



**UNIVERSIDAD DE SEVILLA
Facultad de Medicina
Departamento de Medicina**

TESIS DOCTORAL

Seguimiento del estado de portador de enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido en recién nacidos sanos: estudio NEOBLEE.

Trabajo realizado para alcanzar el grado de Doctor por la licenciada en Medicina y Cirugía D^a M^a Jesús Rodríguez Revuelta.

Sevilla, 19 de Marzo de 2019



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
Facultad de Medicina
Departamento de Medicina

Dr. D. Jesús Rodríguez Baño, Profesor Asociado del Departamento de Medicina de la Universidad de Sevilla y Dra. D^a Salud Luna Lagares, Jefa de la Sección de Neonatología de la Unidad de Gestión Clínica Pediatría

CERTIFICAN:

Que la tesis para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla que lleva por título "Seguimiento del estado de portador de enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido en recién nacidos sanos: estudio NEOBLEE" ha sido realizada por D^a M^a Jesús Rodríguez Revuelta 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 19 de Marzo de 2019.

Fdo. Dr. D. Jesús Rodríguez Baño

Dra. D^a Salud Luna Lagares

AGRADECIMIENTOS

Agradecer en primer lugar al Dr. Rodríguez Baño por haberme acogido bajo su tutela y enseñarme tanto de Microbiología e infeccioso, de investigación y de estadística, todo esto siempre con una gran paciencia y empatía.

A la Dra. Luna Lagares, por haber confiado siempre en mí y haberme apoyado y guiado en este proyecto.

A la Dra. López Cerero, que me iluminó y ayudó en los primeros momentos de esta aventura, y me ha enseñado tanto del mundo de la Microbiología.

A todos los participantes de este estudio, por realizarlo de forma fiel y desinteresada.

A mis compañeros de Urgencias de Pediatría, Carmen, Oscar y M^a José, que vivieron los primeros años de este estudio, me ayudaron y apoyaron en todo momento.

A Julia y Soco, que comenzaron con las muestras neonatales y han sido la base para poder realizar el resto del seguimiento de los pacientes.

A mis compañeros de Neonatología, Mercedes, Nori, Pedro, Carmen, Inma e Isa, que han sufrido los fracasos experimentados y se han alegrado de los éxitos obtenidos.

A todas mis residentes de Pediatría, algunas de ellas ya adjuntas, en especial Carmen, Ana, Marta, Alba, Cristina, Helga, porque gracias a vosotras y vuestra entrega en las guardias he podido realizar este trabajo.

A Pedro, mi apoyo incondicional, que ha vivido conmigo todos los pasos del camino.

A mis padres, sin los cuales no hubiera podido conseguir estar donde estoy.

A mis hijas, Lola, Marta y Rocío, porque les he robado parte de su tiempo.

A mi marido, Álvaro, que me impulsó a comenzar este trabajo y me ha apoyado siempre, animándome en los momentos de mayor dificultad. Sin tí no hubiera sido posible realizarlo.

ÍNDICE

Índice	1
Índice de tablas	5
ABREVIATURAS	7
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. Resistencias microbianas	13
1.1.1. Tipos de resistencia	13
1.1.2. Mecanismos de resistencia	15
1.2. Beta-lactamasas. Beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE)	16
1.2.1. Definición de las beta-lactamasas	16
1.2.2. Clasificación de las beta-lactamasas	17
1.2.3. Beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE)	20
a) BLEE tipo TEM	20
b) BLEE tipo SHV	20
c) BLEE tipo CTX-M	21
d) BLEE tipo OXA	22
e) Otras BLEE	22
1.2.4. Microorganismos productores de BLEE	23
1.2.4.1. <i>Escherichia coli</i>	23
1.2.5. Epidemiología	24
1.2.5.1. Diseminación de las BLEE	24
1.2.5.2. Reservorios	26

1.2.5.3. Mecanismo de transmisión	27
a) Transmisión vertical (madre a hijo)	27
b) Transmisión horizontal	31
c) Transmisión a través de alimentos	31
1.2.5.4. Factores de riesgo de adquisición de colonización	32
a) Factores de riesgo de adquisición de la colonización por E-BLEE en adultos	32
b) Factores de riesgo de adquisición de colonización por E-BLEE en niños	33
1.2.5.5. Duración de colonización de E-BLEE en neonatos y madres	38
1.3. Microbiota intestinal. Sepsis neonatal. Resistencia microbiana en los neonatos	42
1.3.1. Microbiota intestinal en neonatos	42
1.3.2. Sepsis neonatal y sus factores de riesgo	44
1.3.2.1. Sepsis de transmisión vertical	44
a) Estreptococo del grupo B (EGB) o <i>Streptococcus agalactiae</i>	44
b) Otras bacterias	46
1.3.2.2. Sepsis de transmisión horizontal	47
2. JUSTIFICACIÓN	51
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	57
3.1. Hipótesis	59
3.2. Objetivos	59
4. ARTÍCULOS PUBLICADOS	63
4.1. Artículo 1	65

4.2. Artículo 2	73
5. RESUMEN GLOBAL DE RESULTADOS	81
5.1. Adquisición de nueva colonización por E-BLEE tras el parto: prevalencia, incidencia y factores asociados	83
5.2. Duración de colonización por E-BLEE tras el parto y factores asociados	84
6. DISCUSIÓN	89
7. CONCLUSIONES	109
8. BIBLIOGRAFÍA	115
9. ANEXOS	131
10. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	147

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación y propiedades de las beta-lactamasas según Bush, Jacoby y Medeiros	19
Tabla 2. Estudios de colonización por enterobacterias productora de beta-lactamasas de espectro extendido en recién nacidos	30
Tabla 3. Estudios de colonización por enterobacterias productora de beta-lactamasas de espectro extendido en niños tras el parto	36
Tabla 4. Estudios de duración de colonización por enterobacterias productora de beta-lactamasas de espectro extendido en niños	40

RELACIÓN DE ABREVIATURAS USADAS EN ESTA TESIS

ACP: All Children Population

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

BLEE: Beta-Lactamasas de Espectro Extendido

E-BLEE: Enterobacterias productoras de Beta-Lactamasas de Espectro Extendido

CLAV: Ácido Clavulánico

ECDC: European Center for Disease Control and Prevention

E. coli: Escherichia coli

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EGB: Estreptococo del grupo B

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

HR: Hazard Ratio

ITU: Infección del Tracto Urinario

K. pneumoniae: Klebsiella pneumoniae

MALDI: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization

MBPN: Muy Bajo Peso al Nacer

MLEE: Multilocus Enzyme Electrophoresis

NCPC: Non-Previously Colonized Population

OMA: Otitis Media Aguda

OMS: Organización Mundial de la Salud

OR: Odds Ratio

PFGE: Pulsed-field Gel Electrophoresis

PBP: Penicilin binding proteins (Proteínas fijadoras de penicilinas)

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

RN: Recién nacido

RR: Riesgo relativo

SG: Semanas de Gestación

SEGO: Sociedad Española de Obstetricia

SEIMC: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

SENeo: Sociedad Española de Neonatología

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos

UCIN: Unidad de Cuidados Intensivos Neonatal

UCIP: Unidad de Cuidados Intensivos Pediátrico

1. INTRODUCCIÓN

1.1. RESISTENCIAS MICROBIANAS

La resistencia a los antimicrobianos se produce, desde un punto de vista clínico, cuando los microorganismos causantes de infección, sean bacterias, virus, hongos o parásitos, sufren cambios que hacen que los medicamentos utilizados para tratar estas infecciones dejen de ser eficaces para su tratamiento. Los microorganismos resistentes a varios antimicrobianos a los que serían naturalmente sensibles (en general, al menos a un representante de 2 familias) se denominan habitualmente como multirresistentes, mientras que cuando son resistentes a la mayoría de los antimicrobianos se conocen como ultrarresistentes.

La resistencia microbiana es un fenómeno muy preocupante porque las infecciones causadas por microorganismos resistentes pueden causar el fracaso del tratamiento y eventualmente la muerte del paciente, transmitirse a otras personas y generar grandes costos tanto para los pacientes como para la sociedad, con mayor frecuencia que las sensibles. De hecho, instituciones como las Naciones Unidas, la Organización Mundial de la Salud o el Centro Europeo para el Control de Enfermedades (*European Centre for Disease Control*, ECDC) consideran las resistencias microbianas como un problema de salud pública prioritario.

1.1.1. Tipos de resistencia

La resistencia bacteriana a los antimicrobianos puede ser:

1.1.1.1. Natural: Intrínseca a una familia, especie o grupo bacteriano. Es, por lo tanto, inmutable.

1.1.1.2. Adquirida: Distinguimos:

1.1.1.2.1. **Cromosómica**: Se producen por cambios genéticos en el cromosoma bacteriano.

1.1.1.2.2. **Transferible**: La bacteria obtiene la información genética que codifica el mecanismo de resistencia desde otra bacteria. La magnitud y la rapidez con que puede producirse este fenómeno son sus características más importantes desde el punto de vista epidemiológico. Los genes de resistencia se movilizan mediante diversos elementos genéticos móviles, entre los cuales los más importantes son:

a) *Plásmidos*: Son porciones circulares de ADN extracromosómico, que pueden incluir genes que codifican proteínas que causan la resistencia a un determinado antibiótico. Son capaces de autorreplicarse independientemente del ADN cromosómico. En general tienden a codificar características que mejoran los rasgos de supervivencia de las bacterias, sin ser imprescindibles para las mismas.

b) *Transposones*: Son cadenas cortas de ADN que pueden saltar del cromosoma a un plásmido o al revés, entre plásmidos o entre plásmidos y bacteriófagos. La principal característica de este tipo de material genético es

la capacidad de integrarse con facilidad en cadenas de ADN diferentes de la original. A diferencia de los plásmidos, no son autorreplicantes, por lo que deben mantenerse dentro de una estructura autorreplicante para poder replicarse. Un rasgo central de los transposones es que pueden estar varios de ellos incluidos dentro de un mismo plásmido, codificando resistencias a múltiples drogas, lo que permite, por transferencia de este último, la adquisición de multirresistencia por parte de la bacteria receptora.

c) *Integrones*: Son elementos genéticos móviles diferentes de los transposones pero con mecanismos parecidos. Se recombinan en un sitio específico del ADN. Junto con los transposones, son los sistemas que fundamentalmente actúan en la adquisición de resistencias al estar incluidos en plásmidos transmisibles.

1.1.2. Mecanismos de resistencia

Desde el punto de vista del mecanismo de actuación, los mecanismos de resistencia pueden resumirse en los siguientes tipos:

1.1.2.1. Inactivación de los antibióticos mediante enzimas producidas por la propia bacteria, como es el caso de las enzimas beta-lactamasas. Este mecanismo es el único capaz de inactivar la molécula de antimicrobiano.

1.1.2.2. Disminución en la permeabilidad de la membrana o pared celular. Este fenómeno ocurre normalmente por mutaciones en los genes que codifican o regulan la expresión de las proteínas que conforman los canales de membrana o porinas.

1.1.2.3. Expulsión por mecanismos activos del antibiótico. Se producen mediante la adquisición de genes que codifican o permiten la expresión de bombas de expulsión, o se modifican otras existentes para que puedan expulsar determinadas moléculas antimicrobianas. Las resistencias a las tetraciclinas son frecuentemente debidas a este tipo de mecanismo.

1.1.2.4. Modificación de la diana donde actúa el antibiótico en la bacteria. Puede ocurrir por reducción de la afinidad del receptor por la molécula de antimicrobiano o por su “ocultación” o protección de manera que el antimicrobiano no puede acceder a su diana.

1.2. BETA-LACTAMASAS. BETA-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE)

1.2.1. Definición de las beta-lactamasas

Las beta-lactamasas son enzimas capaces de inactivar los antibióticos de la familia beta-lactámicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos). Son capaces de romper el puente amida del anillo penicilánico o cefalosporánico y producir derivados ácidos sin propiedades bactericidas, lo que

evita que dichos antibióticos puedan unirse a las proteínas diana (*penicillin-binding proteins*, PBP), impidiendo su acción sobre la formación de la pared bacteriana y, por tanto, la lisis bacteriana. Los genes que codifican estas enzimas se denominan genes *bla*.

El nivel de resistencia que confieren depende directamente del grado de afinidad con el antibiótico, de las propiedades hidrolíticas del enzima y del nivel de producción de la enzima, que a su vez puede verse condicionado por el número de copias del gen *bla* existente en el cromosoma y/o los plásmidos.

1.2.2. Clasificaciones de las beta-lactamasas

El desarrollo y diversificación de las beta-lactamasas ha provocado la creación de distintas clasificaciones. La creada por Ambler (1) en 1980, basada en la estructura molecular y la secuencia de aminoácidos de las beta-lactamasas, es una de las utilizadas. Ésta reconoce 4 tipos moleculares denominados; A, B, C y D. Los tipos A, C, D poseen serina (serino-enzimas) en su zona activa, mientras que las del grupo B poseen una o más moléculas de zinc (metalo-enzimas).

Otra clasificación muy utilizada en la actualidad es la desarrollada por Bush, Medeiros y Jacoby en 1995 (Tabla 1), basada en los sustratos que las enzimas hidrolizan y en la inhibición de su actividad por el ácido clavulánico, EDTA, aztreonam u oxacillina. En esta clasificación se definen 4 grupos funcionales, integrando propiedades bioquímicas, de estructura molecular y la secuencia

nucleotídica (2). De los distintos grupos de beta-lactamasas según el esquema de Bush, Jacoby y Medeiros, cabe destacar el grupo 2, el más abundante y en el que se incluyen muchas beta-lactamasas de gran relevancia clínica. Sus características son las siguientes:

- Es el más abundante y en él se agrupan las beta-lactamasas pertenecientes a las clases A y D de Ambler.
- Presentan un residuo de serina en el centro activo.
- La mayoría se inhiben por ácido clavulánico.
- La localización de los genes *bla* es plasmídica en la mayoría de los casos.

Tabla 1. Clasificación y propiedades de las betalactamasas según Bush, Jacoby y Medeiros

Grupo Bush, Jacoby y Medeiros	Clase Ambler	Centro activo	Tipo de enzima	Sustrato preferido	Inhibidas por		Enzimas representativas
					CLAV	EDTA	
1	C	Serina	Cefalosporinas de espectro ampliado	Penicilinas, cefalosporinas de espectro restringido y extendido, cefamicinas y monobactámicos	-	-	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	Penicilasas	Penicilinas	+	-	Penicilasas de bacterias Gram positivas
2b	A	Serina	Betalactamasas de espectro ampliado	Penicilinas y cefalosporinas de 1ª generación	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Serina	Betalactamasas de espectro extendido	Penicilinas, cefalosporinas de 1ª, 2ª y 3ª generación Monobactámicos	+	-	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 generación (bajo nivel)	-	-	TEM-50 (CMT-1) TEM-68 (CMT-2) TEM-89 (CMT-3)
2c	A	Serina		Penicilinas, carbenicilina	+	-	PSE-1, PSE-3 a 5
2d	D	Serina	Penicilinasas de espectro reducido	Penicilinas y cloxacilina	+ / -	-	Numerosas variantes OXA
		Serina	Betalactamasas de espectro extendido	Penicilinas, cloxacilina, beta-lactámicos de espectro extendido, a veces monobactámicos o cefalosporinas de 3ª generación	+ / -	-	Algunas derivadas de OXA-2 y OXA-10, OXA-18, 29, 30, 31, 32 y 45
		Serina	Carbapenemasas	Penicilinas, oxacilina y carbapenemas	+	-	OXA-23 a 27, 40, 48, 54
2e	A	Serina	Penicilinasas y cefalosporinasas	Penicilinas y cefalosporinas de 1ª, 2ª y 3ª generación	+	-	Betalactamasa cromosómica de <i>B. fragilis</i> , <i>B. uniformis</i> , <i>B. vulgatus</i> , <i>C. diversus</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Y. enterocolitica</i> , <i>C. koseri</i> y <i>C. sedaki</i>
2f	A	Serina	Carbapenemasa	Penicilinas, cefalosporinas de 1ª a 4ª generación, carbapenemas	+	-	NMC-A, SME-1 a 3, IMI-1, KPC-1 a 3, GES-2
3	B	Zinc	Carbapenemasa	Penicilinas, cefalosporinas de 1ª a 4ª generación, carbapenemas	-	+	IMP-1 a 13, VIM-1 a 7, SPM-1, NDM
4	NI*	Serina	Penicilinasas	Penicilinas	-	-	Enzima cromosómica de <i>Burkholderia cepacia</i>

NI: No Incluido; CLA: ácido clavulánico; EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

1.2.3 Beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE)

Las beta-lactamasas de espectro extendido son enzimas pertenecientes al grupo 2 de Bush, Jacoby y Medeiros, y se caracterizan por hidrolizar las penicilinas, monobactámicos y oxi-imino-cefalosporinas, siendo inhibidas por el ácido clavulánico y otros inhibidores clásicos de beta-lactamasas. Los tipos más importantes son:

a) BLEE tipo TEM

Proceden de mutaciones de las beta-lactamasas TEM-1 y TEM-2. TEM-1 es la beta-lactamasa más frecuentemente descrita en enterobacterias, siendo responsable del más del 90% de la resistencia a ampicilina en *E. coli*. Podemos encontrarla en muchas especies bacterianas. Esta dispersión es debida a su localización en elementos genéticos móviles como plásmidos y transposones. TEM-2 surge como consecuencia de una mutación en la posición 39 que no altera el perfil de sustrato, sino únicamente el punto isoeléctrico de la enzima. A partir de estas dos enzimas y por distintas mutaciones surgieron las beta-lactamasas con fenotipo BLEE tipo TEM. TEM-24 es una de las enzimas más importantes de esta familia.

b) BLEE tipo SHV

Proceden de la beta-lactamasa SHV-1. El gen *bla* que codifica SHV-1 se encuentra en el cromosoma de más del 90% de las cepas de *K. pneumoniae*.

Diversas mutaciones en esta enzima han ido conformando una familia muy amplia y diseminada de BLEE. La mutación más frecuente es la sustitución de una glicina por serina en la posición 238, que proporciona a la enzima SHV-2 la capacidad de hidrolizar ceftazidima de forma eficaz. Esta enzima causó el primer brote de microorganismos resistentes a cefalosporinas de tercera generación descrito en España entre 1988 y 1990 (3).

SHV-12 fue descrita por Nüesch-Inderbinen y cols. en 1997 durante la realización de un estudio multicéntrico llevado a cabo en Suiza (4). Es una de las BLEE derivadas de SHV-1 más ampliamente distribuidas en la actualidad.

c) BLEE tipo CTX-M

La familia CTX-M muestra tan sólo un 40% de homología con las beta-lactamasas de la familia TEM y SHV. Sin embargo, las enzimas de esta familia de BLEE presentan una alta homología (mayor del 90%) con los genes *bla*CTX-M presentes en el cromosoma de *Kluyvera* spp., por lo que se piensa que estos serían los genes originarios, que habrían saltado del cromosoma para integrarse en distintos plásmidos y posteriormente diseminarse (5).

Las enzimas CTX-M pueden subclasificarse a su vez en cinco grupos (que no deben confundirse con las enzimas individuales de igual nombre): CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25. Sumando las enzimas de todos los grupos, en la actualidad se han identificado más de 150 variantes. En concreto, las enzimas CTX-

Las más ampliamente distribuidas a nivel mundial son CTX-M-15 (perteneciente al grupo de CTXM-1) y CTX-M-14 (perteneciente al grupo de CTX-M-9). Esta última ha sido la más frecuente en España, aunque en los últimos años CTX-M-15 ha aumentado significativamente su frecuencia.

d) BLEE tipo OXA

Pertenecen a la clase molecular D y al grupo funcional 2d. Confieren resistencia a penicilinas y cefalosporinas y deben su nombre a que presentan una alta capacidad de hidrólisis de oxacilina y cloxacilina. Su grado de inhibición por ácido clavulánico es variable.

e) Otras BLEE

Aunque la mayoría de BLEE de aislamientos clínicos pertenecen a las familias TEM, SHV y CTX-M, existen otras BLEE como son las pertenecientes a los tipos PER (*Pseudomonas extended-resistance*), VEB (Vietnam extended-spectrum beta-lactamase), CME (*Chryseobacterium meningosepticum*), TLA (Tlahuicas, tribu india), SFO (*Serratia fonticola*), BES (Brasil extended-spectrum) y la familia GES/IBC, que son características de regiones concretas y que se agrupan en las clases moleculares A y D.

1.2.4. Microorganismos productores de BLEE

Aunque se han descrito con mayor frecuencia en cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli*, las BLEE ha sido descritas en todas las enterobacterias, incluyendo sobre todo *Citrobacter* spp., *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp, *Morganella* spp. o *Serratia* spp. Además, pueden ser producidas por otros bacilos Gram negativos como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*.

1.2.4.1. *Escherichia coli*

E. coli es un microorganismo que forma parte de la microbiota intestinal normal de mamíferos y aves. *E. coli* tiene la habilidad de sobrevivir y desarrollarse en el medio ambiente gracias a su versatilidad para aprovechar distintas fuentes de energía, además de ser un microorganismo poco exigente en sus requerimientos nutricionales. Esta capacidad de adaptación a diversas condiciones favorece su integración a comunidades microbianas en una variedad de ambientes (6).

Aunque *E. coli* es el principal componente aerobio de la flora intestinal de los humanos, sus interrelaciones con el huésped permiten clasificar los aislados de este microorganismo en 3 grandes grupos: cepas comensales, patotipos intestinales y patógenos extraintestinales. A su vez, en base al análisis de isoenzimas (MLEE, del inglés *multilocus enzyme electrophoresis*) las cepas de *E. coli* se han clasificado también clásicamente en 4 grupos filogenéticos principales: A, B1, B2 y D (7). Las cepas comensales se ubican principalmente en los filogrupos A y B1, las patógenas

extraintestinales se agrupan en el B2 y el D, y los patotipos intestinales, en cualquiera de los filogrupos (8).

Por otra parte, *E. coli* es considerado como un reservorio y agente transmisor de genes a otros miembros de la microbiota humana o animal. Por consiguiente, el tracto gastrointestinal se convierte en el nicho ideal para la transferencia a gran escala de genes de resistencia antimicrobiana y de factores de patogenicidad. En los últimos años se ha registrado un aumento importante en la prevalencia de cepas de *E. coli* resistentes a antibióticos, provenientes de animales y sus productos alimentarios destinados al consumo humano. Algunos de los mecanismos de resistencia provenientes de aislados animales pueden, al estar codificados principalmente en elementos genéticos móviles, diseminarse a otros aislados de *E. coli* y a otras especies en diferentes ecosistemas.

1.2.5. Epidemiología

1.2.5.1. Diseminación de las BLEE

Hasta finales de los años 90, la mayoría de las BLEE detectadas pertenecían a las familias TEM y SHV y se encontraban, fundamentalmente, en aislados de *K. pneumoniae* causantes de brotes epidémicos nosocomiales.

En 1989 se detectó un aislado clínico de *E. coli* con una enzima diferente a TEM y SHV, que se denominó CTX-M-1 por su actividad hidrolítica preferente por la

cefotaxima (9). Entre 1986 y 1992 aparecieron, casi simultáneamente, las primeras CTX-M en Japón, Alemania, Argentina, Italia y Francia (5). Desde entonces, el grupo CTX-M ha adquirido una gran relevancia epidemiológica debido a su dispersión intra y extrahospitalaria. Se han encontrado en casi todas las enterobacterias, en particular en *K. pneumoniae*, *E. coli* y *Enterobacter* spp. Actualmente se detectan, con mayor frecuencia, en *E. coli* y en pacientes con infecciones contraídas en la comunidad, produciéndose un flujo de aislados desde este ambiente al medio hospitalario. Su éxito epidemiológico se debe a la presencia de genes *bla*CTX-M en elementos móviles (plásmidos o transposones) y su asociación a integrones (10) así como a su diseminación clonal en determinados clones exitosos.

En España, la enzima más frecuente ha sido CTX-M-14, perteneciente al grupo CTX-M-9. En los últimos años está aumentando la prevalencia de CTX-M-15, que es la más frecuente en todo el mundo. La diseminación de esta enzima se ha asociado al complejo clonal ST131 de *E. coli* (11), que se ha diseminado por todos los continentes en las últimas décadas. Las cepas del clon ST131 poseen los factores de virulencia típicos de las cepas de *E. coli* patógenas extraintestinales, al pertenecer al filogrupo tipo B2. Además, CTX-M-15 está asociada a una secuencia de inserción muy efectiva tanto en términos de expresión como de movilización, ISEcp1, que puede ser otro de los mecanismos del éxito de la dispersión de la enzima (12).

1.2.5.2. Reservorios

El tubo digestivo de los mamíferos y las aves son importantes reservorios de las enterobacterias, y por tanto, de las enterobacterias productoras de BLEE (E-BLEE), constituyendo nichos ecológicos naturales en los que puede producirse la transmisión de BLEE entre distintos clones y especies.

La frecuencia de colonización por E-BLEE se incrementa considerablemente en los pacientes hospitalizados. La tasa de portadores fecales en situaciones de endemia en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) puede llegar a ser del 30-70% de los pacientes ingresados. Estos pacientes no solo constituyen una fuente de estos microorganismos para su eventual transmisión a otros enfermos, sino que además, al estar colonizados, tienen más riesgo ellos mismos de desarrollar una infección por estos microorganismos. En un estudio multicéntrico sobre microorganismos productores de BLEE realizado en España en el año 2000, el 93% de las *K. pneumoniae* se aislaron en pacientes hospitalizados (13).

Si bien el principal reservorio suele ser el aparato digestivo de los pacientes, este microorganismo puede contaminar superficies del medio hospitalario (fómites de la habitación del paciente, carpetas de historias clínicas, teléfonos, sifones y desagües de lavabos, etc.) y equipos o dispositivos médicos (superficies de bombas de perfusión, superficies de monitores...), facilitándose de esta manera la transmisión del microorganismo a otros pacientes y posibilitando la aparición de brotes epidémicos (14).

1.2.5.3. Mecanismo de transmisión

a) Transmisión vertical (madre a hijo)

Hasta hace pocos años existía un vacío en el conocimiento sobre la transmisión perinatal de las E-BLEE. En los últimos años, diversos estudios han evaluado la frecuencia de colonización en mujeres embarazadas y la tasa de transmisión a los recién nacidos en el parto, que se revisan a continuación (ver tabla 2).

El mayor estudio realizado hasta la fecha sobre madres portadores de *E. coli* productor de BLEE en el momento del parto se publicó en 2013 por Birgy y cols. (15) en Francia. Durante cinco años (2006-2010) se tomaron una media anual de 2.500 muestras maternas vaginales intraparto y 2.000 neonatales (de oído externo o fluidos gástricos), realizados en menos de tres horas después del nacimiento. Obtuvieron 68 aislados de *E. coli* productores de BLEE, 28 (44%) maternas y 36 (56%) neonatales (4 cepas no se recuperaron después de ser congeladas). Esto suponía una prevalencia del 2,46% para el total de muestras recogidos, ascendiendo cada año la tasa de *E. coli* BLEE detectados desde un 1,1% a un 4,1%. Estos resultados sugerían una distribución generalizada de las enzimas BLEE en la comunidad y destacan la transmisión temprana entre madres y neonatos. Estos hallazgos son preocupantes, especialmente para esta población particularmente vulnerable como son los recién nacidos.

En otro estudio, Denkel y cols. notificaron tasas de colonización por E-BLEE en mujeres embarazadas de entre el 7,3 y el 15,4% (16). En ese estudio, 12 de 209 niños con muy bajo peso al nacer (5,7%) y 18 de 209 (8,6%) madres estaban colonizados por E-BLEE. Entre los aislados de los recién nacidos, 5 (27,7%) estaban clonalmente relacionados con los de su madre. En el análisis multivariado identificaron la colonización de la madre por E-BLEE como factor de riesgo para la colonización en el neonato.

En Israel se realizó un estudio durante el año 2015 en el cual se estudió la colonización por E-BLEE de las madres de niños que nacieron antes de las 31 semanas de edad gestacional y con un peso inferior a 1.700 gramos. Observaron que el 39,4% (28/71) de los niños colonizados nacían de una madre colonizada y, de ellos, 25 compartían la misma cepa que la madre (35,2%), siendo en el 56% de los casos *E. coli*. Cuatro niños colonizados (5,6%) sufrieron una sepsis neonatal tardía por *K. pneumoniae* productor de BLEE, falleciendo 2 niños (2,8%) por ésta, siendo en los dos casos su madre portadora de BLEE (en 1 de ellos se trataba del mismo clon). Los autores concluyeron que la transmisión perinatal de madre a hijo de E-BLEE puede ser un modo importante de adquisición de estos microorganismos en los recién nacidos y, junto con las altas tasas de colonización entre mujeres embarazadas de alto riesgo, muestran la potencial importancia de vigilancia de la colonización materna por E-BLEE (17).

Jiménez-Rámila y cols. (18) realizaron un estudio en nuestro hospital donde se analizaron 815 madres y 800 recién nacidos; 59 mujeres y 13 recién nacidos

estaban colonizados por E-BLEE, resultando una prevalencia de colonización en madres y recién nacidos (intervalo de confianza del 95%) del 6,7% (5,2-8,7) y 1,6 (0,7-2,5), respectivamente. La transmisión materno-neonatal se demostró en 8 (14%) neonatos de las 57 madres colonizadas.

En un estudio de Rettendal y cols. realizado en 2015 (19) se encontró una alta tasa de transmisión de E-BLEE materna-neonatal al nacimiento (35,7%). A pesar del bajo número de casos en ese estudio, el hallazgo sugiere que la colonización por E-BLEE durante el embarazo constituye un riesgo sustancial para la colonización perinatal.

Tabla 2. Estudios de colonización por enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido en recién nacidos.

AUTOR, AÑO PUBLICACIÓN	POBLACIÓN Y AÑOS DEL ESTUDIO	SEGUIMIENTO DE MUESTRAS	ORIGEN	TIPO ESTUDIO	PREVALENCIA DE COLONIZACIÓN	TRANSMISIÓN VERTICAL	FACTORES DE RIESGO DE COLONIZACIÓN
Jiménez-Ramila, 2018	800 RN sanos. 2013 - 2014	Entre 1-3 días tras el parto	Embarazadas y RN sanos (Sevilla)	Observacional Prospectivo Cohorte	1,6% RN	8/57=14%	Madre RR= 43,47 (IC 95% 12,34-142,85) p<0,001
Danino, 2018	478 RN < 31 SG y peso <1.700 gramos. 2015 - 2016	Al ingreso y cada 2 semanas hasta el alta	UCIN (Israel)	Observacional Prospectivo Cohorte	18,3% periparto 14,8% en todo el seguimiento	25/71=35,2%	No datos significativos
Meropol, 2016	35 RN sanos. 2011	Cada 3 meses durante 12 meses	Maternidad (Ohio)	Observacional Prospectivo Cohorte	No se aislaron E-BLEE	No se estudia	No se estudian
Rettedal, 2015	26 RN de madres colonizadas a las 36 SG. 2012	A los 0, 2, 4, 6, 8 y 10 días de vida, y entre los 1 y 5 meses	Embarazadas y RN sanos (Noruega)	Observacional Prospectivo Cohortes	No se estudia	5/14= 35,7%	No se estudian
Denkel, 2014	209 RN de <1.500 gramos. 2012 - 2013	Madre 72 horas tras ingreso. RN a los 3 días y cada semana	UCIN (Berlín)	Observacional Prospectivo Cohorte	5,7%	5/18 = 27,7%	Madre OR=7,42 (IC 95% 2,06 – 26,71) (p=0,002)
Kothari, 2013	75 RN sanos de bajo peso (1.500 - 2.500 g) con LM. 2009 - 2011	Seguimiento los días 1, 21 y 60 de vida	UCIN (India)	Observacional Prospectivo Cohorte	20,6% 1 día: 14,3% 21 días: 27,1% 60 días: 41,5%	No se estudia	No se estudian
Birgy, 2013	Madres y RN. 2006 - 2010	3 horas tras el parto	Sanos (Francia)	Observacional Prospectivo Cohorte	2,46% del total de muestras	No se estudia	No se estudian

RN: recién nacidos. RR: Riesgo relativo. IC: intervalo de confianza. SG: semana gestacional. UCIN: Unidad de cuidados intensivos neonatales. OR: Odds ratio.

b) Transmisión horizontal

En general, y en el caso de las E-BLEE en particular, las manos de los profesionales sanitarios son tradicionalmente considerados como los principales vectores de transmisión de microorganismos en el hospital (transmisión cruzada), así como dispositivos médicos o similares, incluyendo termómetros, geles empleados en ecografías, sondas de oxigenoterapia o jabón líquido. Como ejemplo de la transmisión en medio hospitalario en niños, en un estudio realizado en Madagascar en niños menores de 14 años hospitalizados, se tomaron muestras al personal sanitario y muestras ambientales, obteniendo que el 48,7% del personal médico estaba colonizado por E-BLEE; en el 13% de las muestras ambientales (mesas, fregaderos, estetoscopios) también se aislaron E-BLEE (20).

Los pacientes adultos con infecciones comunitarias y los convivientes colonizados representan un reservorio para las E-BLEE en la comunidad, lo que aumenta la dispersión de la resistencia en las personas sanas (21). Además, puede existir transmisión fuera del ámbito familiar, en los colegios o guarderías. La primera vez que se documentó transmisión no familiar entre preescolares fue en Suecia (22), donde se encontraron aislados de *E. coli* con genotipos idénticos en niños sin relación familiar en 2 casos.

c) Transmisión a través de alimentos

En diversos estudios se ha encontrado que algunos productos cárnicos,

particularmente pollo y pavo, se contaminan frecuentemente con E-BLEE (23), por lo que la manipulación de estos productos contaminados crudos (por ejemplo, al cocinar) puede facilitar la adquisición y transmisión a otros miembros del hogar.

1.2.5.4. Factores de riesgo de adquisición de colonización

a) Factores de riesgo de adquisición de la colonización por E-BLEE en adultos

Los factores de riesgo de colonización por E-BLEE en el ámbito hospitalario o en residencias sociosanitarias son, en general, comunes a otras bacterias multirresistentes, incluyendo la duración de la estancia hospitalaria, la mayor exposición a procedimientos invasivos y el uso de antibióticos.

Existe menos información sobre los factores de riesgo de colonización en la comunidad. En un estudio llevado a cabo en Sevilla para determinar los factores de riesgo para ser portador de E-BLEE se concluyó que el 67,9% de los pacientes comunitarios con infección del tracto urinario (ITU) por estas bacterias eran además portadores de las mismas en su intestino. Se determinó que ser familiar de uno de estos pacientes incrementaba el riesgo de ser portador fecal de E-BLEE y también mostró que aquellos que comían fuera de su hogar más de 15 días durante el mes anterior tenían menos probabilidades de ser portadores fecales (24), sugiriendo que el contacto con alimentos contaminados en el domicilio podría ser un factor de riesgo. Una dieta sin alimentos derivados del cerdo fue un factor de riesgo en un estudio sueco (25), quizás por el aumento de consumo de carnes de ave. En otros

estudios, el uso de antimicrobianos y de inhibidores de la bomba de protones también han sido factores de riesgo (26). De hecho, el incremento en el uso de antibióticos en humanos y animales, la contaminación cruzada en el entorno hospitalario, la importación y exportación de alimentos y los movimientos migratorios podrían haber contribuido igualmente a la diseminación de las E-BLEE fuera de los hospitales, aunque el papel que ha jugado cada uno de estos factores puede ser variable y estar ligado a contextos epidemiológicos específicos.

En diversos estudios se ha encontrado que viajar a determinadas áreas de alto riesgo aumenta la probabilidad de adquirir la colonización por E-BLEE. En el estudio realizado por Meyer y cols. en 2011 (27), se demostró que los viajes a Grecia o África y el contacto con mascotas se asociaron de forma independiente con la colonización por E-BLEE (OR para viaje a Grecia: 15,2; viaje a África: 14,8 y por tener un animal doméstico: 6,7). Estos datos se han corroborado en otros estudios (25)(26), incluyendo niños (28).

b) Factores de riesgo de adquisición de colonización por E-BLEE en niños

A diferencia de los adultos, la epidemiología, factores de riesgo, resultados, terapias y medidas de control para las E-BLEE son menos conocidas en la edad pediátrica.

Un análisis publicado en 2015 (29) proporciona un resumen de la epidemiología de E- BLEE en los niños, con énfasis en los datos clínicos y

moleculares recientes con respecto a la colonización y la infección en situaciones de brotes epidémicos y fuera de ellos. Son conocidos los factores de riesgo para la infección o colonización por E-BLEE en niños ingresados en Unidades de Cuidados Intensivos Pediátricos (UCIP) o neonatales (UCIN). Durante los brotes, los factores de riesgo establecidos han sido prematuridad, bajo peso al nacer, malformaciones, nacimiento por cesárea, recibir nutrición parenteral, los procedimientos invasivos (ventilación mecánica, presión continua en vía aérea, intubación endotraqueal, uso de catéter venoso central), la mayor duración del ingreso, el uso de antibióticos (30)(31) y el uso de uñas artificiales del personal del hospital (32) (en este último caso, se hipotetiza que estaría relacionado con una mayor dificultad en la higiene de manos o contaminación de las mismas).

Hay que diferenciar los estudios que evalúan los factores de riesgo para la colonización en el parto y los que evalúan la colonización posterior. En cuanto a la colonización en el momento del parto, como se muestra en la tabla 2, el estudio de Denkel y cols. estudió los factores de riesgo de la colonización en el momento del parto en recién nacidos (RN) con muy bajo al nacer (<1.500 gramos), donde la madre es el principal factor de riesgo (OR=7,42, IC 95% 2,06-2,71, p=0,002). En RN sanos sólo encontramos el estudio de Jiménez-Ramila, evidenciando que también es la madre el principal factor de riesgo para la colonización del RN (RR= 43,47, IC 95% 12,34-142,85, p<0,001).

Sobre los niños sanos colonizados tras el parto encontramos los siguientes estudios (tabla 3). En Suecia (22) se recogieron muestras de pañales de niños entre

1 y 5 años que asistían a centros preescolares desde Septiembre hasta Octubre de 2010. La edad media de los niños estudiados fue 24 meses. Se obtuvieron 313 muestras (24,5% de los niños en edad preescolar de la ciudad). La prevalencia de colonización por E-BLEE fue del 2,9% de los niños sanos. Se encontraron aislados de *E. coli* con genotipos idénticos en 2 niños sin relación familiar, siendo la primera vez que se documentó transmisión no familiar entre preescolares.

En Guipúzcoa (33) se estudiaron 125 niños sanos nacidos entre Enero y Junio de 2011. Se recogieron muestras de heces a los 8, 12 y 16 meses. En 68 niños se obtuvieron tres muestras y en los 57 restantes dos muestras. Se detectaron E-BLEE en 18/68 (26,5%) niños con las tres muestras y en 12/57 (21,1%) niños con sólo dos muestras. La prevalencia global de colonización por E-BLEE fue 24% (30/125). En total, el 10,7% de las 318 muestras fueron positivas. Las 34 E-BLEE fueron *E. coli*. En el análisis de los factores de riesgo, sólo un factor de riesgo se asoció significativamente a la colonización de E-BLEE: no haber acudido a guardería, lo que está en desacuerdo con el estudio realizado por Kaarme y cols. en Suecia (22), que fué el primero que documentó la transmisión horizontal entre niños en el mismo centro preescolar.

Tabla 3. Estudios de colonización por enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido niños tras el parto.

AUTOR, AÑO PUBLICACIÓN	POBLACIÓN Y AÑOS DEL ESTUDIO	EDAD POBLACIÓN	ORIGEN	TIPO ESTUDIO	PREVALENCIA	FACTORES DE RIESGO DE COLONIZACIÓN	TRANSMISIÓN HORIZONTAL
Nordberg, 2018	14 niños 2008 - 2015	RN. Muestras al ingreso y cada 2 semanas en UCIN. Al alta cada 2 meses hasta 2 años	UCIN (Estocolmo)	Observacional Prospectivo Cohorte	- 5% del total (17/335) - Durante el seguimiento: 7/13 (53,8%)	No se estudia	No se estudia
Farra, 2016	134 niños. 2013	0-59 meses (edad media 14,7 meses)	Hospitalizados con diarrea grave (Bangui, África)	Observacional Prospectivo Caso-control	59%	Familias con altos ingresos OR: 17,5 (IC 95% 1,6-191,8, p=0,001)	No se estudia
Fernández-Reyes, 2014	125 niños	8 meses Seguimiento a los 8, 12 y 16 meses	Sanos (España)	Observacional Prospectivo Cohorte	24%	No acudir a guardería (p=0,007)	No se estudia
Kaarme, 2013	1278 niños 2010	11 a 66 meses (edad media: 24 meses)	Colegios prescolares (Suecia)	Observacional Prospectivo Cohorte	2,9%	No se estudiaron	1ª vez transmisión no familiar de <i>E. coli</i> BLEE
Boutet, 2013	1118 niños 2010 - 2011	0-16 años Edad mediana: 1 año.	Hospitalizados por diarrea en 7 hospitales (Francia)	Observacional Prospectivo Multicéntrico	5,2%	53,3% menores de 1 año; 74,3% no hospitalización previa	No se estudia
Strenger, 2013	25 niños 2007- 2008	RN	UCIN (Austria)	Serie de casos	26/491= 5,3% (1 rechazó estudio)	No se estudia	9/49 personas (18,4%). Clonalmente relacionados: 2/19 familias (10,5%)
Birgy, 2012	411 niños 2010 - 2011	6-24 meses (edad media: 13,3 meses)	Niños sanos o revisión por OMA (Francia)	Observacional Prospectivo Cohorte	4,6%	- Cefalosporina 3ª generación (OR ajustado = 3,52, (IC 95% 1,06-11,66, p=0,04)	No se estudia

Tabla 3 (continuación)

AUTOR, AÑO PUBLICACIÓN	POBLACIÓN ESTUDIADA	EDAD POBLACIÓN	ORIGEN	TIPO ESTUDIO	PREVALENCIA	FACTORES DE RIESGO DE COLONIZACIÓN	TRANSMISIÓN HORIZONTAL
Isendhal, 2012	408 niños 2010	Menos de 5 años (edad media 1,71 años)	Hospitalizados o urgencias con fiebre o taquicardia (Guinea)	Observacional Prospectivo Cohorte	32,6%	Compartir cama con otro niño <5 años (p=0,04)	No se estudia
Lo, 2010	53 niños 172 miembros hogar (de ellos 29 niños < 18 años) 2007 - 2008	0-5 años	Hospitalizados por procesos febriles leves (Hong Kong)	Observacional Prospectivo Cohorte	- Global: 43,5% - Niños hospitalizados: 37,7%	Hacinamiento (No significativo)	- Prevalencia en convivientes niños: 20,7% - Prevalencia en convivientes adultos: 50,3% - T. horizontal: 6/53 (11,3%)
Andratahina, 2010	244 niños 2008	<14 años (edad media 35,6 meses) Muestras de niños 1º y último día de hospitalización	Hospitalizados (Madagascar)	Observacional Prospectivo Cohorte	22,1% de los hospitalizados	Al ingreso: Hospitalización previa (OR = 7,4 [IC 95%: 2,9-18,3], p<0,01) Durante el ingreso: Antibioterapia (OR = 4,1 [IC 95%: 1,8-9,4, p<0,001)	No se estudia
Guimarães, 2009	112 niños 2007- 2008	1-14 años	Niños sanos (Portugal)	Observacional Prospectivo Cohorte	2,7%	No se estudia	No se estudia
Pallechi, 2004	3208 niños 2002	6-72 meses	Niños sanos: 2 áreas de Bolivia 2 de Perú	Observacional Prospectivo Cohorte	0,1%	No se estudia	No se estudia

RN: recién nacidos. UCIN: Unidad de cuidados intensivos neonatales. OR: Odds ratio. IC: intervalo de confianza.

1.2.5.5. Duración de la colonización por E-BLEE en neonatos y madres

La duración y los factores que influyen en el mantenimiento de la colonización son aún peor conocidos que los factores de riesgo de la adquisición. En la bibliografía revisada hemos encontrado algunos estudios sobre los factores que influyen en el mantenimiento del estado de portador de E-BLEE fundamentalmente en niños ingresados en UCIN o en adultos, pero hemos encontrado muy pocos datos sobre la duración de la colonización por E-BLEE en neonatos tras el parto y los factores asociados. En un estudio realizado en el contexto de un brote nosocomial en una UCIN, los principales factores de riesgo para el mantenimiento de la colonización fueron el nacimiento por cesárea y haber recibido tratamiento antibiótico (34).

En cuanto a la media o mediana de duración de la colonización en los pacientes portadores o infectados, se ha estudiado en los siguientes estudios, la mayoría de ellos realizados en población adulta.

Tängdén y cols. analizaron un grupo de 100 adultos suecos voluntarios colonizados por E-BLEE que habían viajado fuera del Norte de Europa (edad mediana 43 años, rango 2-84 años). Completaron el estudio 21 pacientes, y de ellos sólo 5 (24%) seguían colonizados después de 6 meses (35). En Francia (36) se realizó una revisión retrospectiva de 14 años en un hospital; 448 pacientes fueron estudiados (mediana de edad 62,8 años, rango 49-75 años). El 40% se consideraron portadores persistentes. El tiempo mediano de desaparición de BLEE fue de 6,6

meses (rango 3,4-13,4 meses). En Tailandia en 2007 (37) se hizo el seguimiento de 24 pacientes infectados por E-BLEE. La mediana de edad fue de 55 años (rango 21-65 años). El 33% de los pacientes permanecían colonizados a los 6 meses del estudio. La mediana de la duración de la colonización fue de 98 días (rango 14-182 días). En Alemania se estudió un grupo de 123 pacientes colonizados o infectados por E-BLEE; en el 70% de los casos se hizo tratamiento antibiótico. La mediana de edad fue 51 años (rango 0-90 años). Sólo el 6,8% perdieron la colonización después de 3 años. Sin embargo, este estudio fue realizado en una población de comorbilidad alta de un hospital universitario donde se realizan más de 1.500 trasplantes de médula ósea o de órganos sólidos, lo que hace que esta población no sea representativa de la población general (38). En Suecia, Alsterlund y cols. (39) publicaron que el 11,9% de los pacientes (edad mediana 66 años, rango 56-84 años) detectados durante un brote hospitalario eran portadores después de una mediana de 58 meses (rango 41-59 meses). Tham y cols. (40) en 2012 realizaron el seguimiento de pacientes con diarrea del viajero; ellos mismos en un estudio previo estudiaron a 242 personas que sufrieron diarrea del viajero, de ellos 58 eran portadores de E-BLEE, que fueron los evaluados ahora. De estos 58 pacientes (mediana de edad 38 años, rango 1-83 años), 41 completaron el estudio. El 24% eran portadores después de 3-8 meses de seguimiento y el 4,8% después de 3 años.

Los estudios encontrados sobre la duración de colonización en niños se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Estudios de duración de colonización por enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido en niños.

AUTOR, AÑO PUBLICACIÓN	POBLACIÓN ESTUDIADA	EDAD POBLACIÓN	ORIGEN	TIPO ESTUDIO	DURACIÓN MEDIA O MEDIANA	FACTORES DE RIESGO DE LA DURACIÓN DE COLONIZACIÓN
Nordberg, 2018	14 niños 2008 - 2015	RN Muestras al ingreso y cada 2 semanas en UCIN Al alta cada 2 meses durante 2 años Última a los 5 años	UCIN (Estocolmo)	Prospectivo Cohorte	- 12,5 meses - > 2 años: 2 portadores	No se estudia
Löhr, 2013	51 RN	Seguimiento mensual 1 año, trimestral durante 2 años más	Brote nosocomial UCIN (Noruega)	Prospectivo Cohorte	- Mediana: 12,5 meses (9,5-17,5 meses) - Padres: 2,5 meses	- Cesárea (HR 4,5, IC95% 1,6-12,6, p=0,004) - ATB durante la hospitalización (HR 2,4, IC95% 1,1-5,5, p=0,02)
Strenger, 2013	25 niños 2007 - 2008	RN Muestras a los 1, 2, 4, 6, 9 y 12 meses tras el alta	UCIN (Austria)	Serie de casos	<i>Klebsiella</i> : 1 año <i>Serratia</i> : <4 meses	No se estudia
Tandé, 2010	22 niños 49 contactos 2002 - 2005	Niños sanos Muestras en la 1 ^o semana tras adopción y posteriormente mensualmente	Adoptados de Procedentes de Malí (Francia país de acogida)	Prospectivo	9 meses (1-15 meses)	No se estudia

RN: recién nacidos. UCIN: Unidad de cuidados intensivos neonatales. OR: Odds ratio. IC: intervalo de confianza. HR: Hazard ratio.

En Francia, Tandé y cols. (41) estudiaron en 2010 un grupo de 22 niños adoptados de Malí. El tiempo mediano de colonización fue 9 meses (rango 1-15 meses). En España, Fernández-Reyes y cols. en Guipúzcoa detectó el mismo aislado en dos muestras diferentes solamente en 1 niño de los 125 niños analizados (33). Löhr y cols. publicaron en 2013 (34) un estudio de 51 niños colonizados por CTX-M-15 durante un brote en un hospital, 44 en UCIN y los otros 7 en sala de maternidad. Se realizó el seguimiento durante 36 meses tras el alta a los niños y a sus familiares. Se realizaba muestra mensual durante los primeros 12 meses y posteriormente cada 3 meses durante 2 años más. La mediana de la duración de la colonización fue de 12,5 meses, el tiempo más prolongado de colonización fue de 23,5 meses. La mediana de duración de colonización en los 11 padres colonizados fue de 2,5 meses. Los factores de riesgo para el mantenimiento de la colonización fue el tratamiento antibiótico y el parto mediante cesárea.

Recientemente se ha publicado un trabajo realizado en Suecia por Nordberg y cols. (42) en el que realizaron el seguimiento durante 5 años de 14 niños colonizados durante un brote en UCIN. De los 335 niños ingresados durante el brote, 17 se colonizaron. Tres fallecieron por infecciones invasivas por E-BLEE. Se fueron de alta 14 niños a los que se le realizó el seguimiento, de ellos uno falleció a los 13 meses de edad por displasia broncopulmonar grave. La mediana de duración de colonización de 12,5 meses (rango 5-68 meses). Dos niños permanecían colonizados a los 23 y 26 meses respectivamente.

1.3. MICROBIOTA INTESTINAL. SEPSIS NEONATAL. RESISTENCIA MICROBIANA EN LOS NEONATOS

1.3.1. Microbiota intestinal en neonatos

La microbiota se define como el conjunto de microorganismos que ocupan un nicho ecológico específico. La microbiota del tracto gastrointestinal humano está compuesta por una población dinámica de entre 500 y 1.000 especies microbianas diferentes, que se mantienen en equilibrio a pesar de las variaciones entre individuos y en el tiempo en un mismo individuo, debidas a la edad, el estado de salud, la dieta y factores genéticos.

Tradicionalmente se ha entendido que el feto permanece esencialmente estéril hasta la ruptura del saco amniótico. La microbiota oral, intestinal, vaginal y del tracto urinario materno contribuye de forma decisiva a la siembra inicial de la microbiota neonatal. Con el paso a través del canal de parto, los recién nacidos son inoculados al nacer (transmisión vertical) y en conjunción con un número variable de exposiciones posteriores (transmisión horizontal) de bacterias maternas, con lo que se establecerá la composición de su microbiota inicial, que evolucionará en el tiempo, siendo entre los 2 y 3 años indistinguible de una microbiota adulta (43).

Los cambios o pérdidas potenciales en la transmisión vertical de la microbiota desde la madre a su descendencia podrían ser compensados a través de la transmisión horizontal (agua potable contaminada, elevado contacto físico,

conglomeración social y familias numerosas). Los eventos que promueven una disminución en la diversidad y riqueza de la microbiota han sido asociados con riesgos de adquisición de determinadas enfermedades. La práctica médica moderna y el estilo de vida occidental afectan el desarrollo y la diversidad de la microbiota. Al menos 3 factores claves han sido identificados: nacimiento por cesárea, uso de antibióticos y patrones de alimentación (44).

Estudios comparativos de microbiota intestinal entre niños alimentados con lactancia materna y con fórmulas artificiales establecen que la leche humana es un potente inductor de maduración inmunológica, ya que provee probióticos de origen materno capaces de modular la colonización bacteriana neonatal, lo que tendría un efecto protector sobre enfermedades gastrointestinales infecciosas (45). La microbiota intestinal de recién nacidos alimentados solo con lactancia materna tiene un predominio de bifidobacterias, mientras que los niños que reciben lactancia artificial tienen una microbiota más compleja y diversa, con miembros de las familias Enterobacterales y de la especie *Enterococcus* (46). Cuando se comienzan a introducir alimentación complementaria y se empieza a realizar el destete, la complejidad y diversidad de la microbiota aumenta, siendo estos cambios más acusados en los niños alimentados con leche artificial frente a los alimentados con leche materna, y culminando este proceso entre los 12 meses y los tres años de vida, alcanzando un cierto grado de estabilidad.

1.3.2. Sepsis neonatal y sus factores de riesgo

Se entiende por sepsis neonatal la situación clínica derivada de la invasión y proliferación de bacterias, hongos o virus en el torrente sanguíneo, que se produce hasta los 28 días de vida. Estos microorganismos patógenos inicialmente contaminan la piel y/o mucosas del neonato y llegan al torrente circulatorio tras atravesar la barrera cutáneo-mucosa.

1.3.2.1. Sepsis de transmisión vertical

Se produce como consecuencia de la colonización del feto, durante los procesos inherentes a la maternidad (embarazo, parto y lactancia), por tanto, la presencia de patógenos en el canal genital de la gestante es el principal factor de riesgo relacionado con estas infecciones. Esta colonización genital materna está también relacionada con la aparición de rotura prolongada de membranas amnióticas, corioamnionitis y parto prematuro. No se deben excluir de este concepto algunas infecciones que se transmiten después de haber terminado el proceso del parto (por ejemplo, la transmisión de la infección por virus de la inmunodeficiencia humana durante la lactancia) (47).

a) Estreptococo del grupo B (EGB) o *Streptococcus agalactiae*

La infección por *S. agalactiae* continúa siendo la causa más frecuente de

sepsis neonatal de etiología bacteriana. EGB coloniza de forma asintomática el tracto gastrointestinal y la vagina de una alta proporción de mujeres sanas. La colonización puede ser transitoria, intermitente o persistente y, tanto en el hombre como en la mujer, el reservorio principal es el tracto gastrointestinal (recto). La tasa de colonización vagino-rectal por EGB es muy variable. En Europa se han señalado tasas entre el 6,5 y el 36%, con predominio de cifras próximas al 20% (48). En España se han publicado tasas de colonización en embarazadas del 12 al 20% (49).

El recién nacido se coloniza por EGB a su paso por el canal del parto, intraútero tras la rotura de membranas o, menos frecuentemente, por vía ascendente, aún con las membranas íntegras. Aproximadamente el 50% de los recién nacidos de madres portadoras son colonizados por EGB, mientras que sólo el 5% de los nacidos de madres en que EGB no se detecta por cultivo están colonizados. Un elevado grado de colonización vaginal se considera un factor de riesgo de colonización y de infección neonatal precoz. Dado que la colonización vaginal por EGB puede ser intermitente, los cultivos realizados antes del parto no son absolutamente fiables para predecir el estado de portadora en el momento del parto. Por ello, embarazadas que hayan estado colonizadas por EGB en un embarazo anterior pueden no estarlo en el embarazo actual.

En ausencia de medidas de prevención, entre el 1 y el 2% de los RN colonizados durante el parto desarrollan una infección en los primeros 7 días de vida. En los últimos 25 años se ha demostrado que la administración intravenosa de penicilina o ampicilina intraparto durante 4 o más horas antes del final parto es

efectiva para prevenir la transmisión vertical de EGB (50). Por todo ello, en 2013 se publicó el protocolo de prevención (51) que es seguido en la actualidad por las sociedades española de Ginecología y Obstetricia (SEGO) y de Neonatología (SENeo).

b) Otras bacterias

Exceptuando el EGB, la bacteria más frecuentemente implicada en sepsis de transmisión vertical es *E. coli*. Otros microorganismos implicados en las sepsis verticales, aunque más infrecuentes, son *Enterococcus faecalis*, otros *Streptococcus* y *Listeria monocytogenes* dentro de los Gram positivos, y *Klebsiella* spp., *Haemophilus influenzae* y *Enterobacter* spp. dentro de los Gram negativos (52).

En nuestro hospital seguimos el siguiente protocolo (53) en caso de riesgo de infección, considerando los siguientes factores de riesgo obteniendo cada uno de ellos 1 punto:

- Amniorrexis mayor de 18 horas
- Prematuridad (por debajo de 37 semanas de edad gestacional)
- Fiebre materna intraparto (por encima de 38°C)
- Gestación no controlada
- ITU en la última quincena de embarazo con urocultivo positivo
- Líquido amniótico maloliente
- Parto extrahospitalario o no aséptico

Si obtenemos una puntuación mayor o igual a 2, se solicita al recién nacido un hemograma y proteína C reactiva (PCR) a las 12 horas de vida. Si la PCR está por encima de 20 mg/L, se realiza una nueva extracción 12 horas después. Si esta nueva extracción presenta PCR elevada o alteración del hemograma, se ingresará al recién nacido, se le extraen hemocultivos y se inicia tratamiento antibiótico empírico. Si la puntuación es menor de 2, se observará clínicamente al niño durante 48 horas.

1.3.2.2. Sepsis de transmisión horizontal

Son causadas por microorganismos presentes en los servicios de Neonatología (especialmente UCIN) y, por tanto, los factores de riesgo que favorecen su aparición son los relacionados con la transmisión (como la desinfección insuficientes de las manos del personal sanitario, la falta de personal sanitario suficiente, la presencia de otros neonatos colonizados por bacterias específicas o la sobreutilización de antibióticos), así como los procedimientos invasivos (como el uso de catéteres intravasculares, tubos endotraqueales, válvulas de derivación ventriculoperitoneal, sondajes o nutrición parenteral y lípidos, la cirugía, los corticoides o la hospitalización prolongada).

En el caso específico de los RN pretérmino y con muy bajo peso al nacimiento (<1.500 gramos), la inmadurez inmunológica, la mayor tasa de procedimientos invasivos, el mayor tiempo de ingreso y la mayor tasa de población bacteriana patógena sobre la saprófita en las unidades y UCIN, explican la mayor tasa de sepsis encontrada en esta población (54).

2. JUSTIFICACIÓN

Se ha detectado, en estudios hospitalarios nacionales, indicios de una tendencia creciente en el número de neonatos portadores de E-BLEE; sin embargo, son escasos los estudios longitudinales tras el parto sobre adquisición de la colonización por estas bacterias en la comunidad. Asimismo, no se conocen bien los factores asociados a un mayor riesgo de adquisición de E-BLEE en esta población, ni si comporta riesgo de desarrollo de infecciones causadas por estas bacterias.

Existe escasa información sobre la duración de la colonización por E-BLEE en neonatos fuera del ámbito hospitalario, así como de las variables asociadas a una mayor duración de la misma.

Disponer de mayor información sobre las cuestiones anteriores sería de ayuda para valorar la necesidad de establecer programas específicos de cribado y control de la transmisión de E-BLEE en los recién nacidos, además de que proporcionaría datos de interés para entender la epidemiología de estos microorganismos.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPÓTESIS

1. Se puede estimar la prevalencia e incidencia de colonización por E- BLEE en recién nacidos tras el parto y durante el primer año de vida.
2. La colonización materna es el principal factor de riesgo para la adquisición de E-BLEE en neonatos tras el parto, aunque otras variables pueden aumentar o reducir el riesgo.
3. Los neonatos colonizados por E-BLEE podrían tener mayor riesgo de sufrir infección por estos microorganismos que los no colonizados.
4. La duración de la colonización por E-BLEE tras el nacimiento es corta y en general inferior a 3 meses.
5. Pueden identificarse factores de riesgo para una colonización más prolongada en los neonatos.

3.2. OBJETIVOS

1. Determinar la frecuencia de colonización por E-BLEE en recién nacidos sanos tras el parto y durante el primer año de vida, así como la dinámica de colonización durante los primeros 12 meses de vida de recién nacidos sanos.
2. Determinar los factores de riesgo para la adquisición de E-BLEE en neonatos tras el parto, y específicamente, el impacto de la colonización de la madre.
3. Determinar si el estado de portador de E-BLEE se asocia a un aumento de la frecuencia de infecciones por estos microorganismos en los neonatos.
4. Determinar la duración de la colonización por E-BLEE en neonatos

colonizados.

5. Determinar los factores asociados a una mayor duración de la colonización.

4. ARTÍCULOS PUBLICADOS



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Antimicrobial Agents

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijantimicag

Incidence and Risk Factors for Acquisition of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Newborns in Seville, Spain: A Prospective Cohort Study

María Jesús Rodríguez-Revuelta^{a,*}, Lorena López-Cerero^b, Lara Serrano^b, Salud Luna-Lagares^a, Alvaro Pascual^b, Jesús Rodríguez-Baño^b

^aUnidad de Neonatología, Hospital Universitario Virgen Macarena, Seville, Spain

^bUnidad Clínica de Enfermedades Infecciosas y Microbiología, Hospital Universitario Virgen Macarena / Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS) / CSIC / Universidad de Sevilla, Seville, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 30 May 2018
Accepted 9 September 2018

Editor: Dr Minggu Wang

Keywords:
Beta-lactamases
Newborns
Transmission
Enterobacteriaceae
Risk factors
Antimicrobial resistance

ABSTRACT

Background: ESBL-producing Enterobacteriaceae (ESBL-E) are an emerging cause of infections in children. Data are scarce on incidence rates and risk factors for acquisition of colonisation with ESBL-E.

Methods: A total of 46 and 50 newborns from colonised and non-colonised mothers, respectively, were followed during one year after birth. Rectal swabs were performed every 3 months to detect ESBL-E; *bla*_{ESBL} were characterised and isolates were typed for comparison. Multivariate analysis for risk factors was performed using Cox regression.

Results: Incidence density of any new acquisition and of first acquisition of ESBL-E was 2.7 and 1.9 episodes per 100 children-month, respectively, among children whose mothers were colonised, and 1.2 and 1.3, respectively, among children whose mothers were not. The weighted average prevalence of colonisation rates during the first year were 15.9% and 8%, respectively. No infections due to ESBL-E were detected. Living with pets at home, breastfeeding, sterilisation of feeding bottles and out-of-home childcare were protective for ESBL-E acquisition; having a colonised mother increased the risk. The most frequent ESBL types were CTX-M-14 and CTX-M-1. In 5/19 (26.3%) children with acquisition of new clones, the acquired ESBL-E was shared with their mothers.

Conclusions: Acquisition of ESBL-E colonisation is not rare during the first year of life. Breastfeeding and out-of-home childcare were protective for acquisition, and colonised mothers were associated with increased risk. However, the same clone was shared by mother and child in only a subset of acquisition episodes.

© 2018 Elsevier B.V. and International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

1. Introduction

Extended-spectrum β -lactamases (ESBL) confer resistance to penicillins and cephalosporins (excluding cephamycins); bacteria-producing ESBL are also frequently resistant to non- β -lactam antibiotics, such as fluoroquinolones, trimethoprim-sulphamethoxazole and aminoglycosides, and are therefore multidrug-resistant. ESBLs are mostly produced by Enterobacteriaceae and have spread worldwide over the last 20 years both in the community and in hospitals [1,2]. ESBL-producing Enter-

obacteriaceae (ESBL-E) are associated with an increasing number of cases of nosocomial and community sepsis in newborns, and of outbreaks in neonatal intensive care units, resulting in high morbidity and mortality [3–5].

Investigating the rate and risk factors for rectal colonisation with ESBL-E in different settings is of interest for several reasons. First, infections caused by these bacteria are usually preceded by colonisation; second, colonised individuals are an important reservoir for these bacteria; and third, investigating rectal colonisation is key to understanding the transmission dynamics of ESBL-E [2]. The risk factors for colonisation by ESBL-E in the adult population have been studied extensively [6,7]. In children, most studies have been performed in neonatal units [8]. Point prevalence studies in community children have also been reported [9–18], but data are scarce on longitudinal assessment to estimate the incidence and risk factors for acquisition of ESBL-E colonisation.

* Author for correspondence: María Jesús Rodríguez Revuelta, Unidad de Neonatología, Hospital Universitario Virgen Macarena, Avda Dr. Fedriani 3, 41009 Seville, Spain.

E-mail address: machurodriguez@hotmail.com (M.J. Rodríguez-Revuelta).

<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.09.007>

0924-6460/© 2018 Elsevier B.V. and International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

The objectives of our study were to estimate the incidence density and risk factors for colonisation with ESBL-E in newborns. We also evaluated if ESBL-E colonisation is associated with increased risk of infection due to ESBL-E.

2. Methods

2.1. Study design, location and participants

This study is part of a project investigating different aspects of the epidemiology of ESBL-E in pregnant women and neonates, in which the mothers delivering at our hospital and their neonates were eligible. As colonisation status of the mother is considered to be a critical factor for the acquisition of colonisation in newborns, we performed a nested-prospective cohort study including the children from the first 50 mothers found to be colonised by ESBL-E, and 50 newborns randomly selected from non-colonised mothers, from August 1st, 2013 to June 31st, 2014. The study was performed in Hospital Universitario Virgen Macarena in Seville, Spain, a 900-bed tertiary hospital attending a population of 550 000 and with 3200 births per year. Children born to mothers in whom rectal samples were not obtained and those lacking basic epidemiologic data were excluded.

The newborns and their mothers were followed for 1 year; rectal colonisation by ESBL-E was assessed in children and their mothers by performing rectal swabs within the first 48 h of life and delivery, respectively, and subsequently every 3 months (\pm 1 week). Epidemiological and clinical data were collected at each visit (see below). Mothers were instructed to inform about any signs or symptoms for infection so that microbiological samples could be collected; the microbiology records were also checked for all participating children. Participants who were lost to follow-up were censored at the time of their last visit. The study was approved by the local Ethic Committee. Written informed consent was obtained from all mothers in the study.

2.2. Variables and definitions

The main outcome variable was acquisition of colonisation of ESBL-E in newborns from month 3. We investigated both the incidence of any new episode of ESBL-E acquisition (as any child may acquire different ESBL-E strains/clones at any time) and the incidence of the first acquisition of an ESBL-E. Both populations were stratified according to the colonisation status of the mother at delivery.

Data from the children and their mothers were collected from the charts and by interviewing the mothers using a structured case report form at each visit. The exposure variables in children included sex, anthropometric features, travel abroad, number of household members, new household members since the last visit, pets at home, out-of-home childcare, breastfeeding or feeding with artificial milk, use of homemade or industrial puree \geq 5 days per week, sterilisation of feeding bottles before each use, any chronic disease or acute process, hospital admissions, and antibiotic use. Variables of the mothers included cooking homemade food \geq 5 days per week, any chronic or acute disease, being the main carer for a disabled person, hospital admissions, antibiotic use and ESBL-E colonisation status.

2.3. Microbiological studies

Rectal swabs were taken by the investigators, except for a few mothers who preferred to take their own samples after being trained to do so. The samples had to contain visible faecal material or staining to be acceptable; they were inoculated directly

on 4 mg/L cefotaxime seeded on MacConkey agar plates and peptone broth. After overnight enrichment, samples were also plated on 4 mg/L cefotaxime MacConkey agar plates. Colonies with different morphotypes (2–3 per plate) compatible with Enterobacteriaceae were identified using MALDI-TOF and studied for ESBL screening with the double-disk method [19]. The *bla* genes were sought by polymerase chain reaction (PCR) with primers specific for the main groups (CTX-M-1, CTX-M-9, SHV and TEM) as previously described [7] and further sequencing. The genetic relationship among isolates was studied by *Xba*I pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) [20,21]. Dendograms were generated using Fingerprinting 2.0 with Dice index and a position tolerance of 1%; isolates with \leq 3 bands difference were considered to belong to the same pulsotype (corresponding to \geq 90% similarity) [22]. The phylogenetic group was studied in *Escherichia coli* isolates by the multiplex PCR-based method of Clermont et al [22]; screening for the ST131 clone was carried out among B2-positive isolates using specific PCR for O25b *rfb* [23] and allele 3 of the *pabB* gene [24].

2.4. Statistical analyses

For the incidence density of any new acquisition of ESBL-E, the numerator was the number of all new ESBL-E acquisitions (including acquisition of new clones in previously colonised children) and the denominator was children-months until 12 months or censoring if lost to follow-up (“all children population”, ACP). For the incidence density of first acquisition of ESBL-E, the numerator was the number of children acquiring an ESBL-E for the first time, and the denominator was children-months until acquisition of first colonisation or, if colonisation did not occur, until the end of follow-up or censoring. For this, children colonised at birth were excluded (“non-previously colonised children population”, NPCP).

The prevalence of colonisation at each visit was calculated; an average prevalence during the first year of life, weighted according to the number of children studied at each time point, was also calculated. The prevalence of colonisation in newborns for a theoretical unselected population was estimated, considering a 5% to 10% prevalence of colonised mothers (during the study period, the observed prevalence of colonised mothers was 6.8%, 95% confidence interval [CI], 5.2–8.7% [25]).

The Mann-Whitney U test was used to compare continuous variables, and the Chi square or Fisher tests were used for categorical variables, as appropriate. Time until ESBL-E acquisition was plotted using Kaplan-Meier curves; the univariable association of different exposures with time until first colonisation was investigated by Cox regression and log-rank test. Exposure to variables was considered until acquisition of first colonisation if it happened, or otherwise until end of follow-up or censoring. Multivariable analyses were performed using Cox regression models; variables with a *P* value $<$ 0.1 in univariable analyses were included, and selected manually using a stepwise, backward process. We did not investigate the risk factors for any new acquisition because children acquiring $>$ 1 ESBL-E would be included more than once.

3. Results

Of the 100 selected children (50 whose mothers were colonised and 50 whose mothers were not colonised by ESBL-E at birth), 4 from the colonised-mothers group were excluded because of missing key data; therefore, 46 and 50 children whose mothers were colonised and non-colonised by ESBL-E, respectively, were included. The number of children studied in months 3, 6, 9 and 12 were 95, 90, 87 and 85, respectively. The features of the children and their mothers are shown in Table 1.

Table 1

Features of the 96 children included in the study and their mothers. The data are shown as number of participants (percentage) except where specified, and are cumulative until colonisation or censoring.

	Children with colonised mother at birth (n=46)	Children with non-colonised mother at birth (n=50)
Children's variables		
Male sex	29 (63)	26 (52)
Weight at birth in grams, median (IQR)	3367 (3053-3643)	3332 (2970-3662)
Travel abroad	6 (13)	3 (6)
Moved home	9 (19.6)	3 (6)
Household members, median (IQR)	4 (3-4.5)	4 (3-4)
Bedrooms at home, median (IQR)	3 (3-3)	3 (3-3)
Bathrooms at home, median (IQR)	1 (1-2)	1 (1-2)
New household member	5 (10.9)	1 (2)
Pets at home	13 (28.3)	22 (44)
Breastfeeding	38 (82.6)	40 (80)
Months of breastfeeding, median (IQR)	3 (1.5-12)	6 (4-12)
Sterilisation of feeding bottles	41 (89.1)	45 (90)
Eating homemade puree	46 (100)	48 (96)
Out-of-home childcare	14 (30.4)	21 (42)
Any chronic condition	12 (26.1)	8 (16)
Any acute disease	22 (47.8)	34 (68)
Hospitalisation	4 (8.7)	6 (12)
Antibiotic use	17 (37)	22 (44)
Mothers' variables		
Cook homemade food ≥ 5 days/week	40 (87)	44 (88)
Carer for a disabled person	5 (10.9)	7 (14)
Any chronic condition	13 (28.4)	15 (30)
Any acute disease	17 (37)	19 (38)
Hospitalisation	0 (0)	3 (6)
Antibiotic use	14 (30.4)	12 (24)
Children colonised by ESBL-E		
At birth ¹	9/46 (19.6)	2/50 (4)
At 3 months ²	10/45 (22.2)	2/50 (4)
At 6 months	8/40 (20)	6/50 (12)
At 9 months	6/38 (15.8)	4/49 (8.2)
At 12 months	4/36 (11.1)	4/49 (8.2)
Weighted average prevalence after birth (%)	15.9	8.0

IQR: interquartile range.

P values for comparison between children with colonised and non-colonised mothers >0.05 except ¹0.02, ²0.01 (Fisher test).

3.1. Prevalence and incidence density of any new acquisitions and first acquisition of ESBL-E

The prevalence of colonisation after birth at the different study visits is shown in Table 1; it ranged from 11.1% to 22.2% (weighted average, 15.9%) among children whose mothers were colonised at birth, and 4% to 12% (weighted average, 8.0%) among children whose mothers were not colonised. In a theoretical unselected population, and considering a range in mother-colonisation prevalence of 5% to 10%, the estimated prevalence of colonisation in newborns after birth during the first year of life would range from 7.7% to 8.7%.

In the ACP, 19/96 (19.8%) children had a new episode of colonisation by any ESBL-E after birth (12 [26%] and 7 [14%] among children with colonised and non-colonised mothers, respectively; $P=0.2$). The cumulative incidence density of any new acquisition of ESBL-E was 2.7 and 1.2 per 100 children-months in children with colonised and non-colonised mothers, respectively (log-rank test, $P=0.07$).

For the NPCP, 11 children who had been detected as colonised at birth (9 in the group of colonised mothers, and 2 in the group of non-colonised mothers) were excluded; therefore, this population was formed by 85 children, 37 and 48 in the groups of colonised and non-colonised mothers, respectively. Of these, 14 (16.5%) acquired a first colonisation due to ESBL-E after birth during the follow-up, 7/37 (18.9%) and 7/48 (14.6%) in the groups of children with colonised and non-colonised mothers, respectively ($P=0.7$). The overall cumulative incidence density of first acquisition

of ESBL-E was 1.9 and 1.3 per 100 children-months in the groups of children with colonised and non-colonised mothers, respectively (log-rank test, $P=0.44$). Fig. 1 displays the Kaplan-Maier curves for cumulative acquisition of ESBL-E; as shown, the rate of ESBL-E acquisition was constant throughout the first year of life.

During the follow-up, 58.3% of the children suffered an acute disease event, mostly mild respiratory tract infections. No urinary or digestive tract infections were detected, and no infections caused by ESBL-E were diagnosed.

3.2. Risk factors for first colonisation due to ESBL-E

The univariate and multivariate analysis for first colonisation by ESBL-E in children is shown in Table 2. Living with pets at home, breastfeeding, sterilisation of feeding bottles and out-of-home childcare showed a protective effect, whereas a mother colonised during the previous 3 months significantly increased the risk.

3.3. Microbiological data

Overall, 39 clonally different ESBL-E isolates were obtained throughout the study period from 25 children: 12 of these isolates were colonising 11 children at birth (one child had 2 clonally unrelated isolates), and 27 were incident isolates, newly acquired by 19 children after birth (13 children acquired 1 new ESBL-E, 4 acquired 2 new clones, and 2 acquired 3 new clones). Among the incident ESBL-E, 24 (88.8% of those acquired after birth) were E.

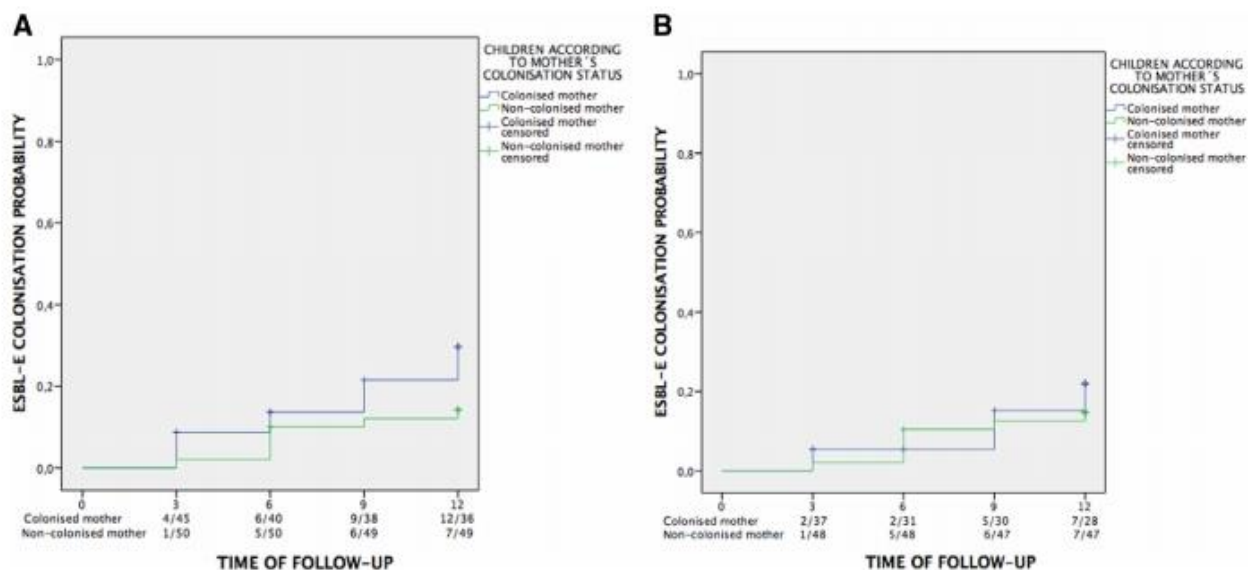


Fig. 1. Kaplan-Meier curves for first colonisation with ESBL-producing Enterobacteriaceae among children with colonised and non-colonised mothers. Fig. 1a corresponds to all children population and Fig. 1b corresponds to non-previously colonised children population.

coli and 3 (11.1%) were *Klebsiella pneumoniae*. The ESBLs produced by the incident (acquired after birth) colonising isolates in children are shown in Table 3. The most frequent enzymes were CTX-M-14 and CTX-M-1. With respect to the phylogroups of *E. coli* (Table 3), the most frequent was A followed by B2.

With regard to the mothers, a total of 71 isolates were obtained, 49 of them at delivery and 22 incident isolates (acquired after delivery) from 18 mothers; all the incident isolates (acquired after delivery) were *E. coli*. The ESBLs produced are shown in Table 3. The most frequent incident ESBLs were CTX-M-14 and CTX-M-1. With regard to the phylogroups of *E. coli* (Table 3), the most frequent was A followed by B2.

According to the molecular typing, 6/27 (22.2%) isolates of incidents obtained from 5/19 (26.3%) children with new acquisitions were shared with their mothers (one child acquired 2 different isolates that also colonised their mother), which indicates transmission between mother and child or acquisition from a common source. One of them was *K. pneumoniae* (16.7%) and the other 5 were *E. coli*. Two of them produced CTX-M-14, two produced CTX-M-1, one produced CTX-M-15, one produced SHV-2 and one produced SHV-12 (one isolate produced CTX-M-1 and SHV-12); three of the shared isolates belonged to the phylogroup B2 (one of them was an ST131 clone), one to A and one to D.

4. Discussion

Our results show that (a) acquisition of ESBL-E after birth is not rare in children born to colonised or non-colonised mothers at delivery (and is more common if the mother is colonised) in our area, and that acquisition continues to occur at a constant rate during the first year of life; (b) only a few variables associated with risk of ESBL-E acquisition were identified; and (c) only around a quarter of ESBL-E acquired after birth are clonally related to mothers' isolates. This study is, to the best of our knowledge, the first to estimate the incidence density of acquisition of ESBL-E in newborns throughout the first year of life. A linear increase in the cumulative colonisation risk was observed, but because colonisation was also lost in some participants, the prevalence rates were similar in all time periods. We did not find any infection caused by ESBL-E in

our cohorts. However, an evaluation of the potential clinical implications of colonisation would need a bigger sample size.

The results of this and previous studies indicate that the prevalence of ESBL-E colonisation in children reflects the overall level of endemicity of these organisms in the region. Thus, studies from the USA and Europe mostly found prevalence rates <10%. A study in USA found no neonates colonised during 1 year of follow-up [18]; however, in that study, rectal samples were diluted 1:100 in saline and enrichment was not used, which might have reduced the sensitivity of detection. A study in Sweden found 2.9% colonisation prevalence in healthy children aged 11–39 months [13]. Two studies in France showed prevalence rates of 4.6% in children aged 6–24 months during a routine check-up or consulting because of otitis media [11] and 5.2% in paediatric patients of all ages admitted because of acute diarrhoea [15]. A study in Spain found prevalence ranging from 8.8% to 13.9% in healthy children studied at months 8, 12 and 16 months after birth [16], similar to this study. However, studies from Asian and African countries found prevalence rates >30%; in Hong Kong and Guinea-Bissau, 37.7% and 32.6% of children aged ≤5 years admitted because of acute respiratory disease or fever were colonised, respectively [9,10]; in India, the prevalence in healthy, vaginally-delivered and breastfed neonates was 13.4%, 27.1% and 41.5% at days 0, 21 and 60 after birth [14]; and in Central African Republic, it was 59% in healthy children <5 years of age [17]. It should be noted that these studies are heterogeneous in the populations studied and microbiological methods to detect colonisation.

The risk factors for colonisation with ESBL-E in children have been mostly investigated in neonatal ICUs: in the neonatal ICU population, some intrinsic features of the children, invasive procedures, length of stay and previous use of antimicrobials are associated with acquisition [8]. Fewer studies have been conducted to investigate the risk factors for colonisation in the community; the variables found included bed-sharing with a <5-year-old child [10], living in high income families [17], previous use of cephalosporins [11] and lower space per person in the household [9]. Out-of-home childcare was a protector [16]. The interpretation of these sometimes-contradictory data is complex as they were obtained in studies with point prevalence designs, in different populations and with heterogeneity in the variables assessed.

Table 2

Univariate and multivariate analysis of risk factors for first acquisition of ESBL-E. All variables were considered until the child's colonisation.

VARIABLE	Newly colonised/children at risk (percentage)	HR (IC 95%)	P	Adjusted HR (95% CI)	P
Children's variables					
Sex					
Male	11/55 (20)	1.16 (0.46–2.9)	0.73		
Female	8/41 (19.5)				
Travel abroad					
Yes	0/6 (0)	0.04 (0.00–94.46)	0.44		
No	19/90 (21.1)				
Moved home					
Yes	3/11 (27.3)	1.44 (0.42–4.95)	0.55		
No	16/85 (18.8)				
New household member					
Yes	2/5 (40)	2.03 (0.47–8.80)	0.34		
No	17/91 (18.7)				
Pets at home					
Yes	3/33 (9.1)	0.30 (0.09–1.05)	0.06	0.3 (0.08–1.05)	0.06
No	16/63 (25.4)				
Breastfeeding					
Yes	12/75 (16)	0.39 (0.15–1.00)	0.05	0.29 (0.11–0.80)	0.01
No	7/21 (33.3)				
Sterilisation of feeding bottles					
Yes	13/82 (15.9)	0.31 (0.12–0.83)	0.02	0.37 (0.13–1.03)	0.05
No	6/14 (42.9)				
Homemade puree					
Yes	19/94 (20.2)	4.56 (0.00–3187.60)	0.64		
No	0/2 (0)				
Out-of-home childcare					
Yes	3/33 (9.1)	0.30 (0.09–1.06)	0.06	0.26 (0.07–0.93)	0.03
No	16/63 (25.4)				
Chronic disease					
Yes	3/18 (16.7)	0.79 (0.23–2.74)	0.72		
No	16/78 (20.5)				
Acute disease					
Yes	9/52 (17.3)	0.64 (0.26–1.58)	0.33		
No	10/44 (22.7)				
Hospitalisation					
Yes	1/8 (12.5)	0.60 (0.08–4.52)	0.62		
No	18/88 (20.5)				
Antibiotic use					
Yes	6/34 (17.6)	0.53 (0.27–1.93)	0.53		
No	13/62 (21)				
Mothers' variables					
Cook homemade food					
Yes	18/85 (21.2)	2.46 (0.32–18.48)	0.37		
No	1/11 (9.1)				
Carer for a disabled person					
Yes	2/10 (20.0)	0.93 (0.21–4.03)	0.92		
No	17/86 (19.8)				
Chronic disease					
Yes	1/28 (3.6)	0.12 (0.01–0.94)	0.04		
No	18/68 (26.5)				
Acute disease					
Yes	3/31 (9.7)	0.32 (0.09–1.13)	0.07		
No	16/65 (24.6)				
Hospitalisation					
Yes	0/1 (0)	0.22 (0.00–2246.07)	0.74		
No	19/95 (20)				
Antibiotic use					
Yes	2/21 (9.5)	0.37 (0.08–1.60)	0.18		
No	17/75 (22.7)				
Mother colonised during the previous 3 months					
Yes	8/25 (32)	2.92 (1.17–7.32)	0.02	3.03 (1.10–8.31)	0.03
No	11/71 (15.5)				

HR: Hazard ratio. CI: confidence interval

Our study is unique as we also investigated the colonisation status of the mother at all time points as mothers are known to be the most important source of colonising bacteria for vaginally-delivered newborns [26]. The impact of mother colonisation is overestimated by our design but it enabled us to find additional risk factors. Breastfeeding and sterilisation of feeding bottles before each use had a protective effect for ESBL-E acquisition. The for-

mer may provide resistance to further colonisation with exogenous flora, and the latter may either reduce ingestion of environmental bacteria or be a surrogate marker for better hygiene practices. Attending a nursing home was also associated with a protective effect (in the limit of statistical significance) as in a previous study [16]. This further supports the concept that colonisation might be preferentially acquired at home. Some food products, particularly

Table 3
ESBL types produced by all isolates and phylogroups of *E. coli* isolates in children.

	Incident children's isolates (acquired after birth) (n=27)	Incident mother's isolates (acquired after delivery) (n=22)	Incident isolates shared by children and their mothers (n=6)
ESBLs			
CTX-M-14	12 (44.4)	8 (36.3)	2 (33.3)
CTX-M-1	8 (29.6) ^a	4 (18.2)	2 (33.3) ^a
SHV-12	5 (18.5) ^b	6 (27.3) ^b	1 (16.7) ^b
CTX-M-15	1 (3.7)	2 (9.1) ^b	1 (16.7)
CTX-M-32	1 (3.7)	2 (9.1)	0
CTX-M-27	1 (3.7)	0	0
SHV-2	1 (3.7)	0	1 (16.7)
CTX-M-24	0	0	0
CTX-M-9	0	1 (4.5)	0
Phylogroups (<i>E. coli</i>)	N=24	N=22	N=5
A	9 (37.5)	13 (59.1)	1 (20)
B ₂	6 (25)	4 (18.2)	3 (60) ^c
D	5 (20.8)	3 (13.6)	1 (20)
B ₁	4 (16.7)	2 (9.1)	0

^a Two isolates produced SHV-12 and CTX-M-1.

^b One isolate produced SHV-12 and CTX-M-15.

^c One isolate belongs to the phylogroup B₂, ST131.

chicken and turkey, have been found to be frequently contaminated with ESBL-E, also in our area [27,28], and manipulation of raw contaminated product (e.g., for cooking) may facilitate transmission to other household members. Finally, we also found that having pets at home was also associated with a protective effect (again in the limit of significance). If any, we had expected the opposite effect, as pets may also be a reservoir for ESBL-E [29]. This association may be spurious but may also be a marker for better hygiene practices in the household.

An important issue is the frequency of household transmission among members or common acquisition of ESBL-E. Clonally-related ESBL-producing *K. pneumoniae* were found to colonise >1 member in 32% of households in which lived neonates who were colonised during an outbreak in a neonatal ICU [12]. In a point prevalence study, clonally-related isolates were found in more than 1 member in 7 households out of 53 studied (13.2%); most of the children in that study were colonised by ESBL-producing *E. coli* [9]. In our study, we found clonally-related strains in 5 children and their mothers. The results of risk factors studies indicate that variables related to better hygiene may be relevant in avoiding transmission.

The most frequent ESBLs found in our study represent the epidemiology of these enzymes in our region, where CTX-M-14 and SHV-12 have been the most frequent [1,7,26]; 1 of the 6 isolates shared by children and their mothers belonged to phylogroup B₂, which includes the ST131 clone. This successful worldwide spread clone may be particularly prone to person-to-person transmission [30,31].

Our study has some limitations that should be considered for the interpretation of the results. The incidence rate and risk factors would apply only to areas with a similar epidemiology of ESBL-E; our sample size was limited to identify some potential risk factors; we did not study other household members beyond the mothers; and the exploratory nature of the study might have found some spurious associations that therefore should be confirmed in hypothesis-based investigations.

In summary, acquisition of ESBL-E colonisation is not rare during the first year of life in our area. Breastfeeding and out-of-home childcare were protective for acquisition, whereas colonised mothers were associated with increased risk. However, the same clone was shared by mother and child in only a subset of acquisition episodes.

Acknowledgements

We thank the participants for their involvement in the study, and particularly my Neonatology and Emergency Paediatrics colleagues, for their unconditional support.

Declarations: The authors declare no conflict of interest for this article.

Funding

This study was funded by: (1) Plan Nacional de I+D+i 2013-2016 and Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015/0010 and REIPI RD16/0016/0001), co-financed by European Development Regional Fund "Away to achieve Europe", Operative Programme Intelligent Growth 2014-2020; (2) Instituto de Salud Carlos III (grants 070190, 10/01955 10/00795 and AC16/00076 through AES 2016 and within the JPI-EC-AMR framework; and (3) Consejería de Innovación, Junta de Andalucía (grants CTS-5259 and CTS210). The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

Competing Interests

No

Ethical Approval

Research Ethics Committee of the Virgen Macarena University Hospital Center on September 23, 2013 with internal code 2179.

References

- [1] Rodríguez-Baño J, Pascual A. Clinical significance of extended-spectrum β -lactamases. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2008;6:671–83.
- [2] Pitout J, Laupland K. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* 2008;8:159–66.
- [3] Lukac P, Bonomo RA, Logan LK. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in children: old foe, emerging threat. *Clin Infect Dis* 2015;60:389–97.

- [4] Murray TS, Peaper DR. The contribution of extended-spectrum β -lactamases to multidrug-resistant infections in children. *Curr Opin Pediatr* 2015;27:124–31.
- [5] Stapleton PJ, Murphy M, McCallion N, Brennan M, Cunney R, Drew RJ. Outbreaks of extended spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in neonatal intensive care units: a systematic review. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2016;101:F72–8.
- [6] Karanika S, Karantanos T, Arvanitis M, Grigoras C, Mylonakis E. Fecal colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae and risk factors among healthy individuals: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2016;63:310–18.
- [7] Rodríguez-Baño J, López-Cerero L, Navarro MD, Díaz 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;62:1142–9.
- [8] Li X, Xu X, Yang X, Luo M, Liu P, Su K, et al. Risk factors for the infection and/or colonization of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in a neonatal intensive care unit: a meta-analysis. *Int J Antimicrob Agents* 2017;50:622–8.
- [9] Lo Wu, Ho PL, Chow KH, Lai EL, Yeung F, Chiu SS. Fecal carriage of CTXM type extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms by children and their household contacts. *J Infect* 2010;60:286–92.
- [10] Isendahl J, Turlej-Rogacka A, Majuba C, Rodrigues A, Giske CG, Naucclér P. Fecal carriage of ESBL producing *E. coli* and *K. pneumoniae* in children in Guinea-Bissau: a hospital-based cross-sectional study. *Plos One* 2012;7:e51981.
- [11] Birgy A, Cohen R, Levy C, Bidet P, Courroux C, Benani M, et al. Community faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in French children. *BMC Infect Dis* 2012;12:315.
- [12] Löhr IH, Rettedal S, Natås OB, Naseer U, Oymar K, Sundsfjord A. Long-term faecal carriage in infants and intra-household transmission of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* following a nosocomial outbreak. *J Antimicrob Chemother* 2013;68:1043–8.
- [13] Kaarme J, Molin Y, Olsen B, Melhus A. Prevalence of extended spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in healthy Swedish preschool children. *Acta Paediatr* 2013;102:655–60.
- [14] Kothari C, Gaiind R, Singh LC, Sinha A, Kumari V, Arya S, et al. Community acquisition of β -lactamase producing Enterobacteriaceae in neonatal gut. *BMC Microbiol* 2013;13:136.
- [15] Boutet-Dubois A, Pantel A, Prère MF, Bellon O, Brieu-Roche N, Lecaillon E, et al. Faecal carriage of oxyminocephalosporin-resistant Enterobacteriaceae among paediatric units in different hospitals in the south of France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013;32:1063–8.
- [16] Fernández-Reyes M, Vicente D, Gomariz M, Esnal O, Landa J, Oñate E, et al. High rate of fecal carriage of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in healthy children in Gipuzkoa, northern Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:1822–4.
- [17] Farra A, Frank T, Tondeur L, Bata P, Gody JC, Onambele M, et al. High rate of faecal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in healthy children in Bangui, Central African Republic. *Clin Microbiol Infect* 2016;22 891.e1–891.e4.
- [18] Meropol SB, Stange KC, Jacobs MR, Weiss JK, Bajaksouzian S, Bonomo RA. Bacterial colonization and antibiotic resistance in a prospective cohort of newborn infants during the first year of life. *Open Forum Infect Dis* 2016;3 ofw221.
- [19] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance Version 1.0. EUCAST; Dec http://www.amcli.it/wp-content/uploads/2015/10/EUCAST_detection_resistance_mechanisms_V1.pdf.
- [20] Fernández Cuenca F, López Cerero L, Pascual Hernández A. Técnicas de tipificación molecular para la vigilancia y control de la infección. *Enferm Infect Microbiol Clin* 2013;31:20–5.
- [21] Johnson JR, Nicolas-Chanoine MH, DebRoy C, Castanheira M, Robicsek A, Hansen G, et al. Comparison of *Escherichia coli* ST131 pulsotypes, by epidemiologic traits, 1967–2009. *Emerg Infect Dis* 2012;18:598–607.
- [22] Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep* 2013;5:58–65.
- [23] Clermont O, Lavollay M, Vimont S, Deschamps C, Forestier C, Branger C, et al. The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:1024–8.
- [24] Clermont O, Dhanji H, Upton M, Gibreel T, Fox A, Boyd D, et al. Rapid detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* encompassing the CTX-M-15-producing strains. *J Antimicrob Chemother* 2009;64:274–7.
- [25] López Cerero L, Jiménez C, Luna S, Vera C, Rodríguez-Baño J, Pascual A. Prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae mother colonisation and mother-to-neonate transmission. 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Barcelona; 2014.
- [26] Denkel LA, Schwab F, Kola A, Leistner R, Garten L, von Weizsäcker K, et al. The mother as most important risk factor for colonization of very low birth weight (VLBW) infants with extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae (ESBL-E). *J Antimicrob Chemother* 2014;69:2230–7.
- [27] Doi Y, Paterson DL, Egea P, Pascual A, López-Cerero L, Navarro MD, et al. Extended-spectrum and CMY-type beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in clinical samples and retail meat from Pittsburgh, USA and Seville, Spain. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:33–8.
- [28] Kluytmans JAJW, Overdeest ITMA, Willemsen I, Kluytmans-van den Bergh MF, van der Zwaluw K, Heck M, et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from retail chicken meat and humans: Comparison of strains, plasmids, resistance genes, and virulence factors. *Clin Infect Dis* 2013;56:478–87.
- [29] Meyer E, Gastmeier P, Kola A, Schwab F. Pet animals and foreign travel are risk factors for colonisation with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Infection* 2012;40:685–7.
- [30] Johnson JR, Davis G, Clabots C, Johnston BD, Porter S, DebRoy C, et al. Household clustering of *Escherichia coli* Sequence Type 131 clinical and fecal isolates according to whole genome sequence analysis. *Open Forum Infect Dis* 2016;3 ofw129.
- [31] Torres E, López-Cerero L, Morales I, Navarro MD, Rodríguez-Baño J, Pascual A. Prevalence and transmission dynamics of *Escherichia coli* ST131 among contacts of infected community and hospitalized patients. *Clin Microbiol Infect* 2017 Sep 19. pii: S1198-743X(17)30505-0.

Duration of Colonization by Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* in Healthy Newborns and Associated Risk Factors: A Prospective Cohort Study

Maria Jesús Rodríguez-Revuelta,^{1,2} Lorena López-Cerero,² Lara Serrano,² Salud Luna-Lagares,¹ Alvaro Pascual,² and Jesús Rodríguez-Baño²

¹Unidad de Neonatología, Unidad de Gestión Clínica de Pediatría, Hospital Universitario Virgen Macarena, Seville, Spain; ²Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva, Hospital Universitario Virgen Macarena/Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS)/CSIC/Departamentos de Microbiología y Enfermedades Infecciosas, Universidad de Sevilla, Spain

Duration of colonization by extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* (ESBL-E) and factors associated with it were studied in 20 newborns in Seville, Spain. Median duration of colonization was 7.5 months; factors associated with prolonged colonization were delivery by caesarean section, colonization of the mother, and phylogroup B2 *Escherichia coli* isolate.

Keywords. colonization; *Escherichia coli*; extended-spectrum β -lactamases; newborns; risk factors.

Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* (ESBL-E) have rapidly spread worldwide. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* are usually resistant to penicillins and cephalosporins, and because ESBL production is frequently associated with resistance to other non- β -lactam drugs, they are also multidrug resistant. Intestinal colonization with ESBL-E is important because colonized persons are key reservoirs of these organisms, and colonization generally precedes infection [1, 2].

The natural history of intestinal colonization by ESBL-E has mostly been studied in adults. In our area, the prevalence of colonization with ESBL-E in pregnant women at delivery is 6.7% (95% confidence interval [CI], 5.2–8.7) [3].

A systematic review showed that colonization was maintained for at least 6 months in 19% (95% CI, 9%–34%) of adults in the community, mostly travelers returning from endemic countries colonized with *Escherichia coli* [4]. However, the data on duration of colonization in neonates are limited, to the best of our knowledge, to 2 studies including only patients discharged after hospital outbreaks [5, 6]. After a literature search in PubMed, no data were found on healthy newborns, and there is very limited information about the human and microbiological factors associated with prolonged colonization [5]. The objective of our study was to investigate the duration of colonization with ESBL-E in healthy newborns during the first year of life and the risk factors for prolonged colonization.

METHODS

A prospective cohort study of children colonized by ESBL-E during the first year of life was undertaken. This study is part of a project investigating different aspects of the epidemiology of ESBL-E during pregnancy and in children. In summary, rectal colonization with ESBL-E was studied in a convenient sample of newborns and their mothers (see below) attended at Virgen Macarena University Hospital (Seville, Spain), a 900-bed tertiary hospital serving a population of 550 000, with 3200 births per year. All pregnant women who gave birth at the hospital (and their children) were eligible if attended for delivery on predefined random days and offered to participate. No exclusion criteria applied. The recruitment was completed from August 1, 2013 to June 30, 2014.

Rectal swabs were taken from the children and their mothers in the first 48 hours of life (or the first 48 hours after delivery in the mothers). Subsequent routine visits were made at 3, 6, 9, and 12 months of life, during which time the data were collected, the babies were explored, and a rectal sample was taken from the children and their mothers. The data were collected using a pre-design questionnaire in a secured electronic database. Children detected as colonized with ESBL-E in any rectal sample were included in this analysis. The study was approved by the local ethics committee. All of the mothers provided written informed consent.

The main outcome variable was clearance of colonization (CoC) of ESBL-E in colonized children, which was defined as 2 negative rectal swabs after any positive one. The CoC date was arbitrarily considered as the intermediate date between the last positive sample and the first negative one (because samples were taken every 3 months, this was typically 6 weeks after the last positive sample). Negative samples with the same clone between 2 positives were considered false negatives. Exposure

Received 12 August 2018; editorial decision 12 November 2018; accepted 16 November 2018.

Correspondence: M. J. Rodríguez Revuelta, MD, Unidad de Neonatología, Hospital Universitario Virgen Macarena, Avda Dr. Fedriani 3, 41009 Seville, Spain (machurodriguez@hotmail.com).

Open Forum Infectious Diseases®

© The Author(s) 2018. Published by Oxford University Press on behalf of Infectious Diseases Society of America. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs licence (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits non-commercial reproduction and distribution of the work, in any medium, provided the original work is not altered or transformed in any way, and that the work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com
DOI: 10.1093/ofid/ofy312

to children, mother-related variables, and microbiologic features of the isolates were collected.

Rectal swab specimens were directly inoculated onto MacConkey agar with 4 mg/L cefotaxime and after 18 hours enrichment in peptone-enriched broth. All colonies morphotypes isolated compatible with *Enterobacteriaceae* (with or without enrichment) were identified by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Extended-spectrum β -lactamase screening was performed by the combination disc test [7]. Characterization of ESBL genes was determined by in-house polymerase chain reaction (PCR) with group-specific primers for the CTX-M-1, CTX-M-9, TEM, and SHV groups [8] and Sanger sequencing in all cases. XbaI pulsed-field gel electrophoresis was used to study genetic relationships among the isolates [9]. Fingerprinting 2.0 was used to generate dendrograms, using the Dice index under 1% tolerance. Isolates with >2 band differences were considered clonally unrelated [10]. *Escherichia coli* phylogroups were assigned by quadruplex PCR for *chuA*, *yjaA*, *TspE4.C2*, and *arpA* genes [11]. B2 isolates were screened for belonging to the O25b:H4/ST131 clonal group, using PCR for O25b rfb and allele 3 of the *pabB* gene and multiplex PCR for phylogroup B23 typing [12].

Due to the difficulties for screen, recruit, and follow healthy newborns, we planned to include at least 20 colonized by ESBL-E. To do so, we screened for ESBL-E colonization the newborns of 50 ESBL-E colonized mothers and the newborns of 50 randomly selected noncolonized mothers which had been studied for another project investigating ESBL-E colonization in pregnancy [3]. Time until CoC was studied by Kaplan-Meier curves. The association between different exposures (considered until CoC or censoring) and time to CoC was investigated by Cox regression. Different multivariate models were constructed using a forward stepwise process. Variables included initially were those with a crude $P \leq .01$. Those causing significant changes in the hazard ratio were kept, and those with an adjusted P value ≥ 0.1 were excluded at each step. Interactions were also investigated. SPSS 17.0 was used for the analyses.

RESULTS

Twenty children were detected as colonized with ESBL-E and were included (Supplementary Figure S1): 11 (55%) were colonized at birth, and 9 (45%) acquired the colonization during the follow-up; acquisition of ESBL-E after birth was detected after a median of 6 months (range, 4.5–9 months). Among the 20 colonized newborns, 13 were detected among the 46 screened children with a colonized mother (4 with a colonized mothers were excluded because of missing data), and 7 among the 50 screened with a noncolonized mother (randomly selected among the 756 noncolonized mothers studied).

Thirty species/clones of ESBL-E were isolated: 2 were *Klebsiella pneumoniae* and the rest were *E coli*; 5 children were colonized with 2 different ESBL-E *E coli* clones, 1 child had 3

clones and 1 had 4 different clones. Overall, 13 isolates obtained from the children were clonally related to ESBL-E isolated from their mothers (43.3% of isolates). The ESBL types were CTX-M-14 in 14 isolates (46.6%), SHV-12 in 8 isolates (26.6%), and CTX-M-1 in 7 isolates (23.3%). One isolate produced both CTX-M-1 and SHV-12. Among the *E coli* tested, 12 isolates (42.8%) belonged to phylogroup A, 7 (25%) belonged to D, 6 (21.4%) belonged to B2 (1 of them belonged to ST131), and 3 (10.8%) belonged to B1.

Duration of colonization is shown in Figure 1. Overall, 17 children cleared colonization during their follow up: 6 at 1.5 months, 2 at 4.5 months, 6 at 7.5 months, and 3 at 10.5 months; 3 remained colonized at the end of follow up. Overall, the mean and median times to clearance were 5.5 and 7.5 months, respectively. Table 1 shows the univariate analysis of child, mother, and microbiologic variables associated with CoC. Multivariate analysis showed that delivery by caesarean section, a colonized mother, and being colonized with phylogroup B2 ESBL-producing *E coli* were associated with prolonged colonization, whereas the opposite was found for colonization with CTX-M-producing ESBL-E (Table 1). No infections due to ESBL-E were detected.

DISCUSSION

Mean duration of rectal colonization with ESBL-E during the first year of life in unselected newborns was found to be approximately 6 months, and some children were persistently colonized. Delivery by caesarean section and colonized mothers were factors associated with prolonged colonization. It is interesting to note that ESBL-producing *E coli* belonging to phylogroup B2 was associated with longer colonization, and the opposite was found in isolates producing CTX-M enzymes.

In our area, the prevalence of colonization with ESBL-E in pregnant women at delivery is 6.7% (95% CI, 5.2–8.7) [3]. Previous studies conducted with newborns were performed in completely different epidemiological situations and included patients discharged from neonatal intensive care units during ESBL-E outbreaks in the unit [5, 6]. Löhr et al [5] found that median duration of carriage was 12.5 months in 51 infants (mostly preterm) colonized with CTX-M-15-producing *K pneumoniae*; risk factors for prolonged carriage were delivery by caesarean section (as in our study) and use of antibiotics during hospitalization. They also found household transmission of ESBL-E in 32% of households. Nordberg et al [6] found that median duration of colonization was 12.5 months in 14 children (13 colonized with ESBL-producing *K pneumoniae*). Tandé et al [13] found that median duration of colonization with ESBL-E in 22 adopted children from Mali living in France was 9 months. To the best of our knowledge, this is the first study to evaluate both the duration and the risk factors for clearance of ESBL-E colonization (mostly *E coli*) in unselected newborns in a non-outbreak situation.

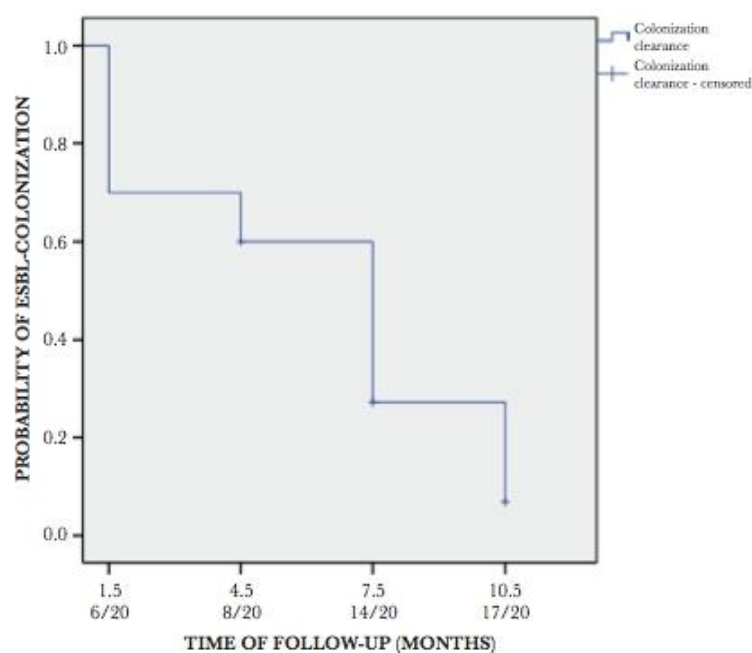


Figure 1. Probability of clearance of colonization in children colonized with extended-spectrum β -lactamase [ESBL]-producing *Enterobacteriaceae*.

The association with delivery by caesarean section and prolonged carriage could be explained by the potential protective influence of the composition of gut microbiota acquired during vaginal delivery. Babies born vaginally are colonized by the mother's vaginal and fecal flora during delivery, whereas those born by caesarean section would have more influence from environment to form their microbiota; the latter also have lower counts of *Bacteroides* spp and bifidobacteria. Such impaired composition of protective gut microbiota might contribute to longer fecal colonization by ESBL-E if colonized early in life [5, 14]. Colonization of the mother was also associated, possibly reflecting person-to-person transmission between mother and newborn or common acquisition from an external source. It is interesting to note that phylogroup B2 ESBL-producing *E coli* was also associated with longer carriage. Titelman et al [15] also found that isolates from this phylogroup were more frequent among those with carriage at 12 months in a recent unadjusted prospective study of 61 colonized hospitalized adults, many of whom had a previous infection; 14 of the 19 B2 isolates in that study belonged to ST131, which may have been part of an outbreak, whereas this was the case in only 1 of 6 in our study. We did not study the virulence factors of the isolates, although Titelman et al [15] found no association with typical uropathogenic virulence factors. Therefore, B2 isolates may have some features unrelated to *E coli* uropathogenesis that favor prolonged intestinal colonization in adults and newborns. Finally, we found that isolates producing CTX-M enzymes were associated with shorter duration of colonization in neonates. We

do not have an explanation for this; in fact, Titelman et al [15] found that CTX-M-9-producing isolates were associated with prolonged carriage, although it is possible that most of the B2 isolates were CTX-M-9 producers. If so, the phylogroup-associated feature would be more important than the ESBL in this regard. Therefore, the association between type of enzyme and carriage duration requires further studies.

CONCLUSIONS

The most important limitations of this study include the small number of patients, the fact that the date for CoC was arbitrarily chosen as the intermediate between the last positive and first negative samples, and the possible limited sensitivity for detection of colonization. In addition, our sample may have overestimated the estimation for mother colonization. Although these data improve our understanding of the epidemiology of ESBL-E in healthy newborns, more studies in this population are needed.

Supplementary Data

Supplementary materials are available at *Open Forum Infectious Diseases* online. Consisting of data provided by the authors to benefit the reader, the posted materials are not copyrighted and are the sole responsibility of the authors, so questions or comments should be addressed to the corresponding author.

Acknowledgments

We thank those who participated in the study for their unconditional support, especially colleagues in the neonatology and pediatric emergency department.

Table 1. Univariate and Multivariate Analysis of Variables Associated With Clearance of ESBL-E Colonization in Children^a

Variable	Category	Colonization Clearance/Exposed (Percentage)	Crude HR (95% CI)	P	Adjusted HR (95% CI)	P
Child Variables						
Gender	Male	9/10 (90)	2.01 (0.75–5.36)	.1		
	Female	8/10 (80)				
Delivery by caesarean section	Yes	2/4 (50)	0.43 (0.09–1.88)	.2	0.18 (0.03–0.91)	.03
	No	15/16 (93.8)				
Travel outside Spain	Yes	2/2 (100)	0.69 (0.15–3.06)	.6		
	No	15/18 (83.3)				
New household member	Yes	1/1 (100)	0.53 (0.06–4.17)	.5		
	No	16/19 (84.2)				
Pets	Yes	6/7 (85.7)	0.89 (0.32–2.44)	.8		
	No	11/13 (84.6)				
Breastfeeding	Yes	11/11 (100)	1.17 (0.43–3.22)	.7		
	No	6/9 (66.7)				
Sterilization of feeding bottles	Yes	11/13 (84.6)	0.50 (0.17–1.48)	.2		
	No	6/7 (85.7)				
Fed with homemade puree	Yes	14/17 (82.4)	0.73 (0.20–2.62)	.6		
	No	3/3 (100)				
Nursery attendee	Yes	2/4 (50)	0.67 (0.15–2.99)	.6		
	No	15/16 (87.5)				
Any chronic disease	Yes	1/2 (50)	0.67 (0.08–5.17)	.7		
	No	16/18 (88.9)				
Any pediatric visit for acute illness ^b	Yes	5/7 (71.4)	0.64 (0.22–1.84)	.4		
	No	12/13 (92.3)				
Hospitalization ^b	Yes	1/2 (50)	0.32 (0.04–2.44)	.2		
	No	16/18 (88.9)				
Antibiotic use ^b	Yes	3/5 (60)	0.39 (0.11–1.38)	.1		
	No	14/15 (93.3)				
Colonization with ESBL-E at birth	Yes	11/11 (100)	1.15 (0.42–3.17)	.7		
	No	6/9 (66.7)				
Time of acquisition of ESBL-E	≤3 months	12/13 (92.3)	0.46 (0.14–1.50)	.2		
	>3 months	5/7 (71.4)				
Mother colonized with the same ESBL-E clone	Yes	9/10 (90)	1.4 (0.53–3.69)	.5		
	No	8/10 (80)				
Mother Variables						
Caregiver of a disabled person	Yes	2/3 (66.7)	0.72 (0.16–3.22)	.6		
	No	15/17 (88.2)				
Any chronic disease	Yes	2/3 (66.7)	0.47 (0.10–2.08)	.3		
	No	15/17 (88.2)				
Any doctor's visit for acute illness	Yes	1/1 (100)	0.21 (0.02–1.69)	.1		
	No	16/18 (88.9)				
Hospitalization	Yes	0/0 (0)	–	–		
	No	17/20 (85)				
Antibiotic use	Yes	1/2 (50)	0.21 (0.02–1.69)	.1		
	No	16/18 (88.9)				
Mother colonized	Yes	11/13 (84.6)	0.62 (0.22–1.71)	.3	0.31 (0.10–1.01)	.05
	No	6/7 (85.7)				
Microbiologic Variables						
CTX-M producer	Yes	12/15 (80)	1.23 (0.42–3.55)	.6	5.15 (1.29–20.55)	.02
	No	5/5 (100)				
SHV-12 producer	Yes	7/8 (87.5)	0.70 (0.25–1.91)	.4		
	No	10/12 (83.3)				
Phylogroup A <i>Escherichia coli</i>	Yes	10/11 (90.9)	1.06 (0.40–2.79)	.9		
	No	7/9 (77.8)				
Phylogroup B1 <i>E coli</i>	Yes	2/3 (66.7)	1.18 (0.26–5.31)	.8		
	No	15/17 (88.2)				
Phylogroup B2 <i>E coli</i>	Yes	4/6 (66.7)	0.51 (0.16–1.58)	.2	0.20 (0.05–0.81)	.02
	No	13/14 (92.9)				
Phylogroup D <i>E coli</i>	Yes	6/7 (85.7)	1.01 (0.37–2.77)	.9		
	No	11/13 (84.6)				

Abbreviations: CI, confidence interval; ESBL-E, extended-spectrum β-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*; HR, hazard ratio.

^aExposures are considered for the whole period from detection of colonization to clearance, or censoring, except where specified.

^bNone of these were related to infection due to ESBL producers.

Disclaimer. The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

Financial support. This work was funded by the following: Plan Nacional de I+D+i 2013–2016 and Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015/0010 and REIPI RD16/0016/0001), cofinanced by European Development Regional Fund “A way to achieve Europe”, Operative Programme Intelligent Growth 2014–2020; Fondo de Investigación Sanitaria; Instituto de Salud Carlos III (Grants 070190, 10/01955, and 10/00795); and Consejería de Innovación, Junta de Andalucía (Grants CTS-5259 and CTS210).

Potential conflicts of interest. All authors: No reported conflicts of interest. All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

References

- Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* 2008; 8:159–66.
- Lukac PJ, Bonomo RA, Logan LK. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in children: old foe, emerging threat. *Clin Infect Dis* 2015; 60:1389–97.
- Jiménez-Rámila C, López-Cerero L, Aguilar Martín MA, et al. Vagino-rectal colonization and maternal-neonatal transmission of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β -lactamases or carbapenemases: a cross-sectional study. *J Hosp Infect* 2018. doi: 10.1016/j.jhin.2018.09.010.
- Bar-Yoseph H, Hussein K, Braun E, Paul M. Natural history and decolonization strategies for ESBL/carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* carriage: systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 2016; 71:2729–39.
- Löhr IH, Rettedal S, Natås OB, et al. Long-term faecal carriage in infants and intra-household transmission of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* following a nosocomial outbreak. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68:1043–8.
- Nordberg V, Jonsson K, Giske CG, et al. Neonatal intestinal colonization with extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*—a 5-year follow-up study. *Clin Microbiol Infect* 2018; 24:1004–9.
- EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistance of clinical and/or epidemiological importance. Available at: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_v1.0_20131211.pdf. Published 2013. Accessed 2 April 2013.
- Rodríguez-Baño J, López-Cerero L, Navarro MD, et al. Faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: prevalence, risk factors and molecular epidemiology. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62:1142–9.
- Standard Operating Procedure for Pulsenet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* Non-O157 (Stec), *Salmonella* Serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. Available at: http://www.pulsenetinternational.org/assets/PulseNet/uploads/pfge/PNI05_Ec-Sal-ShigPFGEprotocol.pdf. Published 2013. Accessed April 2, 2013.
- Johnson JR, Nicolas-Chanoine MH, DeRoy C, et al. Comparison of *Escherichia coli* ST131 pulsotypes, by epidemiologic traits, 1967–2009. *Emerg Infect Dis* 2012; 18:598–607.
- Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep* 2013; 5:58–65.
- López-Cerero L, Bellido Mdel M, Serrano L, et al. *Escherichia coli* O25b:H4/ST131 are prevalent in Spain and are often not associated with ESBL or quinolone resistance. *Enferm Infect Microbiol Clin* 2013; 31:385–8.
- Tandé D, Boisramé-Gastrin S, Münck MR, et al. Intrafamilial transmission of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Babelsberg among the families of internationally adopted children. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65:859–65.
- Rutayisire E, Huang K, Liu Y, Tao F. The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants' life: a systematic review. *BMC Gastroenterol* 2016; 16:86.
- Titelman E, Hasan CM, Iversen A, et al. Faecal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* is common 12 months after infection and is related to strain factors. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20:O508–15.

5. RESUMEN GLOBAL DE RESULTADOS

5.1. ADQUISICIÓN DE NUEVA COLONIZACIÓN POR E-BLEE TRAS EL PARTO: PREVALENCIA, INCIDENCIA Y FACTORES ASOCIADOS.

La prevalencia global de nueva colonización por E-BLEE en la cohorte de todos los niños incluidos (cohorte *all children population*, ACP) durante los 12 meses de seguimiento fue del 26% entre los niños cuyas madres estaban colonizadas y del 14% en los niños cuyas madres no lo estaban ($p=0,2$). Medido como densidad de incidencia acumulada, fue 2,7 y 1,2 por 100 niños-mes, respectivamente ($p=0,07$). La adquisición de E-BLEE se produjo de forma constante a lo largo del año de seguimiento.

Entre los niños que no había estado colonizados al nacimiento (cohorte *non-previously colonized population*, NPCP), la prevalencia fue del 18,9% y del 14,6% en los grupos de niños con madre colonizadas y no colonizadas, respectivamente ($p=0,7$). La densidad de incidencia fue 1,9 y 1,3 por 100 niños-mes, respectivamente ($p=0,4$).

El principal factor de riesgo para adquirir una nueva colonización por E-BLEE durante el seguimiento fue el que la madre estuviera colonizada durante los 3 meses previos. Sin embargo, vivir con mascotas en el hogar, recibir lactancia materna, esterilizar los biberones y acudir a guardería mostraron un efecto protector.

No se detectaron casos de infección por E-BLEE ni en los niños colonizados ni en los no colonizados.

De los 39 aislados de E-BLEE obtenidos de los niños durante el estudio, 27 fueron considerados aislamientos incidentes (o nuevas colonizaciones) tras el parto, tras descartarse los aislamientos obtenidos en el parto y los aislamientos idénticos clonalmente a otros previos en el mismo niño. En total, 24 (88,8%) de los aislados incidentes fueron *E. coli*, entre los cuales el 37,5% pertenecían al filogrupo A, y 3 (11,1%) *K. pneumoniae*. Las BLEE más frecuentemente detectadas fueron CTX-M-14 (44,4% de los aislados), CTX-M-1 (29,6%) y SHV-12 (18,5%). Seis de los 27 aislados incidentes (22,2%) obtenidos en niños eran idénticos a los de sus madres, lo que ocurrió en 5 de 19 familias (26,3%); un niño adquirió 2 clones diferentes. De estos 6 aislados, 5 fueron *E. coli*, el filogrupo predominante fue B2 (1 de ellos ST131) y las enzimas más frecuentemente producidas también fueron CTX-M-14 y CTX-M-1.

5.2. DURACIÓN DE COLONIZACIÓN POR E-BLEE TRAS EL PARTO Y FACTORES ASOCIADOS

Para realizar este estudio, partimos de los 25 niños colonizados por E-BLEE en el artículo anterior, bien en el parto o posteriormente, excluyendo aquellos que se han colonizado en el mes 12 o aquellos en los que no tenemos seguimiento posterior, quedándonos, por lo tanto, con 20 niños. La adquisición de E-BLEE después del nacimiento se había detectado después de una mediana de 6 meses (rango 4.5-9 meses) de seguimiento.

De estos 20 niños, 17 perdieron la colonización con una media y la mediana

de los tiempos de mantenimiento de la colonización de 5,5 y 7,5 meses, respectivamente; 6 niños perdieron la colonización a los 1,5 meses, 2 a los 4,5 meses, 6 a los 7,5 meses y 3 a los 10,5 meses; 3 niños permanecían colonizados al final de su seguimiento.

Con respecto a los factores de riesgo para el mantenimiento de la colonización, el parto por cesárea, la colonización materna y estar el niño colonizado por *E. coli* del filogrupo B2 se asociaron con una colonización más prolongada, mientras la colonización por una E-BLEE productora de enzimas de la familia CTX-M se relacionó con una colonización más corta.

De los 30 aislados obtenidos 93,3% fueron *E. coli*, cuyo filogrupo predominante fue A. El 43,3% de los aislados se relacionaron clonalmente con los de sus madres. Las enzimas más frecuentemente producidas fueron CTX-M-14, SHV-12 y CTX-M-1.

6. DISCUSIÓN

Los resultados de los estudios realizados muestran que: (a) La adquisición de E-BLEE después del nacimiento no es infrecuente ni en niños nacidos de madres colonizadas ni en aquellos nacidos de madres no colonizadas en el momento del parto (aunque es algo más frecuente en los niños de madres colonizadas); (b) la adquisición se produce de forma constante durante el primer año de vida, estando una cuarta parte de las E-BLEE adquiridas clonalmente relacionadas con las de las madres; (c) existen algunas variables asociadas con el riesgo de adquisición de E-BLEE, pero quizás menos de las esperadas; (d) la pérdida de la colonización se produce a los 5,5 meses de media o 7,5 de mediana, habiéndose identificado algunas variables asociadas a la duración de la colonización; y (e) no encontramos infecciones por E-BLEE ni en los pacientes colonizados ni en los no colonizados, en la población estudiada.

Según nuestro conocimiento, nuestro trabajo es el primero en estimar la densidad de incidencia de la adquisición de E-BLEE en recién nacidos sanos durante el primer año de vida. Se observó un aumento lineal en el riesgo de colonización acumulativo, pero debido a que la colonización también se perdió en algunos pacientes, las tasas de prevalencia fueron similares en todos los momentos estudiados. No encontramos ninguna infección ni fallecimientos causados por E-BLEE en nuestras cohortes. Sin embargo, debido a que las infecciones por enterobacterias en general el primer año de vida se produce sobre todo en niños con factores predisponentes y nosotros incluimos una población sana, una evaluación de las posibles implicaciones clínicas de la colonización necesitaría un tamaño de muestra mayor y/o en poblaciones de riesgo para el desarrollo de infección.

Los resultados de éste y otros estudios anteriores sugieren que la prevalencia de la colonización de la E-BLEE en niños refleja el nivel general de endemicidad de estos organismos en la región donde se realiza el estudio, como se refleja en algunos de los trabajos incluidos en la tabla 3.

Así, estudios realizados en América y Europa muestran tasas más bajas de colonización que en otros continentes. El primer estudio que evaluó la prevalencia de colonización en niños sanos se realizó en 4 áreas diferentes de Sudamérica en 2002, obteniendo una prevalencia de 0,1% en niños de 6 a 72 meses (55); este mismo estudio fue el primero que comenzó a hablar sobre la diseminación de las enzimas CTX-M en niños. Esta baja prevalencia pensamos que podría estar relacionada con el hecho de que las cefalosporinas de espectro extendido tenían aún un uso limitado en esas áreas en el año 2002 debido a su coste.

Un estudio realizado en Estados Unidos no encontró neonatos colonizados durante un año de seguimiento (56); sin embargo, en ese estudio, las muestras rectales se diluyeron (1:100) en solución salina y no se utilizó enriquecimiento, lo que podría haber reducido de forma importante la sensibilidad de detección de E-BLEE. Guimarães y cols. (57) comunicaron una incidencia de colonización del 2,7% en niños de todas las edades en Portugal. Otro estudio realizado en Suecia encontró una prevalencia de colonización del 2,9% en niños sanos de 11 a 39 meses (22). Dos estudios en Francia mostraron tasas de prevalencia del 4,6% en niños de 6 a 24 meses durante chequeos o consultas de rutina en niños que consultaban por otitis media aguda (58) y un 5,2% en pacientes pediátricos de todas las edades

ingresados por diarrea aguda (59). Un estudio realizado en España encontró prevalencias que oscilaron entre el 8,8% y el 13,9% en niños sanos estudiados a los 8, 12 y 16 meses después del nacimiento (33), similar a nuestro estudio.

Sin embargo, estudios de países asiáticos y africanos encontraron tasas de prevalencia mayores del 30%; en Hong Kong (60) y Guinea-Bissau (61), el 37,7% y el 32,6% de los niños menores de 5 años ingresados por enfermedad respiratoria aguda o fiebre se detectaron como colonizados, respectivamente; en India, la prevalencia en neonatos sanos, partos y amamantados fue de 13,4%, 27,1% y 41,5% en los días 0, 21 y 60 después del nacimiento (62); en la República Centroafricana, la prevalencia fue del 59% en niños sanos menores de 5 años (63).

Sin embargo, en general, cabe señalar que estos estudios son heterogéneos tanto en las poblaciones estudiadas como en los métodos microbiológicos utilizados para detectar la colonización, por lo que los resultados son difíciles de comparar entre sí. Sin embargo, sí permiten mantener la hipótesis de que la colonización en niños refleja de alguna manera la situación global de la epidemiología de E-BLEE en cada área, como por otra parte cabía esperar.

Como se señaló en la introducción, los factores de riesgo para la colonización con E-BLEE en niños se han investigado principalmente en UCIN; en esa población, algunas características intrínsecas de los niños (peso al nacer, edad gestacional, malformaciones), nacimiento por cesárea, recibir nutrición parenteral, los procedimientos invasivos (ventilación mecánica, presión continua en vía aérea,

intubación endotraqueal, uso de catéter venoso central), la mayor duración del ingreso, el uso previo de antimicrobianos (64) y las uñas artificiales del personal sanitario (29) se han asociado con la adquisición de estas bacterias. En general, las variables encontradas son asimilables a las encontradas para otros microorganismos multirresistentes, o a las encontradas en adultos, y se relacionan con las variables típicamente asociadas a la transmisión nosocomial.

Sin embargo, pocos estudios habían investigado los factores de riesgo para la adquisición de la colonización por E-BLEE en la comunidad, resumidos en la tabla 3. Las poblaciones y tipos de niños estudiados en esas publicaciones son muy heterogéneos. Así, Isendhal y cols. estudiaron 408 niños menores de 5 años desde Junio hasta Septiembre de 2010 en Guinea, los cuales estaban hospitalizados o acudían a un servicio de Urgencias por fiebre o taquicardia; compartir cama con otro niño menor de 5 años fue el principal factor de riesgo de colonización ($p=0,04$) (61). Farra y cols. estudiaron 134 niños con edades comprendidas entre 0 y 59 meses, hospitalizados por diarrea grave en África, entre Marzo y Noviembre de 2013; las familias con altos ingresos económicos fue el principal factor de riesgo para adquirir colonización por E-BLEE (OR: 17,5, IC 95% 1,60-191,89, $p=0,001$) (63). Birgy y cols. en Francia, entre Octubre de 2010 y Marzo de 2011 analizaron la colonización en 411 niños entre 6 y 24 meses que acudían a su pediatra para control de niño sano o revisión por haber tenido una otitis media aguda (OMA); detectaron que el uso previo de cefalosporinas de 3ª generación era el principal factor de riesgo (OR ajustado = 3,52, IC 95% 1,06-11,66, $p=0,04$) (58). Lo y cols. estudiaron en Hong Kong entre Octubre de 2007 y Septiembre de 2008, 53 niños hospitalizados por procesos

febriles leves y 172 miembros de sus hogares; concluían que un posible factor de riesgo es el hacinamiento, aunque sus datos no son estadísticamente significativos (60). Sin embargo, Fernández-Reyes y cols. en España (33) objetivaron que acudir a guardería era protector ($p=0,007$) para adquirir una nueva colonización por E-BLEE. La interpretación de estos datos, algunos de los cuales pueden ser contradictorios, es compleja ya que se obtuvieron en estudios con diseños de prevalencia puntual, en diferentes poblaciones y con heterogeneidad en las variables evaluadas, y deben evaluarse en función de la situación epidemiológica del área geográfica.

Nuestro trabajo es el único que, en nuestro conocimiento, ha investigado hasta la fecha el estado de colonización de la madre en todos los momentos del seguimiento de los niños, utilizando este dato como potencial factor de riesgo para la colonización del recién nacido a lo largo de su primer año de vida. Esto es importante puesto que sabemos que la madre es la fuente más importante de bacterias colonizadoras para los recién nacidos por parto vaginal (16)(29) (ver tabla 2), pero podría ser también el reservorio principal para la transmisión después del parto y durante los primeros meses de vida. Así, en estudios previos se ha encontrado una prevalencia de transmisión madre a hijo de E-BLEE en el periodo perinatal del 8,6% en Berlín (16), 14% en Sevilla (18) y 35,7% en Noruega (19). Es necesario considerar que, en todos estos estudios, incluido el nuestro, cabe la posibilidad de que la transmisión en algún caso haya sido del recién nacido a la madre y no al revés. Sin embargo, en general parece más razonable asumir que la transmisión es más frecuente desde la madre al recién nacido, como se discute más adelante.

La comparación cruda de la incidencia de adquisición en recién nacidos de madres colonizadas y no colonizadas no mostró diferencias “estadísticamente significativas”. Sin embargo, esto no debe interpretarse como que no existe diferencia en la incidencia; debido al limitado tamaño muestral, nuestra precisión en la estimación de la incidencia en ambos grupos es limitada, y por tanto, la diferencia encontrada es informativa de que es probable que con un mayor tamaño muestral las diferencias fueran significativas. De hecho, nuestro diseño sobrestima el número de madres colonizadas respecto a lo que ocurre en la realidad, dado que incluimos de manera intencionada un número similar de recién nacidos de madres colonizadas y no colonizadas. Esto no modifica la estimación del riesgo asociado a la colonización materna, al ser las madres no colonizadas estudiadas probablemente representativa de esa población, pero sí reduce la precisión de la estimación (mayor intervalo de confianza) al no incluir todas las madres no colonizadas. Además, la colonización materna resultó ser un factor de riesgo independiente cuando se controló el efecto de otras variables confusoras.

La lactancia materna y la esterilización de los biberones antes de cada uso tuvieron un efecto protector para la adquisición de E-BLEE. Con respecto a la lactancia materna, en el estudio realizado por Rettedal y cols. se analizaron 146 muestras de leche materna obtenidas de 25 de las 26 madres colonizadas y en ninguna de ellas se aisló E-BLEE (19); por lo tanto la leche materna no parece ser un vehículo común de transmisión. En el estudio de Mammina y cols. (65) la alimentación con fórmula artificial se asoció significativamente con mayor riesgo de colonización por E-BLEE (RR=1,6, IC 95% 1,1-2,3, p=0,007), mientras que la

lactancia materna se mostró protectora (RR= 0,5, IC 95% 0,4-0,8, p=0,001). Debido a las propiedades nutricionales e inmunológicas de la lactancia materna, como ya confirman otros autores (66), pensamos que la leche materna podría proporcionar una mayor resistencia a la colonización por flora exógena. En cuanto a la esterilización de los biberones, se podría hipotetizar que ésta podría reducir la ingestión de bacterias ambientales que podrían haber colonizado los biberones. Sin embargo, creemos que es más probable que esta variable sea en realidad un marcador subrogado de mejores prácticas de higiene (como podrían ser mayor frecuencia de lavado de manos por parte de la madre y otros convivientes, mayor higiene ambiental en el hogar, etc.), por lo que sería de interés realizar estudios específicos al respecto.

La asistencia a guardería también se asoció con un efecto protector (aunque con poca precisión en nuestra estimación y por tanto en el límite de la significación estadística) en nuestro estudio, como ocurrió en el estudio de Fernández-Reyes y cols. (33). Esto podría parecer paradójico, porque podría pensarse que en las guarderías aumentaría la posibilidad de transmisión de E-BLEE desde otros niños colonizados pero, de ser ciertos nuestros resultados, éstos apoyarían aún más la hipótesis de que la colonización podría adquirirse preferentemente en el hogar, donde el contacto persona-persona es más frecuente e íntimo. En el hogar puede haber influjo de otros clones de E-BLEE si algún miembro de la familia los adquiere por contacto con otras personas o por vía alimentaria. De hecho, se ha encontrado que algunos productos alimenticios, particularmente el pollo y el pavo, están frecuentemente contaminados por E-BLEE, también en nuestra área (67) (23)(68), y

la manipulación del producto contaminado (crudo, por ejemplo, al cocinar, dado que la cocción eliminaría las bacterias) puede facilitar la transmisión a otros miembros del hogar de forma directa o indirecta (29).

Finalmente, también hemos encontrado que tener mascotas en casa también se asoció con un efecto protector (nuevamente en el límite de la significación). La realidad es que, intuitivamente, habíamos esperado el efecto contrario, ya que las mascotas se han descrito como potenciales reservorios de E-BLEE (27)(29). Por tanto, no podemos descartar que el efecto protector encontrado sea falso, pero creemos que una explicación alternativa puede ser que las familias con mascotas extremen más las medidas higiénicas y por tanto, de manera similar a lo que vimos con los biberones, también puede ser un marcador de mejores prácticas de higiene en el hogar cuando se convive con mascotas. De hecho, además, la colonización de las mascotas no tendría por qué producirse con clones “externos”, sino que podría ocurrir por transmisión desde los propios miembros de la propia familia.

Un aspecto importante a valorar es qué porcentaje de la adquisición de la colonización por E-BLEE se produce por transmisión horizontal entre los propios convivientes o miembros de la misma familia. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que el hecho de que dos convivientes o contactos presenten colonización por el mismo clon de E-BLEE (o de cualquier otro microorganismo) no significa necesariamente que haya existido transmisión directa entre ellos, pudiendo explicarse también por la adquisición de todos ellos a partir de una fuente común, como pueden ser los alimentos (menos probable, en nuestro medio al menos, a

través del agua), o de reservorios ambientales en el domicilio.

En este sentido, algunos estudios previos han evaluado la transmisión desde un recién nacido al resto de familiares o convivientes. En un estudio que incluyó neonatos que se colonizaron por *K. pneumoniae* productor de BLEE durante un brote en una UCIN en Noruega, se encontró que el microorganismo en cuestión colonizó más de un miembro de la familia en el 32% de los hogares donde estos recién nacidos vivían tras ser dados de alta (34). Debe tenerse en cuenta que cabe la posibilidad de que la transmisibilidad de *K. pneumoniae* sea superior a la de *E. coli*. En un estudio de prevalencia realizado en Hong Kong se identificaron más de un miembro colonizado en 7 hogares de los 53 niños estudiados (13,2%); la mayoría de los niños en ese estudio fueron colonizados por *E. coli* productor de BLEE (60). Tras un brote ocurrido en una UCIN en Austria, 9 de los 49 familiares estudiados se colonizaron por E-BLEE, aunque lo relevante de este estudio es que solo dos de los aislados obtenidos estaban clonalmente relacionados con el caso índice (10,5%) (69) mientras que el resto de adquisiciones habrían sido independientes y por tanto no pueden relacionarse con seguridad con una transmisión desde los neonatos. En un estudio realizado en niños adoptados en Francia procedente de Mali también se apreció que más de un miembro de la familia compartía aislados clonalmente relacionados en 5 de las 22 familias estudiadas (23%), estando también en su mayoría colonizados por *E. coli* productor de CTX-M-15 (41). De nuevo, no es posible asegurar el sentido de la transmisión en este estudio, dado que CTX-M-15 es también endémico en Francia.

En nuestro estudio, al estudiar la adquisición de E-BLEE tras el parto, encontramos cepas relacionadas clonalmente en 5 niños y sus madres (o sea, 20% [5/25] de conjuntos de madre e hijo con madre colonizada). Visto de otra manera, fueron el 22,2% (5/19) de todas las colonizaciones incidentes en neonatos (posteriores al parto). Como en los casos anteriores, nuestro estudio no permite discernir si estos casos fueron debidos a transmisión de madre a hijo, de hijo a madre, o a adquisición por ambos desde una fuente común exógena. El hecho de que la madre estuviera colonizada en los 3 meses previos fuera un factor de riesgo en nuestro análisis, así como que la estancia en guardería fuera un factor protector, nos hace suponer que es plausible que la madre se colonizara previamente y que la transmisión predominante fuera de madre a hijo. En un estudio anterior pudimos comprobar que los recién nacidos de 8 de 10 madres que estaban colonizadas por E-BLEE en el momento del parto, se colonizaron por E-BLEE durante el mismo (18); en este caso, la transmisión de madre a hijo durante el parto sí es evidente.

Las BLEE más frecuentemente encontradas en nuestro estudio representan la epidemiología de estas enzimas en nuestra región, donde CTX-M-14 y SHV-12 han sido las más frecuentes en estudios previos (24)(23); curiosamente, CTX-M-15, que es la BLEE más frecuente en muchas regiones del mundo, solo se encontró en un aislado incidente de un recién nacido y en dos madres (una de ellas, la madre de dicho recién nacido). Las enzimas del grupo CTX-M-1 (en este caso, CTX-M-1, CTX-M-15 y CTX-M-32) suponen, como grupo, el 37% de todas las BLEE incidentes en los neonatos, pero son el 50% de las que son compartidas entre madres e hijos. De manera similar, los aislados de *E. coli* pertenecientes al filogrupo B2 entre los

aislados incidentes en neonatos son el 25% del total, mientras que suponen el 60% de los aislados compartidos por madres e hijos. Es decir, aunque los números son pequeños y no permiten obtener conclusiones determinantes, los datos obtenidos sí podrían sugerir que los aislados de *E. coli* filogrupo B2 (que incluye el complejo clonal ST131) y que producen BLEE del grupo CTX-M-1 podrían ser más transmisibles entre madres e hijos que los aislados de otros filogrupos (que producen más frecuentemente otras BLEE). La mayor o menor transmisibilidad de *E. coli* perteneciente al filogrupo B2 productores de BLEE, y en concreto al clon ST131, es un tema controvertido. Si bien algunos estudios han comunicado brotes de transmisión en entornos familiares (70)(71)(72), un estudio realizado en una residencia sociosanitaria en Holanda no encontró mayor transmisión de *E. coli* ST131 productor de BLEE en comparación con otros grupos clonales (73). Sin embargo, nuestro grupo sí ha encontrado mayor transmisión de ST131 en el entorno familiar que en centros sanitarios (74) por lo que los resultados del estudio holandés podrían no ser extrapolables a nuestra población.

Con respecto a la duración de colonización, la mediana de la colonización rectal con E-BLEE durante el primer año de vida en los recién nacidos sanos fue de 5,5 meses. En la tabla 4 se muestran los estudios que han evaluado la duración de la colonización intestinal por E-BLEE en niños, la mayoría de los cuales se realizaron en situaciones epidemiológicas completamente diferentes, al realizarse en pacientes dados de alta de UCIN durante brotes causados por *K. pneumoniae* productor de BLEE, cuya capacidad de permanencia en el intestino de los niños puede ser diferente a la de *E. coli*. Löhr y cols. encontraron en Noruega que la duración

mediana de la colonización fue de 12,5 meses en 51 lactantes (en su mayoría prematuros), colonizados por *K. pneumoniae* productor de CTX-M-15, con un tiempo máximo de colonización de 23,5 meses en uno de los niños (34). Nordberg y cols. encontraron en Estocolmo que la duración mediana de la colonización fue de 12,5 meses en 14 niños (13 colonizados con *K. pneumoniae* productora de BLEE), siendo el tiempo máximo de colonización de 23 y 26 meses dos casos (42). En otro estudio, Tandé y cols. encontraron que la mediana de la duración de la colonización por E-BLEE en 22 niños adoptados de Mali que viven en Francia, fue de 9 meses (41). En España, Fernández-Reyes y cols. en Guipúzcoa detectaron el mismo aislado en dos muestras diferentes solamente en un niño de los 125 estudiados (33), pero no estudiaron el mantenimiento de la colonización ni los factores asociados a ellos.

Según nuestro conocimiento, el nuestro es el primer estudio que evalúa tanto la duración como los factores de riesgo para la pérdida de la colonización E-BLEE (principalmente *E. coli*) en recién nacidos sanos que no adquirieron la colonización en el contexto de un brote epidémico nosocomial. La asociación encontrada entre el parto por cesárea y la colonización prolongada podría explicarse por la posible influencia protectora de la composición de la microbiota intestinal adquirida durante el parto vaginal. Como se revisó en la introducción, los RN nacidos por vía vaginal son colonizados por la flora vaginal y fecal de la madre durante el parto, mientras que los nacidos por cesárea tendrían más influencia del ambiente para formar su microbiota; además, también tienen menor cantidad de *Bacteroides spp.* y bifidobacterias. Dicha composición deteriorada de la microbiota intestinal protectora podría contribuir a una colonización fecal más prolongada por E-BLEE si se coloniza

tempranamente en la vida (34) (75). De hecho, en el estudio arriba comentado de Löhr y cols. también se encontró que el parto por cesárea se asoció con una colonización más prolongada, en ese caso de *K. pneumoniae* productor de BLEE (34).

La colonización de la madre también se asoció con una colonización más prolongada, posiblemente reflejando que la transmisión continuada o repetida de persona a persona puede ayudar a mantener más tiempo la colonización.

Curiosamente, los aislados de *E. coli* productor de BLEE pertenecientes al filogrupo B2 también se asociaron con una colonización más prolongada. Este dato corroboraría los resultados encontrados por Titelman y cols., que también encontraron que los aislamientos de este filogrupo fueron más frecuentes entre las personas que permanecían colonizadas tras 12 meses en un estudio prospectivo reciente de 61 adultos hospitalizados colonizados, muchos de los cuales tenían una infección previa (76); 14 de los 19 aislados del filogrupo B2 en ese estudio pertenecían a ST131 mientras que sólo uno de los aislados en nuestro estudio fue identificado como perteneciente a este clon mediante las técnicas empleadas. En este trabajo no hemos estudiado los factores de virulencia de los aislamientos, aunque Titelman y cols. no encontraron asociación entre la duración de la colonización con los factores de virulencia uropatogénicos típicos. Por lo tanto, podemos hipotetizar que los aislados B2 podrían tener algunas características no relacionadas con la uropatogénesis de *E. coli* que favorecerían la colonización intestinal prolongada en adultos y recién nacidos. Este dato es importante ya que, al

ser los aislados pertenecientes al filogrupo B2 típicamente patógenos extraintestinales, este hecho podría aumentar el riesgo de ocurrencia de infecciones (sobre todo urinarias) en niños con circunstancias predisponentes para las mismas. Como se señaló anteriormente, el hecho de que en nuestro estudio no hayamos identificado infecciones por E-BLEE no debe considerarse como que la colonización por estos microorganismos no presenta riesgo alguno de aumentar la frecuencia de infecciones, dado el bajo tamaño muestral para evaluar este objetivo y el hecho de que hemos incluido población sana.

Finalmente, nuestros resultados muestran que los aislados que producen enzimas CTX-M se asociaron con una menor duración de la colonización en los neonatos. Esto es contradictorio con lo encontrado en el estudio de Titelman y cols., quienes describieron que los aislamientos productores de CTX-M-9 estaban asociados con una colonización prolongada, aunque creemos que es posible que la mayoría de los aislamientos del filogrupo B2 en su estudio fueran productores de esta enzima, con lo que lo importante (como es de esperar) sería el grupo clonal (que tendría otros factores microbiológicos asociados a la colonización) más que el tipo de BLEE específico. La asociación entre el tipo de enzima y la duración de la colonización, por lo tanto, requiere estudios adicionales.

Nuestro estudio tiene algunas limitaciones que deben ser consideradas para la interpretación de los resultados. La incidencia y los factores de riesgo para la adquisición de E-BLEE serían aplicables en general a áreas con una epidemiología similar de estos microorganismos; podría ocurrir que en áreas con una diseminación

mucho menor o mayor de E-BLEE en la comunidad, o donde predominen otros clones u otras enzimas, los resultados fueran algo distintos. El tamaño muestral fue limitado para identificar algunos factores de riesgo potenciales tanto para la adquisición como para la pérdida de la colonización; debe, sin embargo, considerarse la extrema complejidad de evaluar la exposición a distintos factores de riesgo en esta población, así como conseguir el seguimiento de niños sanos. Además, no hemos estudiado a otros miembros del hogar más allá de las madres, que también podrían servir de reservorios de estos microorganismos. Sin embargo, creemos que las madres pueden representar adecuadamente el reservorio familiar y serían sin duda el mayor foco de transmisión a los recién nacidos. De nuevo, haber incluido otros miembros de la familia habría sido poco viable. La fecha para la pérdida de colonización se eligió arbitrariamente como el punto medio entre la última muestra positiva y la primera negativa, pero ésta pudo producirse inmediatamente después del último control realizado o inmediatamente antes del siguiente. Las técnicas utilizadas para detectar la colonización tienen una sensibilidad limitada. Como fortalezas del estudio podemos incluir su carácter prospectivo, la inclusión de un alto número de variables basadas en el conocimiento existente sobre la epidemiología de E-BLEE en distintas poblaciones, la recogida detallada de los datos y la colaboración entre pediatras, infectólogos y microbiólogos, que ha permitido realizar un estudio clínico y molecular completo.

7. CONCLUSIONES

1. La adquisición de la colonización por E-BLEE después del nacimiento no es infrecuente, y ocurre tanto en niños nacidos de madres que estaban colonizadas en el momento del parto como en aquellas que no lo estaban, siendo más frecuente en el caso de las primeras. La adquisición se produce de forma continua, a una tasa constante durante el primer año de vida.
2. La colonización materna es el principal factor de riesgo para la adquisición de la colonización por E-BLEE tras el parto. Además, la lactancia materna, la asistencia a guardería, el convivir con mascotas en el hogar y la esterilización de los biberones mostraron un efecto protector.
3. Entre los microorganismos causantes de colonización incidente en recién nacidos durante el primer año de vida, predominó claramente *E. coli*, siendo el filogrupo A el más frecuente; la BLEE más común fue CTX-M-14.
4. En alrededor de una cuarta parte de las familias en las que hubo una colonización incidente en los recién nacidos, el aislado de E-BLEE encontrado en estos estaba relacionado clonalmente con el de sus madres; en estos casos, el filogrupo B2 fue algo más frecuente que otros filogrupos.
5. La duración media y mediana de la colonización rectal por E-BLEE durante el primer año de vida en los recién nacidos se estimó en 5.5 y 7.5 meses, respectivamente.
6. El parto por cesárea, la colonización materna y estar colonizado por *E. coli* productor de BLEE perteneciente al filogrupo B2 se asociaron con una colonización más prolongada, mientras que estar colonizado por aislados que producían enzimas CTX-M se asociaron con menor tiempo de colonización.
7. No encontramos infecciones por E-BLEE en recién nacidos colonizados

sanos durante el primer año de vida.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Mulvey MR, Bryce E, Boyd D, Ofner-Agostini M, Christianson S, Simor AE, et al. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Canadian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(4):1204–14.
2. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(6):1211–33.
3. Ghuysen JM. Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu Rev Microbiol.* 1991;45:37–67.
4. Nüesch-Inderbinen MT, Kayser FH, Hächler 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(5):943–9.
5. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(1):1–14.
6. Ishii S, Sadowsky MJ. Minireview *Escherichia coli* in the Environment: Implications for Water Quality and Human Health. *Microbes Env.* 2008;23(2):101–8.
7. Leimbach A, Hacker J, Dobrindt U. *E. coli* as an All-Rounder: The Thin Line Between Commensalism and Pathogenicity. *Current topics in microbiology and immunology.* 2013. p. 3–32.
8. Darehabi HK, Naseri MH, Menbari S, Mobaleghi J, Kalantar E. Antibiotic Resistance Pattern of *Escherichia coli* Groups A, B1, B2 and D Isolated from Frozen Foods and Children with Diarrhea in Sanandaj, Iran. *Int J Enteric*

- Pathog. 2013;1(1):1–4.
9. Bernard H, Tancrede C, Livrelli V, Morand A, Barthelemy M, Labia R. A novel plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase not derived from TEM- or SHV-type enzymes. *J Antimicrob Chemother.* 1992;29(5):590–2.
 10. Machado E, Ferreira J, Novais A, Peixe L, Cantón R, Baquero F, et al. Preservation of integron types among Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases in a Spanish hospital over a 15-year period (1988 to 2003). *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(6):2201–4.
 11. Nicolas-Chanoine M-H, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MP, Canica MM, et al. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother.* 2007;61(2):273–81.
 12. Rogers BA, Sidjabat HE, Paterson DL. *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(1):1–14.
 13. Hernández JR, Pascual A, Cantón R, Martínez-Martínez L, Grupo de Estudio de Infección 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(2):77–82.
 14. Cobo Reinoso FJ, Rodríguez Iglesias M. Infecciones por enterobacterias oportunistas. In: Auxina Ruíz V, Moreno Guillén S, editors. *Tratado SEIMC de las Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Editorial. 2005. p. 337–45.
 15. Birgy A, Mariani-Kurkdjian P, Bidet P, Doit C, Genel N, Courroux C, et al.

- Characterization of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains involved in maternal-fetal colonization: Prevalence of *E. coli* ST131. *J Clin Microbiol.* 2013;51(6):1727–32.
16. Denkel LA, Schwab F, Kola A, Leistner R, Garten L, von Weizsäcker K, et al. The mother as most important risk factor for colonization of very low birth weight (VLBW) infants with extended-spectrum b-lactamase-producing Enterobacteriaceae (ESBL-E). *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(8):2230–7.
17. Danino D, Melamed R, Sterer B, Porat N, Hazan G, Gushanski A, et al. Mother-to-child transmission of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J Hosp Infect.* 2018;100(1):40–6.
18. Jiménez-Rámila C, López-Cerero L, Aguilar Martín M V, Vera Martín C, Serrano L, Pascual Á, et al. Vagino-rectal colonization and maternal-neonatal transmission of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases or carbapenemases: a cross-sectional study. *J Hosp Infect.* 2018;0(0).
19. Rettedal S, Löhr IH, Bernhoff E, Natås OB, Sundsfjord A, Øymar K. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae among pregnant women in Norway: prevalence and maternal–neonatal transmission. *J Perinatol.* 2015;35(11):907–12.
20. Andriatahina T, Randrianirina F, Hariniana ER, Talarmin A, Raobijaona H, Buisson Y, et al. High prevalence of fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric unit in Madagascar. *BMC Infect Dis.* 2010;10:204.
21. Valverde A, Grill F, Coque TM, Pintado V, Baquero F, Cantón R, et al. High

- rate of intestinal colonization with extended-spectrum- β - lactamase-producing organisms in household contacts of infected community patients. *J Clin Microbiol.* 2008;46(8):2796–9.
22. Kaarme J, Molin Y, Olsen B, Melhus Å. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in healthy Swedish preschool children. *Acta Paediatr.* 2013;102(6):655–60.
 23. Kluytmans JAJW, Overdeest ITMA, Willemsen I, Kluytmans-van den Bergh MFQ, van der Zwaluw K, Heck M, et al. Extended-Spectrum β -Lactamase–Producing *Escherichia coli* From Retail Chicken Meat and Humans: Comparison of Strains, Plasmids, Resistance Genes, and Virulence Factors. *Clin Infect Dis.* 2013;56(4):478–87.
 24. Rodríguez-Baño J, Lopez-Cerero L, Navarro MD, de Alba PD, Pascual A. Faecal carriage of extended-spectrum -lactamase-producing *Escherichia coli*: prevalence, risk factors and molecular epidemiology. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62(5):1142–9.
 25. Ny S, Lö Fmark S, Bö Rjesson S, Englund S, Ringman M, Bergströ J, et al. Community carriage of ESBL-producing *Escherichia coli* is associated with strains of low pathogenicity: a Swedish nationwide study. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(2):582–8.
 26. Reuland EA, Al Naiemi N, Kaiser AM, Heck M, Kluytmans JAJW, Savelkoul PHM, et al. Prevalence and risk factors for carriage of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Amsterdam. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(4):1076–82.
 27. Meyer E, Gastmeier P, Kola A, Schwab F. Pet animals and foreign travel are

- risk factors for colonisation with extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*. *Infection*. 2012;40(6):685–7.
28. Islam S, Selvarangan R, Kanwar N, McHenry R, Chappell JD, Halasa N, et al. Intestinal Carriage of Third-Generation Cephalosporin-Resistant and Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Healthy US Children. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2018;7(3):234–40.
29. Lukac PJ, Bonomo RA, Logan LK. Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Children: Old Foe, Emerging Threat. *Clin Infect Dis*. 2015;60(9):1389–97.
30. Crivaro V, Bagattini M, Salza MF, Raimondi F, Rossano F, Triassi M, et al. Risk factors for extended-spectrum beta-lactamase-producing *Serratia marcescens* and *Klebsiella pneumoniae* acquisition in a neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect*. 2007;67(2):135–41.
31. Rettedal S, Löhr IH, Natås O, Sundsfjord A, Øymar K. Risk factors for acquisition of CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* during an outbreak in a neonatal intensive care unit in Norway. *Scand J Infect Dis*. 2013;45(1):54–8.
32. Gupta A, Della-Latta P, Todd B, San Gabriel P, Haas J, Wu F, et al. Outbreak of Extended-Spectrum Beta-Lactamase–Producing *Klebsiella Pneumoniae* in a Neonatal Intensive Care Unit Linked to Artificial Nails. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2004;25(3):210–5.
33. Fernández-Reyes M, Vicente D, Gomariz M, Esnal O, Landa J, Oñate E, et al. High rate of fecal carriage of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in healthy children in Gipuzkoa, northern Spain. *Antimicrob*

- Agents Chemother. 2014;58(3):1822–4.
34. Löhr IH, Rettedal S, Natås OB, Naseer U, Øymar K, Sundsfjord A. Long-term faecal carriage in infants and intra-household transmission of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* following a nosocomial outbreak. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(5):1043–8.
35. Tängdén T, Cars O, Melhus A, Löwdin E. Foreign travel is a major risk factor for colonization with *Escherichia coli* producing CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases: a prospective study with Swedish volunteers. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(9):3564–8.
36. Birgand G, Armand-Lefevre L, Lolom I, Ruppe E, Andremont A, Lucet J-C. Duration of colonization by extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae after hospital discharge. *Am J Infect Control.* 2013;41(5):443–7.
37. Apisarnthanarak A, Bailey TC, Fraser VJ. Duration of Stool Colonization in Patients Infected with Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Infect Dis.* 2008;46(8):1322–3.
38. Kola A, Holst M, Chaberny IF, Ziesing S, Suerbaum S, Gastmeier P. Surveillance of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria and routine use of contact isolation: experience from a three-year period. *J Hosp Infect.* 2007;66(1):46–51.
39. Alsterlund R, Axelsson C, Olsson-Liljequist B. Long-term carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Scand J Infect Dis.* 2012;44(1):51–4.

40. Tham J, Walder M, Melander E, Odenholt I. Duration of colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in patients with travellers' diarrhoea. *Scand J Infect Dis*. 2012;44(8):573–7.
41. Tandé D, Boisramé-Gastrin S, Münck MR, Hery-Arnaud G, Gouriou S, Jallot N, et al. Intrafamilial transmission of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Babelsberg among the families of internationally adopted children. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(5):859–65.
42. Nordberg V, Jonsson K, Giske CG, Iversen A, Aspevall O, Jonsson B, et al. Neonatal intestinal colonization with extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae—a 5-year follow-up study. *Clin Microbiol Infect*. 2018;24(9):1004–9.
43. Yatsunencko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 2012;486(7402):222–7.
44. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(26):11971–5.
45. Thum C, Cookson AL, Otter DE, McNabb WC, Hodgkinson AJ, Dyer J, et al. Can Nutritional Modulation of Maternal Intestinal Microbiota Influence the Development of the Infant Gastrointestinal Tract? *Anim Nutr Heal Gr*. 2012;142(11):1921–8.
46. Deyanira D, Rosa Hernández L, José E, Cabeza G, Niurka D, Castañeda S. La microbiota intestinal en el desarrollo del sistema inmune del recién nacido.

- Revista Cubana de Pediatría. 2014.
47. Salcedo Abizanda S. Epidemiología y fisiopatología de la infección perinatal de transmisión vertical. Barcelona: XVIII Congreso de Medicina Perinatal; 2001. p. 1–7.
 48. Barcaite E, Bartusevicius A, Tameliene R, Kliucinskas M, Maleckiene L, Nadisauskiene R. Prevalence of maternal group B streptococcal colonisation in European countries. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2008;87(3):260–71.
 49. Ramos JM, Milla A, López-García P, Gutiérrez F. Estudio de colonización por *Streptococcus agalactiae* en gestantes extranjeras y españolas, en Elche y Comarca. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009;27(4):249–51.
 50. Verani JR, McGee L, Scharag S. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease: Revised Guidelines from CDC, 2010. *MMWR.* 2010;59:1–32.
 51. Alós Cortés JI, Andreu Domingo A, Arribas Mir L, Cabrero Roura L, Cueto López M, López Sastre J, et al. Prevención de la infección perinatal por estreptococo del grupo B. Recomendaciones españolas. Actualización 2012. Documento de consenso SEIMC/SEGO/SEN/SEQ/SEMFYC. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31(3):159–72.
 52. López Sastre JB, Coto Cotallo GD, Fernández Colomer B, Grupo de Hospitales Castrillo. Neonatal sepsis of vertical transmission: an epidemiological study from the “Grupo de Hospitales Castrillo.” *J Perinat Med.* 2000;28(4):309–15.
 53. Juguera Rodríguez I, Rodríguez Revuelta MJ, Salamanca Cuenca C, González León IM, Jiménez Parrilla PJ, Granero Asencio M, et al. Protocolos y

- procedimientos para la actuación pediátrica en área de partos y plantas de Maternidad. 2016. p. 57.
54. López-Sastre J, Fernández-Colomer B. Sepsis en el recién nacido. *An Pediatría Contin.* 2005;3(1):18–27.
55. Pallecchi L, Malossi M, Mantella A, Gotuzzo E, Trigoso C, Bartoloni A, et al. Detection of CTX-M-type beta-lactamase genes in fecal *Escherichia coli* isolates from healthy children in Bolivia and Peru. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(12):4556–61.
56. Meropol SB, Stange KC, Jacobs MR, Weiss JK, Bajaksouzian S, Bonomo RA. Bacterial Colonization and Antibiotic Resistance in a Prospective Cohort of Newborn Infants During the First Year of Life. *Open Forum Infect Dis.* 2016;3(4):ofw221.
57. Guimarães B, Barreto Â, Radhouani H, Figueiredo N, Gaspar E, Rodrigues J, et al. Genetic Detection of Extended-Spectrum β -Lactamase-Containing *Escherichia coli* Isolates and Vancomycin-Resistant Enterococci in Fecal Samples of Healthy Children. *Microb Drug Resist.* 2009 Sep;15(3):211–6.
58. Birgy A, Cohen R, Levy C, Bidet P, Courroux C, Benani M, et al. Community faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in French children. *BMC Infect Dis. BioMed Central;* 2012;12:315.
59. Boutet-Dubois A, Pantel A, Prère M-F, Bellon O, Brieu-Roche N, Lecaillon E, et al. Faecal carriage of oxyiminocephalosporin-resistant Enterobacteriaceae among paediatric units in different hospitals in the south of France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* Springer Berlin Heidelberg; 2013;32(8):1063–8.

60. Lo W-U, Ho P-L, Chow K-H, Lai EL, Yeung F, Chiu SS. Fecal carriage of CTXM type extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms by children and their household contacts. *J Infect.* 2010;60(4):286–92.
61. Isendahl J, Turlej-Rogacka A, Manjuba C, Rodrigues A, Giske CG, Naucmér P. Fecal Carriage of ESBL-Producing *E. coli* and *K. pneumoniae* in Children in Guinea-Bissau: A Hospital-Based Cross-Sectional Study. *PLoS One.* 2012;7(12):e51981.
62. Kothari C, Gaiind R, Singh LC, Sinha A, Kumari V, Arya S, et al. Community acquisition of β -lactamase producing Enterobacteriaceae in neonatal gut. *BMC Microbiology.* 2013.
63. Farra A, Frank T, Tondeur L, Bata P, Gody JC, Onambele M, et al. High rate of faecal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in healthy children in Bangui, Central African Republic. *Clin Microbiol Infect* 22. 2016;891.e1-891.e4.
64. Li X, Xu X, Yang X, Luo M, Liu P, Su K, et al. Risk factors for infection and/or colonisation with extended-spectrum β -lactamase-producing bacteria in the neonatal intensive care unit: a meta-analysis. *Int J Antimicrob Agents.* 2017;50(5):622–8.
65. Mammina C, Carlo P Di, Cipolla D, Giuffrè M, Casuccio A, Gaetano V Di, et al. Surveillance of multidrug-resistant gram-negative bacilli in a neonatal intensive care unit: prominent role of cross transmission. *Am J Infect Control.* 2007;35(4):222–30.
66. Hylander MA, Strobino DM, Dhanireddy R. Human Milk Feedings and Infection Among Very Low Birth Weight Infants. *Pediatrics.* 1998;102(3):E38.

67. Doi Y, Paterson DL, Egea P, Pascual A, López-Cerero L, Navarro MD, et al. Extended-spectrum and CMY-type b-lactamase-producing *Escherichia coli* in clinical samples and retail meat from Pittsburgh, USA and Seville, Spain. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(1):33–8.
68. Kola A, Kohler C, Pfeifer Y, Schwab F, Kuhn K, Schulz K, et al. High prevalence of extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in organic and conventional retail chicken meat, Germany. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(11):2631–4.
69. Strenger V, Feierl G, Resch B, Zarfel G, Grisold A, Masoud-Landgraf L, et al. Fecal Carriage and Intrafamilial Spread of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae Following Colonization at the Neonatal ICU. *Pediatr Crit Care Med*. 2013;14(2):157–63.
70. Madigan T, Johnson JR, Clabots C, Johnston BD, Porter SB, Slater BS, et al. Extensive Household Outbreak of Urinary Tract Infection and Intestinal Colonization due to Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Sequence Type 131. *Clin Infect Dis*. 2015;61(1):e5.
71. Johnson JR, Davis G, Clabots C, Johnston BD, Porter S, DebRoy C, et al. Household Clustering of *Escherichia coli* Sequence Type 131 Clinical and Fecal Isolates According to Whole Genome Sequence Analysis. *Open Forum Infect Dis*. 2016;3(3):ofw129.
72. Liakopoulos A, van den Bunt G, Geurts Y, Bootsma MCJ, Toleman M, Ceccarelli D, et al. High Prevalence of Intra-Familial Co-colonization by Extended-Spectrum Cephalosporin Resistant Enterobacteriaceae in Preschool Children and Their Parents in Dutch Households. *Front Microbiol*. 2018;9:293.

73. Overdevest I, Haverkate M, Veenemans J, Hendriks Y, Verhulst C, Mulders A, et al. Prolonged colonisation with *Escherichia coli* O25:ST131 versus other extended-spectrum beta-lactamase-producing *E. coli* in a long-term care facility with high endemic level of rectal colonisation, the Netherlands, 2013 to 2014. *Euro Surveill.* 2016;21(42):30376.
74. Torres E, López-Cerero L, Morales I, Navarro MD, Rodríguez-Baño J, Pascual A. Prevalence and transmission dynamics of *Escherichia coli* ST131 among contacts of infected community and hospitalized patients. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24(6):618–23.
75. Rutayisire E, Huang K, Liu Y, Tao F. The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants' life: a systematic review. *BMC Gastroenterol.* 2016;16(1):86.
76. Titelman E, Hasan CM, Iversen A, Naucmér P, Kais M, Kalin M, et al. Faecal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* is common 12 months after infection and is related to strain factors. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(8):O508-15.

9. ANEXOS

Anexo 1. Hoja de información al paciente y su entorno.

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE Y SU ENTORNO

SEGUIMIENTO DEL ESTADO DE PORTADOR DE ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BETA-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO EN RECIÉN NACIDOS

Le proponemos participar en un estudio de investigación cuyo objetivo es la observación de la prevalencia (proporción de personas con una determinada característica con respecto al total de la población) de transmitir la colonización de unos microorganismos multirresistentes denominados enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido y carbapenemasas a su hijo durante el parto, la lactancia o durante el primer año de vida.

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

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

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

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

Las peculiaridades anatómicas y fisiológicas del recién nacido y del lactante van a condicionar una mayor susceptibilidad a la infección así como una mayor vulnerabilidad ante la misma, por lo que la repercusión clínica y epidemiológica es sustancialmente mayor que en otras edades de la vida.

Los objetivos establecidos de nuestro estudio son los siguientes:

- a. Conocer la frecuencia de transmisión vertical (madre-hijo) de enterobacterias productoras de BLEE y carbapenemasas en tres periodos diferentes: durante el parto, durante la lactancia materna o durante el primer año del niño.
- b. Conocer la dinámica del estado de portador en neonatos.
- c. Determinar si el estado de portador en recién nacidos confiere un aumento de problemas de salud durante el primer año de vida.

No sabemos todo lo que quisiéramos saber sobre estos microorganismos que pudieran ser perniciosos tanto para su salud y la de su hijo como para la población

en general. La única manera de saberlo es realizar estudios como éste. Aunque puede que usted no obtenga un beneficio individual directo de los conocimientos obtenidos como resultado de este estudio, ya que lo más probable es que ni usted ni su hijo se hallen colonizados por estas bacterias se beneficiarán en el futuro otras mujeres o usted misma en futuros embarazos. Gracias a su participación podremos conocer más acerca de la cantidad de neonatos que hay en nuestro medio colonizadas por dichas bacterias y establecer si esto determina un aumento de su morbimortalidad y si en un futuro sería recomendable emprender estrategias de cribado sistemático y uso de antibióticos de forma empírica en los casos de recién nacidos colonizados.

Se le propone este estudio porque:

- A- Su hijo ha nacido en el Hospital Universitario Virgen Macarena, lugar donde se va a llevar a cabo el estudio durante los próximos 12 meses.

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

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

A partir de su aceptación del estudio haremos lo siguiente:

- A) En TODAS las participantes, se recogerá una encuesta con los datos

socioculturales y una pequeña encuesta con los factores de riesgo probables o establecidos para la colonización por parte de los microorganismos estudiados.

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

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

C) En el caso de que el neonato esté colonizado por alguno de los microorganismos estudiados se realizará un seguimiento durante 12 meses con una nueva determinación cada 3 meses tanto los servicios de Neonatología como de Enfermedades Infecciosas y Microbiología del Hospital Universitario Virgen Macarena.

D) Puede ser que aunque su hijo no esté colonizado se le hagan revisiones trimestrales con nueva muestra de frotis rectal, ya que para poder determinar si la presencia de estas bacterias aumentan la morbimortalidad de su hijo es

necesario poder compararlo con recién nacidos que no sean portadores.

- E) En TODAS las madres que acepten el estudio se tomará muestra al igual que a su hijo cada 3 meses, para poder valorar la persistencia del estado de portador, la nueva colonización o la posibilidad de dejar de estar colonizado por estos microorganismos. La toma de muestra será a elección de la madre, bien mediante frotis rectal recogido por el personal sanitario o bien con muestra de heces que aportará en la visita.

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

Tiene que saber que la participación en el estudio es voluntaria y que, si decide participar, tiene la posibilidad de revocar su consentimiento en cualquier momento sin perjuicio alguno, sin tener que dar explicaciones, y sin que ello afecte a su relación con su/s médico/s o a futuros tratamientos.

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

Los datos del estudio son confidenciales y sólo tendrán acceso a ellos los investigadores y el personal encargado de garantizar la calidad de los datos. Estos datos se registrarán en una base de datos con códigos numéricos, y será destruida

cuando finalice el estudio. Las autoridades sanitarias pueden, eventualmente, acceder a los mismos durante una inspección. Los nombres de los participantes no aparecerán en ninguna información o publicación de los datos del estudio. Su información personal no estará disponible al público, cumpliendo lo establecido en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal.

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

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

El investigador responsable del estudio es la Dra. Rodríguez Revuelta, que le responderá a cualquier duda que tenga sobre el estudio, y con el que puede contactar en el Teléfono

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

Anexo 2. Consentimiento informado.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

TÍTULO DEL ESTUDIO: Seguimiento del estado de portador de enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido en recién nacidos.

Yo _____ como progenitor
/ tutor del recién nacido _____

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

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con la Dra. Rodríguez Revuelta o alguno de los colaboradores del estudio.

Comprendo que la participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirar al recién nacido del estudio:

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

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Firma de la participante

Fecha

DNI:

Firma del investigador

Fecha

DNI:

Anexo 3. Hoja de instrucciones para la toma de muestras.

**INSTRUCCIONES PARA LA CORRECTA RECOGIDA DE FROTIS RECTAL PARA
LA DETERMINACIÓN DE ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BLEE**

A. Material necesario:

- a. Guantes de goma
- b. Torunda facilitada para dicho uso

B. Obtención de la muestra

- a. Se introducirá a través del esfínter anal. Para que la muestra sea válida, ésta debe salir **manchada con heces**.

C. Conservación

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

Anexo 4. Encuesta de seguimiento.

ESTUDIO NEOBLEE

- NOMBRE MADRE:
- NOMBRE NIÑO:
- Edad: 3m 6m 9m 12m
- Peso: _____ Kg.
- Talla: _____ cm.
- PC: _____ cm.
- Estancia en otro país desde la última visita. SI / NO.

- Cambio de domicilio desde la última visita. SI / NO
- Número de convivientes en domicilio: 1 – 2 – 3 – 4 – 5 – 6 – 7 – 8 – 9
- Nuevo conviviente en el domicilio desde la última visita. SI / NO
- Número de cuartos de baño: 1 – 2 – 3 – 4
- Número de dormitorios: 1 – 2 – 3 – 4 – 5 – 6
- Nivel socioeconómico: bajo – medio – medio/alto - alto
- Presencia de animales en domicilio. SI / NO
- Cuántas veces ha realizado la comida principal fuera de casa en el último mes: * Menos de 7 veces * Entre 7 y 15 veces * Más de 15 veces
- La madre cuida alguna persona enferma: SI/ NO. Sonda: SI / NO
- Cuidador del niño diferente a la madre y/o padre: SI / NO.
- Abuelo en residencia o las frecuenta: SI / NO

- Lactancia materna: SI / NO
 - Esterilización de biberones: SI / NO
 - Si procede, el puré de verduras y/o fruta es casero: SI / NO / A VECES
 - Acude a guardería: SI / NO. Puré: catering / casero / canasto / no comedor.
- | | MADRE | NIÑO |
|---|---------|---------|
| - Patología de base: | SI / NO | SI / NO |
| - Tratamiento de mantenimiento: | SI / NO | SI / NO |
| - Enfermedades desde la última visita: | SI / NO | SI / NO |
| - Ingresos hospitalarios desde la última visita: | SI / NO | SI / NO |
| - Tratamiento antibiótico desde la última visita: | SI / NO | SI / NO |
- Muestra

10. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

COMUNICACIONES EN CONGRESOS

1. **Rodríguez Revuelta MJ**, Luna Lagares S, López Cerero L y Rodríguez-Baño J. Seguimiento del estado de portador en Enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido: ESTUDIO NEOBLEE. Comunicación oral para optar a Miembro Numerario de la Sociedad Española de Neonatología, presentado en XXV Congreso de Neonatología y Medicina Perinatal. Sevilla, 20-22 de Mayo de 2015.
2. **Rodríguez Revuelta MJ**, López Cerero L, Luna Lagares S, Rodríguez-Baño J y Pascual Hernández A. Monitoring the state of extended-spectrum producing beta-lactamase Enterobacteriaceae carrier in newborns: NEOBLEE study. Póster presentado en 12th World congress of Perinatal Medicine. Madrid, 3-6 Noviembre de 2015.

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS EN REVISTAS REVISADAS POR PARES

1. **Rodríguez-Revuelta MJ**, López-Cerero L, Serrano L, Luna-Lagares S, Pascual A, Rodríguez-Baño J. Incidence and Risk Factors for Acquisition of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Newborns after Birth in Seville, Spain: A Prospective Cohort Study. *Int J Antimicrob Agents*. 2018; 52(6): 835-41.
2. **Rodríguez-Revuelta MJ**, López-Cerero L, Serrano L, Luna-Lagares S, Pascual A, Rodríguez-Baño J. Duration of Colonization by Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Healthy Newborns and Associated Risk Factors: a Prospective Cohort Study. *Open Forum Infect Dis*. 2018; 52(12):ofy312.

