 40 (2 puntos); 35,1 – 36 ó 39 – 39,3 (1 punto); 36,1 – 38,9 (0 puntos).
 - Hipotensión: disminución aguda de TAs > 30 mmHg ó TAd > 20, ó necesidad de tratamiento vasopresor, ó Tas > 90 mmHg (2 puntos).
 - Ventilación mecánica (2 puntos).
 - Fallo cardiaco (4 puntos).
 - Estado mental: alerta (0 puntos), desorientado (1 punto), estuporoso (2 puntos), comatoso (4 puntos).
 - **Repercusión sistémica** ^[6]:
 - **Sepsis:** presencia de al menos dos de los siguientes factores:
 - Fiebre ($T^a \geq 38^{\circ}\text{C}$) ó hipotermia ($\leq 36^{\circ}\text{C}$).
 - Taquicardia > 90 spm.

- Taquipnea > 20 respiraciones por minuto ó Pa CO₂ < 32 mmHg.
- Leucocitosis (> 12.000/mm³) o leucopenia (< 4.000/mm³).
- **Sepsis grave:** presencia (además) de hipotensión o hipoperfusión que cede con aporte de fluidos.
- **Shock séptico:** hipotensión ó hipoperfusión que no cede con aporte de fluidos y que precisa de la administración de aminas vasoactivas (dopamina, etc).
- **Síndrome de disfunción multiorgánica:** función alterada de 3 ó más órganos durante un periodo de al menos 24 horas como consecuencia de la infección.
- **Insuficiencia renal aguda:** en pacientes con función renal previa normal, creatinina sérica > 2 mg/dL ó disminución del aclaramiento de creatinina en > 50%.
- **Tratamiento empírico:** el que se indica antes de conocer la sensibilidad del microorganismo causante.
- **Tratamiento dirigido:** el que se indica una vez conocida la sensibilidad del microorganismo causante.
- **Tratamiento antimicrobiano adecuado o "no inapropiado":** cuando se utiliza un antimicrobiano frente al que el microorganismo aislado presenta una CMI de sensibilidad o intermedia in vitro durante al menos 24 horas, a dosis habituales.
- **Variables resultado del pronóstico:**
 - **Mortalidad cruda:** muerte por cualquier causa a los 14 y 30 días.
 - **Mortalidad relacionada con la infección:** cuando se produce en presencia de signos y síntomas de infección sistémica, en ausencia de otra explicación.
 - **Estancia hospitalaria:** días de estancia desde el día de referencia (solo evaluable en pacientes supervivientes).
- **Variables del tratamiento antimicrobiano.**
 - **Antibioterapia previa (2 meses)**

En el protocolo se pudieron reflejar hasta 4 antibióticos diferentes de un grupo de 67 incluidos en el protocolo online (Anexo VII), además de la vía empleada y los días de duración del tratamiento.

Los 67 antimicrobianos fueron englobados en 17 grupos para su análisis, siendo éstos:

- Penicilinas: ampicilina, amoxicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, cloxacilina, penicilina y ampicilina-sulbactam.
- Cefalosporinas de 1ª generación: cefazolina, cefadroxilo y cefalotina.
- Cefalosporinas de 2ª generación: cefuroxima y acetil cefuroxima.
- Cefalosporinas de 3ª generación grupo A: cefotaxima y ceftriaxona.
- Cefalosporinas de 3ª generación grupo B: ceftazidima.
- Cefalosporinas de 4ª generación: cefepima.
- Cefoxitina.
- Aztreonam.
- Carbapenemas: imipinem-cilastatina, ertapenem y carbapenem.
- Piperacilina-tazobactam.
- Aminoglucósidos: amikacina, gentamicina y tobramicina.
- Fluorquinolonas: ofloxacino, norfloxacino, moxifloxacino, enoxacino, clinafloxacino, ciprofloxacino y levofloxacino.
- Cotrimoxazol.
- Fosfomicina.
- Metronidazol.
- Glicopéptidos: vancomicina y teicoplanina.
- Otros: resto de antibióticos incluidos en el protocolo online.

o **Tratamiento antimicrobiano empírico y dirigido**

Fueron recogidos hasta un máximo de dos antimicrobianos (Anexo VII) del tratamiento antimicrobiano empírico (antes de conocer la sensibilidad a antimicrobianos) y tratamiento antimicrobiano dirigido (después de conocerla) administrado a los pacientes casos y a los controles B durante el estudio. Se anotaron las dosis empleadas, en mg/día, las vías de administración de dichos antimicrobianos y si era tratamiento inapropiado desde el punto de vista microbiológico.

3.3. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa SPSS versión 12.0.

3.3.1. Tamaño muestral

Inicialmente se planificó obtener un tamaño muestral suficiente para realizar análisis independiente de factores de riesgo de los episodios nosocomiales y de los comunitarios. Para un error alfa del 5% y beta del 20%, estimando una diferencia del 25% entre casos y controles en la exposición a factores de riesgo clave, se necesitarían unos 62 casos comunitarios y otros tantos nosocomiales. Dicha estimación parecía correcta en base a los resultados preliminares de un estudio piloto realizado en el centro de referencia y del estudio de Ho y cols. ^[95]

En base a la incidencia previa comunicada por los centros participantes, se calculó un periodo de tiempo necesario de inclusión de casos de dos años. Debido al aumento de incidencia de este tipo de infecciones en un tiempo inferior al esperado se obtuvo un tamaño muestral muy superior al calculado.

3.3.2. Análisis de factores de riesgo

Para realizar el análisis de factores de riesgo en este tipo de infecciones se realizó la comparación de la frecuencia de exposición de casos y cada grupo de controles a las variables de interés.

Las variables dicotómicas se compararon mediante el test de Chi cuadrado (o de Fisher si era adecuado) y las policotómicas mediante regresión logística; se calcularon las Odds Ratio (OR) con sus intervalos de confianza (IC) del 95%. Las variables continuas se compararon con la T de Student o mediante el test U de Mann-Whitney cuando era necesario por no cumplir con los criterios de normalidad. Se realizaron análisis multivariante de los factores de riesgo mediante regresión logística, considerando interacciones.

Las variables se seleccionaron para su inclusión en los modelos si mostraron asociación en el análisis univariante o si tenían sentido biológico. Las variables introducidas se seleccionaron mediante un modelo "hacia atrás".

3.3.3. Análisis pronóstico

Entre la cohorte de casos de bacteriemia por *E. coli* productor de BLEE se calculó el riesgo relativo (y su IC al 95%) de mortalidad en función de la exposición a las distintas variables de interés pronóstico, y específicamente, al tratamiento antimicrobiano recibido.

Se analizaron independientemente los casos comunitarios y los nosocomiales. Se calcularon los riesgos relativos (RR) y sus IC de 95%. Las técnicas estadísticas fueron iguales a las comentadas previamente.

Se realizó un estudio multivariante de las variables asociadas a mortalidad y curación, considerando interacciones, mediante regresión logística.

Asimismo, se comparó el pronóstico de los casos y los controles B mediante análisis multivariante, considerando en los modelos las variables de interés pronóstico necesarias.

3.4. Aspectos éticos

El diseño del estudio fue puramente observacional, no existió intervención alguna por parte de los investigadores. Fue aprobado por el Comité Ético del centro coordinador y por los Comités de Ética de los hospitales participantes.

Aquellos hospitales cuyos comités éticos lo exigieron incluyeron un consentimiento informado en el estudio (Anexo III).

3.5. Aislamiento e identificación bacteriana

3.5.1. Medios de cultivo y reactivos

- Agar MacConkey (Oxoid, Reino Unido)
- Agar Sangre (AS, bioMérieux, Francia)
- Agar Mueller-Hinton (MHA, Difco, EE.UU.) con Ampicilina 100 mg/L (AMP, Sigma-Aldrich, España)
- Solución salina fisiológica (agua con 0,9 g/L ClNa)
- Galería API20E (bioMérieux)
- Caldo de tripticasa soja (TSB, Difco)
- Glicerol (Difco)

3.5.2. Procedimiento

Durante un periodo de 15 meses, desde el 14 de octubre de 2004 a 17 de enero de 2006, fueron incluidos todos los aislados clínicos de *E. coli* productores de BLEE procedentes de los laboratorios de Microbiología de 13 hospitales españoles de diferentes zonas geográficas que produjeron una bacteriemia clínicamente significativa.

Como criterio de selección se tomó la CMI de dichos aislamientos a diferentes antimicrobianos, siendo seleccionados aquellos cuyas CMIs fueran iguales o superiores a 2 µg/mL de al menos uno de los betalactámicos siguientes: ceftazidima, cefotaxima, cefepima y aztreonam; excluyéndose aquellos obtenidos del mismo paciente y misma muestra cuando el antibiograma de rutina no evidenciara diferencias de más de dos diluciones en las CMIs de los distintos grupos de antimicrobianos.

En aquellos centros en los que la técnica utilizada era la difusión en disco para el estudio de sensibilidad, se seleccionaron aquellos aislamientos en los que se observó sinergia entre amoxicilina-clavulánico y alguna cefalosporina de 3ª o 4ª generación o aztreonam. Se descartaron los aislamientos de *E. coli* con CMI de

cefexitina superior a 16 µg/mL o diámetro de halo inferior a 15 mm, debido a la alta probabilidad de producción de betalactamasa AmpC y no de BLEE. Asimismo, la identificación de los microorganismos fue realizada en primera instancia según la metodología de cada laboratorio. Todos los aislados se conservaron a -30 °C hasta su envío al laboratorio de referencia.

En el centro de referencia fueron estudiados todos los aislamientos de *E. coli* procedentes de hemocultivos de los casos incluidos seleccionando sólo un aislamiento por paciente, debiendo ser el primero que se obtuvo.

A continuación se procedió a su aislamiento y comprobación de pureza utilizando para ello diferentes medios de cultivo y se continuó con la confirmación de su identificación mediante el sistema API20E. Posteriormente se procedió a su congelación en viales de TSB-Glicerol al 10% a - 80 °C hasta su procesamiento.

3.6. Confirmación de producción de BLEE

3.6.1. Material

- Discos antimicrobianos (Becton Dickinson, EE.UU.) :
 - Cefotaxima, 30 µg
 - Cefotaxima, 30 µg
 - Cefotaxima 30 µg + Ácido clavulánico 10 µg
 - Cefotaxima 30 µg + Ácido clavulánico 10 µg
- Agar Mueller-Hinton con Ampicilina 100 mg/L (AMP, Sigma-Aldrich).

3.6.2. Procedimiento

La producción de BLEE se confirmó en el centro de referencia mediante la técnica de difusión en disco siguiendo las normas del NCCLS ^[153, 154] (actualmente CLSI) usando placas de agar de Mueller-Hinton y discos conteniendo 30 µg de

cefotaxima o ceftazidima, con y sin ácido clavulánico, siguiendo las instrucciones del 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 del 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).

3.7. Estudio de relación clonal

3.7.1. REP PCR

3.7.1.1. Material

- **Reactivos:**
 - Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs, Invitrogen, Francia)
 - Tampón de PCR (Invitrogen)
 - Cloruro magnésico ($MgCl_2$, Invitrogen)
 - Taq ADN polimerasa (Invitrogen)
 - Cebadores (TIB MOLBIOL Syntheselabor GMBH, Francia)
 - REP-1: III GCG CCG ICA TCA GGC
 - REP-2: ACG TCT TAT CAG GCC TAC
 - Agua destilada (Braun Medical, España)
 - Solución TBE (10x) para 1L:
 - 55 g Ácido bórico
 - 180 g Trizma base
 - 40 mL EDTA 0,5 M pH=8
 - Marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Invitrogen)

- Agarosa Grade Molecular Biology (Promega, España)
- Bromuro de etidio (Sigma-Aldrich)
- Azul de bromofenol (Amersham Pharmacia Biotech, España)

- **Equipos:**
 - Microcentrífuga Biofuge fresco (Heraeus, Alemania)
 - Cabina de seguridad BIO-II-A (Telstar, España)
 - Termociclador Gene Cyclor (Bio-Rad, España)
 - Cubetas de electroforesis Sub-Cell GT (Bio-Rad)
 - Fuente de alimentación modelo 1000/500 (Bio-Rad)
 - Cámara de fotos digital Kodak DC290 (Eastman Kodak, EE.UU.)
 - Sistema de análisis digital de imágenes Kodak 1D EDAS 290 (Eastman Kodak)

3.7.1.2. Procedimiento

El estudio de la relación clonal de los aislados se realizó en primer lugar por la distribución de secuencias repetitivas de ADN, mediante el análisis de los elementos palindrómicos repetitivos extragénicos (REP-PCR). Este análisis consiste en la amplificación mediante una PCR utilizando unos iniciadores diseñados para hibridar con dichas secuencias repetidas intercaladas en el genoma, de forma que se obtienen patrones de amplificación de diferentes fragmentos de ADN que permiten establecer una relación clonal entre las distintas cepas.

El ADN bacteriano se extrajo a partir de un cultivo fresco de microorganismo en MHA + AMP, varias colonias se resuspendieron en 2 mL de agua destilada estéril hasta alcanzar una densidad óptica de 2 a 620 nm. Una vez se obtuvo la muestra se calentó a 100 °C durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugó esta suspensión durante 1 min a 13.000 rpm, del sobrenadante se hizo una dilución al 1:10 en agua destilada estéril siendo esta nueva suspensión la utilizada para la amplificación. Se mezclaron 23,5 µL de extracto de ADN, 26,5 µL de una mezcla maestra que contenía: tampón para Taq polimerasa, MgCl₂ 3 mM, desoxinucleótidos trifosfato 400 µM, iniciadores REP-1 y REP-2 a 1 µM y, 0,5 µL de Taq polimerasa (2,5 U). Esta mezcla se amplificó con el siguiente programa: 1 paso inicial de activación de la Taq de 3 min a

94 °C seguido de 30 ciclos que incluían los pasos: 1 min a 94 °C de desnaturalización del ADN, 1 min a 40 °C de hibridación y 8 min a 65 °C de extensión; finalizando con una extensión final de 16 min a 65 °C.

El producto de la PCR (15 µL) se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% usando como tampón TBE 0,5X durante 5 h a 90 V. Posteriormente se realizó un baño del gel en 500 mL de agua destilada con bromuro de etidio a 0,50 µg/mL y posterior enjuague.

Se utilizó el sistema de análisis digital de imágenes Kodak 1D EDAS 290 (Eastman Kodak) para comparar los distintos patrones de REP-PCR obtenidos. Se consideraron patrones idénticos de REP-PCR y, por tanto, cepas pertenecientes al mismo clon, aquellos que presentaban el mismo número de bandas y en la misma localización.

Fueron consideradas cepas relacionadas clonalmente aquellas que tuvieran una o dos bandas de diferencia en su patrón, los aislamientos con más de dos bandas de diferencia en los patrones de REP-PCR fueron considerados no relacionados clonalmente; según los criterios de Bou y cols. ^[33]

3.7.2. PFGE

3.7.2.1. Material

1. 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

2. 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 1D EDAS 290 (Eastman Kodak)

3.7.2.2. Procedimiento

A aquellos aislados que mediante REP-PCR estaban clonalmente relacionados se les realizó el estudio de clonalidad mediante la electroforesis en campo pulsante (PFGE) para su confirmación, ya que esta técnica posee mayor capacidad de discriminación.

A partir de un cultivo fresco se tomó un asa de crecimiento y se suspendió en 500 μ L de PIV, tras una centrifugación a 13.000 rpm durante 1 min y eliminación del sobrenadante se añadió 200 μ L del mismo reactivo a la suspensión hasta conseguir una suspensión de 0,9-1 de densidad óptica a 620 nm de radiación. A 100 μ L de esta suspensión se añadió 100 μ L 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 μ L y 5 μ L por mililitro de reacción, utilizando 500 μ L/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 μ L 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 μ L/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 T^a 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 μ L de buffer H al 1x y 40 U de enzima XbaI 10 U/ μ L, 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 *Staphylococcus aureus* de igual forma pero con la enzima SmaI y buffer A. La escalera comercial usada fue en forma de bloque, se tomaron 500 µL de buffer TBE 0,5X 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. ^[230] considerando 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. Caracterización de BLEE

Para caracterizar las BLEE se procedió a realizar: conjugación, microdilución en placa, isoelectroenfoque, PCR y secuenciación.

3.8.1. Conjugación

3.8.1.1. Material

- Agar sangre (AS, bioMérieux)
- Caldo Mueller-Hinton (MHB, Difco)
- Agar MacConkey (Oxoid)
- Agar Mueller-Hinton (MHA, Difco)
- Caldo tripticasa-soja con 10% de glicerol (TSB, Difco)
- Caldo nutritivo LB: (CINa, Panreac; Bacto Triptosa, Difco; Extracto de levadura, Difco).
- Caldo A: sulfato amónico (1 g/L), fosfato monopotásico (4,5 g/L), fosfato dipotásico (13,1 g/L) y citrato sódico (0,5 g/L).
- Medio deficiente en prolina y metionina (Medio Pro-Met-) formado por: Caldo A al 1x (1 L) más 1 mL de sulfato magnésico heptahidratado a 1 M, 10 mL de glucosa al 20 % y 15 g de agar.
- Azida sódica (AZ, Sigma-Aldrich)
- Rifampicina (RIF, Sigma-Aldrich)
- Cefotaxima (CTX, Sigma-Aldrich)
- Ceftazidima (CAZ, Sigma-Aldrich)
- Agar Mueller-Hinton + Azida o Rifampicina
- Medio de cultivo sin Prolina ni Metionina (Medio Pro-Met-)

CEPAS BACTERIANAS RECEPTORAS

- *Escherichia coli* J53 resistente a azida
- *Escherichia coli* J53 resistente a rifampicina

3.8.1.2. Procedimiento

Realizamos la técnica de conjugación con cada una de las cepas con el fin de obtener transconjugantes, para demostrar la transferencia de plásmidos en los que se encontraban los genes *bla* de las cepas clínicas a la cepa receptora. Se confirmó la presencia de BLEE en los transconjugantes obtenidos mediante la técnica de difusión en placa. Posteriormente, los transconjugantes junto con las cepas originales se estudiaron para ver si los patrones de sensibilidad a antimicrobianos coincidían, y confirmar que dichos genes *bla* se encontraban en plásmidos y se habían transferido de forma horizontal de las cepas originales (donadoras, *E. coli* BLEE) a las transconjugantes (receptoras, *E. coli* J53) y presentaban los mismos perfiles de sensibilidad así como CMI's similares.

A partir de un cultivo de 18 h se procedió a inocular en 4 mL de medio líquido LB, por separado el aislado a estudiar y la cepa receptora *E. coli* J53 resistente a azida, e incubarlos a 37 °C en agitación durante 18 h. A continuación se tomaron 0,5 mL de cada caldo de cultivo de aislado (célula donadora) y 0,5 mL de la bacteria receptora, transfiriéndolos a 4 mL de LB. Tras un periodo de incubación de 18 h, a 37 °C en reposo e inclinación para facilitar un mayor contacto entre las células y asimismo el proceso de la conjugación, se tomaron 100 µL y se sembraron en una placa de MHA conteniendo 200 mg/L de azida y 2 mg/L de cefotaxima o de ceftazidima, dependiendo de si la cepa originariamente era resistente a cefotaxima o ceftazidima respectivamente. Realizamos la misma operación para una dilución 1/100 del caldo cultivado.

Tras un periodo de incubación de 24 h a 37 °C en el caso de existir colonias de crecimiento se tomó una y se sembró en una placa de MHA conteniendo azida a 200 mg/L, para facilitar que sólo creciera la cepa receptora en el caso de existir cepas donadoras mezcladas. Igualmente se sembró en placa de medio Pro-Met-, en este medio no puede crecer *E. coli* J53 resistente a azida, siendo por tanto útil para saber si las colonias que crecieron de la mezcla de conjugación en las placas con azida-cefotaxima o azida-ceftazidima eran en principio la cepa receptora con el plásmido que le permitió crecer con la cefalosporina (cepa transconjugante). En el caso de sí crecer en medio Pro-Met-, se trataba de la cepa donante (cepa original) y por tanto no fue válido el proceso de conjugación.

A las cepas consideradas transconjugantes se procedió a realizar la detección y confirmación de BLEE, técnica ya explicada anteriormente. En el caso de ser

positiva, se trataba de una transconjugante del aislado clínico, es decir, una cepa de *E. coli* J53 resistente a azida y cefotaxima o ceftazidima, según fuera la cepa original donante, gracias a haber recibido un plásmido de la cepa caso conteniendo el gen *bla* que le confería la multirresistencia; se procedió a su conservación en TSB con glicerol al 10% a -80 °C.

3.8.2. Determinación de sensibilidad a antimicrobianos

3.8.2.1. Material

ANTIMICROBIANOS

- **Betalactámicos:**
 - Amoxicilina (AMX, Sigma-Aldrich)
 - Cefepima (FEP, Sigma-Aldrich)
 - Cefotaxima (CTX, Sigma-Aldrich)
 - Ceftazidima (CAZ, Sigma-Aldrich)
 - Cefuroxima (CXM, Sigma-Aldrich)
 - Ertapenem (ERT, Merck, Alemania)
 - Imipenem (IMP, Merck)
 - Meropenem (MPM, Astra Zeneca, España)
 - Piperacilina (PIP, Sigma-Aldrich)
 - Ticarcilina (TIC, Sigma-Aldrich)
 - Ácido clavulánico [CL, Glaxo-SmithKline (GSK), Reino Unido]
 - Tazobactam (TZ, Sigma-Aldrich)
- **Aminoglucósidos:**
 - Amikacina (AMK, Sigma-Aldrich)
 - Gentamicina (GEN, Sigma-Aldrich)
 - Tobramicina (TOB, Sigma-Aldrich)
- **Quinolonas:**
 - Ciprofloxacino (CIP, BAYER, Alemania)
 - Ácido nalidíxico (NAL, Sigma-Aldrich)

- **Otros:**
 - Sulfametoxazol (SX, Sigma-Aldrich)
 - Trimetoprim (T, Sigma-Aldrich)
 - Fosfomicina (FOS, Sigma-Aldrich)
 - Tigeciclina (TGC, Wyeth, EE.UU.)

CEPAS BACTERIANAS CONTROL

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Escherichia coli* ATCC 35218
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

OTROS

- Placas de microdilución (Francisco Soria Melguizo S.A., España)
- Caldo Mueller-Hinton con cationes ajustados (CAMHB)

3.8.2.2. Procedimiento

Se determinó la sensibilidad de las cepas productoras de BLEE a los antimicrobianos indicados anteriormente con los siguientes rangos de concentración:

- Ceftazidima y cefuroxima: 1 - 128 µg/mL
- Cefotaxima: 2 - 256 µg/mL
- Cefepime: 0,5 - 64 µg/mL
- Ciprofloxacino, amikacina, gentamicina, tobramicina y tigeciclina: 0,06 - 128 µg/mL
- Amoxicilina-clavulánico: 0,25 - 512 µg/mL (en proporción 2:1)
- Ticarcilina-clavulánico: 0,5 - 1.024 µg/mL (concentración fija de clavulánico: 2 µg/mL)
- Meropenem, imipenem y ertapenem: 0,008 - 16 µg/mL
- Piperacilina-tazobactam: 0,5 - 1.024 µg/mL (concentración fija de tazobactam: 4 µg/mL)
- Trimetoprim/sulfametoxazol: 4,75/0,25 - 608/512 µg/mL (en proporción 19:1)

- Ácido nalidíxico: 0,5 – 1.024 µg/mL
- Fosfomicina: 8 – 1.024 µg/mL

Todos los antimicrobianos fueron suministrados por sus fabricantes en forma de polvo valorado, para su preparación se utilizaron los solventes y diluyentes recomendados por el CLSI ^[153, 154]. Para tigeciclina se siguieron las guías de 2006 del EUCAST ^[73].

Se determinó la CMI a cada antimicrobiano mediante el método de microdilución en caldo Mueller-Hinton con cationes ajustados siguiendo las recomendaciones del CLSI. Se emplearon placas de microdilución de poliestireno con 96 pocillos y fondo en U. El inóculo de microorganismo (1×10^5 UFC/mL) se preparó a partir de un cultivo fresco en medio MHA + ampicilina. Las placas de microdilución se incubaron a 35 °C durante 18-20 h en condiciones aerobias. La CMI considerada fue la concentración más baja de antimicrobiano que inhibió totalmente, a simple vista, el crecimiento bacteriano. Para la definición de las categorías clínicas de sensibilidad o resistencia se utilizaron los puntos de corte recomendados por el CLSI y EUCAST para tigeciclina.

Como control se utilizaron varias cepas: *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 para la combinación de antimicrobianos.

3.8.3. Isoelectroenfoque (IEF)

3.8.3.1. Material

- **Reactivos:**
 - Geles de poliacrilamida al 5% PhastGel IEF 3-9 (Pharmacia Biosciences, Suecia)
 - Nitrocefina (Oxoid)
- **Equipos:**
 - Centrífuga Varifuge 3.0R (Heraeus)
 - Microcentrífuga Thermo Scientific Fresco 17 (Heraeus)

- Sonicador Vibracell (Sonics & Materials, EE.UU.)
- Sistema para isoelectroenfoque PhastSystem (Amersham Pharmacia Biotech)
- Aplicadores de muestra 8/1 (Amersham Biosciences, Suecia)

3.8.3.2. Procedimiento

Se inició el proceso de caracterización de la enzimas BLEE en las cepas originales y en sus transconjugantes mediante la técnica de isoelectroenfoque (IEF) a partir de extractos crudos, utilizando el sistema PhastSystem con geles de acrilamida al 5% PhastGel IEF 3 - 9.

A partir de un crecimiento nuevo en placa se inocularon tubos con MHB y se dejaron crecer durante 18 h a 37 °C en agitación, a continuación se tomó 1 mL del mismo y se inoculó otro tubo conteniendo MHB + Ampicilina (100 mg/L). Tras un periodo de incubación de 4 h a 37 °C en agitación, se centrifugó a 4.000 rpm durante 20 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se añadió agua destilada fría, se volvió a centrifugar a 4.000 rpm 10 min a 4 °C. Se resuspendió en agua de nuevo y se congeló durante 15 min a -20 °C, descongelándose posteriormente durante el mismo tiempo. Se volvió a realizar el mismo proceso 10 veces, de esta forma las bacterias se rompieron quedando liberadas las betalactamasas en la suspensión, según se comprobó mediante revelado con nitrocefina. Aquellos extractos que no presentaron reacción de actividad, es decir, que la cefalosporina cromógena (nitrocefina) de color amarillo no pasó a color rojo antes de 1 min de estar en contacto con el extracto debido a su hidrólisis, se procedió a sonicarlos durante 30 segundos dos veces.

Se utilizaron como patrones cepas cuyos pIs eran perfectamente conocidos, para su preparación se realizó el mismo proceso de extracción de betalactamasas que a las cepas de estudio. A continuación se separaron las betalactamasas del resto de los componentes celulares mediante centrifugación a 13.000 rpm durante 45 min a 4 °C y se mezclaron los sobrenadantes correspondientes de diferentes patrones y se conservaron a -20 °C.

El proceso de IEF al que fueron sometidos los extractos enzimáticos crudos (2 µL) se componía de los siguientes pasos:

- Preenfoque a 15 °C, en este paso se forma el gradiente de pH durante 75 Vh con un voltaje de 2.000 V.

- Aplicación de la muestra sobre el gel a un voltaje de 200 V.

- Enfoque, en el que las proteínas migran a su pI durante 500 Vh a un voltaje de 2.000 V.

Una vez terminado el IEF se cubrieron los geles con 100 µL de solución de nitrocefina (500 µg/mL) durante 2-3 min. Las bandas correspondientes a betalactamasas aparecieron de color rojo debido a la hidrólisis de la nitrocefina. El tipo de betalactamasa se determinó mediante el pI, tomando como referencia los pIs de enzimas conocidas utilizadas como patrones: TEM-1 (5,4), TEM-10 (5,6), TEM-4 (5,9), TEM-24 (6,5), SHV-2 (7,6), CTX-M-9 (8,0) y SHV-5 (8,2); colocadas en el gel en el mismo momento que las muestras.

Una vez obtenidos los perfiles de betalactamasas en función de los pIs, éstos fueron utilizados para orientar y continuar con el proceso siguiente, la amplificación mediante PCR.

3.8.4. PCR

3.8.4.1. Material

- **Material de PCR:**
 - Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs, Invitrogen)
 - Tampón de PCR (Invitrogen)
 - Cloruro magnésico (MgCl₂, Invitrogen)
 - Taq ADN polimerasa (Invitrogen)
 - Agua destilada (Braun Medical)
 - Marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Invitrogen)
 - Agarosa Grade Molecular Biology (Promega)
 - Bromuro de etidio (Sigma-Aldrich)
 - 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 ^[190]
- TEM-R: 5´ - CTG ACA GTT ACC AAT GCT TA ^[190]
- SHV-F: 5´ - GGG TTA TTC TTA TTT GTC GC ^[190]
- SHV-F2: 5´ - GGT TAT GCG TTA TAT TCG CC ^[190]
- SHV-R: 5´ - TTA GCG TTG CCA GTG CTC ^[190]
- CTX-M-1-F: 5´ - ATG GCG ACG GCA ACC GTC A ^[43]
- CTX-M-1-R: 5´ - CAA ACC GTT GGT GAC GAT TTT A ^[43]
- CTX-M-9-F: 5´ - GTG ACA AAG AGA GTG CAA CGG ^[215]
- CTX-M-9-R: 5´ - ATG ATT CTC GCC GCT GAA GCC ^[215]
- CTX-M-1-F2: 5´ - GCG GCC GCG CTA CAG TAC
- CTX-M-1-R2: 5´ - CAT TCC GTT TCC GCT ATT AC
- CTX-M-1-I2: 5´ - GAC TAT TCA TGT TGT GT

3.8.4.2. Procedimiento

En base a los pIs obtenidos por la técnica de IE se realizó la detección de las betalactamasas 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 µL de agua destilada estéril, con posterior tratamiento de calor a 100 °C durante 10 min. Tras centrifugación a 13.000 rpm durante 1 min se tomaron 2 µL del sobrenadante y se añadieron a una mezcla de 48 µL que contenía: tampón de PCR 1X, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, cada uno de los cebadores a 0,5 µM 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 °C durante 3 min, seguido de 35 ciclos con diferentes temperaturas y tiempos (Tabla 11).

Tabla 11. Características de las fases de cada ciclo de PCR para cada tipo de familia de BLEE, tras desnaturalización previa de 95 °C durante 3'.

	TEM	SHV	CTX-M-9	CTX-M-1
Desnaturalización	94 °C 45''	94 °C 45''	95 °C 30''	95 °C 1'
Anillamiento	58 °C 30''	60 °C 30''	62 °C 30''	64 °C 1'
Extensión	72 °C 1'30''	72 °C 1'30''	72 °C 1'15''	72 °C 2'
Extensión final	72 °C 10'	72 °C 10'	72 °C 10'	72 °C 7'

El producto de la PCR obtenido se visualizó a través de electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % en TAE 1X 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.

3.8.5. Secuenciación de los genes que codifican BLEE

3.8.5.1. Material

- **Reactivos:**
 - Kit de purificación de ADN Sephaglas BandPrep (Pharmacia)
 - Kit de purificación de ADN: Microsep TM Centrifugal Devices (PALL Life Sciences, EE.UU.)
- **Equipos:**
 - Secuenciador ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Perkin Elmer, EE.UU.)
 - Analizadores genéticos multicapilares modelo ABI Prism 3.130XL (Applied Biosystems)
- **Bioinformática: los análisis informáticos se llevaron a cabo empleando los siguientes softwares:**

- La página web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (NCBI: National Center for Biotechnology Information), BLAST ^[3], BLASTX ^[83]
- Traduction Multiple (Infobiogen, www.infobiogen.fr/services/analyseq/cgi-bin/traduc_in.pl)
- Página del EBI-European Bioinformatics Institute, EMBL Outstation (<http://www.ebi.ac.uk>) ^[11]
- Los programas:
 - ClustalW2 de EMBL-EBI v 1.81 ^[232]
 - Chromas versión 1.34

3.8.5.2. 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 la Unidad de Genómica del Servicio Central de Apoyo a la Investigación (Universidad de Córdoba) con el analizador ABI Prism 310 y 2 analizadores genéticos multicapilares. 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.

3.8.5.3. 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 Thermo Electronic Corporation BioMate (Thermo 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.)

4. RESULTADOS

Durante el periodo de estudio (14 de octubre de 2004 a 17 de enero de 2006) se comunicaron 209 casos de bacteriemias clínicamente significativas por *E. coli* productor de betalactamasas de espectro extendido en los 13 hospitales participantes en el mismo.

De los 209 casos se excluyeron 18 (8 por no disponer del aislado, 4 por comprobarse en el centro de referencia que no eran productoras de BLEE, y 6 por no disponer de información clínica). Por tanto, se trabajó con los aislados y los datos clínicos de 191 casos para el estudio de casos-controles para la investigación de factores de riesgo.

La contribución de casos al estudio por cada hospital tuvo un rango de 7 a 29 (Tabla 13).

4.1. Incidencias

La incidencia global poblacional de los centros participantes en función de los casos obtenidos en el estudio fue 2,62 casos por cada 100.000 habitantes durante el periodo estudiado, siendo 0,02 casos/100 ingresos la incidencia nosocomial y 0,04 casos/1.000 urgencias la incidencia de casos comunitarios (Tabla 12).

Tabla 12. Incidencias globales de las bacteriemias nosocomiales y comunitarias en el periodo estudiado e incidencia global poblacional.

INCIDENCIAS	MEDIA	MEDIANA	RANGO
CASOS COMUNITARIOS			
Casos/1.000 urgencias atendidas	0,13	0,03	0,01-1,18
Casos/100 bacteriemias comunitarias	2,18	0,96	0,13-12,37
Casos/100 bacteriemias <i>E. coli</i>	4,88	3,08	0,36-14,12
CASOS NOSOCOMIALES			
Casos/100 ingresos	0,02	0,01	0,01-0,04
Casos/1.000 estancias	0,34*	0,02*	0,01-0,10*
Casos/1.000 bacteriemias <i>E. coli</i>	6,8	5	0,86-21,43
POBLACIONAL			
Casos/100.000 habitantes/año		2,03	

*Datos referidos a 12 hospitales

Tabla 13. Características, datos globales, distribución de casos totales incluidos en el estudio y en función del tipo de adquisición, comunitaria y nosocomial, e incidencias por hospital. Los datos de bacteriemias *E. coli* BLEE se expresan como N (%).

	HSC Sant Pau	HU Bellvitge	HUV Hebron	CS Clínic	HUG Trias i Pujol	CS Taulí	HGU Gregorio Marañón	HU Ramón y Cajal
CARACTERÍSTICAS HOSPITAL								
Tipo	U	U	G, U	U	U	G	G, U	U
Unidades	UCI, N, T	UCI, T	UCI, N, T	UCI, T	UCI, N, T	UCI, N	UCI, N, T	UCI, T
Nº camas	723	906	1.200	839	638	795	1.702	1.165
Población de referencia	431.828	1.288.518	450.000	500.000	679.517	407.763	738.481	478.617
DATOS*								
Nº ingresos	34.023	35.099	64.499	58.858	41.265	25.534	96.342	42.509
Nº estancias	214.642	305.333	584.341	348.150	248.153	189.698	683.097	41.219
Nº hemocultivos urgencias	4.013	15.007	16.514	1.651	1.316	5.810	2.339	8.885
Nº urgencias	109.232	153.803	335.834	146.977	144.928	5.938	402.153	188.289
Nº bacteriemias comunitarias								
Totales	561	1040	1594	629	662	893	2016	636
Comunitarias <i>E. coli</i>	184	427	557	260	241	278	413	290
Nº bacteriemias nosocomiales								
Totales	476	909	5122	943	411	220	5831	806
Nosocomiales <i>E. coli</i>	81	154	928	155	76	58	915	157
Bacteriemias <i>E. coli</i> BLEE								
Casos totales	8 (3,8)	18 (8,6)	16 (7,7)	15 (7,2)	12 (5,7)	9 (4,3)	30 (14,4)	22 (10,5)
Casos procesados	7 (3,7)	18 (9,4)	10 (5,2)	15 (7,9)	12 (6,3)	9 (4,7)	29 (15,2)	14 (7,3)
Casos comunitarios	3 (43)	10 (56)	2 (20)	8 (53)	4 (33)	7 (78)	18 (62)	10 (71)
Casos nosocomiales	4 (57)	8 (44)	8 (80)	7 (47)	8 (67)	2 (22)	11 (38)	4 (29)

INCIDENCIAS

Comunitaria

Casos/1.000 urgencias	0,03	0,07	0,01	0,05	0,03	1,18	0,04	0,05
Casos/100 bacteriemias comunitarias	0,53	0,96	0,13	1,27	0,60	0,78	0,89	1,57
Casos/100.000 habitantes	0,69	0,78	0,44	1,60	0,59	1,72	2,44	2,09
Casos/100 bacteriemias <i>E. coli</i>	1,63	2,34	0,36	3,08	1,66	2,52	4,36	3,45

Nosocomial

Casos/100 ingresos	0,01	0,02	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01
Casos/1.000 estancias	0,02	0,03	0,01	0,02	0,03	0,01	0,02	0,10
Casos/1.000 bacteriemias <i>E. coli</i>	4,94	5,19	0,86	4,52	10,53	3,45	1,20	2,55

Poblacional

Casos/100.000 habitantes	1,62	1,40	3,56	3,00	1,77	2,21	3,93	4,39
--------------------------	------	------	------	------	------	------	------	------

Anual

Casos/año	5,6	14,4	8,0	12,0	9,6	7,2	23,2	11,2
-----------	-----	------	-----	------	-----	-----	------	------

Continuación Tabla 13.

	HU Ribera	HU Son Espases	HHUUV Rocío	HUV Macarena	HUM Valdecilla
<i>CARACTERÍSTICAS HOSPITAL</i>					
Tipo	G	U	U	G, U	U
Unidades	UCI, N	UCI, N, T	UCI, N, T	UCI, N	UCI, N, T
Nº camas	282	800	1.526	950	900
Población de referencia	243.409	278.973	973.200	550.000	500.000
<i>DATOS*</i>					
Nº ingresos	25.677	38.284	45.507	42.305	38.420
Nº estancias	120.991	309.515	---	337.594	314.753
Nº hemocultivos urgencias	2.179	5.370	1.904	2.081	707
Nº urgencias	147.121	156.656	327.868	265.510	210.879
Número de bacteriemias comunitarias					
Totales	97	717	220	357	115
Comunitarias <i>E. coli</i>	85	133	45	119	51
Número de bacteriemias nosocomiales					
Totales	19	1547	2048	388	544
Nosocomiales <i>E. coli</i>	17	73	249	70	80
Bacteriemias <i>E. coli</i> BLEE					
Casos totales	14 (6,7)	11 (5,3)	22 (10,5)	23 (11)	9 (4,3)
Casos procesados	14 (7,3)	11 (5,8)	20 (10,5)	23 (12)	9 (4,7)
Casos comunitarios	12 (86)	3 (27)	5 (25)	8 (35)	5 (56)
Casos nosocomiales	2 (14)	8 (73)	15 (75)	15 (65)	4 (44)

INCIDENCIAS					
Comunitaria					
Casos/1.000 urgencias	0,08	0,02	0,02	0,03	0,02
Casos/100 bacteriemias comunitarias	12,37	0,42	2,27	2,24	4,35
Casos/100.000 habitantes	4,93	1,08	0,51	1,45	1,00
Casos/100 bacteriemias <i>E. coli</i>	14,12	2,26	11,11	6,72	9,80
Nosocomial					
Casos/100 ingresos	0,01	0,02	0,03	0,04	0,01
Casos/1.000 estancias	0,02	0,03	---	0,04	0,01
Casos/1.000 bacteriemias <i>E. coli</i>	11,76	10,96	6,02	21,43	5,00
Poblacional					
Casos/100.000 habitantes	5,75	3,94	2,16	4,18	1,80
Anual					
Casos/año	11,2	8,8	16,0	18,4	7,2

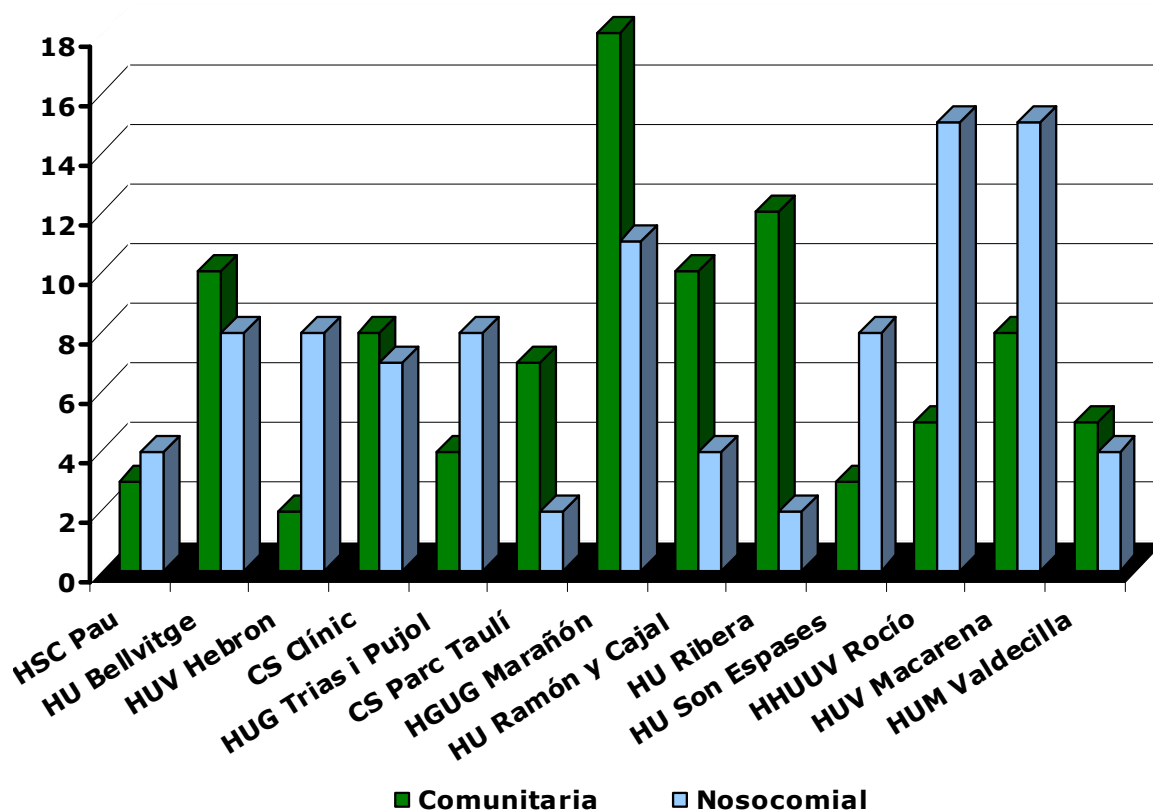
U: Universitario; CM: Comarcal; G: General; UCI: Unidad de Cuidados Intensivos; N: Neonatal; T: Transplantes.

*Datos referidos al periodo de estudio.

4.2. Clasificación en función de la adquisición

Desde el punto de vista del tipo de origen de la adquisición de la infección el número de casos comunitarios y nosocomiales fue muy similar 95 (49,74%) y 96 (50,26%) respectivamente. En cuanto a los distintos hospitales, los datos se muestran en la Figura 2.

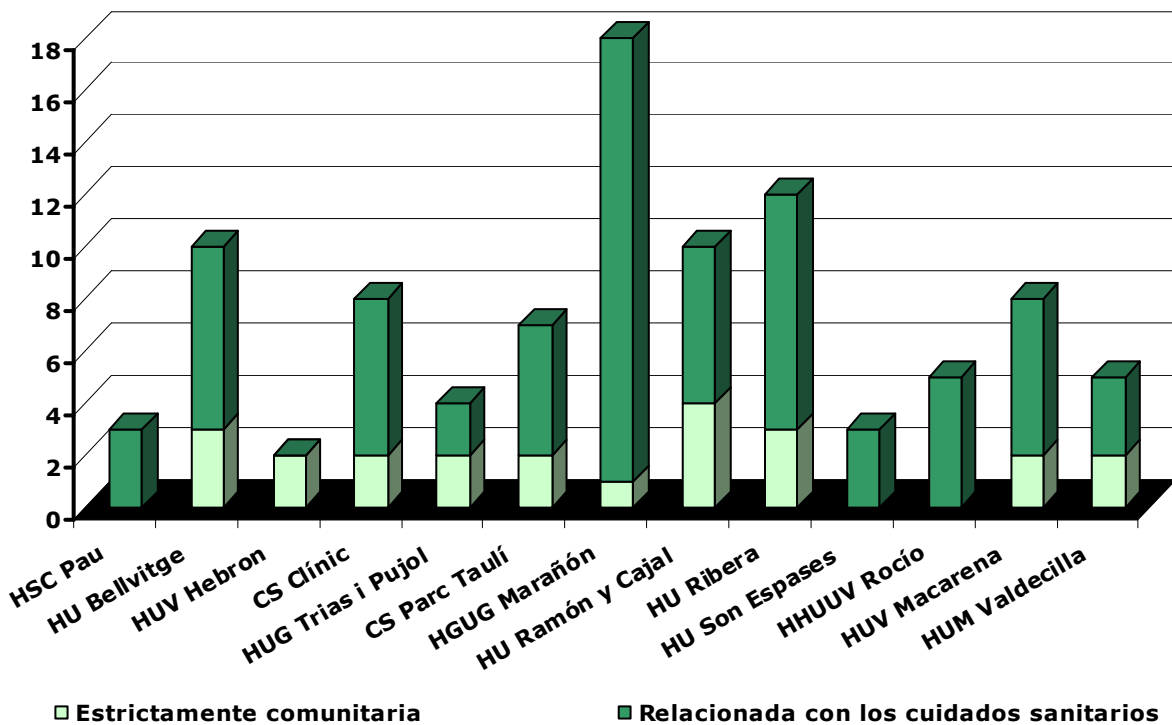
Figura 2. Distribución de casos por centro hospitalario en función de la adquisición de la infección: comunitaria o nosocomial.



El número de días de estancia previa para los casos nosocomiales fue muy variado, con un rango de 2 a 267 días y mediana de 16 días.

Los casos comunitarios fueron divididos en aquellos que tuvieron relación con los cuidados sanitarios y aquellos que fueron estrictamente comunitarios. De las 95 bacteriemias comunitarias 23 (16,6%) fueron estrictamente comunitarias y 72 (68,4%) tuvieron algún tipo de relación con los cuidados sanitarios. La distribución por hospital fue heterogénea y se muestra en la Figura 3.

Figura 3. Distribución por hospital del número de casos de bacteriemia de adquisición comunitaria según los criterios de Friedman: estrictamente comunitarias y relacionadas con los cuidados sanitarios.



4.3. Estudio microbiológico

4.3.1. Identificación bacteriana

Una vez realizado el aislamiento y cultivo de todos los aislados, se procedió a la identificación mediante el sistema API20E, se confirmó la identificación de *E. coli* en todos los aislados.

4.3.2. Confirmación de la producción de BLEE

Se realizó la técnica de difusión en disco a todos los aislados, confirmándose la producción de BLEE en el 98% de los mismos. Cuatro de las 201 cepas (2%) fueron negativas para la producción de BLEE, siendo 197 el número de cepas productoras de BLEE. De ellas sólo se disponía de información clínica de 191, siendo éste por tanto el número definitivo de cepas o casos incluidos para los análisis pertinentes.

4.3.3. Estudio de la relación clonal

Fueron incluidos todos los aislados *E. coli* BLEE (191) en el estudio de clonalidad. Todos aquellos aislados que mostraron un patrón de bandas que indicaba algún tipo de relación clonal entre sí se analizaron posteriormente mediante la técnica de PFGE para su confirmación. Nueve cepas no fueron tipables mediante PFGE (1 del CS Clínic, 1 del HUV Macarena, 2 del HU Ribera y 5 del HGU Gregorio Marañón).

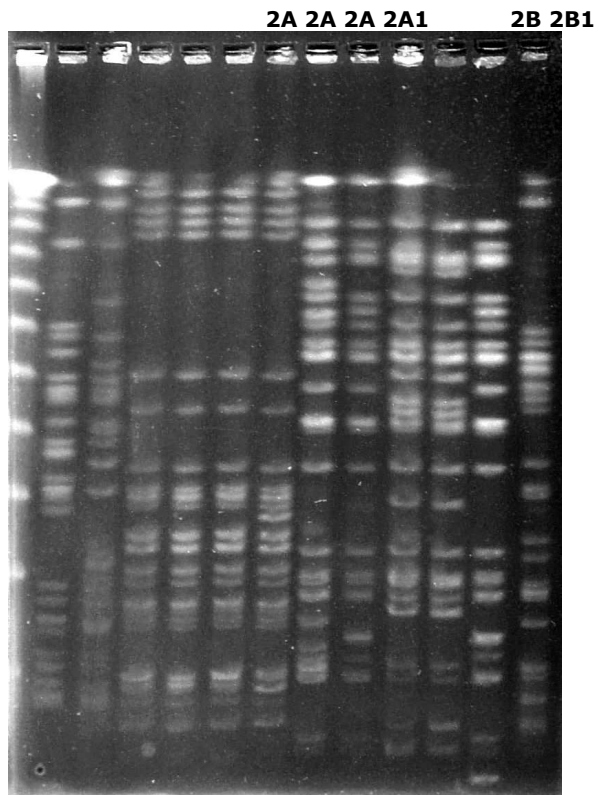
Se obtuvieron 174 clones diferentes y 10 subclones entre los 191 aislados; solo 28 cepas (15%) mostraron relación clonal con otras, en 11 clusters de entre de

2 y 4 cepas cada uno. Hubo 7 hospitales (54%) con cepas relacionadas clonalmente. En el HU Bellvitge, 3 cepas mostraron un patrón indistinguible, y otra cepa un patrón estrechamente relacionado con las anteriores (Figura 4, A: clon 2A); además se apreció otro cluster de 2 cepas. En este hospital, el 33% de las cepas aisladas tenían relación clonal con otras. En el HGU Gregorio Marañón, 3 cepas mostraron patrones indistinguibles mediante REP (Figura 5, A: clon 7C), pero no fueron tipables por PFGE; otras 5 también mostraron un patrón idéntico por REP (Figura 5, A: clon 7B) pero mediante PFGE solo 4 resultaron relacionadas, mientras que el otro aislado mostró un patrón de PFGE totalmente diferente (Figura 5, B: clones 7B, 7B1, 7B2, 7B3 y 7E); otros 2 aislados estaban relacionados (Figura 5, A: clon 7A y Figura 5, B: clones 7A y 7A1) y los 2 últimos aislados eran iguales por REP y no tipables por PFGE (Figura 5, A: clon 7D). En este hospital, el 38% de las cepas tenían relación clonal con otras. En el HU Son Espases se encontraron 2 aislados estrechamente relacionados (Figura 4, B: clon 10A).

Tanto en el HUG Trias i Pujol como en los HHUUV Rocío hubo 2 cepas relacionadas clonalmente, siendo iguales en las de los segundos. En el HUV Macarena hubo 3 cepas relacionadas, siendo iguales por REP y relacionadas por PFGE 2 de ellas mientras que la tercera no era tipable por dicha técnica. En el HU Ribera hubo 2 cepas que mostraron solamente por REP ser estrechamente relacionadas.

Figura 4. Patrones de PFGE de aislados relacionados clonalmente.

A) Aislados relacionados del HU Bellvitge formado por 6 aislados: 3 aislados indistinguibles con patrón de bandas del clon 2A y 1 aislado estrechamente relacionado con patrón 2A1; y 2 aislados estrechamente relacionados con patrones de bandas 2B y 2B1.



B) HU Son Espases: dos aislados estrechamente relacionados clonalmente, patrón de bandas del clon 10A y 10A1.

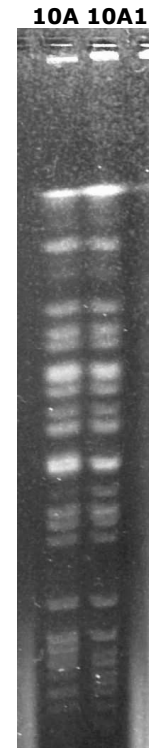
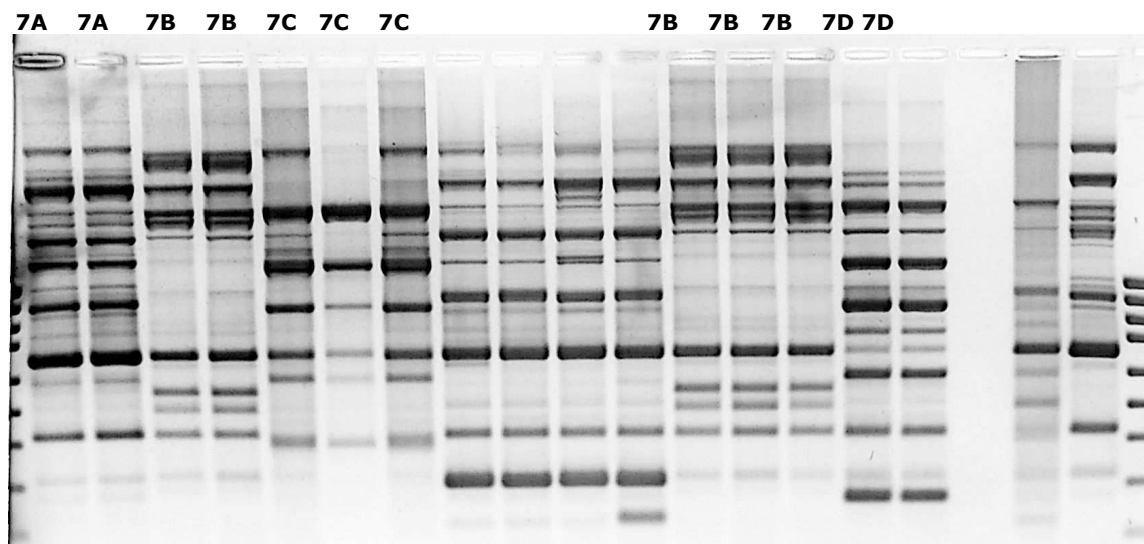
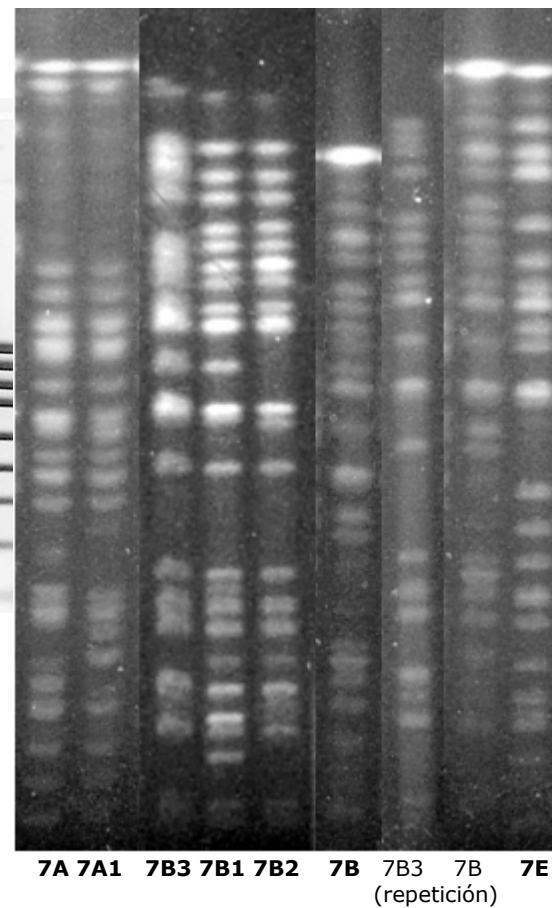


Figura 5. Patrones de PFGE de aislados relacionados clonalmente del HGU Gregorio Marañón.

A) Fotografías correspondientes a la técnica de REP-PCR, con 4 grupos de aislados correspondientes a 4 clones: 7A, 7B, 7C y 7D.



B) Patrones de PFGE de los aislados anteriores, dando como resultado 4 grupos de aislados correspondientes a 4 clones: 7A y 7A1 relacionados; B: 7B, 7B1, 7B2 y 7B3 relacionados clonalmente entre sí y; el clon 7E. Los clones resultantes de REP-PCR 7C y 7D no eran tipables por PFGE.



4.3.4. Caracterización de las BLEE

4.3.4.1. Conjugación

Se obtuvieron transconjugantes en 141 aislados (74%).

4.3.4.2. Determinación de sensibilidad a antimicrobianos

Los valores de CMI₅₀, CMI₉₀ y categoría clínica se detallan en la Tabla 14.

El 100% de las cepas fueron sensibles a las tres carbapenemas estudiadas (imipenem, meropenem y ertapenem) y a tigeciclina. Los antimicrobianos que les siguieron en número de aislados sensibles fueron fosfomicina (96%), piperacilina-tazobactam (92%) y los aminoglucósidos (amikacina, 98%; tobramicina, 82%; y gentamicina, 80%). El porcentaje de sensibilidad a amoxicilina-clavulánico fue bastante inferior (62%), hecho debido al alto porcentaje de aislados con sensibilidad intermedia al mismo (32%). El número de cepas sensibles a las cefalosporinas estudiadas fue inferior, siendo en orden decreciente: ceftazidima (63%), cefepime (35%) y cefotaxima (4%). El resto de antimicrobianos estudiados presentó actividad frente a menos del 50% de los aislados.

Los porcentajes de sensibilidad de los transconjugantes fueron muy similares a los de las cepas originales, a excepción de las quinolonas y trimetoprim-sulfametoxazol. Así, fueron sensibles a ciprofloxacino el 34% de las cepas originales y el 100% de los transconjugantes; en el caso de ácido nalidíxico, las cifras fueron del 15 y del 99%, respectivamente; y en el caso de trimetoprim-sulfametoxazol, el 39 y el 15%, respectivamente.

Tabla 14. Valores de CMI₅₀, CMI₉₀ y categoría clínica de diferentes antimicrobianos.

	Sensible	Intermedia	Resistente	CMI ₅₀	CMI ₉₀
	N (%)	N (%)	N (%)		
Ciprofloxacino	62 (32)	7 (4)	122 (64)	8	64
Ácido nalidíxico	26 (14)	-	165 (86)	1024	1024
Piperacilina-tazobactam	175 (92)	10 (5)	6 (3)	2	16
Amoxicilina-clavulánico	118 (62)	61 (32)	12 (6)	8/4	16/8
Ticarcilina-clavulánico	33 (17)	72 (38)	86 (45)	64/4	256/4
Ceftazidima	121 (63)	6 (3)	64 (34)	4	128
Cefotaxima	7 (4)	26 (14)	158 (83)	256	256
Cefepime	67 (35)	12 (6)	112 (59)	64	64
Amikacina	188 (98)	2 (1)	1 (1)	4	16
Gentamicina	152 (80)	8 (4)	31 (16)	1	64
Tobramicina	157 (82)	6 (3)	28 (15)	1	32
Imipenem	191 (100)	0 (0)	0 (0)	0,25	0,5
Meropenem	191 (100)	0 (0)	0 (0)	0,03	0,06
Ertapenem	191 (100)	0 (0)	0 (0)	0,03	0,125
Tigeciclina	191 (100)	0 (0)	0 (0)	0,06	0,06
Trimetoprim-sulfametoxazol	75 (39)	-	116 (61)	256/4864	512/9728
Fosfomicina	184 (96)	1 (1)	6 (3)	8	32

4.3.4.3. Isoelectroenfoque

Se realizó la técnica de IEF de los extractos enzimáticos crudos para determinar los pIs de las betalactamasas a todas las cepas originales productoras de BLEE y, a los transconjugantes obtenidos para poder analizar la transferencia de los genes por conjugación en éstos.

A partir de esta técnica pudimos ver cuántas betalactamasas expresaba cada cepa productora de BLEE y clasificarlas de forma preliminar en las distintas familias en función de los pIs.

Entre las cepas originales, se obtuvieron 115 cepas con bandas de pI en el rango de 5,2 a 6,5, clasificadas preliminarmente como posibles betalactamasas de la familia TEM. Hubo 259 cepas con pI entre 7,0 y 8,2, que se consideraron inicialmente

como posibles betalactamasas tipo SHV a excepción de aquellas con pI de 8,0 y 8,1, que se clasificaron preliminarmente como de la familia CTX-M. Finalmente, se obtuvieron 276 bandas con pI entre 8,0 y > 8,2, clasificadas inicialmente como CTX-M.

4.3.4.4. Caracterización de BLEE mediante PCR

Una vez realizada la técnica de IEF y obtenidos los pIs de cada una de las cepas, se procedió a realizar la técnica de PCR utilizando cebadores específicos de cada familia según la clasificación preliminar del tipo de blea en función del pI obtenido.

Hubo aislados con pI diferentes a los encontrados en su cepa transconjugante, por lo que se iniciaron las PCRs en las cepas transconjugantes; en aquellas que no se obtuvo resultado positivo se realizó posteriormente en la cepa original. En muchos casos no se obtuvieron los productos de PCR que inicialmente se esperaban, por lo que se procedió a someter dichos aislados a PCR con cebadores específicos no realizados inicialmente por no haber pI indicativo de existencia de ese tipo de BLEE. Asimismo, a todas aquellas parejas de transconjugante y original que presentaron pI indicativo de grupo TEM, aquellas que sólo tenían pI de rango TEM y aquellas que no habían amplificado inicialmente con cebadores de otras familias se les realizó PCR con cebadores específicos de la familia TEM.

Por PCR se obtuvieron 169 (83%) BLEE de la familia CTX-M, 34 (17%) de la familia SHV, y una sola BLEE de la familia TEM (0,5%).

4.3.4.5. Secuenciación de los genes codificantes de BLEE

Una vez obtenidos los elementos amplificados se analizaron las secuencias para caracterizar específicamente las enzimas expresadas en los aislados (Tabla 15). Las enzimas mayoritarias fueron del grupo CTX-M-9 (123, el 64%) seguidas del

grupo CTX-M-1 (41 aislados) y SHV (33 aislados). En 7 aislados (3,7%) se detectaron dos BLEE diferentes.

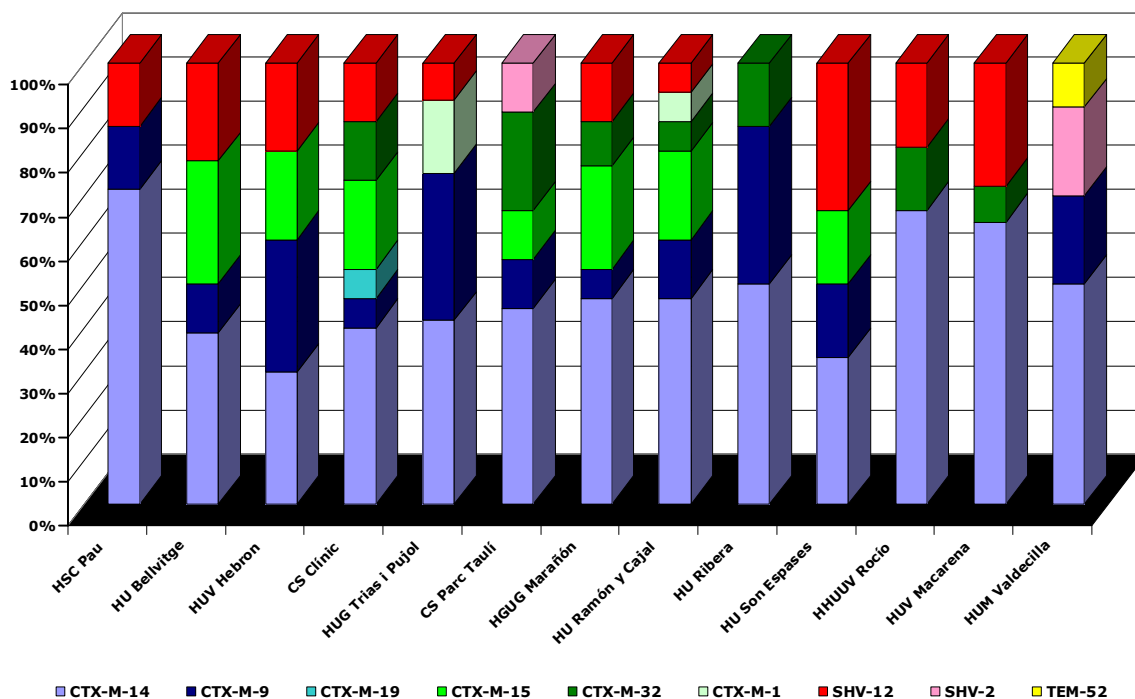
Tabla 15. Distribución de enzimas BLEE producidas por los aislados del estudio según la familia y grupo de enzima al que pertenecen, N° (%).

	N (%)
FAMILIA CTX-M, GRUPO CTX-M-9	
CTX-M-14	97 (49)
CTX-M-9	25 (13)
CTX-M-19	1 (0,5)
FAMILIA CTX-M, GRUPO CTX-M-1	
CTX-M-15	23 (12)
CTX-M-32	15 (8)
CTX-M-1	3 (1,5)
FAMILIA TEM	
TEM-52	1 (0,5)
FAMILIA SHV	
SHV-12	30 (15)
SHV-2	3 (1,5)
DOS TIPOS DE BLEE	
CTX-M-14 y CTX-M-1	1 (0,5)
CTX-M-14 y CTX-M-15	1 (0,5)
CTX-M-14 y CTX-M-32	1 (0,5)
CTX-M-14 y SHV-12	3 (1,5)
CTX-M-14 y SHV-2	1 (0,5)

Las combinaciones de dos BLEE estaban formadas por una de la familia CTX-M y una de la familia SHV o dos de la familia CTX-M, cada enzima de un grupo distinto, una del grupo 9, CTX-M-14, y otra del grupo 1.

La distribución de enzimas producida por cada hospital se encuentra representada en la Figura 6.

Figura 6. Porcentaje de distribución de cada tipo de BLEE producida por cada uno de los centros hospitalarios participantes.



4.3.4.6. Sensibilidad a antimicrobianos en función del grupo de BLEE producida

En la Tabla 16 se muestran los datos de sensibilidad de los 191 aislados del estudio a los antimicrobianos más relevantes, y en función del grupo de BLEE: CTX-M-9, CTX-M-1 y SHV, de aquellos aislados que produjeron solo una BLEE (116, 38 y 29 aislados respectivamente). En función de los puntos de corte del CLSI 2009 todos los aislados serían resistentes a las cefalosporinas, mientras que por los criterios del CLSI 2010 y EUCAST 2011 habría un 58,6 y 14,7% de sensibilidad a ceftazidima y, 35,1 y 14,7% a cefepime respectivamente. Para el resto de antimicrobianos no supone grandes diferencias el hecho de utilizar unos criterios u otros, a excepción de ertapenem, al que algunos aislados presentan resistencia según los puntos de corte

del CLSI 2010; a imipenem y meropenem todos los aislados son sensibles en función de los tres criterios comparados.

El patrón de sensibilidad para algunos antibióticos fue diferente según la enzima producida. En general, las cepas productoras de CTX-M-15 mostraron menor sensibilidad a ciprofloxacino, BLIBL, tobramicina y trimetoprim-sulfametoxazol. Como era de esperar, las cepas productoras de BLEE tipo SHV presentaron peores cifras de sensibilidad a ceftazidima, mientras que un alto porcentaje de cepas productoras de CTX-M-14 y CTX-M-9 eran sensibles a este antibiótico.

Tabla 16. Sensibilidad de los aislados de *E. coli* BLEE a los antimicrobianos más relevantes, según los criterios del CLSI 2009, CLSI 2010 y EUCAST 2011, y por el grupo de BLEE producido. Datos expresados como número de aislados (%). Todos los aislados están incluidos en los totales, los 191. De los grupos CTX-M-9, CTX-M-1 y SHV se incluyeron los aislados que sólo produjeron una BLEE (116, 38 y 29 aislados respectivamente).

	BLEE	CLSI 2009	CLSI 2010	EUCAST 2011
Cefotaxima	Total	0	0	0
	Grupo CTX-M-9	0	0	0
	Grupo CTX-M-1	0	0	0
	Grupo SHV	0	0	0
Ceftazidima	Total	0	112 (58,6) ^a	28 (14,7) ^d
	Grupo CTX-M-9	0	103 (88,8) ^a	27 (23,3) ^d
	Grupo CTX-M-1	0	8 (21,1) ^b	1 (2,6) ^e
	Grupo SHV	0	0	0
Cefepime	Total	0	67 (35,1) ^a	28 (14,7) ^d
	Grupo CTX-M-9	0	31 (26,7) ^a	3 (2,6) ^d
	Grupo CTX-M-1	0	8 (21,1) ^b	4 (10,5)
	Grupo SHV	0	26 (89,7) ^a	19 (65,5) ^f
Amoxicilina-clavulánico	Total	SC	118 (61,8)	118 (61,8)*
	Grupo CTX-M-9	SC	41 (35,3)	41 (35,3)*
	Grupo CTX-M-1	SC	23 (60,5)	23 (60,5)*
	Grupo SHV	SC	6 (20,7)	6 (20,7)*
Piperacilina-tazobactam	Total	SC	175 (91,6)	164 (85,9) ^g
	Grupo CTX-M-9	SC	110 (94,8)	108 (93,1)
	Grupo CTX-M-1	SC	31 (81,6)	23 (60,5) ^h
	Grupo SHV	SC	27 (93,1)	27 (93,1)

Ertapenem	Total	191 (100)	187 (97,9) ^c	191 (100) ⁱ
	Grupo CTX-M-9	116 (100)	114 (98,3)	116 (100)
	Grupo CTX-M-1	38 (100)	36 (94,7)	38 (100)
	Grupo SHV	29 (100)	29 (100)	29 (100)
Imipenem	Total	191 (100)	191 (100)	191 (100)
	Grupo CTX-M-9	116 (100)	116 (100)	116 (100)
	Grupo CTX-M-1	38 (100)	38 (100)	38 (100)
	Grupo SHV	29 (100)	29 (100)	29 (100)
Ciprofloxacino	Total	SC	62 (32,5)	59 (30,9)
	Grupo CTX-M-9	SC	40 (34,5)	38 (32,8)
	Grupo CTX-M-1	SC	6 (15,8)	6 (15,8)
	Grupo SHV	SC	12 (41,4)	11 (37,9)
Gentamicina	Total	SC	152 (79,6)	145 (75,9)
	Grupo CTX-M-9	SC	96 (82,8)	89 (76,7)
	Grupo CTX-M-1	SC	27 (71,1)	27 (71,1)
	Grupo SHV	SC	23 (79,3)	23 (79,3)
Tobramicina	Total	SC	175 (91,6)	164 (85,9) ^j
	Grupo CTX-M-9	SC	106 (91,4)	102 (87,9)
	Grupo CTX-M-1	SC	18 (47,4)	17 (44,7)
	Grupo SHV	SC	27 (93,1)	24 (82,8)
Amikacina	Total	SC	188 (98,4)	171 (75,9) ^d
	Grupo CTX-M-9	SC	116 (100)	113 (97,4)
	Grupo CTX-M-1	SC	35 (92,1)	23 (60,5) ^d
	Grupo SHV	SC	29 (100)	28 (96,6)

*Ninguno resistente.

SC: sin cambios en los puntos de corte en la versión de 2010. Valores de p para las comparaciones entre CLSI 2010 y CLSI 2009 (chi-cuadrado excepto donde se especifica): ^a≤0,001; ^b0,002 (test de Fisher); ^c0,06 (test de Fisher). Valores de p para la comparación entre CLSI 2010 y EUCAST 2011 (chi-cuadrado excepto donde se especifica): ^d≤0,001; ^e0,007; ^f0,02; ^g0,07; ^h0,04; ⁱ0,06 (test de Fisher); ^j0,07. El resto de comparaciones >0,1.

4.4. Análisis de potenciales diferencias clínico-epidemiológicas en función de la BLEE producida

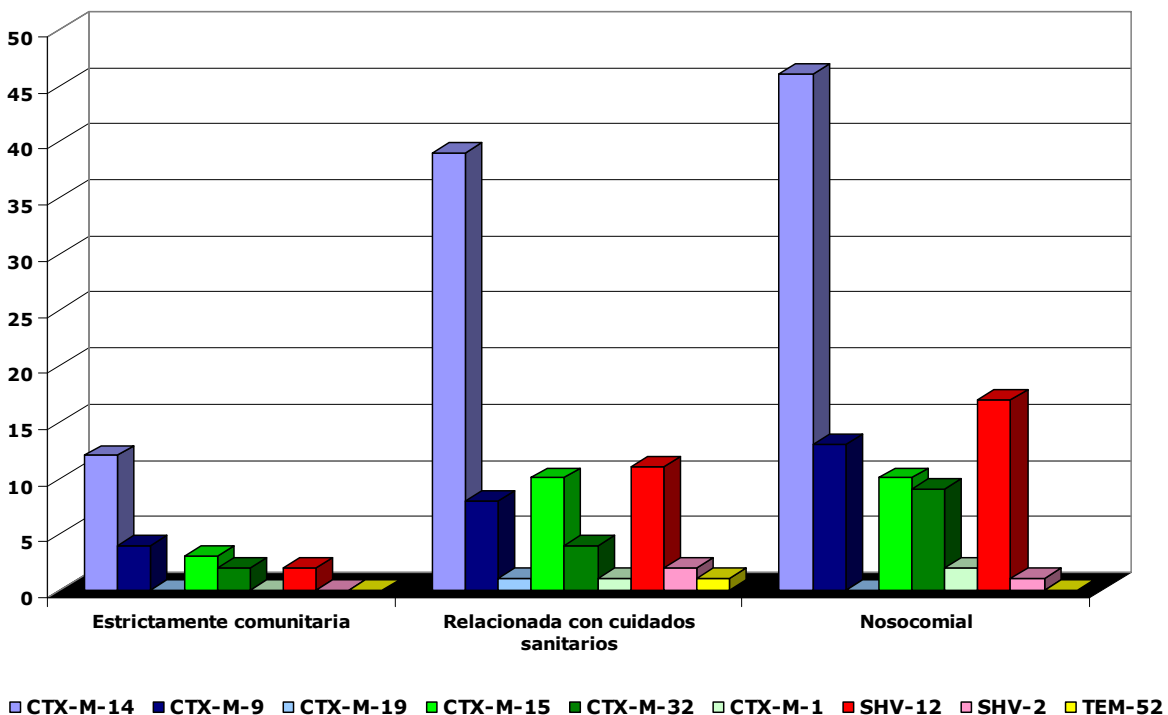
Se realizó una comparativa entre las características clínico-epidemiológicas en función del tipo de BLEE, encontrándose los siguientes resultados referidos

fundamentalmente a las enzimas producidas mayoritariamente (CTX-M-14, CTX-M-9, CTX-M-15, CTX-M-32 y SHV-12):

4.4.1. Adquisición

De forma global, la distribución de BLEE por familias no presentó diferencias significativas en cuanto al modo de adquisición de la bacteriemia (datos no mostrados). En el caso de la familia TEM la única BLEE producida fue por un aislado de origen comunitario. Los números de cepas productoras de cada tipo de BLEE en función del origen se muestran en la Figura 7.

Figura 7. Distribución de cada tipo de enzima BLEE producida en el estudio en función de la adquisición de la bacteriemia.



4.4.2. Factores predisponentes

Los datos se muestran en la Tabla 17. Comparando las características estudiadas por grupo de enzima, los porcentajes de exposición a los distintos factores fueron muy similares. Los pacientes con SHV-12 presentaron enfermedad de la vía biliar y pancreática en mayor número que el resto. Los pacientes con CTX-M-14 tuvieron como diferencia mayor frecuencia de enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Los pacientes con cepa productora de CTX-M-15 tenían con mayor frecuencia insuficiencia cardíaca como enfermedad de base.

A nivel global los antibióticos más empleados en los dos meses previos fueron muy similares para cada tipo de BLEE con algunas diferencias, pero no significativas, a excepción del mayor empleo de amoxicilina-clavulánico en pacientes con cepas productoras de SHV-12.

Tabla 17. Características clínicas y epidemiológicas de los pacientes cuyos aislados produjeron las enzimas mayoritarias de cada familia de enzimas y por grupo de familia de BLEE, N (%).

	CTX-M GRUPO 9		CTX-M GRUPO 1		SHV	CTX-M		SHV
	14	9	15	32	12	GRUPO 9	GRUPO 1	SHV
CASOS	97 (51)	25 (13)	23 (12)	15 (8)	30 (16)	123 (64)	41 (22)	33 (17)
Hombres	57 (59)	15 (60)	13 (57)	8 (53)	15 (50)	72 (59)	22 (54)	17 (52)
Edad > 65 años	59 (61)	14 (56)	16 (70)	11 (73)	13 (43)	73 (59)	29 (71)	16 (49)
Mc Cabe Rápidamente fatal	10 (10)	0	3 (13)	1 (7)	3 (10)	10 (8)	4 (10)	3 (9)
Charlson > 2	46 (47)	8 (32)	11 (48)	7 (47)	14 (47)	54 (44)	20 (49)	16 (49)
Adquisición								
Nosocomial	46 (47)	13 (52)	10 (44)	9 (60)	17 (57)	59 (48)	21 (51)	18 (55)
Comunitaria relacionada con cuidados sanitarios	39 (40)	8 (32)	10 (44)	4 (27)	11 (37)	48 (39)	15 (37)	13 (39)
ENFERMEDADES DE BASE								
Diabetes	25 (26)	5 (20)	6 (26)	6 (40)	9 (30)	30 (24)	14 (34)	10 (30)
EPOC	23 (24) ¹	2 (8)	4 (14)	4 (27)	4 (13)	25 (20)	8 (20)	4 (12)
Insuficiencia cardiaca	12 (12)	2 (8)	6 (26) ²	0	4 (13)	14 (11)	7 (17)	4 (12)
Neoplasia	32 (33)	4 (16)	3 (13)	6 (40)	10 (33)	37 (30)	11 (27)	10 (30)
Insuficiencia renal crónica	18 (19)	3 (12)	2 (9)	2 (13)	4 (13)	21 (17)	4 (10)	4 (12)
Enfermedad neurológica discapacitante	15 (16)	2 (8)	4 (17)	2 (13)	1 (3)	17 (14)	6 (15)	1 (3)
Enfermedad o tratamiento inmunosupresor	13 (13)	2 (8)	3 (13)	3 (20)	4 (13)	15 (12)	7 (17)	5 (15)
Uropatía obstructiva crónica	21 (22)	5 (20)	7 (30)	5 (33)	4 (13)	26 (21)	13 (32)	4 (12)
Patología digestiva crónica	11 (11)	2 (8)	0	1 (7)	2 (7)	13 (11)	1 (2)	2 (6)
Cirrosis	8 (8)	2 (8)	4 (17)	1 (7)	5 (17)	10 (8)	5 (12)	6 (18)
Enfermedad vía biliar y pancreática	8 (8)	2 (8)	2 (9)	0	7 (23) ³	10 (8)	2 (5)	7 (21) ⁴
Neutropenia	5 (5)	1 (4)	0	0	1 (4)	7 (6)	1 (2)	2 (6)

ANTIMICROBIANOS PREVIOS								
Quinolonas	24 (25)	5 (20)	9 (39)	2 (13)	8 (27)	30 (24)	11 (27)	9 (27)
Cefalosporinas	24 (25)	8 (32)	8 (35)	7 (47)	6 (20)	32 (26)	16 (39)	7 (21)
Amoxicilina-clavulánico	7 (7)	2 (8)	2 (9)	2 (13)	6 (20) ⁸	9 (27)	4 (10)	6 (18)
Penicilinas	8 (8)	2 (8)	3 (13)	2 (13)	6 (20)	10 (8)	5 (12)	6 (18)
CLÍNICA								
Origen bacteriemia								
Desconocido	12 (12)	2 (8)	1 (4)	1 (7)	7 (23)	15 (12)	3 (7)	8 (24) ⁵
Urinario	51 (53)	10 (40)	10 (44)	9 (60)	10 (33)	61 (50)	20 (49)	10 (30) ⁶
Intraabdominal	23 (24)	8 (32)	8 (35)	4 (27)	8 (27)	31 (25)	12 (29)	9 (27)
Neumonía	1 (1)	3 (12) ⁷	1 (4)	0	1 (3)	4 (3)	1 (2)	1 (3)
Otras respiratorias	2 (2)	1 (4)	0	0	1 (3)	3 (2)	0	1 (3)
Catéter	5 (5)	1 (4)	1 (4)	0	1 (3)	6 (5)	2 (5)	1 (3)
Otras	3 (3)	0	2 (9)	1 (7)	2 (7)	3 (2)	3 (7)	3 (9)
Gravedad de la infección								
Pitt > 3	10 (10)	2 (3)	5 (23)	0	2 (7)	12 (10)	6 (15)	2 (6)
Sepsis grave	14 (14)	1 (4)	4 (17)	1 (7)	2 (7)	15 (12)	5 (12)	3 (9)
Shock séptico	16 (17)	2 (8)	4 (17)	2 (13)	4 (13)	18 (15)	7 (17)	4 (12)
Síndrome de disfunción multiorgánico	3 (3)	2 (8)	1 (4)	2 (3)	0	5 (4)	3 (7)	0
Insuficiencia renal aguda	12 (12)	2 (8)	4 (17)	1 (7)	3 (10)	14 (11)	5 (12)	4 (12)
PRONÓSTICO								
Éxito global	21 (22)	7 (28)	8 (35)	4 (27)	6 (20)	28 (23)	13 (32)	7 (21)
Éxito 14 días primeros	18 (19)	6 (24)	7 (30)	2 (13)	4 (13)	29 (20)	10 (24)	5 (15)
Éxito 30 días	19 (20)	7 (28)	8 (35)	3 (20)	4 (13)	26 (21)	12 (29)	5 (15)
ANTIMICROBIANOS EMPÍRICOS								
Fluorquinolonas	17 (18)	1 (4)	4 (17)	3 (20)	7 (23)	18 (15)	7 (17)	7 (21)
Cefalosporinas	31 (32)	7 (28)	8 (35)	6 (40)	8 (27)	38 (31)	16 (39)	9 (27)
Amoxicilina-clavulánico	24 (25)	9 (36)	4 (17)	4 (27)	7 (23)	33 (27)	9 (22)	8 (24)
Carbapenemas	15 (16)	4 (16)	3 (13)	4 (27)	3 (10)	19 (15)	7 (17)	4 (12)
Aminoglucósidos	8 (8)	5 (20)	2 (9)	1 (7)	1 (3)	13 (11)	3 (7)	1 (3)
ANTIMICROBIANOS DIRIGIDOS								
	77 (79)	20 (80)	14 (61)	10 (67)	24 (80)	98 (80)	26 (63) ⁹	25 (76)

Diferencias significativas: ¹p=0,030; ²p=0,048 (Fisher); ³p=0,011 (Fisher); ⁴p=0,019 (Fisher); ⁵p=0,048 (Fisher); ⁶p=0,033; ⁷p=0,031 (Fisher); ⁸p=0,042 (Fisher); ⁹p=0,045.

NOTA: Indirectamente el número total de casos resultante en ocasiones es 198 en lugar de 191, debido a que hubo 7 aislados que produjeron 2 enzimas, así como en otros resulta 190 por no estar incluido el aislado que produjo la enzima TEM-52.

4.4.3. Origen de la bacteriemia

El origen de las bacteriemias más frecuente para todas las BLEE mayoritarias fue el urinario seguido del intraabdominal, y en tercer lugar el origen desconocido. Entre los pacientes con dos BLEE hubo 4 de origen intraabdominal, 2 urinario y uno desconocido. Los pacientes con enzimas del tipo CTX-M-9 fueron los únicos que presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto al origen, al tener 3 pacientes (12%) neumonía. Las bacteriemias producidas por *E. coli* productora de enzimas de la familia SHV tuvieron con más frecuencia como origen de las mismas el origen desconocido y el urinario.

4.4.4. Tratamiento, gravedad y pronóstico

Al igual que en las variables anteriores ninguna característica sobre la gravedad de la infección o sobre el pronóstico del enfermo presentó diferencias estadísticamente significativas en función de la BLEE producida.

En cuanto al tratamiento tampoco se hallaron diferencias significativas en el empleo de los antimicrobianos de forma empírica. Solo los aminoglucósidos fueron empleados con mayor frecuencia en pacientes con cepas productoras de CTX-M-9, 5 (20%), en el límite de la significación ($p=0,05$).

4.5. Estudio descriptivo de la cohorte de casos

4.5.1. Variables demográficas

Las distintas características se presentarán en el global de la serie y en función de la adquisición (Tablas 18 y 19).

La proporción de bacteriemias de *E. coli* BLEE fue muy similar para ambos sexos, siendo ligeramente superior el número de hombres afectados, 56%. No hubo diferencias en la frecuencia por sexos en función de la adquisición.

La edad media fue de 66,6 años y la mediana de 71; el rango de edades estaba comprendido entre 20 y 93 años. La media de edad de los casos comunitarios fue 72 años, 10 más que para los nosocomiales. Comparando el porcentaje de pacientes mayores de 65 años entre el grupo nosocomial (47%) y el grupo relacionado con los cuidados sanitarios (74%), la diferencia fue significativa, pero no entre el grupo nosocomial y el estrictamente comunitario (70%). La distribución por grupos de edad se muestra en la Figura 8.

Figura 8. Distribución del número de pacientes por edad en grupos de diez años en función de la adquisición de la bacteriemia.

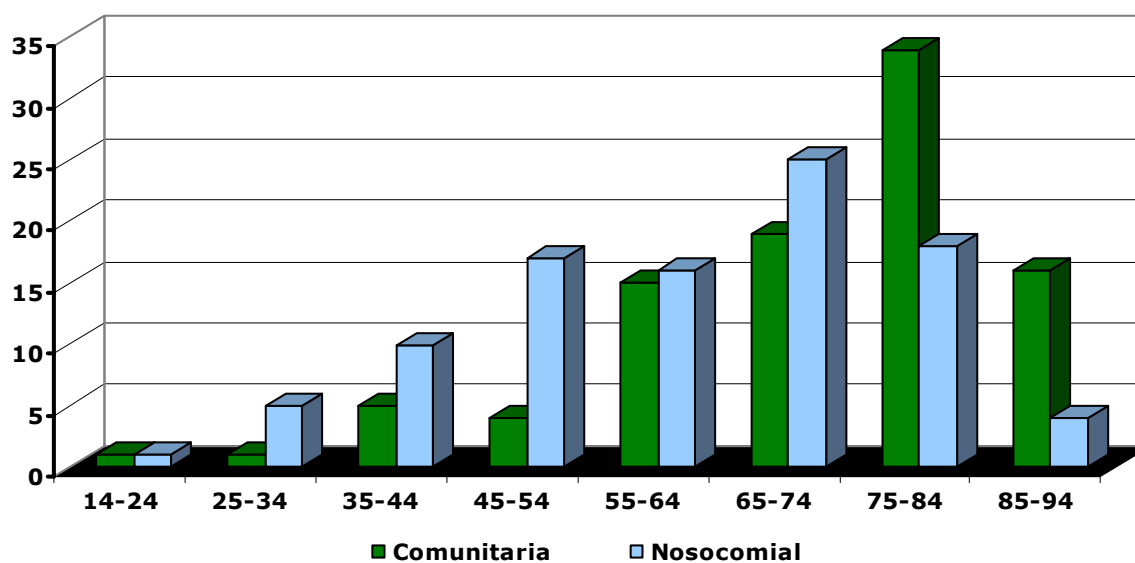


Tabla 18. Características demográficas y factores predisponentes de los pacientes con bacteriemia por *E. coli* BLEE globales y en función de la adquisición de la infección. Los datos se expresan como N° (%), excepto donde se especifica.

	GLOBAL	ESTRICTAMENTE COMUNITARIA (EC)	RELACIONADA CON CUIDADOS SANITARIOS (RCS)	NOSOCOMIAL (N)
	N=191	N=23	N=72	N=96
Casos	191 (100)	23 (24)	72 (76)	96 (50)
Hombres	107 (56)	11 (48)	42 (58)	54 (56)
Edad (mediana y rango)	71 (20-93)	75 (21-93)	76 (31-93)	63 (20-89)
Edad > 65 años	114 (60)	16 (70)	53* (74)	45 (47)
SERVICIOS				
Urgencias	68 (36)	15 (65)	53 (74)	0
Médicos	76 (40)	8 (35)	18 (25)	50 (52)
Quirúrgicos	33 (17)	0	1 (1)	32 (33)
UCI	14 (7)	0	0	14 (15)
ENFERMEDADES DE BASE				
Diabetes	52 (27)	7 (30)	17 (24)	28 (29)
EPOC	34 (18)	5 (22)	13 (18)	16 (17)
Insuficiencia cardíaca	24 (13)	1 (4)	10 (14)	13 (14)
Neoplasia	55 (29)	0**	24 (33)	31 (32)
Insuficiencia renal crónica	28 (15)	3 (13)	7 (10)	18 (19)
Enfermedad neurológica discapacitante	24 (13)	2 (9)	17* (24)	5 (5)
Enfermedad o tratamiento inmunosupresor	27 (14)	1 (4)	6* (8)	20 (21)
Uropatía obstructiva crónica	43 (23)	7 (30)	20 (28)	16 (17)
Patología digestiva crónica	16 (8)	1 (4)	7 (10)	8 (8)
Cirrosis	18 (9)	1 (4)	9 (13)	8 (8)
Enfermedad vía biliar y pancreática	18 (9)	0	8 (11)	10 (10)
Litiasis biliar no complicada	6 (3)	1 (4)	2 (3)	3 (3)
Neutropenia	10 (5)	0	4 (6)	6 (6)

ÍNDICES				
McCabe				
No fatal	106 (56)	21** (91)	36 (50)	49 (51)
Rápidamente fatal	16 (8)	1 (4)	6 (8)	9 (9)
Charlson (media)	3	1	3	3
Charlson > 2	86 (45)	4** (17)	42* (58)	40 (42)
PROCEDIMIENTOS INVASIVOS PREVIOS				
Catéter venoso	79 (41)	0*	20* (28)	53 (55)
Catéter central	53 (28)	0*	8* (11)	45 (47)
Ventilación mecánica (1 semana antes)	8 (4)	0	0*	8 (8)
Sonda urinaria transitoria	48 (25)	2* (9)	7* (10)	39 (41)
Sonda urinaria permanente	18 (9)	2 (9)	12* (17)	4 (4)
Prótesis biliar actual	11 (6)	0	4 (6)	7 (7)
Cirugía (un mes previo)	45 (24)	0*	11* (15)	33 (34)
Cirugía vía biliar previa	5 (3)	0	3 (4)	2 (2)
Procedimiento endoscópico (1 semana antes)	10 (5)	0	1 (1)	9 (9)
Procedimiento urológico (un mes previo)	10 (5)	0	1 (1)	9 (9)
TERAPIA ANTIMICROBIANA PREVIA				
Terapia combinada	60 (31)	1 (4)	15 (21)	44 (46)
Un antibiótico sólo	48 (25)	5 (22)	18 (25)	25 (26)
Dos antibióticos	37 (19)	1 (4)	9 (13)	27 (28)
Tres antibióticos	23 (12)	0	6 (8)	17 (18)
Cuatro o más antibióticos	10 (5)	0	3 (4)	7 (7)
Penicilinas	20 (11)	0	7 (10)	13 (14)
Amoxicilina-clavulánico	18 (9)	0	6 (8)	12 (13)
Quinolonas	49 (26)	4 (17)	20 (28)	25 (26)
Cefalosporinas	53 (28)	2* (9)	11* (15)	40 (42)

*Diferencias significativas:

***N versus RCS:** Edad > 65 (p=0,001), Charlson > 2 (p=0,032), enfermedad neurológica discapacitante (p<0,001), enfermedad o tratamiento inmunosupresor (p=0,027), sondas urinarias (transitoria p<0,001 y permanente p=0,006), catéteres (venoso y central p<0,001), ventilación mecánica (p=0,011), cirugía un mes previo (p=0,005) y uso previo de cefalosporinas (p<0,001).

***N versus EC:** Charlson > 2 (p=0,03), Mc Cabe no fatal (p<0,001), neoplasia (p=0,002), sonda urinaria transitoria (p=0,004), catéteres (venoso p=0,012, central p<0,001), cirugía un mes previo (p=0,004) uso previo de cefalosporinas (p=0,003).

***RCS versus EC:** Charlson > 2 (p=0,001), Mc Cabe no fatal (p<0,001) y neoplasia (p=0,001).

Tabla 19. Características clínicas y pronósticas de los pacientes con bacteriemia por *E. coli* BLEE globales y en función de la adquisición de la infección, datos expresados en N° (%), excepto donde se indica.

	GLOBAL N=191	ESTRICTAMENTE COMUNITARIA (EC) N=23	RELACIONADA CON CUIDADOS SANITARIOS (RCS) N=72	NOSOCOMIAL (N) N=96
CLÍNICA				
Origen de la bacteriemia				
Desconocido	25 (13)	1 (4)	6 (8)	18 (19)
Urinario	90 (47)	15* (65)	40* (56)	35 (37)
Intraadominal	48 (25)	4 (17)	20 (28)	24 (25)
Neumonía	6 (3)	1 (4)	1 (1)	4 (4)
Otras respiratorias	4 (2)	1 (4)	1 (1)	2 (2)
Catéter	9 (5)	0	1 (1)	8 (8)
Gastroenteritis	1 (1)	0	1 (1)	0
Aparato genital	1 (1)	1 (4)	0	0
Piel y partes blandas	3 (2)	0	1 (1)	2 (2)
Osteoarticular	3 (2)	0	1 (1)	2 (2)
Otras	1 (1)	0	1 (1)	1 (1)

Síntomas y signos				
Fiebre > 39 °C	65 (34)	7 (30)	19 (26)	39 (41)
Hipotermia (< 35,5 °C)	3 (2)	0	2 (3)	1 (1)
Leucocitosis > 12.000	73 (38)	10 (44)	29 (40)	34 (35)
Leucopenia < 4.000	21 (11)	0	7 (10)	14 (15)
Coagulopatía	3 (2)	0	0	3 (3)
Insuficiencia renal aguda	23 (12)	2 (9)	8 (11)	13 (14)
Gravedad de la infección				
Sepsis grave	22 (12)	0*	12 (17)	10 (10)
Shock séptico	28 (15)	3 (13)	8 (11)	17 (18)
Síndrome de disfunción multiorgánico	8 (4)	0	3 (4)	5 (5)
Índice Pitt				
Índice Pitt > 3	22 (12)	1 (4)	9 (13)	9 (10)
Índice Pitt [media (rango)]	1,6 (0-14)	1,3 (0-14)	1,7 (0-7)	1,6* (0-11)
PRONÓSTICO				
Éxito a los 30 días	47 (24,6)	3 (13)	15 (21)	29 (30)
Éxito a los 14 días	40 (85)	3 (13)	13 (18)	24 (25)

*Tres valores perdidos.

*Diferencias significativas:

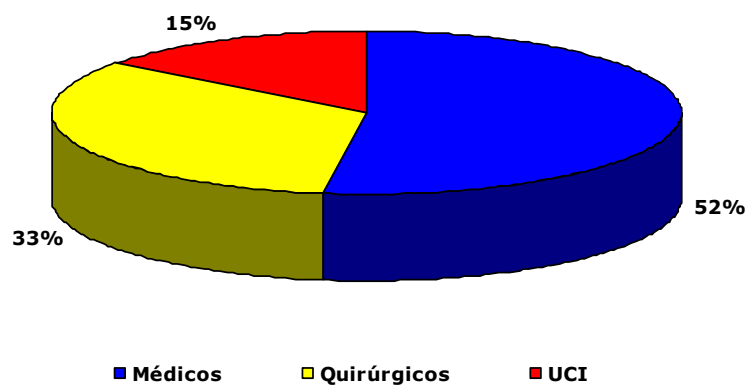
***N versus RCS**: Origen urinario (p=0,014).

***N versus EC**: Origen urinario (p=0,012).

***RCS versus EC**: Sepsis grave (p=0,035).

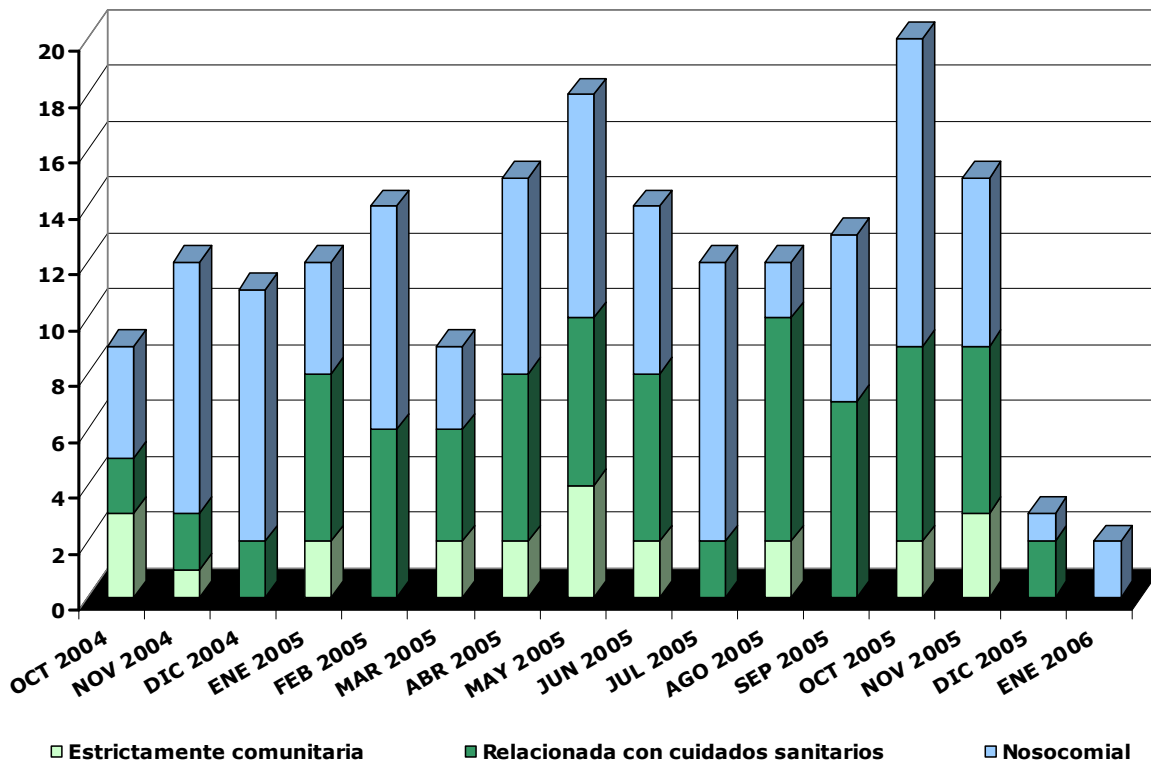
En cuanto a los casos nosocomiales, el 52% de los pacientes estaban ingresados en servicios médicos, el 33% en servicios quirúrgicos y el 15% en UCI (Figura 9). Los casos de origen comunitarios fueron principalmente detectados en los servicios de urgencias (72%) y en segundo lugar en los servicios médicos (27%).

Figura 9. Porcentaje de casos nosocomiales en función del servicio hospitalario donde se encontraba el paciente cuando se detectó la bacteriemia.



En la Figura 10 se muestra la distribución de los casos a lo largo del periodo de estudio. El rango de casos por mes fue desde 2 en enero de 2006 a 20 casos en octubre de 2005, con una media de 12 casos por mes. Desde el inicio del estudio hasta noviembre de 2005 se observó una tendencia creciente. En diciembre de 2005 y enero de 2006 se apreció un descenso brusco, en relación con el hecho de que solo una minoría de centros continuaron incluyendo casos en el estudio en estos dos meses.

Figura 10. Número de casos ocurridos en cada mes del estudio en función del tipo de adquisición de la bacteriemia.



4.5.1.1. Enfermedades de base

Las enfermedades de base más frecuentes fueron la neoplasia, diabetes y uropatía obstructiva. Los datos se muestran en la Tabla 18.

La comparación entre casos nosocomiales y comunitarios no arrojó grandes diferencias en las enfermedades de base; los porcentajes fueron similares con algunas excepciones. La enfermedad neurológica discapacitante y uropatía obstructiva crónica fueron más frecuentes entre los comunitarios. La mayoría de los casos comunitarios con enfermedad neurológica discapacitante eran relacionados con los cuidados sanitarios. El porcentaje de pacientes con enfermedad o tratamiento inmunosupresor fue mayor entre los casos nosocomiales. Entre los casos comunitarios todos los casos de neoplasia, cirrosis y neutropenia se dieron en aquellos que estaban relacionados con los cuidados sanitarios.

Entre las uropatías, la más frecuente fue la hiperplasia benigna de próstata seguida de la litiasis renal (42 y 26% respectivamente).

En cuanto a la gravedad de las enfermedades de base, el 56% de los pacientes padecía una enfermedad no fatal, el 36% de los pacientes tenía enfermedad últimamente fatal y el 8% restante rápidamente fatal. Medida la gravedad de la enfermedad de base mediante el índice de Charlson, el 55% de los pacientes tuvo un valor entre 0 y 2, por tanto, enfermedades de baja gravedad; el 29% tuvo valores de índice entre 3 y 5 y tan sólo un 3% tuvo entre 8 y 10. Los datos de los dos índices, Mc Cabe y Charlson fueron en general coincidentes. La mediana del índice de Charlson y el porcentaje de casos con índice de Charlson > 2 fueron inferiores para los casos estrictamente comunitarios que para los casos relacionados con los cuidados sanitarios y nosocomiales.

4.5.1.2. Utilización de procedimientos invasivos

El procedimiento más utilizado fue el catéter venoso, en el 41% de los pacientes, seguido del catéter central, sonda urinaria transitoria y cirugía. La ventilación mecánica fue empleada en el 4% de los pacientes. El 5% de los pacientes sufrieron un procedimiento endoscópico en la semana previa al hemocultivo, 9 pacientes de origen nosocomial y 1 comunitario. Prótesis biliar tuvieron el 6% de los pacientes, 7 nosocomiales y 4 comunitarios.

Comparando los casos nosocomiales frente a los comunitarios relacionados con los cuidados sanitarios se encontraron diferencias estadísticamente significativas (como era de esperar) en el empleo de sonda urinaria transitoria, catéter venoso, catéter central, cirugía un mes previo, sonda urinaria permanente, ventilación mecánica y procedimiento endoscópico una semana antes del hemocultivo.

4.5.1.3. Utilización de antimicrobianos previos

Entre los 191 casos, hubo 108 (57%) que recibieron al menos un antimicrobiano durante los dos meses previos al hemocultivo en el que se aisló *E. coli* productor de BLEE (Tabla 19). Hubo 48 pacientes que recibieron sólo un antibiótico, 60 recibieron 2, 23 pacientes recibieron 3 antibióticos diferentes y 10 fueron tratados con al menos 4 antibióticos.

De los casos nosocomiales, el 72% había recibido tratamiento antimicrobiano en los dos meses previos, mientras que de los casos comunitarios fue el 41% (específicamente, 46% entre los relacionados con los cuidados sanitarios y 26% entre los estrictamente comunitarios).

Las familias de antimicrobianos más empleadas fueron las cefalosporinas en el 28% de los pacientes, las quinolonas (26%) y las penicilinas (11%). Esto fue así también entre los casos nosocomiales, mientras que entre los casos relacionados con los cuidados sanitarios y estrictamente comunitarios, las quinolonas fueron los antibióticos más frecuentemente recibidos. El uso previo de cefalosporinas fue significativamente más frecuente en los casos nosocomiales que en los relacionados

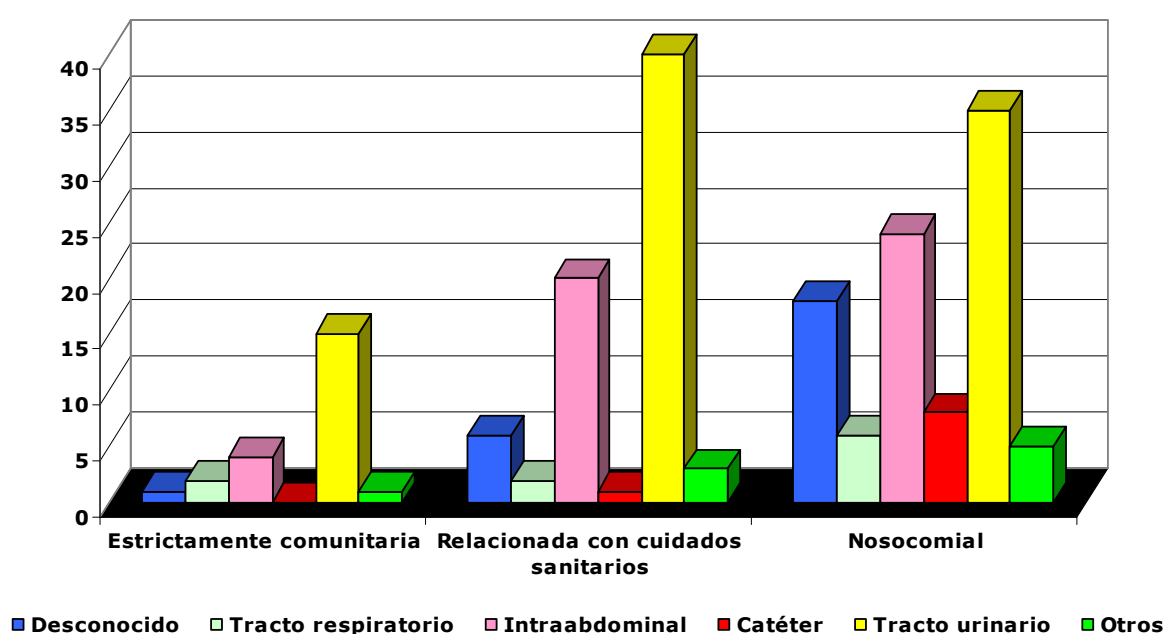
con los cuidados sanitarios y los estrictamente comunitarios (42, 15 y 9%, respectivamente).

4.5.2. Clínica

4.5.2.1. Origen de la bacteriemia

El origen de la bacteriemia predominante fue el urinario seguido del intraabdominal (47 y 25% respectivamente) (Figura 11 y Tabla 19). De las infecciones con causa intraabdominal fueron mayoritarias las de origen biliar con la mitad de los casos. El origen urinario fue significativamente más frecuente entre las bacteriemias estrictamente comunitarias y relacionadas con los cuidados sanitarios que entre las nosocomiales. Como se observa en la Figura 11, la distribución de orígenes fue mayor en las nosocomiales y menor en las estrictamente comunitarias.

Figura 11. Número de casos según el origen de la bacteriemia en función de la adquisición de la infección.



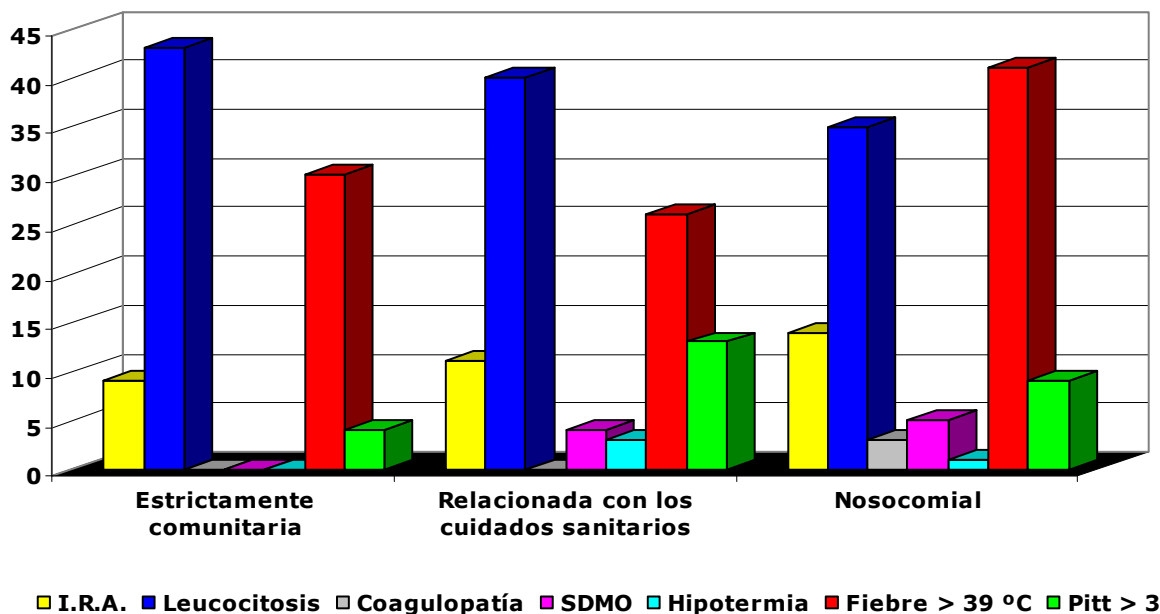
4.5.2.2. Gravedad en la presentación

La situación clínica del paciente fue medida a través de diferentes parámetros reflejados en la Tabla 19. En primer lugar se valoró el índice de Pitt medido el mismo día de la toma del hemocultivo. El 88% de los pacientes presentó un índice de Pitt con valores de 0 a 3; un 34% de los pacientes presentó un índice de Pitt de 0. La mediana de este índice fue muy similar para cada grupo de pacientes según la adquisición.

Durante las primeras 24 horas la situación clínica de los pacientes fue recogida a través de varios parámetros: 34% de los pacientes presentaron fiebre mayor de 39 °C y 38% tuvieron leucocitosis con un recuento superior a 12.000 células/L. El 12% presentaron insuficiencia renal aguda, y el 11% leucopenia. Los datos en función de la adquisición se muestran en la Figura 12 y en la Tabla 19.

En cuanto a la gravedad del SRIS, el 11% presentó sepsis grave y el 15% shock séptico. En cuanto a la adquisición, presentaron sepsis grave o shock séptico el 13% de los pacientes estrictamente comunitarios y el 28% de los nosocomiales y de los relacionados con los cuidados sanitarios.

Figura 12. Datos clínicos en las primeras 24 horas de los pacientes con bacteriemias por *E. coli* BLEE en función de la adquisición de la infección. (I.R.A.: Insuficiencia Renal Aguda, SDMO: Síndrome de Disfunción Multi Orgánico).



4.5.3. Terapia antimicrobiana

4.5.3.1. Tratamiento antimicrobiano empírico y dirigido

A. Empírico

Los datos se muestran en la Tabla 20. Casi la totalidad de los pacientes, el 95%, recibió algún antibiótico de forma empírica, 9 no recibieron ningún antimicrobiano (5 comunitarios, 3 relacionados con los cuidados sanitarios y 2 estrictamente comunitarios, y 4 nosocomiales).

La familia de antimicrobianos más empleada fue la de los BLIBL: 70% en los casos estrictamente comunitarios, 44% en los relacionadas con los cuidados

sanitarios y en el 29% de los nosocomiales. Las cefalosporinas fueron los segundos antibióticos más empleados, alrededor del 30% de los pacientes de los tres grupos. Le siguieron las fluorquinolonas, en el 24% de las bacteriemias relacionadas con los cuidados sanitarios y en el 17% de las nosocomiales, no se utilizó en ningún paciente estrictamente comunitario. Las carbapenemas fueron la cuarta familia de antimicrobianos más empleada: 22% en casos nosocomiales, 10% en casos comunitarios relacionados con los cuidados sanitarios y 4% en el grupo estrictamente comunitario. En cuanto a antibióticos individuales, el más utilizado fue amoxicilina-clavulánico en el 26% de los pacientes (49), seguido de ceftriaxona (19%), piperacilina-tazobactam (14%), imipenem (12%) y ciprofloxacino (11%). En los tres grupos estudiados los antibióticos más empleados fueron los mismos y en el mismo orden que a nivel global, a excepción de los casos nosocomiales en los que se utilizó con mayor frecuencia imipenem (17%, 16 pacientes).

De los 182 pacientes que recibieron terapia antimicrobiana empírica, 60 (31%) fueron tratados con 2 antibióticos. Entre los nosocomiales la variedad de antibióticos empleados fue mayor, encontrándose combinaciones de cefalosporinas con fluorquinolonas, con aminoglucósidos y con glicopéptidos fundamentalmente. Hubo combinaciones en 5 casos con alguna carbapenema, en 3 casos con amoxicilina-clavulánico y en 4 con piperacilina-tazobactam. En los pacientes de adquisición comunitaria se emplearon menor número de combinaciones, siendo la mayoría fluorquinolonas, cefalosporinas, amoxicilina-clavulánico y piperacilina-tazobactam. En función del servicio hospitalario en el que se encontraban los pacientes, amoxicilina-clavulánico fue el más empleado en urgencias, y piperacilina-tazobactam y las carbapenemas en la UCI.

El tratamiento antibiótico empírico fue inadecuado en 98 pacientes (51%).

Tabla 20. Número y porcentaje de pacientes que recibieron tratamiento antimicrobiano empírico, datos globales y en función de la adquisición de la infección, N° (%).

	GENERAL	ESTRICTAMENTE COMUNITARIA	RELACIONADA CON LOS CUIDADOS SANITARIOS	NOSOCOMIAL
	(N=191)	(EC)	(RCS)	(N)
	N=191	N=23	N=72	N=96
Tratamiento empírico	182 (95)	21 (91)	69 (96)	92 (96)
Tratamiento combinado	60 (31)	3 (13)	26 (36)	31 (32)
Carbapenemas	29 (15)	1 (4)	7 (10)	21 (22)
Imipenem	22 (12)	0	6 (8)	16 (17)
Ertapenem	0	0	0	0
Meropenem	7 (4)	1 (4)	1 (1)	5 (5)
β-lactámico/inhibidor β-lactamasas	76 (40)	16 (70)	32 (44)	28 (29)
Amoxicilina-clavulánico	49 (26)	13 (57)	22 (31)	14 (15)
Piperacilina-tazobactam	27 (14)	3 (13)	10 (14)	14 (15)
Fluorquinolonas	33 (17)	0	17 (24)	16 (17)
Ciprofloxacino	21 (11)	0	11 (15)	10 (10)
Levofloxacino	11 (6)	0	5 (7)	6 (6)
Norfloxacino	1 (1)	0	1 (1)	0
Cefalosporinas	62 (33)	6 (26)	27 (38)	29 (30)
Cefotaxima	6 (3)	0	3 (4)	3 (3)
Ceftriaxona	37 (19)	5 (22)	17 (24)	15 (16)
Ceftazidima	2 (1)	0	1 (1)	1 (1)
Cefuroxima	7 (4)	1 (4)	2 (3)	4 (4)
Cefepima	10 (5)	0	4 (6)	6 (6)
Aminoglucósidos	17 (9)	1 (4)	6 (8)	10 (10)
Amikacina	11 (6)	0	4 (6)	7 (7)
Gentamicina	4 (2)	1 (4)	2 (3)	1 (1)
Tobramicina	2 (1)	0	0	2 (2)

B. Dirigido

Los datos se encuentran reflejados en la Tabla 21; 144 (75%) recibieron un tratamiento dirigido específico para la infección, estando repartidos casi por igual en función de la adquisición (77% entre los nosocomiales y 74% entre los comunitarios; tampoco hubo diferencias entre los dos grupos de comunitarios: 75% entre los relacionados con los cuidados sanitarios y 70% entre los estrictamente comunitarios. De los 144 pacientes, 26 (14%) recibieron dos antimicrobianos.

Fueron empleados 20 antibióticos diferentes como tratamiento dirigido para las bacteriemias por *E. coli* productor de BLEE. La familia utilizada mayoritariamente fue la de las carbapenemas (92 pacientes, 48%), seguida de los BLIBL (33 pacientes, 17%), de las fluorquinolonas (20, 11%) y de los aminoglucósidos (13, 7%). En concreto los antimicrobianos más empleados fueron imipenem (33%), amoxicilina-clavulánico (15%) y ciprofloxacino (8%). No hubo diferencias significativas en función del tipo de adquisición.

Tabla 21. Número y porcentaje de pacientes que recibieron tratamiento antimicrobiano dirigido, datos globales y en función de la adquisición de la infección, Nº (%).

	GENERAL	ESTRICTAMENTE COMUNITARIA (EC)	RELACIONADA CON LOS CUIDADOS SANITARIOS (RCS)	NOSOCOMIAL (N)
	(N=191)	(N=23)	(N=72)	(N=96)
Tratamiento dirigido	144 (75)	16 (70)	54 (75)	74 (77)
Carbapenemas	92 (48)	6 (26)	33 (46)	53 (55)
Imipenem	62 (33)	4 (17)	19 (26)	39 (41)
Ertapenem	19 (10)	1 (4)	10 (14)	8 (8)
Meropenem	11 (6)	1 (4)	4 (6)	6 (6)
β-lactámico/inhibidor β-lactamasas	33 (17)	6 (26)	14 (19)	14 (15)
Amoxicilina-clavulánico	28 (15)	6 (26)	10 (14)	12 (13)
Piperacilina-tazobactam	6 (3)	0	4 (6)	2 (2)
Fluorquinolonas	20 (11)	1 (4)	9 (13)	10 (10)
Ciprofloxacino	15 (8)	1 (4)	7 (10)	7 (7)
Levofloxacino	4 (2)	0	2 (3)	2 (2)
Enoxacino	1 (0,5)	0	0	1 (1)
Cefalosporinas	2 (1)	1 (4)	1 (1)	0
Cefotaxima	1 (0,5)	1 (4)	0	0
Cefuroxima	1 (0,5)	0	1 (1)	0
Aminoglucósidos	13 (7)	1 (4)	3 (4)	9 (9)
Amikacina	6 (3)	0	1 (1)	5 (5)
Gentamicina	7 (4)	1 (4)	2 (3)	4 (4)
Fosfomicina	1 (0,5)	1 (4)	0	0

4.6. Factores de riesgo

4.6.1. Bacteriemias de adquisición comunitaria

4.6.1.1. Análisis univariante

La comparación entre los casos y los dos grupos de controles respecto a los factores predisponentes se muestra en la Tabla 22.

Los casos presentaron con más frecuencia que los controles A (pacientes con sepsis) una edad > 65 años, relación con los cuidados sanitarios, cirrosis y uropatía obstructiva; también tenían con más frecuencia catéter urinario y habían sido sometidos a una cirugía. En relación con los controles B (pacientes con bacteriemia por *E. coli* no BLEE) presentaron con más frecuencia el género femenino, relación con los cuidados sanitarios, índice de Charlson > 2, cirrosis y enfermedad pulmonar crónica; también tuvieron más frecuentemente catéter urinario y cirugía.

En cuanto a los antibióticos, el uso previo de antimicrobianos fue mayor en los casos que en los dos grupos de controles, específicamente el empleo de fluorquinolonas, además del empleo de cefalosporinas respecto de los controles B.

El origen de la bacteriemia no presentó diferencias significativas entre los casos de bacteriemias por *E. coli* BLEE y los controles B (bacteriemias por *E. coli* no BLEE) (Tabla 23).

4.6.1.2. Análisis multivariante

Para el estudio de factores de riesgo de las bacteriemias comunitarias por *E. coli* BLEE se realizó análisis multivariante por separado para la población con sepsis (grupo control A). Se introdujeron las variables siguientes: edad, sexo, relación con

los cuidados sanitarios, índice de Charlson, diabetes mellitus, cirrosis hepática, uropatía obstructiva, enfermedad biliar obstructiva, uso de catéter urinario, cirugía y uso reciente de antimicrobianos. Posteriormente se realizaron modelos en los que las variables relación con los cuidados sanitarios y uso reciente de antimicrobianos se sustituyeron por sus tipos específicos.

Para la población con bacteriemias por *E. coli*, el grupo control B, se incluyeron en el estudio multivariante las siguientes variables: edad, sexo, relación con los cuidados sanitarios, índice de Charlson, diabetes mellitus, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, cirrosis hepática, uso de catéter urinario, cirugía y uso reciente de antimicrobianos. También se realizaron modelos en los que las variables relación con los cuidados sanitarios y uso reciente de antimicrobianos se sustituyeron por sus tipos específicos.

Los modelos multivariantes finales se muestran en las Tablas 24.A y 24.B. Fueron factores de riesgo independientes con respecto a los controles A: edad > 65 años, sexo femenino, cirrosis, uropatía obstructiva, catéter urinario, bacteriemia relacionada con los cuidados sanitarios (específicamente: residente en centro sociosanitario) y uso previo de antibióticos (específicamente: flouoroquinolonas).

Con respecto a los controles B fueron factores de riesgo independientes: enfermedad pulmonar obstructiva crónica, catéter urinario, bacteriemia relacionada con los cuidados sanitarios (específicamente: residente en centro sociosanitario) y uso previo de antibióticos (específicamente: flouoroquinolonas y cefalosporinas).

Considerando los 3 factores de riesgo comunes para las dos poblaciones (bacteriemia relacionada con los cuidados sanitarios, catéter urinario y uso reciente de antibióticos), 20 casos (21%) no estaba expuesto a ninguno de ellos.

Tabla 22. Análisis univariante de factores de riesgo de pacientes caso con bacteriemias de adquisición comunitaria producidas por *E. coli* BLEE comparado con pacientes con sepsis de adquisición comunitaria (Control A) y con pacientes con bacteriemias de adquisición comunitaria producidas por *E. coli* no-BLEE (Control B), N° (%).

	CASOS (N=95)	GRUPO CONTROL A (N=190)	OR (95% IC)	p	GRUPO CONTROL B (N=188)	OR (95% IC)	p
Edad > 65 años	69 (73)	96 (51)	2,5 (1,5-4,3)	< 0,001	120 (64)	1,5 (0,8-2,5)	0,1
Género femenino	42 (44)	80 (42)	1,0 (0,6-1,7)	0,7	105 (56)	0,6 (0,3-1,0)	0,06
BACTERIEMIAS COMUNITARIAS RELACIONADAS CON LOS CUIDADOS SANITARIOS	72 (76)	102 (54)	2,6 (1,5-4,6)	< 0,001	99 (53)	2,8 (1,6-4,8)	< 0,001
Ingreso previo	45 (47)	63 (33)	1,8 (1,0-2,9)	0,02	57 (30)	2,0 (1,2-3,4)	0,005
Centro sociosanitario	10 (11)	3 (2)	7,2 (1,9-27,1)	0,001	5 (3)	4,3 (1,4-12,9)	0,005
Hemodiálisis	4 (4)	4 (2)	2,0 (0,4-8,3)	0,3	0	-	0,005
Hospital de día	37 (39)	59 (31)	1,4 (0,8-2,4)	0,1	49 (26)	1,8 (1,0-3,0)	0,02
Hospital domiciliario	2 (2)	2 (1)	2,0 (0,2-14,5)	0,4	1 (1)	4,0 (0,3-44,9)	0,2
Transplantado	0	1 (1)	-	0,4	6 (3)	-	0,07
PATOLOGÍA DE BASE							
Índice Charlson > 2	46 (48)	71 (38)	1,5 (0,9-2,5)	0,08	58 (31)	2,1 (1,2-3,4)	0,004
Diabetes mellitus	24 (25)	36 (19)	1,4 (0,7-2,5)	0,2	40 (21)	1,2 (0,7-2,3)	0,4
Enfermedad pulmonar crónica	18 (19)	33 (18)	1,1 (0,5-2,0)	0,7	13 (7)	3,1 (1,4-6,7)	0,002
Insuficiencia cardíaca	11 (12)	19 (10)	1,1 (0,5-2,5)	0,6	22 (12)	0,9 (0,4-2,1)	0,9
Neoplasia	24 (25)	35 (19)	1,4 (0,8-2,6)	0,1	44 (23)	1,1 (0,6-1,9)	0,7
Cirrosis	10 (11)	6 (3)	3,5 (1,2-10,1)	0,01	8 (4)	2,6 (1,0-6,9)	0,04
Insuficiencia renal crónica	10 (11)	14 (7)	1,4 (0,6-3,4)	0,3	11 (6)	1,8 (0,7-4,6)	0,1
Tratamiento inmunosupresor	7 (7)	25 (13)	0,5 (0,2-1,2)	0,1	19 (10)	0,7 (0,2-1,7)	0,4
Uropatía obstructiva	26 (27)	16 (9)	4,0 (2,0-8,0)	< 0,001	43 (23)	1,2 (0,7-2,2)	0,4
Enfermedad biliar obstructiva	8 (8)	7 (4)	2,3 (0,8-6,8)	0,09	21 (11)	0,7 (0,3-1,7)	0,4
Neutropenia	4 (4)	7 (4)	1,1 (0,3-4,0)	0,8	12 (6)	0,6 (0,2-2,0)	0,4
Catéter venoso	8 (8)	10 (5)	1,6 (0,6-4,3)	0,3	10 (5)	1,6 (0,6-4,2)	0,3

Catéter urinario	23 (24)	17 (9)	3,2 (1,6-6,4)	0,001	17 (9)	3,2 (1,6-6,3)	0,001
Cirugía	12 (13)	10 (5)	2,5 (1,0-6,2)	0,02	7 (4)	3,7 (1,4-9,8)	0,005
USO ANTIMICROBIANOS PREVIOS	39 (41)	44 (23)	2,2 (1,3-3,8)	0,002	34 (18)	3,1 (1,8-5,4)	< 0,001
Aminopenicilinas	7 (7)	22 (12)	0,6 (0,2-1,4)	0,2	13 (7)	1,0 (0,4-2,7)	0,8
Cefalosporinas	12 (13)	17 (9)	1,4 (0,6-3,2)	0,3	2 (1)	13,4 (2,9-61,4)	< 0,001
Fluorquinolonas	23 (24)	15 (8)	3,7 (1,8-7,5)	< 0,001	10 (5)	5,6 (2,5-12,5)	< 0,001

*IC: Intervalo de confianza, OR: Odds ratio

Tabla 23. Origen de las bacteriemias de adquisición comunitaria causadas por *E. coli* BLEE y *E. coli* no BLEE (Control B), N° (%).

	CASOS (N=95)	GRUPO CONTROL B¹ (N=187)	p
No determinado	7 (7)	24 (13)	0,1
Tracto urinario	55 (58)	119 (63)	0,3
Infección intraabdominal ²	25 (26)	35 (19)	0,1
Tracto respiratorio	4 (4)	8 (5)	0,6
Otros ³	4 (4)	2 (1)	0,1

¹Un paciente fue excluido por falta de datos.

²Peritonitis espontánea (6 casos, 1 control); peritonitis secundaria (6 casos, 11 controles); enteritis (1 caso, 2 controles); colangitis (12 casos, 21 controles).

³Tejido blando (1 caso); relacionado con catéter (1 caso); tracto genital (1 caso, 2 controles); osteomielitis (1 caso).

Tabla 24. Análisis multivariante de los factores de riesgo para las bacteriemias comunitarias causadas por *E. coli* BLEE.

A). Comparado con el grupo control A, población inicial con sepsis de adquisición comunitaria.

	OR (95% IC)	p
MODELO GENERAL		
Edad > 65 años	2,3 (1,2-4,3)	0,005
Género femenino	1,9 (1,07-3,5)	0,02
Bacteriemia relacionada con cuidados sanitarios	2,1 (1,2-3,8)	0,008
Cirrosis	4,7 (1,4-15,4)	0,008
Uropatía obstructiva crónica	3,5 (1,5-7,8)	0,001
Catéter urinario	2,3 (1,05-5,0)	0,03
Uso reciente de antimicrobianos	1,9 (1,03-3,5)	0,03
MODELO CON ESPECÍFICOS TIPOS DE RELACIÓN CON LOS CUIDADOS SANITARIOS*		
Residencia en centros sociosanitarios	8,6 (2,0-36,2)	0,003
MODELO CON ANTIMICROBIANOS ESPECÍFICOS*		
Fluorquinolonas	2,8 (1,2-6,5)	0,01

B). Comparado con el grupo control B, bacteriemias de adquisición comunitaria producidas por *E. coli*.

	OR (95% IC)	p
MODELO GENERAL		
Bacteriemia relacionada con cuidados sanitarios	2,1 (1,2-3,8)	0,008
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	3,1 (1,3-7,0)	0,005
Catéter urinario	3,1 (1,5-6,5)	0,001
Uso reciente de antimicrobianos	2,7 (1,5-4,9)	0,0008
MODELO CON ESPECÍFICOS TIPOS DE RELACIÓN CON LOS CUIDADOS SANITARIOS*		
Residencia en centros sociosanitarios	5,3 (1,6-17,3)	0,005
MODELO CON ANTIMICROBIANOS ESPECÍFICOS*		
Fluorquinolonas	4,7 (2,0-11,1)	0,0003
Cefalosporinas	10,3 (2,1-50,3)	0,003

* Las variables restantes incluidas en los modelos generales no están mostradas porque los valores de OR y p no muestran cambios significativos.

4.6.2. Bacteriemias de adquisición nosocomial

4.6.2.1. Análisis univariante

En el análisis univariante de las bacteriemias de adquisición nosocomial por *E. coli* BLEE comparadas con la población con sepsis (controles A) y con la población con bacteriemia por *E. coli* no BLEE (control B) hubo pocas variables que presentaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 25).

Los casos presentaron con más frecuencia que los controles A una uropatía obstructiva, procedimiento urológico, diabetes mellitus, catéter urinario y estancia previa en hospital. En relación con los controles B presentaron con más frecuencia edad > 65 años, transplantado y estancia previa en hospital. En cuanto a los antibióticos, el uso previo de antimicrobianos fue mayor en los casos que en los dos grupos de controles, y específicamente el empleo de cefalosporinas y fluorquinolonas.

El estudio comparativo del origen de las bacteriemias no presentó diferencias significativas entre las producidas por *E. coli* BLEE (casos) y las producidas por *E. coli* no BLEE (controles B), aunque sí fue más frecuente el origen desconocido entre los controles (Tabla 26).

4.6.2.2. Análisis multivariante

En el estudio multivariante de las variables asociadas a las bacteriemias de adquisición nosocomial por *E. coli* BLEE se utilizaron diferentes variables según el tipo de grupo control comparado (Tabla 27). Para la población con sepsis, el grupo control A, se incluyeron en el estudio multivariante las siguientes variables: edad, sexo, estancia previa en el hospital, índice de Charlson, diabetes mellitus, uropatía obstructiva, uso de catéter urinario, cualquier otro procedimiento invasivo del tracto urinario y el empleo reciente de antimicrobianos.

Las variables estudiadas en el análisis multivariante de los factores de riesgo para las bacteriemias de origen nosocomial causadas por *E. coli* BLEE en la población con bacteriemia por *E. coli* fueron: edad, sexo, estancia previa en el hospital, índice de Charlson, transplante, hemodiálisis, el uso reciente de antimicrobianos y origen desconocido de la bacteriemia.

Los modelos multivariantes finales se muestran en las Tablas 27.A) y 27.B). Fueron factores de riesgo independientes con respecto a los controles A: diabetes mellitus y uso previo de cefalosporinas.

Con respecto a los controles B fueron factores de riesgo independientes: transplante, origen desconocido, estancia previa en hospital y uso previo de cefalosporinas.

Tabla 25. Análisis univariante de factores de riesgo de pacientes caso con bacteriemias de adquisición nosocomial producidas por *E. coli* BLEE comparado con pacientes con sepsis de adquisición nosocomial (Control A) y con pacientes con bacteriemias de adquisición nosocomial producidas por *E. coli* no BLEE (Control B), N° (%).

	CASOS (N=96)	GRUPO CONTROL A (N=190)	OR (95% IC)	p	GRUPO CONTROL B (N=186)	OR (95% IC)	p
Edad >65 años	45 (47)	97 (51)	0,8 (0,5-1,3)	0,5	115 (62)	0,5 (0,3-0,8)	0,01
Género femenino	42 (44)	73 (38)	1,2 (0,7-2,0)	0,3	76 (41)	1,1 (0,6-1,8)	0,6
Estancia previa en hospital*	24 (31)	18 (18)	-	0,05	15 (13)	-	0,001
PATOLOGÍA DE BASE							
Índice Charlson > 2	40 (42)	64 (34)	1,4 (0,8-2,3)	0,1	71 (38)	1,1 (0,7-1,9)	0,5
Transplantado	9 (9)	9(5)	2,0 (0,7-5,4)	0,1	5 (3)	3,7 (1,2-11,5)	0,02
Diabetes mellitus	28 (29)	38 (20)	1,6 (0,9-5,4)	0,08	43 (23)	1,3 (0,7-2,3)	0,2
Enfermedad pulmonar crónica	16 (17)	27 (14)	1,2 (0,6-2,3)	0,5	23 (12)	1,4 (0,7-2,8)	0,3
Insuficiencia cardíaca	13 (14)	24 (13)	1,0 (0,5-2,2)	0,8	24 (23)	1,0 (0,5-2,1)	0,8
Neoplasia	31 (32)	61 (32)	1,0 (0,5-1,7)	0,9	77 (41)	0,6 (0,4-1,1)	0,1
Cirrosis	8 (8)	11 (6)	1,4 (0,5-3,8)	0,4	11 (6)	1,4 (0,5-3,7)	0,4
Insuficiencia renal crónica	18 (19)	28 (15)	1,3 (0,6-2,5)	0,3	23 (12)	1,6 (0,8-3,2)	0,1
Tratamiento inmunosupresor	20 (21)	34 (18)	1,2 (0,6-2,2)	0,5	33 17()	1,2 (0,6-2,2)	0,5
Uropatía obstructiva	16 (17)	18 (10)	1,9 (0,9-3,9)	0,07	24 (13)	1,3 (0,6-2,6)	0,3
Enfermedad biliar obstructiva	10 (10)	14 (7)	1,4 (0,9-3,9)	0,3	15 (13)	0,7 (0,3-1,6)	0,4
Neutropenia	6 (6)	9 (5)	1,3 (0,4-3,4)	0,5	15 (8)	0,7 (0,2-2,0)	0,5
Catéter venoso central	45 (47)	88 (46)	1,0 (0,6-1,6)	0,9	77 (40)	1,3 (0,8-2,1)	0,2
Catéter urinario	43 (45)	65 (34)	1,5 (0,9-2,5)	0,08	70 (38)	1,3 (0,8-2,2)	0,2
Ventilación mecánica	8 (8)	22 (12)	0,6 (0,2-1,6)	0,3	18 (10)	0,8 (0,3-2,0)	0,7
Cirugía	32 (33)	62 (33)	1,0 (0,6-4,7)	0,9	48 (26)	1,4 (0,8-2,4)	0,1
Procedimiento endoscópico	9 (9)	10 (5)	1,8 (0,7-4,7)	0,1	13 (7)	1,3 (0,5-3,3)	0,4
Procedimiento urológico	7 (7)	5 (3)	2,9 (0,8-9,4)	0,06	10 (5)	1,3 (0,5-3,7)	0,5

ANTIMICROBIANOS PREVIOS	69 (72)	92 (48)	2,7 (1,6-4,6)	< 0,001	96 (52)	2,3 (1,4-4,0)	0,001
Aminopenicilinas	13 (14)	31 (16)	0,8 (0,3-1,6)	0,5	37 (20)	0,6 (0,3-1,2)	0,1
Oximino-β-lactámicos	35 (37)	28 (15)	3,3 (1,8-5,9)	< 0,001	17 (9)	5,7 (2,9-10,9)	< 0,001
Carbapenemas	8 (8)	16 (8)	0,9 (0,4-2,3)	0,9	8 (4)	2,0 (0,7-5,5)	0,1
Fluorquinolonas	24 (25)	28 (15)	1,9 (1,0-3,5)	0,03	27 (15)	1,9 (1,0-3,6)	0,03

*Media de días (Desviación estándar).

Tabla 26. Origen de las bacteriemias nosocomiales causadas por *E. coli* BLEE comparado con pacientes con bacteriemias de adquisición nosocomial producidas por *E. coli* no BLEE (Control B), N° (%).

	CASOS (N=96)	GRUPO CONTROL B (N=186)	OR (95% IC)	P
Infección del tracto urinario	34 (35)	63 (34)	1,0 (0,6-1,8)	0,7
Infección intraabdominal ¹	24 (25)	45 (24)	1,0 (0,7-1,9)	0,8
Infección tracto respiratorio ²	6 (6)	7 (4)	1,7 (0,4-1,8)	0,3
Infección por catéter venoso	8 (8)	7 (4)	1,6 (0,9-2,6)	0,1
Otros	5 (5)	9 (5)	1,0 (0,3-3,6)	0,8
Desconocido	19 (20)	55 (30)	0,6 (0,3-1,1)	0,07

¹ Infección del tracto biliar en 12 pacientes caso y 28 pacientes control.

² Neumonía en 4 pacientes caso y 5 en pacientes control.

Tabla 27. Análisis multivariante de los factores de riesgo para bacteriemias de adquisición nosocomial producidas por *E. coli* BLEE.

A). Comparado con el grupo control A, población inicial con sepsis de adquisición nosocomial.

	COEFICIENTE β	OR (95% IC)	P
Diabetes mellitus	0,5	1,6 (0,9-2,9)	0,09
Uso previo de oxi-imino- β -lactámicos	1,16	3,1 (1,7-5,7)	< 0,001
Estancia en hospital (por día)	0,007	1,00 (0,99-1,01)	0,1

B). Comparado con el grupo control B, bacteriemias de adquisición nosocomial producidas por *E. coli*.

	COEFICIENTE β	OR (95% IC)	P
Transplante	1,57	4,8 (1,4-15,7)	0,009
Uso previo oxi-imino- β -lactámicos	1,79	6,0 (3,0-11,8)	< 0,001
Origen desconocido	- 0,71	0,4 (0,2-0,9)	0,03
Estancia en hospital (por día)	0,02	1,02 (1,00-1,03)	0,01

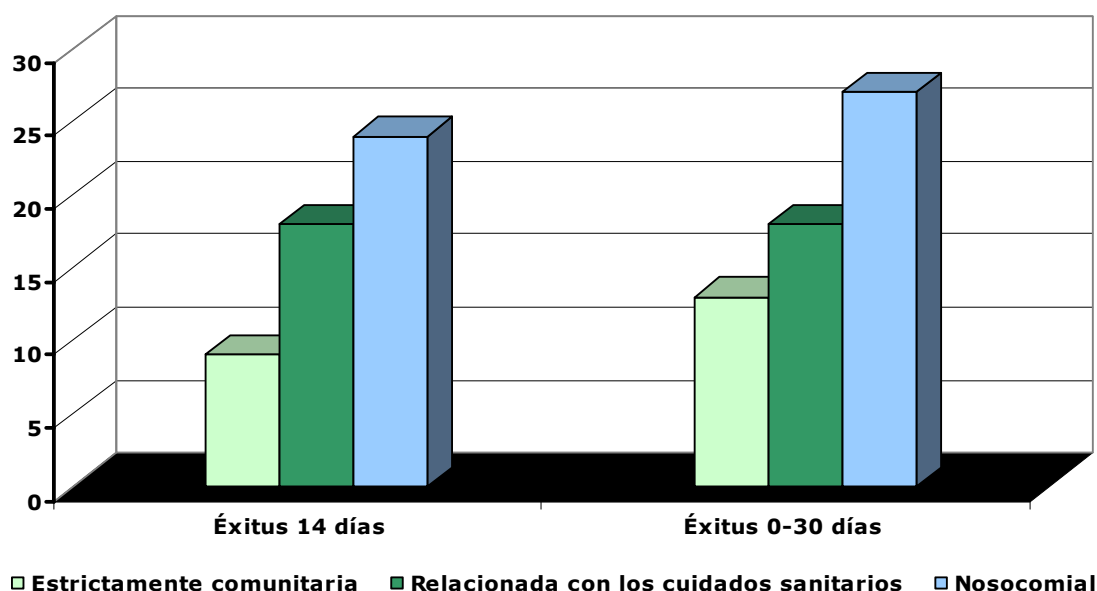
4.7. Análisis pronóstico

4.7.1. Mortalidad global

Fallecieron 47 pacientes de los 191 casos incluidos en el estudio (mortalidad en el día 30: 24,6%), 38 en los primeros 14 días tras realizarse el hemocultivo (mortalidad en el día 14: 20,9%).

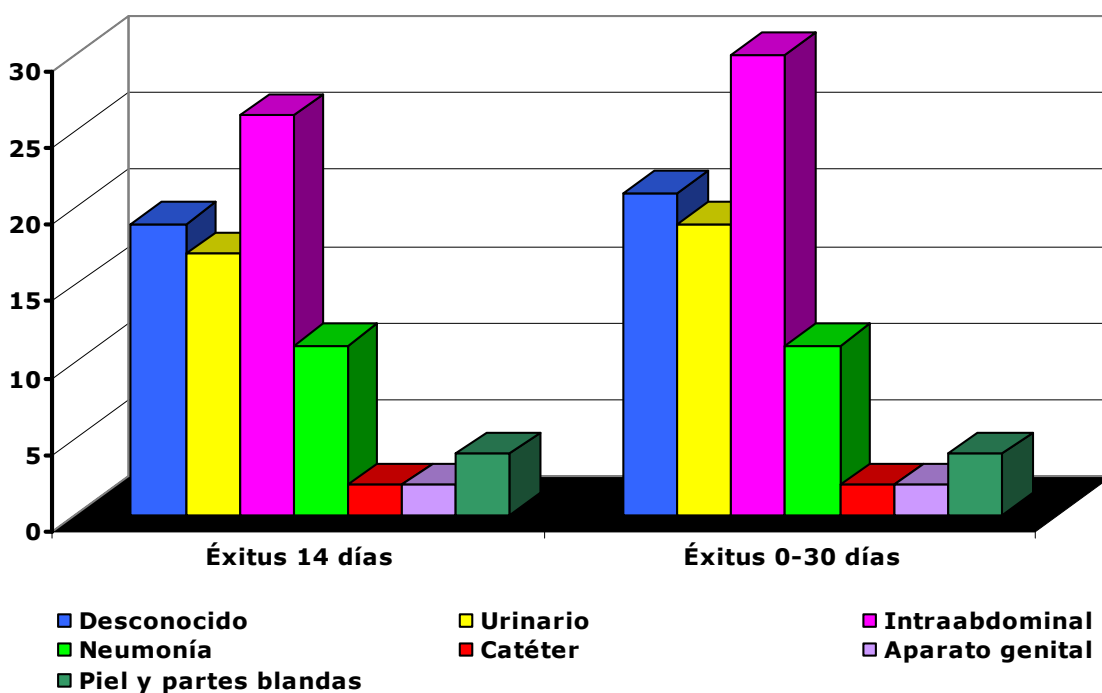
La mortalidad fue significativamente mayor entre los casos nosocomiales que entre los relacionadas con los cuidados sanitarios y estrictamente comunitarios (30, 21 y 13%, respectivamente).

Figura 13. Porcentaje de casos éxitos en función de la adquisición de la infección y el periodo de tiempo en el que se produjo desde la toma del hemocultivo: a los 14 días y entre 0-30 días.



La mortalidad fue mayor en las bacteriemias de origen intraabdominal (34%), seguido del origen desconocido (19%) y urinario (17%) (Figura 14).

Figura 14. Porcentaje de casos éxitus en función del origen de la infección y periodo de tiempo en el que se produjo desde la toma del hemocultivo: a los 14 días y entre 0-30 días.



La mortalidad en función de los antibióticos recibidos empíricamente se muestra en la Tabla 28, en función de la CMI. Es necesario tener en cuenta que estos datos son crudos, sin que estén controlados por otras variables como la gravedad del SRIS, del origen, etc.

Tabla 28. Mortalidad según CMI del antimicrobiano utilizado empíricamente (sólo o combinado). Los datos se muestran como el número de pacientes que fueron éxitos para cada CMI del antimicrobiano que recibieron de forma empírica/el número de tratados.

	CMI (mg/L)														TOTAL (%)
	≤ 0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	
Cefalosporinas															
Cefotaxima/ ceftriaxona/cefepima						0/1	1/1	1/1	0/1	2/3	1/4	4/10	1/3	7/29	17/53 (32)
Carbapenemas															
Imipenem/meropenem	1/3	2/2	0/8	5/13	1/1										9/29 (31)
Otros															
Amoxicilina-clavulánico								0/2	5/32	3/12	0/3				8/49 (16,3)
Piperacilina-tazobactam					0/1	0/4	1/9	0/3	1/4	1/4	0/1			0/1	3/27 (11,1)
Ciprofloxacino		1/2		0/2	0/2				1/1	1/2	1/6	0/2	3/3	0/1	7/21 (33,3)
Amikacina							0/1	1/6	2/3	1/1					4/11 (36,4)

Color: Verde: sensible; amarillo: sensibilidad intermedia; rojo: resistente.

4.7.2. Análisis de mortalidad en bacteriemias de adquisición comunitaria

En las bacteriemias comunitarias por *E. coli* realizamos un análisis de las variables asociadas a la mortalidad en el día 30, incluyendo los casos y los controles B.

Tanto la gravedad aguda de la enfermedad, medida como índice de Pitt, como el tratamiento empírico inapropiado fueron más elevados en los pacientes con bacteriemias de adquisición comunitaria producidas por *E. coli* BLEE que en no-BLEE, así como la mortalidad a día 14, siendo significativamente diferentes (Tabla 29).

Tabla 29. Factores clínicos y pronósticos de pacientes con bacteriemias de adquisición comunitaria causadas por *E. coli* BLEE y *E. coli* no BLEE (Control B), N° (%).

	CASOS (N=95)	GRUPO CONTROL B ¹ (N=187)	p
Índice Pitt > 1	40 (42)	42 (22)	< 0,001
Sepsis grave o shock séptico	23 (24)	40 (21)	0,5
Tratamiento empírico inapropiado	55 (58)	22 (12)	< 0,001
Mortalidad a día 14	16 (17)	15 (8)	0,02

* Un paciente fue excluido por falta de datos.

Los resultados del análisis univariante y multivariante de las variables asociadas a la mortalidad se muestran en la Tabla 30.

La producción de BLEE se asoció con mayor mortalidad en el análisis univariante, pero no en el multivariante.

Tabla 30. Análisis univariante y multivariante de las variables asociadas a la mortalidad entre los 282* pacientes (95 casos y 188 controles B) con bacteriemias de adquisición comunitaria por *E. coli*.

	Nº ÉXITOS/ Nº PACIENTES EN LA CATEGORÍA (%)	RR (95% IC)	P	OR AJUSTADA	P
Género					
Mujer	16 /147 (11)	1,0 (0,5-1,9)	0,9	-	
Hombre	15/135 (11)				
Edad					
> 65 años	25/188 (13)	2,0 (0,8-5,0)	0,08	-	
≤ 65 años	6/94 (6)				
Índice Charlson					
> 2	10/42 (24)	2,7 (1,3-5,5)	0,004	-	
≤ 2	21/240 (9)				
Adquisición					
Comunitario estricto	17/152 (11)	0,8 (0,4-1,5)	0,9	-	
Relacionado con los cuidados sanitarios	14/130 (11)				
Origen de la bacteriemia					
Tracto urinario	13/174 (7)	0,4 (0,2-0,8)	0,01	0,3 (0,1-0,8)	0,001
Otros	18/108 (16)				
Índice Pitt					
> 1	20/82 (24)	4,5 (2,2-9,0)	< 0,001	5,3 (2,3-12,2)	< 0,001
≤ 1	11/200 (5)				
Sepsis grave o shock séptico					
Sí	13/63 (21)	2,5 (1,4-5,0)	0,005	-	
No	18/219 (8)				
Tratamiento empírico					
Inapropiado	17/77 (22)	3,3 (1,6-6,2)	< 0,001	3,0 (1,3-12,2)	0,007
Apropiado	14/205 (7)				
Productor de BLEE					
Sí	16/95 (17)	2,1 (1,0-4,1)	0,02	-	
No	15/187 (8)				

* Un paciente con bacteriemia de origen comunitario por *E. coli* no productor de BLEE fue excluido por falta de datos.

4.7.3. Bacteriemias de adquisición nosocomial

En el caso de las bacteriemias nosocomiales, por la mayor heterogeneidad clínica y de manejo clínico de los casos y los controles, no realizamos una comparación entre estos. En su lugar, sólo realizamos un análisis de la mortalidad en las bacteriemias productoras de BLEE.

El análisis multivariante de los factores de riesgo asociados a la mortalidad a día 14 y día 30 entre los pacientes con bacteriemias de origen nosocomial causadas por *E. coli* BLEE arrojó como factores independientes asociados a la mortalidad los mismos si se trataba a día 14 que a día 30: índice de Pitt > 1, origen de la infección de alto riesgo, sepsis grave o shock séptico y más de 3 puntos de resistencia (Tabla 31.A y 31.B).

Tabla 31. Análisis univariante y multivariante de los factores de riesgo asociados a la mortalidad a día 14 (A) y día 30 (B) de pacientes con bacteriemias de adquisición nosocomial producidas por *E. coli* BLEE.

A). A día 14.

	Nº ÉXITOS/ Nº PACIENTES EN LA CATEGORÍA (%)	RR (95% IC)	P para el RR	OR AJUSTADA (95% IC)	P ajustada para OR
Género					
Mujer	13 /54 (24)	1,0 (0,5-2,1)	0,8	-	
Hombre	11/42 (26)				
Edad					
> 65 años	12/45 (27)	1,1 (0,5-2,2)	0,7	-	
14 - 65 años	12/51 (24)				
Índice Charlson					
> 2	15/40 (38)	2,3 (1,1-4,7)	0,01	-	
≤ 2	9/56 (16)				
Índice Pitt					
> 1	17/37 (46)	3,8 (1,7-8,4)	< 0,001	3,9 (1,2-12,9)	0,02
≤ 1	7/59 (12)				
Origen de alto riesgo*					
Sí	19/48 (40)	3,8 (1,5-9,3)	0,001	5,5 (1,4-21,9)	0,01
No	5/48 (10)				
Sepsis grave o shock séptico					
Sí	15/27 (56)	4,2 (2,1-8,5)	< 0,001	4,6 (1,4-15,2)	0,01
No	9/69 (13)				
Número de resistencias					
> 3	8/16 (50)	2,5 (1,2-4,8)	0,02	6,5 (1,4-30,0)	0,01
≤ 3	16/80 (20)				
Tratamiento empírico					
Inapropiado	11/43 (26)	1,0 (0,5-2,0)	0,9		
Apropiado	11/53 (25)				

*Origen de alto riesgo: infección intraabdominal, infección del tracto respiratorio y origen desconocido.

B). A día 30.

	Nº ÉXITOS/ Nº PACIENTES EN LA CATEGORÍA (%)	RR (95% IC)	P para el RR	OR AJUSTADA (95% IC)	P ajustada para OR
Género					
Mujer	16 /54 (30)	1,0 (0,05-1,9)	0,8	-	
Hombre	13/42 (26)				
Edad					
> 65 años	14/45 (31)	1,0 (0,5-1,9)	0,8	-	
14 - 65 años	15/51 (29)				
Índice Charlson					
> 2	18/40 (45)	2,3 (1,2-4,3)	0,008	2,7 (0,8-9,0)	0,09
≤ 2	11/56 (20)				
Índice Pitt					
> 1	21/37 (57)	4,3 (2,0-9,0)	< 0,001	5,5 (1,9-21,3)	0,002
≤ 1	8/59 (14)				
Origen de alto riesgo*					
Sí	23/48 (48)	3,8 (1,7-9,0)	< 0,001	5,8 (1,5-21,7)	0,008
No	6/48 (13)				
Sepsis grave o shock séptico					
Sí	17/27 (63)	3,7 (2,0-6,6)	< 0,001	3,5 (1,1-11,6)	0,03
No	12/69 (17)				
Número de resistencias					
> 3	8/16 (50)	1,9 (1,0-3,5)	0,07	4,9 (1,0-23,0)	0,04
≤ 3	21/80 (26)				
Tratamiento empírico					
Inapropiado	13/43 (30)	1,0 (0,5-1,8)	0,9		
Apropiado	16/53 (30)				

5. DISCUSIÓN

Hasta la fecha de realización de este trabajo se habían realizado pocos estudios específicos sobre las bacteriemias causadas por *E. coli* productora de BLEE, y existía escasa información o era controvertida tanto sobre los factores de riesgo, como sobre las características generales epidemiológicas y clínicas, las características específicas en función de la adquisición de los casos, o las variables clave que influyen en el pronóstico. Por todos estos motivos se desarrolló el trabajo de investigación de esta tesis doctoral, que ha proporcionado una información completa al respecto, tanto desde el punto de vista clínico como microbiológico.

Entre los estudios previos, algunos eran retrospectivos [95, 102, 236, 237], con escaso número de casos [22, 243], o bien incluían exclusivamente casos comunitarios o nosocomiales [7, 22]. La gran mayoría de los trabajos previos se habían desarrollado en un único centro y habitualmente se focalizaron en dos o tres aspectos, como en los factores de riesgo, en la mortalidad y en el tratamiento empírico inadecuado y sus consecuencias [139, 201, 237].

En primer lugar, nuestro trabajo muestra que *E. coli* BLEE es una causa significativa de bacteriemia tanto comunitaria como nosocomial en nuestro medio; asimismo, por primera vez se ha estimado la incidencia global poblacional de bacteriemias producidas por *E. coli* BLEE, así como la incidencia nosocomial. Esta incidencia es difícil de comparar con otros países, puesto que los diseños de otros trabajos son diferentes y por tanto no comparables. El porcentaje de bacteriemias por *E. coli* BLEE respecto de las bacteriemias por *E. coli* fue 3,23%, similar al 2 y 4% encontrados en dos trabajos canadienses, respectivamente [174, 184]; en Taiwán se encontró una prevalencia del 5,4% [255]. En otros estudios se encontraron prevalencias más altas: un 13% en el Reino Unido [139], un 27,6% en Italia [235] y un 35,1% en Turquía [141]. Estas diferencias probablemente se deban a la diferente prevalencia de estas bacterias en cada zona geográfica, puesto que los estudios se desarrollaron todos entre 2003 y 2007; y a posibles sesgos de selección de pacientes, con sobrerrepresentación en algunos estudios de los casos relacionados con los cuidados sanitarios o nosocomiales.

A nivel nacional se han desarrollado diferentes trabajos sobre bacteriemias y sobre bacterias productoras de BLEE. En el estudio nacional GEIH realizado en 2000 el 11% del total de los aislados de *E. coli* que se aislaron en sangre fueron productores de BLEE [93]. En estudios unicéntricos realizados en España, la prevalencia ha oscilado entre el 4 y el 22,2% [78, 160, 202]. Por otra parte, un trabajo multicéntrico español recientemente publicado y realizado entre 2004 y 2008 mostró

un aumento considerable en el número de casos de bacteriemias por *E. coli* BLEE [177].

En cuanto a la adquisición de las bacteriemias por *E. coli* BLEE incluidas en nuestro estudio, la mitad fueron de adquisición nosocomial y la mitad de inicio comunitario; de éstas, dos tercios presentaban criterios para ser consideradas como relacionadas con los cuidados sanitarios. Estos datos son similares a los encontrados posteriormente en otros estudios españoles, por lo que parece que ésta es una distribución epidemiológica estable en distintas áreas geográficas de nuestro país. En general, la distribución es parecida, con matices, en estudios realizados en Canadá [174] o en Holanda [243]. En resumen, queda claro que *E. coli* productor de BLEE es una causa relevante de bacteriemia comunitaria (relacionada y no relacionada con cuidados sanitarios) y nosocomial, y que la existencia de relación previa con los cuidados sanitarios es un potencial factor de riesgo a evaluar posteriormente (como hemos hecho) para las bacteriemias de presentación comunitaria causadas por esta bacteria.

En cuanto a las características microbiológicas, hemos encontrado que los tipos de BLEE de las cepas causantes de bacteriemia reflejan la situación epidemiológica existente en el país en esos años, con un predominio de enzimas de la familia CTX-M (y en concreto, de CTX-M-14), seguidas de SHV (y en concreto, de SHV-12); la producción de BLEE tipo TEM fue anecdótica. Es interesante que no se encontraran diferencias significativas en los tipos de BLEE según la adquisición de la bacteriemia, lo que significa que probablemente los hospitales no son reservorios específicos de uno de los tipos de enzima, y coincide con la hipótesis de que el principal reservorio de estas enzimas estaría en la comunidad, y que muchos de los casos nosocomiales pueden ocurrir en pacientes que ingresan ya colonizados. Estos resultados confirmaron en su momento un hecho que entonces comenzaba a hacerse patente [61, 94, 202, 205, 211] y que posteriormente ya es bien conocido: en la epidemiología global de las BLEE hemos asistido a una reducción en la frecuencia de enzimas tipo TEM y SHV, que predominaron en los 90 sobre todo en cepas de *K. pneumoniae*, y a la emergencia y rápida diseminación de enzimas CTX-M, como un fenómeno nuevo básicamente ligado inicialmente a *E. coli*.

Esta situación no es exclusiva de España. En Italia, Tumbarello y cols. han encontrado resultados similares. En un primer estudio llevado a cabo entre 1999 y 2004 el porcentaje de BLEE tipo CTX-M encontrado fue del 29,3%, el de SHV del 34,6% y el de TEM 36,1%; pero en otro trabajo desarrollado en 2006 la prevalencia

de los distintos tipos de BLEE había cambiado, encontrando un 62,5% de CTX-M, un 37,5% de SHV y ninguna TEM [235, 236]. También en la región de Calgary en Canadá, Pitout y cols. en un trabajo desarrollado durante 2000-2007 describieron que el 89,5% de las bacteriemias por *E. coli* eran producidas por aislados productores de CTX-M, el 7,5% de SHV y el 3% de TEM. Y en el siguiente realizado por Peirano y cols. en la misma región canadiense desde 2000 a 2010, los porcentajes fueron respectivamente: 95, 3,5 y 1,5% [174, 181]. Hay diversos trabajos donde también se demuestra la sustitución de enzimas SHV y TEM por CTX-M en Estados Unidos [44, 122, 146]. Entre ellos hay un estudio retrospectivo publicado recientemente por Qureshi y cols. que abarcó 4 años (2005 a 2008) en tres hospitales del noreste de EE.UU., donde el 72,4% de las *E. coli* producían BLEE de la familia CTX-M [189].

Los tipos específicos de BLEE producidas por las cepas de *E. coli* de nuestro estudio fueron en su mayoría CTX-M-14, seguida de CTX-M-9 (ambas pertenecientes al grupo CTX-M-9). En cuanto a las del grupo CTX-M-1, el segundo en frecuencia aunque a distancia de las anteriores, las más frecuentes fueron CTX-M-15 y CTX-M-32. Estos datos obtenidos de pacientes con bacteriemia son representativos de los tipos de BLEE circulantes; así, en estudios previos o contemporáneos al nuestro realizados en España predominaron igualmente las enzimas del grupo CTX-M-9, y especialmente CTX-M-14 [42]. Este predominio de CTX-M-14 (y en general del grupo CTX-M-9) con respecto a la familia CTX-M-1 (y en concreto, de CTX-M-15) es un fenómeno propio de España y algunos países asiáticos, dado que en la mayoría de países de nuestro entorno predomina CTX-M-15 [42, 213]. Sin embargo, la proporción de cepas que producen CTX-M-15 ha ido aumentando a lo largo de los últimos años. Si bien en el estudio nacional del año 2000 no se aisló ninguna enzima de la familia CTX-M-1 [94], en 2006 ya se aislaron enzimas de esta familia, y en concreto CTX-M-15 [61]. En un estudio de portadores realizado entre 2005 y 2006 en nuestra área ya se aislaron cepas productoras de CTX-M-15 y 32 [197]. Parece que este cambio epidemiológico se podría deber a la diseminación de cepas del complejo clonal ST131, que cuando producen BLEE suele ser de este tipo [25, 57, 179].

En cuanto a las BLEE tipo SHV, la mayoría fueron SHV-12. La frecuencia con que *E. coli* produce enzimas de este tipo en nuestra área es también más alto que en otras zonas. Así, además de en cepas causantes de bacteriemias, lo hemos encontrado en cepas aisladas de todo tipo de muestras [205] y en muestras de pollo crudos [65], lo que sugiere que la transmisión alimentaria puede ser una vía de

diseminación clave de estas enzimas en nuestro país, como también ocurre con las enzimas de la familia CTX-M-9.

En este trabajo hemos analizado las características clínico-epidemiológicas de los pacientes con bacteriemia en función de los tres grupos de BLEE producidas de forma mayoritaria. Se han publicado escasos trabajos en los que ésto se investiga específicamente, y los que hay al respecto presentan resultados contradictorios. Rodríguez-Baño y cols. encontraron algunas similitudes entre los pacientes con infección/colonización nosocomial por cepas de *E. coli* productoras de enzimas de tipo TEM y SHV, dado que estas cepas eran predominantemente clonales, a diferencia de las productoras de CTX-M ^[203]. Calbo y cols. también encontraron algunas diferencias entre las cepas de *E. coli* productoras de enzimas tipo CTX-M y las productoras de SHV-TEM causantes de infecciones urinarias comunitarias ^[41]. En nuestro trabajo centrado en bacteriemias, aunque se encontraron algunas diferencias puntuales en función del tipo de enzima, es probable que las mismas se deban más a la realización de comparaciones múltiples que al hecho de que estas diferencias sean epidemiológica o clínicamente relevantes.

Las cepas de nuestro estudio presentaron un bajo índice de relación clonal. Una situación similar ha sido descrita en otros estudios ^[202, 255]. Sin embargo, en otros trabajos sobre bacteriemias por *E. coli* BLEE realizados en Canadá y Holanda, se encontró una mayor clonalidad ^[174, 181, 243]. Las causas de esta divergencia pueden ser varias. Por una parte, algunos estudios han utilizado diferentes criterios para definir relación clonal, concepto que es por definición relativo. Por otra parte, parece cierto que la diseminación de enzimas del grupo CTX-M-9, y particularmente CTX-M-14, en algunas áreas (como España y algunos países asiáticos) se ha producido principalmente por la diseminación de determinados plásmidos entre clones diversos de *E. coli* ^[245], mientras que la diseminación de CTX-M-15 parece haber estado ligada también a determinados complejos clonales, como ST131 ^[55]. Por tanto, la epidemiología molecular de las cepas bacteriémicas es un reflejo del global de las cepas de *E. coli* BLEE, sin que en nuestro medio sea un fenómeno relevante la transmisión nosocomial de determinados clones, aunque no puede descartarse la transmisión intrahospitalaria de plásmidos u otros elementos genéticos móviles entre distintos clones de *E. coli*. En este sentido, compartiendo lo observado en nuestro medio ^[203], algún trabajo reciente proporciona información que sugiere que no se precisan medidas de aislamiento para evitar la transmisión nosocomial de *E. coli* BLEE ^[234], aunque siempre deba mantenerse la alerta por la posibilidad cierta de que ocurra un brote epidémico.

En cuanto al estudio de sensibilidad a antimicrobianos de los aislados, se encontró que todas las cepas eran sensibles a las carbapenemas, que hasta hace poco tiempo ha sido una constante [102, 139, 141, 166, 174, 181, 235, 236, 243]. El hecho de que las carbapenemas no se vean afectadas por la producción de BLEE es, junto con la información clínica disponible, uno de los motivos por lo que estos fármacos se han considerado los de elección en infecciones invasivas o graves por enterobacterias productoras de BLEE. En los últimos años, la aparición de cepas productoras de BLEE junto con carbapenemasas (tipo NDM, KPC ó OXA-48, sobre todo) en algunas áreas supone un salto cualitativo importante en el desarrollo de resistencias en estas bacterias [13, 23, 157, 188].

Tigeciclina también fue activa frente a todas las cepas en nuestro estudio, como ha ocurrido en otros trabajos [235]. Los aminoglucósidos han mostrado datos aceptables de actividad in vitro, particularmente amikacina (al igual que en otros estudios [181, 235]), motivo por el que deben ser considerados para el tratamiento en determinadas situaciones clínicas. Sin embargo, puede haber diferencias locales que deben ser conocidas para la toma de decisiones [174, 243]. Entre los BLIBL, piperacilina-tazobactam también mostró excelentes niveles de actividad in vitro, mientras que 2 de cada 3 cepas fueron sensibles a amoxicilina-clavulánico. En este sentido, la sensibilidad a piperacilina-tazobactam ha sido dispar en distintos estudios, y los dos únicos que investigaron amoxicilina-clavulánico obtuvieron porcentajes de sensibilidad inferiores al nuestro [235, 255]. Por el contrario, la actividad de ciprofloxacino fue mucho más reducida y esto es más constante [166, 236], con alguna excepción de difícil explicación [139]. En resumen, el patrón de actividad in vitro muestra las escasas opciones terapéuticas fiables para estas infecciones; para el tratamiento empírico, las opciones más seguras han venido siendo las carbapenemas, los aminoglucósidos y piperacilina-tazobactam. Posteriormente se discutirán las implicaciones de cada uno.

En cuanto a los datos de los pacientes, el perfil más frecuente del paciente que sufre una bacteriemia por *E. coli* BLEE sería el de un paciente mayor de 65 años, atendido en los servicios médicos, con diversas enfermedades crónicas de base, que está sondado o que tiene algún tipo de relación con los cuidados sanitarios, que ha tomado antibióticos recientemente y que tiene una bacteriemia de origen urinario. Entre las enfermedades de base más frecuente se encuentran las neoplasias, la diabetes mellitus y la existencia de una uropatía obstructiva crónica.

Pero más allá de esto, en este trabajo identificamos por primera vez los factores de riesgo para las bacteriemias comunitarias y nosocomiales por *E. coli* BLEE. Para ello hemos utilizado una metodología que respondiera a dos preguntas: La primera es: ¿Cuáles son los factores de riesgo para que una sepsis sea causada por *E. coli* BLEE? Y la segunda: ¿Cuáles son los factores de riesgo para que una bacteriemia por *E. coli* esté causada por una cepa que produce BLEE? Ambas preguntas se respondieron por separado para infecciones comunitarias y nosocomiales, dadas las grandes diferencias existentes entre ambas. Para responder a ambas preguntas se utilizó un diseño de casos y controles; los casos fueron los mismos para ambas preguntas (pacientes con bacteriemia por *E. coli* BLEE), pero los controles fueron diferentes; para la primera pregunta, lo formaban pacientes con hemocultivos tomados, y para la segunda, pacientes con bacteriemia por *E. coli*.

Las ventajas de este diseño son varias. Uno de los problemas de los estudios de casos y controles que investigan los factores de riesgo para infecciones causadas por bacterias resistentes en los que los controles se eligen entre los pacientes con infección por la bacteria sensible es que, en general, se tiende a sobrestimar la asociación del uso previo de antibióticos como factor de riesgo, ya que la exposición previa a antibióticos reduce la posibilidad de tener una infección por la bacteria sensible ^[90], como fue elegantemente demostrado por Kaye y cols. ^[108]. Sin embargo, este diseño permite responder a nuestra segunda pregunta. Por otra parte, un diseño que evita la sobrestimación de la importancia del uso previo de antibióticos, como el usado para responder la primera de nuestras preguntas, tiene el inconveniente de que puede encontrar factores de riesgo inespecíficos de infección por el patógeno (en este caso, *E. coli*) pero no del patógeno resistente. Por tanto, estos autores propusieron el uso de un diseño combinado que incluya dos grupos de casos (pacientes con la bacteria sensible, y pacientes con la bacteria resistente), comparados con un solo grupo control (pacientes con infección). En nuestro caso esto era complicado porque uno de los grupos de casos (el de pacientes con la bacteria sensible) es tremendamente grande (la bacteriemia por *E. coli* es muy frecuente), lo que suponía un problema logístico y de eficiencia del estudio. Por ello ideamos este diseño novedoso, en el que un grupo de casos es comparado con dos grupos de controles, uno de los cuales está contenido en el otro. Además de responder a las preguntas planteadas, la comparación de los factores de riesgo encontrados en ambos estudios permite matizar tanto la estimación de la importancia del uso previo de antibióticos como la posibilidad de que se encuentren factores de riesgo inespecíficos.

Un análisis de los modelos multivariantes de factores de riesgo de nuestro estudio nos permite reflexionar al respecto. Entre los casos comunitarios, efectivamente la OR encontrada en la comparación con los controles escogidos entre pacientes con bacteriemia por *E. coli* no productor de BLEE es mayor que la encontrada en la comparación con los controles con sepsis, indicativa del efecto antes comentado. Por tanto, es probable que la OR verdadera esté más próxima a la encontrada con los controles con sepsis. Por otra parte, algunas de las variables encontradas con estos controles (y no con los otros) probablemente son factores de riesgo inespecíficos de bacteriemia por *E. coli* (como por ejemplo, la cirrosis, enfermedad urinaria obstructiva). Algo parecido ocurre con las bacteriemias nosocomiales, aunque en estos casos es más difícil discernir los verdaderos factores de riesgo, al tratarse todos los grupos de pacientes más homogéneos. De manera que, con este análisis conjunto podemos probablemente hacernos una idea bastante aproximada de las circunstancias que aumentan el riesgo de padecer una bacteriemia por *E. coli* BLEE, y aunque de un estudio de casos y controles no puede obtenerse un modelo predictivo, estas variables son útiles para la toma de decisiones clínicas ante pacientes con sepsis. En nuestra opinión, para las bacteriemias comunitarias y en nuestro medio, en pacientes en los que sospechamos una sepsis por *E. coli*, el uso previo de cefalosporinas o quinolonas, el venir de una residencia de ancianos y el ser portador de sonda urinaria son factores que deben hacer considerar la cobertura empírica de *E. coli* BLEE. En pacientes con sepsis nosocomial, el uso previo de cefalosporinas de tercera generación es probablemente el marcador más claro.

Aunque se han realizado diversos estudios de factores de riesgo para las bacteriemias por *E. coli* BLEE [78, 95, 102, 104, 160, 166, 201, 204, 256], los resultados han sido en general parecidos, considerando las importantes diferencias en los diseños y calidad de los trabajos, y de ámbitos geográficos.

Una cuestión de interés es la existencia de casos "sin factores de riesgo". Mientras la mayoría de los casos se produzcan en pacientes con los factores de riesgo descritos, la toma de decisiones basada en la existencia de dichos factores parece razonablemente segura. Sin embargo, si el número de pacientes sin factores de riesgo aumenta, esto creará una situación de incertidumbre muy peligrosa y que puede tener un impacto negativo en la utilización de antibióticos de amplio espectro. Dado que la colonización rectal por *E. coli* BLEE en pacientes sanos ha ido aumentando, no se puede descartar este hecho [197, 242]. Por ahora tranquiliza el hecho de que la mayoría de los casos de bacteriemia están causados en nuestro medio por cepas "poco virulentas", que probablemente precisan ser seleccionadas

por el uso previo de antibióticos, en pacientes predispuestos ^[200]. Sin embargo, cabe la posibilidad de que esto no sea así en áreas donde predominan los casos debidos a cepas ST131 productoras de CTX-M-15, ya que estas cepas pertenecen al filogrupo B2, tradicionalmente asociado a cepas de *E. coli* patógenas extraintestinales ^[57, 105]. En cualquier caso, se trata de un tema a investigar.

El hecho de que las cefalosporinas y las quinolonas puedan ser factores de riesgo no es casual. Las cefalosporinas pueden seleccionar en el intestino de los pacientes las cepas productoras de BLEE; dado que la mayoría son resistentes a quinolonas, estos antibióticos también pueden actuar como coselectores de estas cepas. En general, cualquier antibiótico que seleccione, directa o indirectamente, estas cepas puede ser un factor de riesgo potencial.

El comportamiento clínico de las bacteriemias por *E. coli* BLEE fue el esperado, y similar a los controles del grupo de bacteriemias por *E. coli* no productor de BLEE en cuanto a orígenes de la bacteriemia o la presentación con sepsis grave o shock. En cuanto a la mortalidad, alta, refleja la situación de los pacientes, y es similar o incluso menor a la encontrada en otros estudios con pacientes similares ^[78, 95, 139, 166]. En general, la mortalidad es mayor en las bacteriemias nosocomiales que en las comunitarias en nuestro estudio y en otros.

En las bacteriemias comunitarias por *E. coli* quisimos investigar si la producción de BLEE fue un predictor independiente de mortalidad. Efectivamente, la mortalidad de los pacientes con *E. coli* BLEE fue significativamente mayor que la de los pacientes con cepas no productoras de BLEE en la comparación cruda. Sin embargo, cuando se introdujo en el análisis la adecuación del tratamiento empírico, la producción de BLEE dejó de mostrar asociación; la mejor explicación para este hallazgo es que no es la producción de BLEE la que incrementa la mortalidad (de hecho ya vimos que no se trata de bacterias especialmente virulentas), sino que es el hecho de que el tratamiento inicial es frecuentemente inadecuado lo que condiciona verdaderamente un peor pronóstico; esto ocurre porque al tratarse de bacterias resistentes a los antibióticos más usados para el tratamiento de estas infecciones, la probabilidad de error aumenta. Es cierto que el estudio se realiza en una "cohorte sesgada" de bacteriemias por *E. coli*, dado que los casos producidos por cepas BLEE están sobrerrepresentados; sin embargo, esto en todo caso hubiera sobreestimado la importancia pronóstica de las BLEE. No realizamos este análisis en las bacteriemias nosocomiales dado que los casos con y sin BLEE son más parecidos, se trata de una

población más homogénea, donde el impacto de la situación basal es demasiado importante para realizar un análisis adecuado con el diseño elegido.

Sea como fuere, existen dos meta-análisis que han analizado el impacto pronóstico de la producción de BLEE en las bacteriemias (causadas por cualquier enterobacteria). En el primero de ellos se apreció un aumento de mortalidad en los casos debidos a enterobacterias productoras de BLEE, pero los autores señalaron que los estudios no controlaban adecuadamente determinadas covariables, entre ellas el tratamiento inicial; de hecho, la bacteriemia por enterobacteria BLEE se asoció a un retraso de 5 días de media en la indicación de antibióticos activos ^[221]. El segundo meta-análisis, más reciente y en el que está incluido parte de nuestro trabajo, también encontró que la producción de BLEE se asocia a mayor mortalidad, pero que este efecto se modifica por diversas covariables; en concreto, cuando se ajusta por tratamiento empírico adecuado, la asociación disminuye de forma importante ^[214], lo que confirma el mensaje de nuestro trabajo. Dada la existencia de estos meta-análisis no tiene mucho sentido entrar a discutir los resultados de trabajos individuales.

En las bacteriemias nosocomiales, por el contrario, hicimos otro tipo de análisis: el de las variables asociadas a la mortalidad entre las bacteriemias por *E. coli* BLEE. En este análisis, tras controlar por las variables habituales que marcan el riesgo basal de mortalidad (score de Pitt, origen de la bacteriemia, presentación con sepsis grave o shock) pudimos apreciar que el hecho de que la bacteriemia estuviera causada por una cepa con más resistencias se asoció a mayor mortalidad, y en este caso no encontramos que el tratamiento empírico fuera determinante. Esto puede deberse a falta de poder estadístico o a que la clasificación de los tratamientos en adecuados o inadecuados en base a la actividad in vitro no sea la más correcta; de hecho, como veremos, existe controversia sobre las alternativas a las carbapenemas que pueden ser útiles en el tratamiento.

En cuanto al tratamiento, los fármacos más usados como tratamiento empírico en los pacientes de nuestra serie fueron BLIBL, seguidos de las cefalosporinas, las quinolonas y las carbapenemas; se consideró que hasta el 51% de los pacientes había recibido un tratamiento empírico no activo para la cepa de *E. coli* BLEE causante de la bacteriemia. En otros trabajos, el porcentaje de tratamientos inapropiados muestra un amplio rango, entre el 15 y 80% ^[95, 141]. En cuanto al tratamiento dirigido, los más usados en nuestro trabajo fueron, como era de esperar,

las carbapenemas, seguidos de los BLIBL, reflejando la actividad in vitro de los aislados.

Actualmente se considera que las carbapenemas son los antimicrobianos de primera elección en las infecciones graves causadas por enterobacterias productoras de BLEE. Las moléculas de este grupo de antimicrobianos son muy estables a la hidrólisis por betalactamasas, y parece que son los únicos que pueden tener acción bactericida durante 24 horas sobre altos inóculos de cepas productoras de BLEE in vitro ^[80]. Las carbapenemas, en general, se han asociado con menor mortalidad (o igual, pero no más) que otros antibióticos en estudios observacionales (no se han realizado ensayos aleatorizados); en un meta-análisis reciente, Vardakas y cols. analizaron 21 artículos sobre bacteriemias producidas por enterobacterias productoras de BLEE ^[244], concluyendo que se asocian con menor mortalidad que el resto de fármacos con la excepción de los BLIBL, en los que no pudieron encontrar diferencias estadísticamente significativas.

Dentro de las carbapenemas, la experiencia publicada es mayor con imipenem y meropenem. Ertapenem es una alternativa atractiva al carecer de actividad frente a *P. aeruginosa*, lo que podría evitar la presión sobre estos microorganismos ^[74]; algunos estudios observacionales recientes han mostrado datos de eficacia clínica similar a los de las otras carbapenemas ^[53, 116, 117, 257], por lo que sería una buena alternativa a imipenem y meropenem para el tratamiento de infecciones comunitarias con sospecha de ser causadas por dichos microorganismos y en las que no hubiera factores de riesgo para infección por *P. aeruginosa* ^[70, 130, 194]. Por otra parte, existe el riesgo de desarrollo de resistencias en infecciones complejas.

La diseminación de carbapenemasas está obligando a buscar alternativas a las carbapenemas. Entre las posibles alternativas se encuentran los BLIBL, cuya eficacia y adecuación en el tratamiento de estas infecciones es controvertida ^[167]. Recientemente realizamos un análisis post-hoc de 6 estudios prospectivos sobre bacteriemias por *E. coli* productor de BLEE (incluyendo este trabajo), en el que se compararon los tratamientos empíricos y dirigidos realizados con carbapenemas y BLIBL. Tras varios tipos de análisis, no pudimos encontrar que los pacientes tratados con BLBLI tuvieran mayor mortalidad o estancia hospitalaria que los tratados con carbapenemas ^[198]. Precisamente el meta-análisis antes comentado tampoco pudo demostrar que estos fármacos se asocien con peor pronóstico que las carbapenemas ^[244], por lo que actualmente son una alternativa sobre todo para las bacteriemias por

E. coli BLEE de origen urinario, precisándose más estudios para otras enterobacterias y otros tipos de infección.

En cuanto a la utilidad de las cefalosporinas, se trata de un tema controvertido que escapa a los objetivos de esta tesis como para tratarlo en profundidad. En resumen, CLSI y EUCAST recomendaban hace unos años que todas las cepas productoras de BLEE se informaran como resistentes a los antibióticos independientemente de su CMI. Sin embargo, en los últimos años han modificado estas recomendaciones; por una parte, han reducido los puntos de corte de sensibilidad, y por otra, recomiendan que si una cefalosporina muestra una CMI en el rango de lo sensible, debe considerarse como tal aunque produzca una BLEE. Este cambio está motivado por los resultados de modelos estocásticos en animales ^[132], pero la información clínica que la sustenta es escasa ^[22, 191].

Nuestro trabajo presenta limitaciones que deben tenerse en cuenta a la hora de interpretar sus resultados. No hemos realizado un estudio de plásmidos, estudio filogenético de los aislados o caracterización de clones específicos, aspectos que ayudarían a caracterizar mejor la epidemiología molecular de estas infecciones. En otros trabajos posteriores se han estudiado los factores de virulencia. Aunque se trata de un estudio multicéntrico, el tamaño muestral puede no haber sido suficiente para identificar algunos factores de riesgo. Los resultados obtenidos no son representativos de todo el país por la distribución de los hospitales incluidos en el estudio y por la diversa epidemiología que hay en cuanto a enzimas BLEE. Asimismo, puede no ser extrapolable a otros países, pero puede que sí a aquellas áreas geográficas donde la mayoría de las infecciones causadas por *E. coli* BLEE tenga una epidemiología similar. Finalmente, aunque se han usado herramientas avanzadas para el control de sesgos, estos siempre pueden ocurrir en estudios observacionales.

En resumen, podemos decir que las infecciones por *E. coli* productor de BLEE, y en concreto las bacteriemias, son una preocupación importante para la salud pública debido a su frecuencia, su compleja epidemiología, la morbimortalidad asociada y el coste económico que conllevan. Por todo ello es necesario que las autoridades sanitarias faciliten la investigación en esta área que permita seguir los cambios epidemiológicos, definir nuevos factores de riesgo, aumentar la vigilancia y realizar protocolos de actuación que permitan priorizar grupos de pacientes en los que aplicar acciones encaminadas a prevenir las bacteriemias por *E. coli* productora de betalactamasas de espectro extendido, así como desarrollar protocolos

terapéuticos más eficaces. Por otra parte, es también necesario seguir investigando en viejos y nuevos antimicrobianos.

6. CONCLUSIONES

1. La incidencia global poblacional estimada de bacteriemias por *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido fue 2,03 casos/100.000 habitantes/año.
2. Aproximadamente la mitad de las bacteriemias por *E. coli* BLEE son de adquisición comunitaria; de éstas, el 68,4% son relacionadas con los cuidados sanitarios.
3. Los aislados de *E. coli* BLEE no estaban relacionados clonalmente; la enzima BLEE producida mayoritariamente fue CTX-M-14, seguida de CTX-M-9, CTX-M-15, CTX-M-32 y SHV-12.
4. Los antibióticos más activos frente a los casos de *E. coli* BLEE causantes de bacteriemias fueron las carbapenemas, seguidas de los β -lactámicos/inhibidores de β -lactamasas y en tercer lugar por las fluorquinolonas; específicamente imipenem, amoxicilina-ácido clavulánico y ciprofloxacino.
5. El origen mayoritario de las bacteriemias por *E. coli* BLEE fue el tracto urinario, seguido del intraabdominal y desconocido, excepto para las estrictamente comunitarias que el tercero fue el tracto respiratorio.
6. Los factores de riesgo para una bacteriemia por *E. coli* BLEE de adquisición comunitaria son: haber tenido relación con el sistema sanitario, el uso de catéter urinario y el uso reciente de antimicrobianos.
7. Los factores de riesgo para una bacteriemia por *E. coli* BLEE de adquisición nosocomial son: haber recibido previamente antibióticos oxi-imino- β -lactámicos y la estancia en el hospital (en días).
8. Las variables asociadas a la mortalidad para las bacteriemias por *E. coli* de adquisición comunitaria fueron: índice de Pitt > 1, origen diferente del urinario y el tratamiento empírico inapropiado, sin que la producción de BLEE fuera una variable asociada.
9. Las variables asociadas a la mortalidad para las bacteriemias por *E. coli* BLEE de adquisición nosocomial fueron: índice de Pitt > 1, origen de alto riesgo, aislado multirresistente y sepsis grave o shock séptico.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Rev Infect Dis.* 1988; 10:677-678.
2. Agerso Y, Aarestrup FM, Pedersen K, Seyfarth AM, Struve T, Hasman H. Prevalence of extended-spectrum cephalosporinase (ESC)-producing *Escherichia coli* in danish slaughter pigs and retail meat identified by selective enrichment and association with cephalosporin usage. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67:582-588.
3. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990; 215:403-410.
4. Alvarez-Lerma F, Gasulla Guillermo M, Abad Peruga V, Pueyo Pont MJ, Tarrago Eixarch E. Effectiveness of contact isolation in the control of multiresistant bacteria in an intensive care service. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2002; 20:57-63.
5. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980; 289:321-331.
6. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Consensus conference committee. definitions for sepsis and organ failure and guidelines for use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992; 20:864-74. 1992.
7. Apisarnthanarak A, Kiratisin P, Mundy LM. Clinical and molecular epidemiology of healthcare-associated infections due to extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* that harbor multiple ESBL genes. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008; 29:1026-1034.
8. Arlet G, Rouveau M, Casin I, Bouvet PJ, Lagrange PH, Philippon A. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* strains that produce SHV-4 beta-lactamase and which were isolated in 14 french hospitals. *J Clin Microbiol.* 1994; 32:2553-2558.
9. Asensio A, Oliver A, Gonzalez-Diego P, et al. Outbreak of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strain in an intensive care unit: Antibiotic use as risk factor for colonization and infection. *Clin Infect Dis.* 2000; 30:55-60.
10. Babini GS, Livermore DM. Are SHV beta-lactamases universal in *Klebsiella pneumoniae*? *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44:2230.

11. Baker W, van den Broek A, Camon E, et al. The EMBL nucleotide sequence database. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28:19-23.
12. Baquero F, Reguera J, Ojeda M, et al. *Escherichia coli* con resistencia a cefalosporinas de tercera generación codificada por beta-lactamasa de tipo plasmídico: Primer brote en España. *Revista Española de Microbiología Clínica.* 1988; 3:581-582.
13. Baroud M, Dandache I, Araj GF, et al. Underlying mechanisms of carbapenem resistance in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates at a tertiary care centre in Lebanon: Role of OXA-48 and NDM-1 carbapenemases. *Int J Antimicrob Agents.* 2013; 41:75-79.
14. Batchelor M, Hopkins K, Threlfall EJ, et al. Bla(CTX-M) genes in clinical salmonella isolates recovered from humans in England and Wales from 1992 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49:1319-1322.
15. Bauernfeind A, Grimm H, Schweighart S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection.* 1990; 18:294-298.
16. Bedenic B, Schmidt H, Herold S, et al. Epidemic and endemic spread of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 beta-lactamase in Dubrava University Hospital, Zagreb, Croatia. *J Chemother.* 2005; 17:367-375.
17. Ben-Ami R, Schwaber MJ, Navon-Venezia S, et al. Influx of extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae into the hospital. *Clin Infect Dis.* 2006; 42:925-934.
18. Ben-Ami R, Rodriguez-Bano J, Arslan H, et al. A multinational survey of risk factors for infection with extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae in nonhospitalized patients. *Clin Infect Dis.* 2009; 49:682-690.
19. Ben-Hamouda T, Foulon T, Ben-Mahrez K. Involvement of SHV-12 and SHV-2a encoding plasmids in outbreaks of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Tunisian neonatal ward. *Microb Drug Resist.* 2004; 10:132-138.
20. Bertrand X, Hocquet D, Boisson K, Siebor E, Plesiat P, Talon D. Molecular epidemiology of enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-

- lactamase in a french university-affiliated hospital. *Int J Antimicrob Agents*. 2003; 22:128-133.
21. Biedenbach DJ, Moet GJ, Jones RN. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2002). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004; 50:59-69.
 22. Bin C, Hui W, Renyuan Z, et al. Outcome of cephalosporin treatment of bacteremia due to CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006; 56:351-357.
 23. Birgy A, Bidet P, Genel N, et al. Phenotypic screening of carbapenemases and associated beta-lactamases in carbapenem-resistant enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*. 2012; 50:1295-1302.
 24. Blanc V, Mesa R, Saco M, et al. ESBL- and plasmidic class C beta-lactamase-producing *E. coli* strains isolated from poultry, pig and rabbit farms. *Vet Microbiol*. 2006; 118:299-304.
 25. Blanco M, Alonso MP, Nicolas-Chanoine MH, et al. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum {beta}-lactamases in lugo (spain): Dissemination of clone O25b:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother*. 2009; 63:1135-1141.
 26. Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: A new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest*. 1997; 112:235-243.
 27. Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest*. 1992; 101:1481-1483.
 28. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM consensus conference committee. American college of chest Physicians/Society of critical care medicine. *Chest*. 1992; 101:1644-1655.
 29. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: The CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48:1-14.
 30. Bonnet R, Dutour C, Sampaio JL, et al. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution asp-240-->Gly. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45:2269-2275.

31. Bonomo RA, Rice LB. Emerging issues in antibiotic resistant infections in long-term care facilities. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 1999; 54:B260-7.
32. Borer A, Gilad J, Menashe G, Peled N, Riesenberk K, Schlaeffer F. Extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae strains in community-acquired bacteremia in southern Israel. *Med Sci Monit*. 2002; 8:CR44-7.
33. Bou G, Cartelle M, Tomas M, et al. Identification and broad dissemination of the CTX-M-14 beta-lactamase in different *Escherichia coli* strains in the northwest area of Spain. *J Clin Microbiol*. 2002; 40:4030-4036.
34. Bouza E, Boza E, Planes A, Rodríguez A, Romero J. Procedimientos en microbiología clínica, 3. Hemocultivos. 1993. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 1ª Edición, 1993.
35. Boyd DA, Tyler S, Christianson S, et al. Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase involved in an outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48:3758-3764.
36. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*. 2001; 14:933-51, table of contents.
37. Bradford PA, Urban C, Jaiswal A, et al. SHV-7, a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase, identified in *Escherichia coli* isolates from hospitalized nursing home patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995; 39:899-905.
38. Brinas L, Lantero M, Zarazaga M, Perez F, Torres C. Outbreak of SHV-5 beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal-pediatric intensive care unit in Spain. *Microb Drug Resist*. 2004; 10:354-358.
39. Brinas L, Moreno MA, Zarazaga M, et al. Detection of CMY-2, CTX-M-14, and SHV-12 beta-lactamases in *Escherichia coli* fecal-sample isolates from healthy chickens. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47:2056-2058.
40. Brun-Buisson C, Legrand P, Philippon A, Montravers F, Ansquer M, Duval J. Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet*. 1987; 2:302-306.

41. Calbo E, Romani V, Xercavins M, et al. Risk factors for community-onset urinary tract infections due to *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 57:780-783.
42. Canton R, Coque TM. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol.* 2006; 9:466-475.
43. Cartelle M. Beta-lactamasas del tipo CTX-M: aspectos epidemiológicos, descriptivos y estructurales. [Dissertation]. 2006.
44. Castanheira M, Mendes RE, Rhomberg PR, Jones RN. Rapid emergence of blaCTX-M among enterobacteriaceae in U.S. medical centers: Molecular evaluation from the MYSTIC program (2007). *Microb Drug Resist.* 2008; 14:211-216.
45. Chanawong A, M'Zali FH, Heritage J, Xiong JH, Hawkey PM. Three cefotaximases, CTX-M-9, CTX-M-13, and CTX-M-14, among enterobacteriaceae in the people's Republic of China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46:630-637.
46. Chanawong A, M'Zali FH, Heritage J, Lulitanond A, Hawkey PM. SHV-12, SHV-5, SHV-2a and VEB-1 extended-spectrum beta-lactamases in gram-negative bacteria isolated in a University Hospital in Thailand. *J Antimicrob Chemother.* 2001; 48:839-852.
47. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: Development and validation. *J Chronic Dis.* 1987; 40:373-383.
48. Chaves J, Ladona MG, Segura C, Coira A, Reig R, Ampurdanes C. SHV-1 beta-lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45:2856-2861.
49. Cisneros J, Sánchez M, Prados M, et al. Hemocultivos en el servicio de urgencias. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005; 23(3):135-9.
50. Cisneros-Herreros JM, Cobo-Reinoso J, Pujol-Rojo M, Rodríguez-Baño J, Salavert-Lletí M. Guía para el diagnóstico y tratamiento del paciente con bacteriemia. Guías de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2007; 25:111.

51. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 21st informational supplement. CLSI document M100-S21. Wayne, PA: CLSI, 2011.
52. Cobo J, Pujol M, Rodríguez-Baño J, Salavert M. Guía para el diagnóstico y tratamiento del paciente con bacteriemia. In: Aguado, JM., Fortún, J. (ed). Guías Clínicas SEIMC 2006. 2006:1-24.
53. Collins VL, Marchaim D, Pogue JM, et al. Efficacy of ertapenem for treatment of bloodstream infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56:2173-2177.
54. Colodner R, Rock W, Chazan B, et al. Risk factors for the development of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in nonhospitalized patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004; 23:163-167.
55. Coque TM, Novais A, Carattoli A, et al. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14:195-200.
56. Cristofaro P, Opal SM. The toll-like receptors and their role in septic shock. *Expert Opin Ther Targets.* 2003; 7:603-612.
57. Dahbi G, Mora A, Lopez C, et al. Emergence of new variants of ST131 clonal group among extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases. *Int J Antimicrob Agents.* 2013; 42:347-351.
58. Daikos GL, Kosmidis C, Tassios PT, et al. Enterobacteriaceae bloodstream infections: Presence of integrons, risk factors, and outcome. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51:2366-2372.
59. De Champs C, Sirot D, Chanal C, Bonnet R, Sirot J. A 1998 survey of extended-spectrum beta-lactamases in enterobacteriaceae in France. The French Study Group. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44:3177-3179.
60. De Kraker ME, Wolkewitz M, Davey PG, et al. Burden of antimicrobial resistance in european hospitals: Excess mortality and length of hospital stay associated with bloodstream infections due to *Escherichia coli* resistant to third-generation cephalosporins. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66:398-407.

61. Diaz MA, Hernandez-Bello JR, Rodriguez-Bano J, et al. Diversity of *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain: Second nationwide study. *J Clin Microbiol*. 2010; 48:2840-2845.
62. Díaz M, Hernández J, Martínez-Martínez L, Rodríguez-Baño J, Pascual A, Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria (GEIH). *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles: 2º estudio multicéntrico (proyecto GEIH-BLEE 2006). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009; 27: 503-10.
63. Diestra K, Coque TM, Miro E, et al. Characterization and molecular epidemiology of ESBL in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in 11 spanish hospitals (2004). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008; 26:404-410.
64. Diwan V, Chandran SP, Tamhankar AJ, Stalsby Lundborg C, Macaden R. Identification of extended-spectrum beta-lactamase and quinolone resistance genes in *Escherichia coli* isolated from hospital wastewater from central India. *J Antimicrob Chemother*. 2012; 67:857-859.
65. Doi Y, Paterson DL, Egea P, 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; 16:33-38.
66. Dominguez-Castellano A, Angel Muniain M, Jose Rios-Villegas M, et al. *Prevotella denticola* endocarditis in an intravenous drug abuser. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2001; 19:280-281.
67. Du Bois SK, Marriott MS, Amyes SG. TEM- and SHV-derived extended-spectrum beta-lactamases: Relationship between selection, structure and function. *J Antimicrob Chemother*. 1995; 35:7-22.
68. Du B, Long Y, Liu H, et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection: Risk factors and clinical outcome. *Intensive Care Med*. 2002; 28:1718-1723.
69. Dutour C, Bonnet R, Marchandin H, et al. CTX-M-1, CTX-M-3, and CTX-M-14 beta-lactamases from enterobacteriaceae isolated in France. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46:534-537.
70. Elliott E, Brink AJ, van Greune J, et al. In vivo development of ertapenem resistance in a patient with pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae* with an extended-spectrum beta-lactamase. *Clin Infect Dis*. 2006; 42:e95-8.

71. Espinosa de los Monteros L, Silva-Sánchez J, Jiménez L, Rojas T, Garza-Ramos U, Valverde V. Outbreak of infection by extended-spectrum b-lactamase SHV-5-producing *Serratia marcescens* in a mexican hospital. J Chemother. 2008; 20:586-592.
72. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST breakpoint table. Available at: [Http//www.eucast.org](http://www.eucast.org).
73. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Tigecycline-rationale for the EUCAST clinical breakpoints, version 1.0, 30 march 2006.
74. Falagas ME, Tansarli GS, Kapaskelis A, Vardakas KZ. Ertapenem use and antimicrobial resistance to group 2 carbapenems in gram-negative infections: A systematic review. Expert Rev Anti Infect Ther. 2013; 11:69-78.
75. Fernandez-Rodriguez A, Reguera JA, Perez-Diaz JC, Picazo JJ, Baquero F. 1st spanish epidemic of plasmid resistance to 3rd generation cephalosporins: The implication of SHV-2. Enferm Infecc Microbiol Clin. 1992; 10:456-461.
76. Freeman JT, McBride SJ, Nisbet MS, et al. Bloodstream infection with extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae at a tertiary care hospital in New Zealand: Risk factors and outcomes. Int J Infect Dis. 2012; 16:e371-4.
77. Friedman ND, Kaye KS, Stout JE, et al. Health care-associated bloodstream infections in adults: A reason to change the accepted definition of community-acquired infections. Ann Intern Med. 2002; 137:791-797.
78. García Hernández A, García-Vázquez E, Gómez Gómez J, Canteras M, Hernandez-Torres A, Ruiz Gómez J. Bacteriemia por *Escherichia coli*: Factores predictivos de presencia de bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido e influencia de la resistencia en la mortalidad de los pacientes. Medicina Clínica. 2011; 136:56-60.
79. García Ordóñez MA, Colmenero Castillo JD. Modelos pronósticos en bacteriemia y sepsis. Anales de Medicina Interna. 2006; 23:53-55.
80. Garcia-Hernandez AM, Garcia-Vazquez E, Hernandez-Torres A, et al. Bacteraemia due to *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBL): Clinical relevance and today's insights. Rev Esp Quimioter. 2011; 24:57-66.

81. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *Am J Infect Control*. 1988; 16:128-140.
82. Gaynes R, Edwards JR, National Nosocomial Infections Surveillance System. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis*. 2005; 41:848-854.
83. Gish W, States DJ. Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nat Genet*. 1993; 3:266-272.
84. Gniadkowski M. Evolution and epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. *Clin Microbiol Infect*. 2001; 7:597-608.
85. Gniadkowski M, Schneider I, Palucha A, Jungwirth R, Mikiewicz B, Bauernfeind A. Cefotaxime-resistant enterobacteriaceae isolates from a hospital in Warsaw, Poland: Identification of a new CTX-M-3 cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase that is closely related to the CTX-M-1/MEN-1 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42:827-832.
86. Graff LR, Franklin KK, Witt L, et al. Antimicrobial therapy of gram-negative bacteremia at two university-affiliated medical centers. *Am J Med*. 2002; 112:204-211.
87. Greenberg BM, Atmar RL, Stager CE, Greenberg SB. Bacteraemia in the elderly: Predictors of outcome in an urban teaching hospital. *J Infect*. 2005; 50:288-295.
88. Gudiol C, Calatayud L, Garcia-Vidal C, et al. Bacteraemia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* (ESBL-EC) in cancer patients: Clinical features, risk factors, molecular epidemiology and outcome. *J Antimicrob Chemother*. 2010; 65:333-341.
89. Gutmann L, Ferre B, Goldstein FW, et al. SHV-5, a novel SHV-type beta-lactamase that hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins and monobactams. *Antimicrob Agents Chemother*. 1989; 33:951-956.
90. Harris AD, Karchmer TB, Carmeli Y, Samore MH. Methodological principles of case-control studies that analyzed risk factors for antibiotic resistance: A systematic review. *Clin Infect Dis*. 2001; 32:1055-1061.

91. Harris AD, Kotetishvili M, Shurland S, et al. How important is patient-to-patient transmission in extended-spectrum beta-lactamase *Escherichia coli* acquisition. *Am J Infect Control*. 2007; 35:97-101.
92. Heritage J, M'Zali FH, Gascoyne-Binzi D, Hawkey PM. Evolution and spread of SHV extended-spectrum beta-lactamases in gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother*. 1999; 44:309-318.
93. Hernandez JR, Pascual A, Canton R, Martinez-Martinez L, Grupo de Estudio de Infeccion Hospitalaria. GEIH. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in spanish hospitals (GEIH-BLEE project 2002). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2003; 21:77-82.
94. Hernandez JR, Martinez-Martinez L, Canton R, Coque TM, Pascual A, Spanish Group for Nosocomial Infections (GEIH). Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49:2122-2125.
95. Ho PL, Chan WM, Tsang KW, Wong SS, Young K. Bacteremia caused by *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamase: A case-control study of risk factors and outcomes. *Scand J Infect Dis*. 2002; 34:567-573.
96. Hyle EP, Lipworth AD, Zaoutis TE, Nachamkin I, Bilker WB, Lautenbach E. Impact of inadequate initial antimicrobial therapy on mortality in infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae: Variability by site of infection. *Arch Intern Med*. 2005; 165:1375-1380.
97. Jacoby GA, Munoz-Price LS. The new beta-lactamases. *N Engl J Med*. 2005; 352:380-391.
98. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in enterobacteriaceae: Hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis*. 1988; 10:867-878.
99. Javaloyas M, Garcia-Somoza D, Gudiol F. Bacteremia due to *Escherichia coli*: Epidemiological analysis and sensitivity to antibiotics in a county hospital. *Med Clin (Barc)*. 2003; 120:125-127.
100. Jeong SH, Bae IK, Lee JH, et al. Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases produced by clinical isolates of *Klebsiella*

- pneumoniae* and *Escherichia coli* from a korean nationwide survey. J Clin Microbiol. 2004; 42:2902-2906.
101. Jones CH, Ruzin A, Tuckman M, Visalli MA, Petersen PJ, Bradford PA. Pyrosequencing using the single-nucleotide polymorphism protocol for rapid determination of TEM- and SHV-type extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates and identification of the novel beta-lactamase genes blaSHV-48, blaSHV-105, and blaTEM-155. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53:977-986.
 102. Kang CI, Cheong HS, Chung DR, et al. Clinical features and outcome of community-onset bloodstream infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2008; 27:85-88.
 103. Kang CI, Kim SH, Kim DM, et al. Risk factors for and clinical outcomes of bloodstream infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. Infect Control Hosp Epidemiol. 2004; 25:860-867.
 104. Kang CI, Song JH, Chung DR, et al. Risk factors and treatment outcomes of community-onset bacteraemia caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. Int J Antimicrob Agents. 2010; 36:284-287.
 105. Karfunkel D, Carmeli Y, Chmelnitsky I, Kotlovsky T, Navon-Venezia S. The emergence and dissemination of CTX-M-producing *Escherichia coli* sequence type 131 causing community-onset bacteremia in Israel. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2013; 32:513-521.
 106. 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; 201:237-241.
 107. Karisik E, Ellington MJ, Pike R, Livermore DM, Woodford N. Development of high-level ceftazidime resistance via single-base substitutions of blaCTX-M-3 in hyper-mutable *Escherichia coli*. Clin Microbiol Infect. 2006; 12:803-806.
 108. Kaye KS, Harris AD, Samore M, Carmeli Y. The case-case-control study design: Addressing the limitations of risk factor studies for antimicrobial resistance. Infect Control Hosp Epidemiol. 2005; 26:346-351.

109. Kim J, Lim YM, Jeong YS, Seol SY. Occurrence of CTX-M-3, CTX-M-15, CTX-M-14, and CTX-M-9 extended-spectrum beta-lactamases in enterobacteriaceae clinical isolates in Korea. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49:1572-1575.
110. Kim YK, Pai H, Lee HJ, et al. Bloodstream infections by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children: Epidemiology and clinical outcome. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46:1481-1491.
111. Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutzling RM, Wiedemann B. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985; 28:302-307.
112. Knaus W, Draper E, Wagner D, Zimmerman J. APACHE II: A severity of disease classification system. *Critical Care Medicine*, 1985, 13(10), 818-829. 1985; 13:818.
113. Kola A, Maciejewski O, Sohr D, Ziesing S, Gastmeier P. Clinical impact of infections caused by ESBL-producing *E. coli* and *K. pneumoniae*. *Scand J Infect Dis.* 2007; 39:975-982.
114. Laksai Y, Severino M, Perilli M, Amicosante G, Bonfiglio G, Stefani S. First identification of an SHV-12 extended-spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Italy. *J Antimicrob Chemother.* 2000; 45:349-351.
115. Lautenbach E, Patel JB, Bilker WB, Edelstein PH, Fishman NO. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: Risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *Clin Infect Dis.* 2001; 32:1162-1171.
116. Lee NY, Huang WH, Tsui KC, Hsueh PR, Ko WC. Carbapenem therapy for bacteremia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* or *Klebsiella pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011; 70:150-153.
117. Lee NY, Lee CC, Huang WH, Tsui KC, Hsueh PR, Ko WC. Carbapenem therapy for bacteremia due to extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* or *Klebsiella pneumoniae*: Implications of ertapenem susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56:2888-2893.
118. Lee SH, Kim JY, Shin SH, et al. Dissemination of SHV-12 and characterization of new AmpC-type beta-lactamase genes among clinical isolates of enterobacter species in Korea. *J Clin Microbiol.* 2003; 41:2477-2482.

119. Leflon-Guibout V, Jurand C, Bonacorsi S, et al. Emergence and spread of three clonally related virulent isolates of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* with variable resistance to aminoglycosides and tetracycline in a french geriatric hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48:3736-3742.
120. Lefort A, Panhard X, Clermont O, et al. Host factors and portal of entry outweigh bacterial determinants to predict the severity of *Escherichia coli* bacteremia. *J Clin Microbiol.* 2011; 49:777-783.
121. Levy M.M., Fink M.P., Marshall J.C., Abraham E., Angus D., Cook D. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS international sepsis definitions conference. *Crit Care Med* 2003; 31: 1250-6. 2003; 31:1250-1256.
122. Lewis JS,2nd, Herrera M, Wickes B, Patterson JE, Jorgensen JH. First report of the emergence of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) as the predominant ESBL isolated in a U.S. health care system. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51:4015-4021.
123. Lin MF, Huang ML, Lai SH. Risk factors in the acquisition of extended-spectrum beta-lactamase *Klebsiella pneumoniae*: A case-control study in a district teaching hospital in Taiwan. *J Hosp Infect.* 2003; 53:39-45.
124. Lin WJ, Yeh WC. Implication of toll-like receptor and tumor necrosis factor alpha signaling in septic shock. *Shock.* 2005; 24:206-209.
125. Livermore DM. Beta-lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. *J Antimicrob Chemother.* 1998; 41 Suppl D:25-41.
126. Livermore DM. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1995; 8:557-584.
127. Lizarralde E, Gutiérrez A, Martínez P, Franco R, García N, Miguel F. Bacteriemia adquirida en la comunidad: Elaboración de un modelo de predicción clínica en pacientes ingresados en un servicio de medicina interna. *Med Clin (Barc)* 2004;123(7):241-6.
128. Lopez-Cerero L, Picon E, Morillo C, et al. Comparative assessment of inoculum effects on the antimicrobial activity of amoxicillin-clavulanate and piperacillin-tazobactam with extended-spectrum beta-lactamase-producing and extended-spectrum beta-lactamase-non-producing *Escherichia coli* isolates. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16:132-136.

129. Luzzaro F, Viganò EF, Fossati D, et al. Prevalence and drug susceptibility of pathogens causing bloodstream infections in northern Italy: A two-year study in 16 hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2002; 21:849-855.
130. Lye DC, Wijaya L, Chan J, Teng CP, Leo YS. Ertapenem for treatment of extended-spectrum beta-lactamase-producing and multidrug-resistant gram-negative bacteraemia. *Ann Acad Med Singapore*. 2008; 37:831-834.
131. Ma L, Ishii Y, Chang FY, Yamaguchi K, Ho M, Siu LK. CTX-M-14, a plasmid-mediated CTX-M type extended-spectrum beta-lactamase isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46:1985-1988.
132. MacGowan A. Breakpoints for extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae: Pharmacokinetic/pharmacodynamic considerations. *Clin Microbiol Infect*. 2008; 14 Suppl 1:166-168.
133. Marchandin H, Carrière C, Sirot D, Pierre HJ, Darbas H. TEM-24 produced by four different species of enterobacteriaceae, including *Providencia rettgeri*, in a single patient. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; 43:2069-2073.
134. Martínez JA, Soto S, Fabrega A, et al. Relationship of phylogenetic background, biofilm production, and time to detection of growth in blood culture vials with clinical variables and prognosis associated with *Escherichia coli* bacteremia. *J Clin Microbiol*. 2006; 44:1468-1474.
135. Martínez-Martínez L, Hernández-Alles S, Alberti S, Tomás JM, Benedi VJ, Jacoby GA. In vivo selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum-cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996; 40:342-348.
136. Martínez-Martínez L, Pascual A, Hernández-Alles S, et al. Roles of beta-lactamases and porins in activities of carbapenems and cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; 43:1669-1673.
137. Matsumoto Y, Ikeda F, Kamimura T, Yokota Y, Mine Y. Novel plasmid-mediated beta-lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*. 1988; 32:1243-1246.
138. McCabe W, Jackson G. Gram-negative bacteremia I. etiology and ecology. *Arch Intern Med*. 1962; 110:847-855.

139. Melzer M, Petersen I. Mortality following bacteraemic infection caused by extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *E. coli* compared to non-ESBL producing *E. coli*. *J Infect.* 2007; 55:254-259.
140. Mesa RJ, Blanc V, Blanch AR, et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *J Antimicrob Chemother.* 2006; 58:211-215.
141. Metan G, Zarakolu P, Cakir B, Hascelik G, Uzun O. Clinical outcomes and therapeutic options of bloodstream infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents.* 2005; 26:254-257.
142. Meyer KS, Urban C, Eagan JA, Berger BJ, Rahal JJ. Nosocomial outbreak of *Klebsiella* infection resistant to late-generation cephalosporins. *Ann Intern Med.* 1993; 119:353-358.
143. Miranda G, Castro N, Leanos B, et al. Clonal and horizontal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* expressing SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase in a mexican pediatric hospital. *J Clin Microbiol.* 2004; 42:30-35.
144. Mirelis B, Navarro F, Miro E, Mesa RJ, Coll P, Prats G. Community transmission of extended-spectrum beta-lactamase. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9:1024-1025.
145. Miro E, Mirelis B, Navarro F, et al. Surveillance of extended-spectrum beta-lactamases from clinical samples and faecal carriers in Barcelona, Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56:1152-1155.
146. Moland ES, Black JA, Hossain A, Hanson ND, Thomson KS, Pottumarthy S. Discovery of CTX-M-like extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolates from five US states. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47:2382-2383.
147. Moss M, Martin GS. A global perspective on the epidemiology of sepsis. *Intensive Care Med.* 2004; 30:527-529.
148. Mulvey MR, Bryce E, Boyd D, et al. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *klebsiella* spp. in canadian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48:1204-1214.
149. Munday CJ, Xiong J, Li C, Shen D, Hawkey PM. Dissemination of CTX-M type beta-lactamases in enterobacteriaceae isolates in the people's Republic of China. *Int J Antimicrob Agents.* 2004; 23:175-180.

150. Murray P, Baron E, Jorgensen H, Landry M, Pfaller M. Manual of clinical microbiology, 9th edition . Edited by DC: ASM Press, 2007 2488 pp., illustrated. 2007.
151. Mylotte JM, Tayara A, Goodnough S. Epidemiology of bloodstream infection in nursing home residents: Evaluation in a large cohort from multiple homes. Clin Infect Dis. 2002; 35:1484-1490.
152. Naas T, Namdari F, Reglier-Poupet H, Poyart C, Nordmann P. Panresistant extended-spectrum beta-lactamase SHV-5-producing *Acinetobacter baumannii* from New York city. J Antimicrob Chemother. 2007; 60:1174-1176.
153. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 6th ed. approved standard M7-A6. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, PA. 2003.
154. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 13th informational supplement. NCCLS document M100-S13. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, PA. 2003.
155. Naumovski L, Quinn JP, Miyashiro D, et al. Outbreak of ceftazidime resistance due to a novel extended-spectrum beta-lactamase in isolates from cancer patients. Antimicrob Agents Chemother. 1992; 36:1991-1996.
156. Neonakis IK, Scoulica EV, Dimitriou SK, Gikas AI, Tselentis YJ. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases produced by clinical isolates in a university hospital in Greece: Detection of SHV-5 in *Pseudomonas aeruginosa* and prevalence of SHV-12. Microb Drug Resist. 2003; 9:161-165.
157. Nucleo E, Spalla M, Piazza A, et al. Emergence of a VIM-1 MBL and CTX-M-15 ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* clone from acute and rehabilitation hospitals in Italy. New Microbiol. 2013; 36:279-282.
158. Nuesch-Inderbinen MT, Kayser FH, Hachler H. Survey and molecular genetics of SHV beta-lactamases in enterobacteriaceae in Switzerland: Two novel enzymes, SHV-11 and SHV-12. Antimicrob Agents Chemother. 1997; 41:943-949.
159. Olson AB, Silverman M, Boyd DA, et al. Identification of a progenitor of the CTX-M-9 group of extended-spectrum beta-lactamases from *Kluyvera*

- georgiana* isolated in Guyana. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49:2112-2115.
160. Ortega M, Marco F, Soriano A, et al. Analysis of 4758 *Escherichia coli* bacteraemia episodes: Predictive factors for isolation of an antibiotic-resistant strain and their impact on the outcome. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 63:568-574.
161. Oteo J, Bautista V, Lara N, et al. Parallel increase in community use of fosfomicin and resistance to fosfomicin in extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65:2459-2463.
162. Oteo J, Orden B, Bautista V, et al. CTX-M-15-producing urinary *Escherichia coli* O25b-ST131-phylogroup B2 has acquired resistance to fosfomicin. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 64:712-717.
163. Oteo J, Navarro C, Cercenado E, et al. Spread of *Escherichia coli* strains with high-level cefotaxime and ceftazidime resistance between the community, long-term care facilities, and hospital institutions. *J Clin Microbiol.* 2006; 44:2359-2366.
164. Pai H, Choi EH, Lee HJ, Hong JY, Jacoby GA. Identification of CTX-M-14 extended-spectrum beta-lactamase in clinical isolates of *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, and *Klebsiella pneumoniae* in Korea. *J Clin Microbiol.* 2001; 39:3747-3749.
165. Palucha A, Mikiewicz B, Gniadkowski M. Diversification of *Escherichia coli* expressing an SHV-type extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) during a hospital outbreak: Emergence of an ESBL-hyperproducing strain resistant to expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43:393-396.
166. Park SH, Choi SM, Lee DG, et al. Emergence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* as a cause of community-onset bacteremia in South Korea: Risk factors and clinical outcomes. *Microb Drug Resist.* 2011; 17:537-544.
167. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: A clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18:657-686.

168. Paterson DL, Yu VL. Extended-spectrum beta-lactamases: A call for improved detection and control. *Clin Infect Dis.* 1999; 29:1419-1422.
169. Paterson DL, Singh N, Rihs JD, Squier C, Rihs BL, Muder RR. Control of an outbreak of infection due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in a liver transplantation unit. *Clin Infect Dis.* 2001; 33:126-128.
170. Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A, et al. Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum beta-lactamases: Implications for the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol.* 2001; 39:2206-2212.
171. Paterson DL, Mulazimoglu L, Casellas JM, et al. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum beta-lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. *Clin Infect Dis.* 2000; 30:473-478.
172. Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A, et al. International prospective study of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: Implications of extended-spectrum beta-lactamase production in nosocomial infections. *Ann Intern Med.* 2004; 140:26-32.
173. Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A, et al. Antibiotic therapy for *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: Implications of production of extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Infect Dis.* 2004; 39:31-37.
174. Peirano G, van der Bij AK, Gregson DB, Pitout JD. Molecular epidemiology over an 11-year period (2000 to 2010) of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* causing bacteremia in a centralized canadian region. *J Clin Microbiol.* 2012; 50:294-299.
175. Pena C, Pujol M, Ardanuy C, et al. Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42:53-58.
176. Peralta G, Sanchez MB, Garrido JC, et al. Impact of antibiotic resistance and of adequate empirical antibiotic treatment in the prognosis of patients with *Escherichia coli* bacteraemia. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 60:855-863.

177. Peralta G, Lamelo M, Alvarez-Garcia P, et al. Impact of empirical treatment in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. bacteremia. A multicentric cohort study. BMC Infect Dis. 2012; 12:245.
178. Perilli M, Dell'Amico E, Segatore B, et al. Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases produced by nosocomial isolates of enterobacteriaceae from an italian nationwide survey. J Clin Microbiol. 2002; 40:611-614.
179. Pitout JD. Recent changes in the epidemiology and management of extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae. F1000 Med Rep. 2009; 1:10.3410/M1-84.
180. Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae: An emerging public-health concern. Lancet Infect Dis. 2008; 8:159-166.
181. Pitout JD, Gregson DB, Campbell L, Laupland KB. Molecular characteristics of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates causing bacteremia in the Calgary Health Region from 2000 to 2007: Emergence of clone ST131 as a cause of community-acquired infections. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53:2846-2851.
182. Pitout JD, Nordmann P, Laupland KB, Poirel L. Emergence of enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. J Antimicrob Chemother. 2005; 56:52-59.
183. Pitout JD, Hanson ND, Church DL, Laupland KB. Population-based laboratory surveillance for *Escherichia coli*-producing extended-spectrum beta-lactamases: Importance of community isolates with blaCTX-M genes. Clin Infect Dis. 2004; 38:1736-1741.
184. Pitout JD, Campbell L, Church DL, Gregson DB, Laupland KB. Molecular characteristics of travel-related extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from the Calgary Health Region. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53:2539-2543.
185. Pitout JD, Gregson DB, Church DL, Elsayed S, Laupland KB. Community-wide outbreaks of clonally related CTX-M-14 beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains in the Calgary Health Region. J Clin Microbiol. 2005; 43:2844-2849.

186. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev. 1998; 11:589-603.
187. Poirel L, Lebessi E, Castro M, Fevre C, Foustoukou M, Nordmann P. Nosocomial outbreak of extended-spectrum beta-lactamase SHV-5-producing isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in athens, Greece. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48:2277-2279.
188. Pournaras S, Poulou A, Voulgari E, Vrioni G, Kristo I, Tsakris A. Detection of the new metallo-beta-lactamase VIM-19 along with KPC-2, CMY-2 and CTX-M-15 in *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother. 2010; 65:1604-1607.
189. Qureshi ZA, Paterson DL, Peleg AY, et al. Clinical characteristics of bacteraemia caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae in the era of CTX-M-type and KPC-type beta-lactamases. Clin Microbiol Infect. 2012; 18:887-893.
190. Rasheed JK, Jay C, Metchock B, et al. Evolution of extended-spectrum beta-lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. Antimicrob Agents Chemother. 1997; 41:647-653.
191. Retamar P, Portillo MM, Lopez-Prieto MD, et al. Impact of inadequate empirical therapy on the mortality of patients with bloodstream infections: A propensity score-based analysis. Antimicrob Agents Chemother. 2012; 56:472-478.
192. Rice LB, Eckstein EC, DeVente J, Shlaes DM. Ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates recovered at the cleveland department of veterans affairs medical center. Clin Infect Dis. 1996; 23:118-124.
193. Rice L, Sahm D, Bonomo R. Mechanisms of resistance to antibacterial agents. En Manual of Clinical Microbiology, ASM Press. 2003; :1074-1101.
194. Rodriguez-Bano J, Pascual A. Clinical significance of extended-spectrum beta-lactamases. Expert Rev Anti Infect Ther. 2008; 6:671-683.
195. Rodriguez-Bano J, Navarro MD. Extended-spectrum beta-lactamases in ambulatory care: A clinical perspective. Clin Microbiol Infect. 2008; 14 Suppl 1:104-110.
196. Rodriguez-Bano J, de Cueto M, Retamar P, Galvez-Acebal J. Current management of bloodstream infections. Expert Rev Anti Infect Ther. 2010; 8:815-829.

197. Rodriguez-Bano 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; 62:1142-1149.
198. Rodriguez-Bano J, Navarro MD, Retamar P, Picon E, Pascual A, Extended-Spectrum Beta-Lactamases-Red Espanola de Investigacion en Patologia Infecciosa Group/Grupo de Estudio de Infeccion Hospitalaria. Beta-Lactam/beta-lactam inhibitor combinations for the treatment of bacteremia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: A post hoc analysis of prospective cohorts. *Clin Infect Dis.* 2012; 54:167-174.
199. Rodriguez-Bano J, Picon E, Navarro MD, Lopez-Cerero L, Pascual A, ESBL-REIPI Group. Impact of changes in CLSI and EUCAST breakpoints for susceptibility in bloodstream infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18:894-900.
200. Rodriguez-Bano J, Mingorance J, Fernandez-Romero N, et al. Virulence profiles of bacteremic extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: Association with epidemiological and clinical features. *PLoS One.* 2012; 7:e44238.
201. Rodriguez-Bano J, Navarro MD, Romero L, et al. Risk-factors for emerging bloodstream infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14:180-183.
202. Rodriguez-Bano J, Navarro MD, Romero L, et al. Bacteremia due to extended-spectrum beta -lactamase-producing *Escherichia coli* in the CTX-M era: A new clinical challenge. *Clin Infect Dis.* 2006; 43:1407-1414.
203. Rodriguez-Bano J, Navarro MD, Romero L, et al. Clinical and molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* as a cause of nosocomial infection or colonization: Implications for control. *Clin Infect Dis.* 2006; 42:37-45.
204. Rodriguez-Bano J, Navarro MD, Romero L, et al. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. *J Clin Microbiol.* 2004; 42:1089-1094.

205. Rodríguez-Bano J, Alcalá J, Cisneros JM, et al. *Escherichia coli* producing SHV-type extended-spectrum beta-lactamase is a significant cause of community-acquired infection. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 63:781-784.
206. Rodríguez-Bano J, Alcalá JC, Cisneros JM, et al. Community infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Arch Intern Med.* 2008; 168:1897-1902.
207. Rodríguez-Bano J, Picon E, Gijón P, et al. Community-onset bacteremia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: Risk factors and prognosis. *Clin Infect Dis.* 2010; 50:40-48.
208. Rodríguez-Bano J, López-Prieto MD, Portillo MM, et al. Epidemiology and clinical features of community-acquired, healthcare-associated and nosocomial bloodstream infections in tertiary-care and community hospitals. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16:1408-1413.
209. Rodríguez-Baño J, Paño-Pardo J, Álvarez-Rochac L, Asensio Aea. Programas de optimización de uso de antimicrobianos (PROA) en hospitales españoles: Documento de consenso GEIH-SEIMC, SEFH y SEMPSPH. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012; 30(1):22.e1–22.e23.
210. Rodríguez-Creixems M, Alcalá L, Muñoz P, Cercenado E, Vicente T, Bouza E. Bloodstream infections: Evolution and trends in the microbiology workload, incidence, and etiology, 1985-2006. *Medicine (Baltimore).* 2008; 87:234-249.
211. Romero L, López L, Rodríguez-Bano J, Ramon Hernández J, Martínez-Martínez 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; 11:625-631.
212. Romero L, López L, Martínez-Martínez L, Guerra B, Hernández JR, Pascual A. Characterization of the first CTX-M-14-producing *Salmonella enterica* serotype enteritidis isolate. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 53:1113-1114.
213. Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14 Suppl 1:33-41.
214. Rottier WC, Ammerlaan HS, Bonten MJ. Effects of confounders and intermediates on the association of bacteraemia caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae and patient outcome: A meta-analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67:1311-1320.

-
215. Sabaté M, Tarragó R, Navarro F, et al. Cloning and sequence of the gene encoding a novelcefotaxime-hydrolyzing β -lactamase (CTX-M-9) from *Escherichia coli* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; Vol. 44:p. 1970–1973.
 216. Sabate M, Miro E, Navarro F, et al. Beta-lactamases involved in resistance to broad-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. clinical isolates collected between 1994 and 1996, in Barcelona (Spain). *J Antimicrob Chemother.* 2002; 49:989-997.
 217. Saenz Y, Zarazaga M, Brinas L, Ruiz-Larrea F, Torres C. Mutations in *gyrA* and *parC* genes in nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* strains from food products, humans and animals. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 51:1001-1005.
 218. Saladin M, Cao VT, Lambert T, et al. Diversity of CTX-M beta-lactamases and their promoter regions from enterobacteriaceae isolated in three parisian hospitals. *FEMS Microbiol Lett.* 2002; 209:161-168.
 219. Salso S, Culebras E, Andrade R, Picazo JJ. Outbreak of TEM-24-producing *Enterobacter aerogenes* in a spanish hospital. *Microb Drug Resist.* 2003; 9:299-305.
 220. Schiappa DA, Hayden MK, Matushek MG, et al. Ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* bloodstream infection: A case-control and molecular epidemiologic investigation. *J Infect Dis.* 1996; 174:529-536.
 221. Schwaber MJ, Carmeli Y. Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum beta-lactamase production in enterobacteriaceae bacteraemia: A systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 60:913-920.
 222. Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Kaye KS, Ben-Ami R, Schwartz D, Carmeli Y. Clinical and economic impact of bacteremia with extended- spectrum-beta-lactamase-producing enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50:1257-1262.
 223. Siegman-Igra Y, Fourer B, Orni-Wasserlauf R, et al. Reappraisal of community-acquired bacteremia: A proposal of a new classification for the spectrum of acquisition of bacteremia. *Clin Infect Dis.* 2002; 34:1431-1439.
 224. Sirot D. Extended-spectrum plasmid-mediated beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother.* 1995; 36 Suppl A:19-34.

225. Sirot D, Sirot J, Labia R, et al. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: Identification of CTX-1, a novel beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother.* 1987; 20:323-334.
226. Siu LK, Lu PL, Hsueh PR, et al. Bacteremia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric oncology ward: Clinical features and identification of different plasmids carrying both SHV-5 and TEM-1 genes. *J Clin Microbiol.* 1999; 37:4020-4027.
227. Sligl W, Taylor G, Brindley PG. Five years of nosocomial gram-negative bacteremia in a general intensive care unit: Epidemiology, antimicrobial susceptibility patterns, and outcomes. *Int J Infect Dis.* 2006; 10:320-325.
228. Soge OO, Queenan AM, Ojo KK, Adeniyi BA, Roberts MC. CTX-M-15 extended-spectrum (beta)-lactamase from Nigerian *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 57:24-30.
229. Tausova D, Dolejska M, Cizek A, et al. *Escherichia coli* with extended-spectrum beta-lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in great cormorants and mallards in Central Europe. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67:1103-1107.
230. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995; 33:2233-2239.
231. Teshager T, Dominguez L, Moreno MA, Saenz Y, Torres C, Cardenosa S. Isolation of an SHV-12 beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strain from a dog with recurrent urinary tract infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44:3483-3484.
232. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25:4876-4882.
233. Torrabadella P, Giménez M. Diagnóstico y tratamiento de los grandes síndromes en patología infecciosa. In: 14ª ed. Madrid: Farreras, Ediciones Harcourt, 2000;2:2885-2892.

-
234. Tschudin-Sutter S, Frei R, Dangel M, Strandén A, Widmer AF. Rate of transmission of extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae without contact isolation. *Clin Infect Dis*. 2012; 55:1505-1511.
235. Tumbarello M, Spanu T, Di Bidino R, et al. Costs of bloodstream infections caused by *Escherichia coli* and influence of extended-spectrum-beta-lactamase production and inadequate initial antibiotic therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54:4085-4091.
236. Tumbarello M, Sanguinetti M, Montuori E, et al. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing enterobacteriaceae: Importance of inadequate initial antimicrobial treatment. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51:1987-1994.
237. Tumbarello M, Sali M, Trecarichi EM, et al. Bloodstream infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: Risk factors for inadequate initial antimicrobial therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52:3244-3252.
238. Uzunovic-Kamberovic S, Bedenic B, Vranes J. Predominance of SHV-5 beta-lactamase in enteric bacteria causing community-acquired urinary tract infections in Bosnia and Herzegovina. *Clin Microbiol Infect*. 2007; 13:820-823.
239. Valenzuela E, Mantilla A, Reguero M, et al. Detection of CTX-M-1, CTX-M-15, and CTX-M-2 in clinical isolates of enterobacteriaceae in Bogotá, Colombia. *J Clin Microbiol*. 2006; 44: 1919-1920.
240. Valles J, Calbo E, Anoro E, et al. Bloodstream infections in adults: Importance of healthcare-associated infections. *J Infect*. 2008; 56:27-34.
241. Valverde A, Coque TM, Garcia-San Miguel L, Baquero F, Canton R. Complex molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae*: A long-term perspective from a single institution in Madrid. *J Antimicrob Chemother*. 2008; 61:64-72.
242. Valverde A, Coque TM, Sanchez-Moreno MP, Rollan A, Baquero F, Canton R. Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae during nonoutbreak situations in Spain. *J Clin Microbiol*. 2004; 42:4769-4775.
243. Van der Bij AK, Peirano G, Goessens WH, van der Vorm ER, van Westreenen M, Pitout JD. Clinical and molecular characteristics of extended-spectrum-beta-

- lactamase-producing *Escherichia coli* causing bacteremia in the Rotterdam area, Netherlands. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55:3576-3578.
244. Vardakas KZ, Tansarli GS, Rafailidis PI, Falagas ME. Carbapenems versus alternative antibiotics for the treatment of bacteraemia due to enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases: A systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67:2793-2803.
245. Velasco C, Romero L, Martinez JM, Rodriguez-Bano J, Pascual A. Analysis of plasmids encoding extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) from *Escherichia coli* isolated from non-hospitalised patients in Seville. *Int J Antimicrob Agents.* 2007; 29:89-92.
246. Velasco E, Byington R, Martins CA, Schirmer M, Dias LM, Goncalves VM. Prospective evaluation of the epidemiology, microbiology, and outcome of bloodstream infections in hematologic patients in a single cancer center. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2003; 22:137-143.
247. Warren RE, Harvey G, Carr R, Ward D, Doroshenko A. Control of infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms in hospitals and the community. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14 Suppl 1:124-133.
248. Warren RE, Ensor VM, O'Neill P, et al. Imported chicken meat as a potential source of quinolone-resistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 61:504-508.
249. Weill FX, Demartin M, Tande D, Espie E, Rakotoarivony I, Grimont PA. SHV-12-like extended-spectrum-beta-lactamase-producing strains of *Salmonella enterica* serotypes babelsberg and enteritidis isolated in France among infants adopted from Mali. *J Clin Microbiol.* 2004; 42:2432-2437.
250. Wiener J, Quinn JP, Bradford PA, et al. Multiple antibiotic-resistant *Klebsiella* and *Escherichia coli* in nursing homes. *JAMA.* 1999; 281:517-523.
251. Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific Region. *Clin Infect Dis.* 2001; 32 Suppl 2:S94-103.
252. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: Analysis of 24,179 cases

- from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis*. 2004; 39:309-317.
253. Wong-Beringer A, Hindler J, Loeloff M, et al. Molecular correlation for the treatment outcomes in bloodstream infections caused by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* with reduced susceptibility to ceftazidime. *Clin Infect Dis*. 2002; 34:135-146.
254. Woodford N, Ward ME, Kaufmann ME, et al. Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother*. 2004; 54:735-743.
255. Wu UI, Wang JL, Chen WC, Chang SC, Chen YC. Risk factors and outcomes of *Escherichia coli* bacteremia caused by strains that produce CTX-M or non-CTX-M extended-spectrum-beta-lactamases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011; 30:33-39.
256. Wu UI, Yang CS, Chen WC, Chen YC, Chang SC. Risk factors for bloodstream infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *J Microbiol Immunol Infect*. 2010; 43:310-316.
257. Wu UI, Chen WC, Yang CS, et al. Ertapenem in the treatment of bacteremia caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: A propensity score analysis. *Int J Infect Dis*. 2012; 16:e47-52.
258. Yan JJ, Wu SM, Tsai SH, Wu JJ, Su IJ. Prevalence of SHV-12 among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases and identification of a novel AmpC enzyme (CMY-8) in southern Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44:1438-1442.

8. ANEXOS

8.1. Anexo I: Protocolo de datos generales de hospital

Hospital

Tipo: General Comarcal Universitario

Número de Camas:

Dispone de: UCI Unidad neonatal Programa de Transplantes

Población de referencia atendida por el hospital: habitantes

Número de casos de bacteriemia por E.coli productor de BLEE en el periodo estudiado	
Número de casos de adquisición nosocomial	
Número de casos de adquisición comunitaria	
Número de casos de bacteriemia comunitaria en el periodo estudiado	
Número de casos de bacteriemia comunitaria por E.coli en el periodo estudiado	
Número de hemocultivos realizados en área de Urgencias en el periodo estudiado	
Número de urgencias atendidas en el periodo estudiado	
Número de casos de bacteriemia nosocomial en el periodo estudiado	
Número de casos de bacteriemia nosocomial por E.coli en el periodo estudiado	
Número de ingresos en el periodo estudiado	
Número de estancias en el periodo estudiado	

8.2. Anexo II: Protocolo de recogida de datos

ANEXO 1. PROTOCOLO DE RECOGIDA DE DATOS

BACTERIEMIAS E. COLI PRODUCTOR DE BLEE CASO N°..... CONTROL: A B N°

NOMBRE: **SERVICIO:**..... **CAMA:**

HOSPITAL: **N°H:** **SEXO:** H M **EDAD:**

Fecha ingreso: .../.../..... Fecha hemocultivo (casos y controles B) ó alta (controles A): .../.../.....

Nosocomial. Días de estancia previa: Comunitaria

Rel. con atención sanitaria: Ingreso año previo Centro sociosanitario Diálisis

Seguimiento en consultas externas hospital H día H. domiciliaria Transplantado

ENFERMEDADES DE BASE

McCabe: No fatal Ultimam. fatal Rapid. fatal Índice Charlson: APACHE (ingreso):

Diabetes EPOC Insuf. cardiaca Neoplasia Cirrosis Insuf. renal crónica

Enf. neurológica discapacitante Enfermedad ó tratamiento inmunosupresor:

Uropatía obstructiva. Tipo: HBP Ca. próstata Ca. renal Litiasis renal Otra

Enfermedad vía biliar y pancreática salvo litiasis biliar no complicada Litiasis biliar no complicada

Patología digestiva crónica. Tipo: Enf. inflamatoria intestinal Diverticulosis Otra:

Neutropenia (menos de 100 menos de 500 menos de 1000)

PROCEDIMIENTOS INVASIVOS Y DÍAS (referidos al “día de referencia”)

Catéter venoso..... Central Sonda urinaria transitoria Sonda urinaria permanente

Ventilación mecánica (1 semana previa)

Cirugía (1 mes previo) Loc: Cabeza y cuello Tórax Abdomen Urogenital Miembros

Proced. endoscópico (1 sem. antes) Tipo: Gastroscopia CPRE Colonoscopia Broncoscopia

Prótesis biliar actual Cirugía vía biliar previa

Procedimiento urológico (1 mes previo) Tipo: Prostatectomía abdominal Resección transuretral

Cistoscopia Cirugía renal Nefrostomía

Antibioterapia previa (2 meses) (señalar vía y días, a anotar el antimicrobiano específico)

Antimicrobiano	Vía	Días	Antimicrobiano	Vía	Días

CLINICA (solo casos y controles B)

Origen: Desconocido Urinario Intraabdominal Neumonía Otras respiratorias Catéter

Gastroenteritis Intraabdominal (biliar PBE Peritonitis secundaria Otras)

Aparato genital Piel y partes blandas

Osteoarticular Otras

ADemás: Es infección de localización quirúrgica (superficial profunda órgano/espacio)

Pitt score (día de prescripción):

Antes de tratamiento antimicrobiano y primeras 24 h de tratamiento:

Fiebre >39°C Hipotermia <35,5°C

Sepsis Sepsis grave Shock séptico Sind disf multiorg Coagulopatía

Leucocitosis (>12000) Leucopenia (<4000) Neutropenia Insuficiencia renal aguda

TRATAMIENTO ANTIMICROBIANO (solo casos y controles B)

	Antimicrobiano	Dosis	Vía	Inapropiado
Empírico				
Dirigido				

PRONOSTICO (Solo si Karnofsky previo >10)

TODOS: Exitus (14 días) Exitus (30 días) Relacionado No relacionado

Estancia posterior días

CASOS Y CONTROLES B ADEMAS:

Cur clínica Curación microbiológica Recidiva clínica Recidiva microbiológica

Fracaso terapéutico Superinfección

8.3. Anexo III: Documento de consentimiento informado.

Red Española de de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI)

Proyecto 16. Bacteriemias *E. coli* BLEE

DOCUMENTO DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL ESTUDIO “BACTERIEMIAS POR ESCHERICHIA COLI PRODUCTOR DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO: CARACTERÍSTICAS CLINICAS, FACTORES DE RIESGO Y ANÁLISIS PRONOSTICO. RED ESPAÑOLA DE INVESTIGACIÓN EN PATOLOGÍA INFECCIOSA.”

HOSPITAL

PACIENTE: N^oHP:

INFORMACION

Nuestro Hospital está participando en un estudio multicéntrico que pretende obtener información sobre los factores de riesgo, la evolución y el pronóstico de las bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasa de espectro extendido (es decir, de una infección detectada mediante cultivos de sangre, causada por una bacteria común pero que en este caso es resistente a múltiples antibióticos), que consideramos será de utilidad para el mejor tratamiento de otros pacientes en el futuro. Para ello, simplemente necesitamos recoger datos de la historia clínica de algunos pacientes que tienen dicha infección y de otros que no la tienen. Todos los datos que se recojan serán tratados con absoluta confidencialidad y solo serán usados para el estudio. Su consentimiento no supone modificación alguna en los cuidados, pruebas diagnósticas o tratamiento que el personal de enfermería y su médico consideren apropiado aconsejarle ó proporcionarle. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético del hospital.

Le solicitamos su consentimiento para recoger los datos necesarios para el estudio.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, Don/Doña, de años, en calidad de paciente / familiar / tutor del paciente (señálese lo que proceda), habiendo sido informado/a por el Dr. sobre el estudio arriba mencionado, acepto que se recojan de la historia clínica los datos necesarios para la realización de dicho estudio. Entiendo que mi consentimiento es voluntario y que puedo retirarlo cuando quiera.

En, a de de 200....

Fdo: El paciente / familiar (señalar lo que proceda)

Fdo: Dr.

A. TOTAL APS (Acute physiological score):

Glasgow

- Apertura de ojos: espontánea	4
a la voz	3
al dolor	2
no	1
- Respuesta verbal: orientada	5
confusa	4
palabras inapropiadas	3
sonidos incomprensibles	2
no	1
- Respuesta motora: obedece órdenes	6
localiza dolor	5
retirada	4
flexión	3
extensión	2
no	1

B. Edad:

#44	0 puntos
65-74	5 puntos
45-45	2 puntos
>75	6 puntos
55-64	3 puntos

C. Estado crónico de salud:

Si el paciente tiene insuficiencia de órgano ó inmunodepresión en función de los siguientes criterios:

- Insuficiencia de órgano: debe ser evidente antes del ingreso. Hepática: cirrosis. Cardiovascular: ICC NYHA clase IV. Respiratorio: EPOC, Htpulmonar, hipoxia crónica. Renal: diálisis crónica.
 - Inmunodepresión: tto. inmunosupresor (quimioterapia, radioterapia, corticoides) ó enfermedad inmunodepresora (leucemia, linfoma, SIDA)
- a. Pacientes no quirúrgicos ó cirugía emergente: 5 puntos
b. Pacientes con cirugía electiva: 2 puntos

APACHE: TOTAL APS + EDAD + ESTADO CRÓNICO DE SALUD =.....

8.5. Anexo V: Índice de CHARLSON

Method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation ^[47].

PESO	CONDICIONES
1	Infarto de miocardio Insuficiencia cardíaca congestiva Enfermedad vascular periférica Demencia Enfermedad pulmonar crónica Enfermedad del tejido conectivo Enfermedad ulcerosa Enfermedad hepática leve Diabetes
2	Hemiplejía Enfermedad renal moderada o grave Diabetes con afectación en órgano diana Cualquier tumor Leucemia Linfoma
3	Enfermedad hepática grave
6	Tumor sólido metastásico SIDA

8.6. Anexo VI: Score de Pitt de bacteriemia

Recoger la puntuación más alta entre el día de la bacteriemia y las 48 horas anteriores. La temperatura oral se considera alrededor de 0,5 °C mayor que la axilar^[172].

Criterio	Puntos
Fiebre (T ^a oral)	
≤35°C ó ≥40°C	2
35,1-36 ó 39-39,9	1
36,1-38,9	0
Hipotensión	
Disminución aguda de la TA sistólica >30 mmHg y diastólica <20 mmHg, ó requerimiento de drogas vasopresoras intravenosas ó TA sistólica < 90 mmHg	2
Ventilación mecánica	2
Fallo cardiaco	4
Estado mental	
Alerta	0
Desorientado	1
Estuporoso	2
Comatoso	4

8.7. Anexo VII: Relación de antibióticos con código en el estudio

CÓDIGO	ANTIMICROBIANO	CÓDIGO	ANTIMICROBIANO
2	Ácido Fusídico	55	Enoxacino
3	Ácido Nalidíxico	56	Eritromicina
4	Ácido Pipemídico	65	Fosfomicina
6	Amikacina	67	Gentamicina
7	Amoxicilina	71	Imipenem-Cilastatina
8	Ampicilina	73	Isoniacida
11	Amoxicilina+ ác.clavulánico	76	Kanamicina
12	Azitromicina	212	Levofloxacina
13	Azlocilina	161	Meropenem
14	Aztreonam	85	Metronidazol
20	Cefaclor	98	Norfloxacino
21	Cefadroxilo	99	Ofloxacino
22	Cefalexina	104	Pefloxacino
23	Cefalotina	105	Penicilina
24	Cefamandol	107	Piperacilina-Tazobactam
25	Cefazolina	115	Rifampicina
151	Cefepima	116	Roxitromicina
26	Cefmetazol	119	Sulbactam-Ampicilina
27	Cefixima	123	Teicoplanina
170	Cefminox	129	Tobramicina
153	Cefnidir	131	Vancomicina
30	Cefotaxima	133	Otro Antibacteriano
31	Cefoxitina	134	Ertapenem
172	Cefpiroma	135	Linezolid
157	Cefpodoxima	223	Moxifloxacino
171	Cefprozil	93	Netilmicina
34	Ceftazidima	96	Nitrofurantoína
35	Ceftriaxona		
36	Ceftizoxima		
37	Cefuroxima		
38	Cefuroxima Acetil		
40	Ciprofloxacino		
41	Claritromicina		
221	Clinafloxacino		
42	Clindamicina		
43	Cloranfenicol		
44	Cloxacilina		
46	Cotrimoxazol (Trimet+Sulfamet)		
52	Doxiciclina		

9. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

- Jesús Rodríguez-Baño, **Encarnación Picón**, Paloma Gijón, José Ramón Hernández, Maite Ruíz, Carmen Peña, Manuel Almela, Benito Almirante, Fabio Grill, Javier Colomina, Monserrat Giménez, Antonio Oliver, Juan Pablo Horcajada, Gemma Navarro, Ana Coloma, and Alvaro Pascual. **"Community-onset bacteremia due to extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*: risk factors and prognosis"**. *Clinical Infectious Diseases*, 2010; 50: 40-48.
- Jesús Rodríguez-Baño, **Encarnación Picón**, Paloma Gijón, José Ramón Hernández, José M. Cisneros, Carmen Peña, Manuel Almela, Benito Almirante, Fabio Grill, Javier Colomina, Sonia Molinos, Antonio Oliver, Carlos Fernández-Mazarrasa, Gemma Navarro, Ana Coloma, Lorena López-Cerero and Alvaro Pascual. **"Risk Factors and Prognosis of Nosocomial Bloodstream Infections Caused by Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli*"**. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010; 48: 1726-1731.
- J. Rodríguez-Baño, **E. Picón**, M. D. Navarro, L. López-Cerero, Á. Pascual, and the ESBL-REIPI Group. **"Impact of changes in CLSI and EUCAST breakpoints for susceptibility in bloodstream infections due to extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*"**. *Clinical Microbiology and Infection*, 2011; 18: 894-900.
- Jesús Rodríguez-Baño, Pilar Retamar, Dolores Navarro, **Encarnación Picón**, Álvaro Pascual y la Red Española de Investigación en Patología Infecciosa- β -lactamasas de espectro extendido/Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria. **" β -lactam/ β -lactam inhibitor combinations for the treatment of bacteremia due to extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*: A post-hoc analysis of prospective cohorts"**. *Clinical Infectious Diseases*, 2012 ; 54: 167-174.