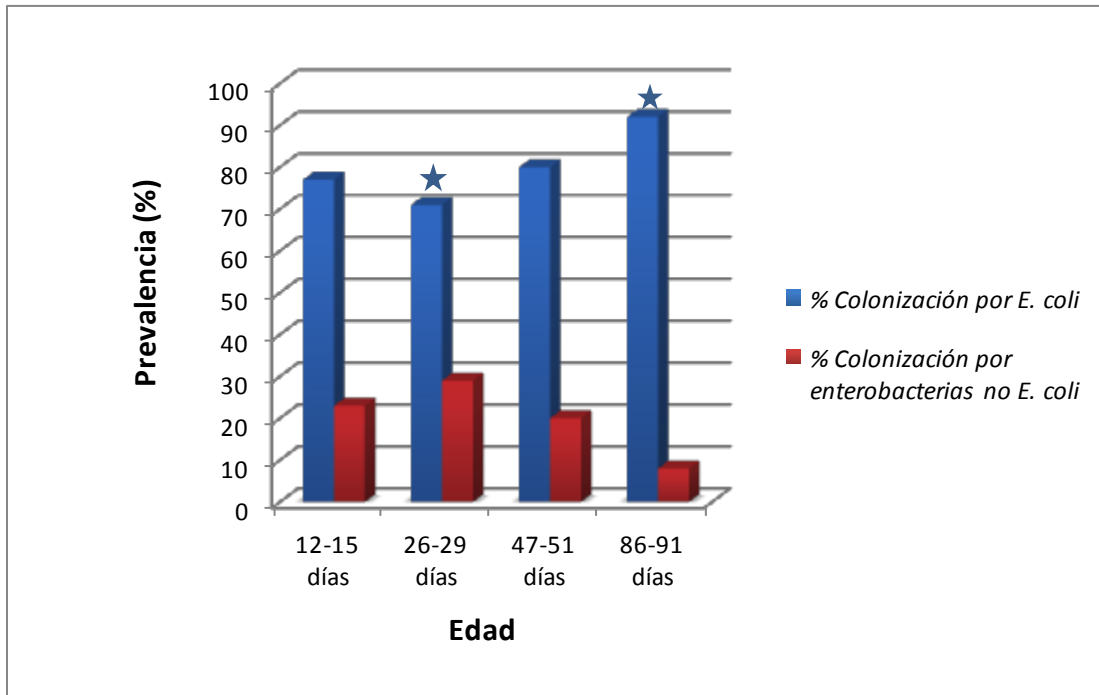


## 1. PREVALENCIA DE COLONIZACIÓN INTESTINAL POR BACIOS GRAMNEGATIVOS EN LACTANTES. INFLUENCIA DEL TIPO DE ALIMENTACIÓN.

La proporción de niños colonizados por bacilos gramnegativos (BGN) fue muy elevada independientemente de la edad. Así, en el primer momento estudiado (12-15 días tras el nacimiento) el 97% del total de neonatos presentaron colonización por BGN. Este porcentaje se mantuvo en los siguientes periodos estudiados con un 98% de niños colonizados en cada uno de ellos.

El tipo de alimentación no influyó de manera significativa en estos porcentajes, estando un 97% de niños alimentados con lactancia materna colonizados por BGN, el 100% de los que recibieron fórmula estándar y el 96% de los alimentados con la fórmula suplementada.

Se estudiaron los porcentajes de colonización por *Escherichia coli*, la especie de Enterobacteria más prevalente en la flora comensal del tracto gastrointestinal. En los primeros días de vida, un 74% de los neonatos presentaban esta especie como parte de su flora gastrointestinal. Este porcentaje disminuyó hasta un 69% a los 26-29 días. A partir de aquí, el porcentaje de niños colonizados aumentó progresivamente, con un 78% a los 47-51 días de edad hasta alcanzar un 90% a los 86-91 días. Únicamente la diferencia en el porcentaje de niños colonizados por *E. coli* entre el segundo y cuarto periodo de muestreo, 69% versus 90%, fue estadísticamente significativa ( $p=0.035$ ) (**Figura 9**).

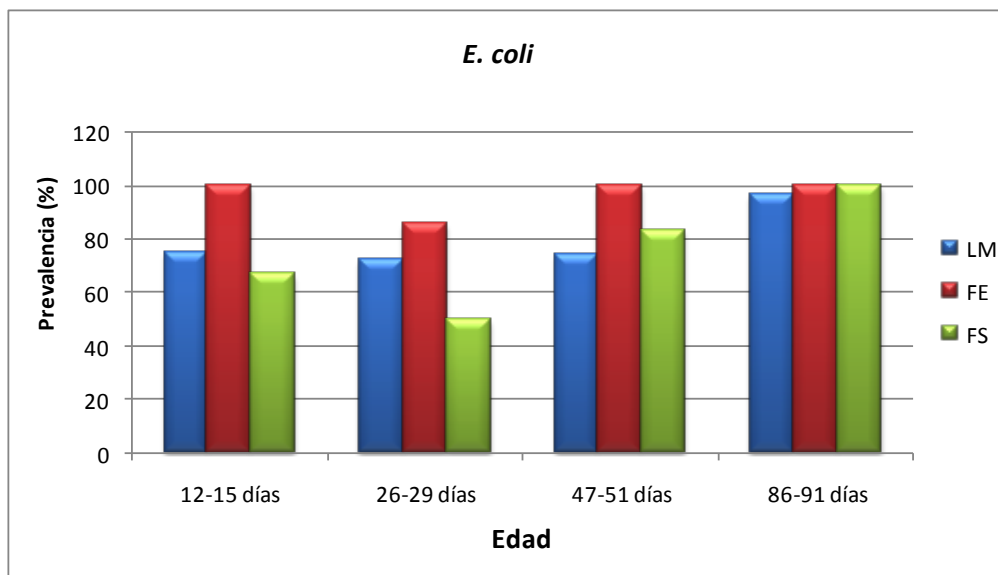


**Figura 9.** Niveles de colonización (%) por *E. coli* y por Enterobacterias no *E. coli* a las edades 12-15 días, 26-29 días, 47-51 días y 86-91 días. ★ Diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) entre las edades 26-29 días y 86-91 días.

Aunque en la mayor parte de la flora fecal de los niños estudiados *E. coli* se encontró formando parte de una población mixta de bacilos gramnegativos, constituida por otras especies de Enterobacterias y/o BGN no fermentadores, es de destacar que en un porcentaje de estos niños (37% de niños de 12-15 días de edad, 38% de 26-29 días, 36% de 47-51 días y 28% en el grupo de 86-91 días) *E. coli* apareció como única especie de bacilo gramnegativo colonizante en el tracto intestinal.

En un porcentaje pequeño de niños no se aisló *E. coli* como parte de su flora intestinal (**Figura 9**). La mayor prevalencia de colonización por especies de BGN diferentes a *E. coli* se detectó a los 26 y 29 días, con un 29% de niños. Este porcentaje disminuyó a medida que avanzaba la edad de los niños encontrándose a los 3 meses de edad sólo un 8% de niños sin la especie *E. coli* en su microbiota intestinal.

Al estudiar la influencia del tipo de alimentación en los porcentajes de niños colonizados por *E. coli*, el grupo de niños alimentados con fórmula estándar presentó mayores valores con un 100% de niños colonizados en todas las edades estudiadas excepto a los 26-29 días en la que el porcentaje fue del 86% (Figura 10).



**Figura 10.** Niveles de colonización (%) por *E. coli* a las edades 12-15 días, 26-29 días, 47-51 días y 86-91 días. LM=Leche materna, FE=Fórmula estándar, FS=Fórmula suplementada.

En los dos grupos restantes, y por tanto alimentados con lactancia materna y fórmula suplementada, los porcentajes fueron inferiores en todas las edades estudiadas, excepto en la última (86-91 días) en la que la proporción de niños colonizados por *E. coli* en los diferentes grupos de alimentación se igualó, alcanzando valores del 100% en los grupos de niños alimentados con fórmulas, estándar y suplementada, y del 97% en los niños alimentados con lactancia materna. Por tanto, a los 86-91 días de edad, la práctica totalidad de los niños estaban colonizados por *E. coli*, independientemente del tipo de alimentación recibida.

Hay que resaltar que a los 26-29 días la proporción de niños colonizados por *E. coli* disminuyó tanto en los niños lactados a pecho como en los alimentados con fórmula.

No se encontraron individuos colonizados exclusivamente por *E. coli* en el grupo de niños alimentados con fórmula suplementada. En los otros dos grupos, lactancia materna y fórmula estándar, aunque predominaron los niños con flora mixta, existió un porcentaje en los que *E. coli* fue la única especie aislada de bacilo gramnegativo del tracto gastrointestinal. Además, la proporción de niños colonizados por *E. coli* formando parte de flora mixta con otras especies fue superior en los grupos alimentados con fórmulas artificiales, estándar y suplementada, frente a los alimentados con leche materna (**Tabla 8**).

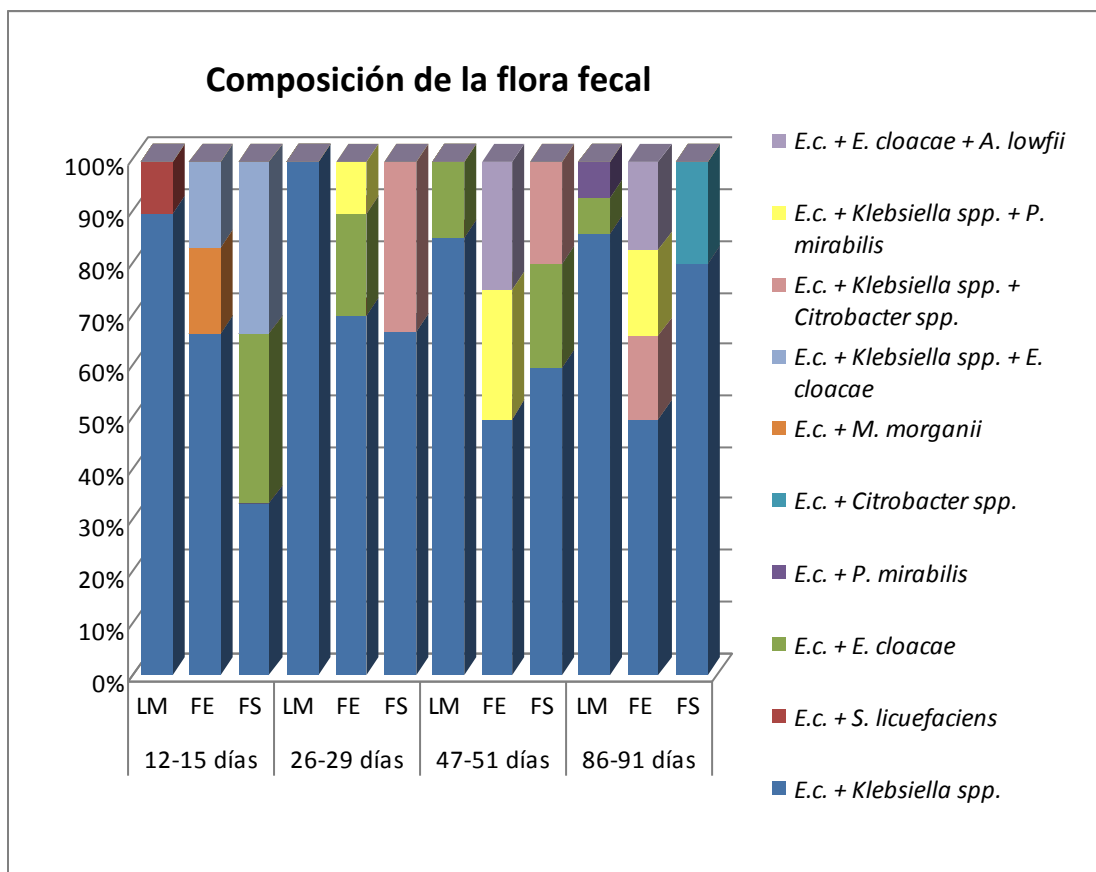
**Tabla 8.** Número y porcentaje de niños del estudio colonizados por *E. coli* según edad de los neonatos y tipo de alimentación, diferenciando entre *E. coli* como flora única y *E. coli* formando parte de flora mixta. LM=Leche materna, FE=Fórmula estándar, FS=Fórmula suplementada.

Edad del niño	Niños colonizados por <i>E. coli</i> – Flora única n (%)			Niños colonizados por <i>E. coli</i> - Flora Mixta n (%)		
	LM	FE	FS	LM	FE	FS
<b>12-15 días</b>	15 (31)	2 (25)	0	20 (42)	6 (75)	3 (50)
<b>26-29 días</b>	12 (33)	1 (14)	0	13 (36)	5 (71)	3 (50)
<b>47-51 días</b>	10 (32)	2 (25)	0	12 (39)	4 (57)	5 (83)
<b>86-91 días</b>	9 (35)	1 (14)	0	15 (58)	6 (86)	5 (100)

Entre las Enterobacterias que junto a *E. coli* formaban parte de la flora fecal de los niños, las especies del género *Klebsiella* spp., fueron las encontradas

con más frecuencia, aislándose en todos los niños estudiados, independientemente de la alimentación recibida y de la edad.

Tal y como se refleja en la **Figura 11**, excepto en los primeros días (12-15 días) en el grupo de niños alimentados con fórmula suplementada, la combinación de *E. coli* con *Klebsiella* spp. fue la asociación de Enterobacterias encontrada en más del 50% de los niños, siendo en los niños alimentados con lactancia materna a los 26-29 días de edad las únicas especies encontradas.



**Figura 11.** Niveles de colonización (%) por diferentes combinaciones de bacilos gramnegativos (BGN) junto con los que *E. coli* (*E.c.*) constituía la flora intestinal de los lactantes a las edades de 12-15 días, 26-29 días, 47-51 días y 86-91 días y según tipo de alimentación (LM=Leche materna, FE=Fórmula estándar, FS=Fórmula suplementada).

Entre el resto de especies que formaban parte de la flora gramnegativa de los niños, es importante destacar la presencia de Enterobacterias con determinantes especiales de resistencia, tales como *Serratia* spp., *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter* spp., y *Morganella morganii*.

Al analizar la prevalencia de colonización por estas cepas resistentes en los niños a diferentes edades y con diferente alimentación, se comprobó que entre los niños alimentados con lactancia materna ésta era menor que en los que recibían fórmula (tanto estándar como suplementada) (**Figura 11**).

Así, en los primeros días de vida, sólo en un 10% de los niños alimentados con lactancia materna se aisló *Serratia* spp., junto a *E. coli*. En el grupo alimentado con fórmula estándar, en un 17% se encontró *M. morganii* y en otro 17% *E. cloacae*. Finalmente, de los alimentados con fórmula suplementada, el 66% estaban colonizados por *E. cloacae*.

A la edad de 26-29 días, entre los neonatos alimentados con lactancia materna ninguno estaba colonizado por cepas resistentes, frente al 20% de los alimentados con fórmula estándar que estaban colonizados por *E. cloacae* y el 33% de los alimentados con fórmula suplementada que estaban colonizados por *Citrobacter* spp.

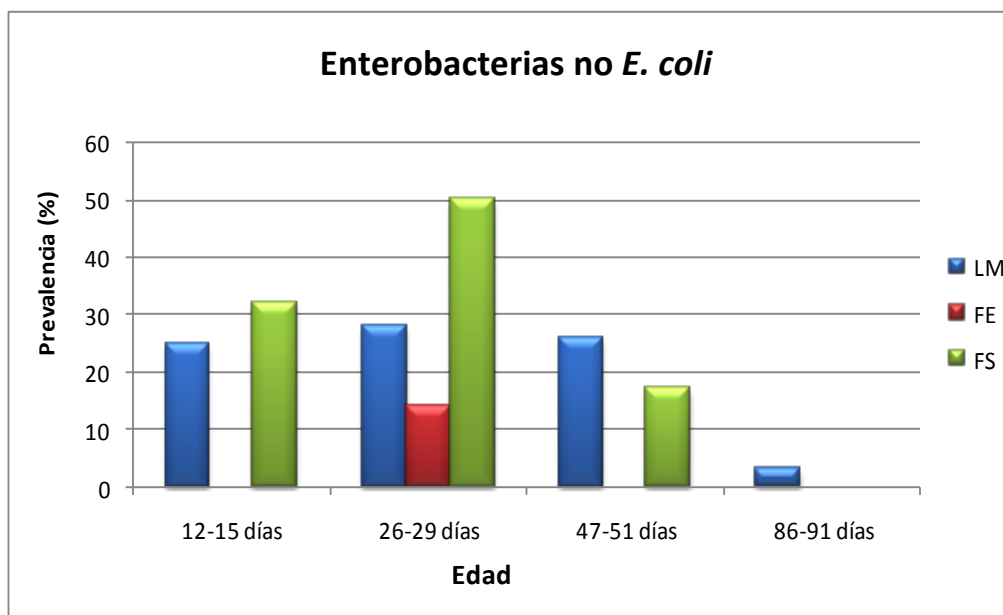
A la edad de 47-51 días, los porcentajes de colonización por *E. cloacae* fueron de un 15% en los lactantes alimentados con lactancia materna, de un 25% en el grupo de los alimentados con fórmula estándar y de un 20% en los que recibieron fórmula suplementada. Además, en este último grupo, otro 20% de neonatos estaban colonizados por *Citrobacter* spp.

Diferenciando entre los dos grupos de lactantes alimentados con fórmulas artificiales y, salvo en el último periodo de edad estudiado, observamos que los porcentajes de colonización por estas cepas resistente en el grupo de

niños que recibieron fórmula suplementada eran ligeramente superiores a los que recibieron fórmula estándar (**Figura 11**).

Finalmente, el porcentaje más bajo de niños colonizados por cepas resistentes en los tres grupos de alimentación se encontró en el último periodo de edad estudiado, aproximadamente a los tres meses de vida. De forma que de los niños alimentados con lactancia materna un 7% estaban colonizados por *E. cloacae*, de los niños alimentados con fórmula estándar un 17% por *E. cloacae* y un 16% por *Citrobacter spp.*, y de los que recibieron fórmula suplementada un 20% colonizados por *Citrobacter spp.* (**Figura 11**).

En relación a los niños colonizados por Enterobacterias diferentes a *E. coli*, la prevalencia de colonización por dichas especies en los diferentes periodos de edad varió entre los tres grupos de alimentación, lactancia materna y los dos de fórmula artificial (**Figura 12**).



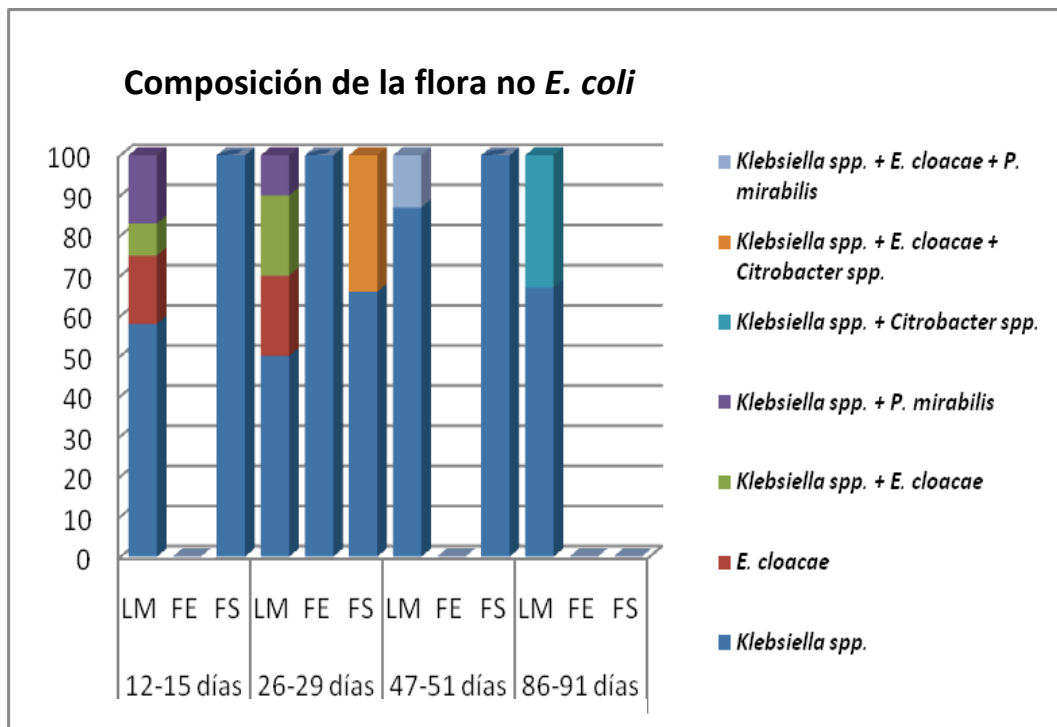
**Figura 12.** Niveles de colonización (%) por Enterobacterias diferentes de *E. coli* a las edades 12-15 días, 26-29 días, 47-51 días y 86-91 días. (LM=Leche materna, FE=Fórmula estándar, FS=Fórmula suplementada).

Entre los niños alimentados con lactancia materna, a todas las edades existió un porcentaje en los que no se aisló *E. coli* como parte de su flora comensal, con valores en torno al 25% en las tres primeros momentos estudiados. Este porcentaje disminuyó al 3% en el último momento. En niños alimentados con fórmula estándar únicamente a los 47-51 días existió un porcentaje de ellos (14%) con ausencia de *E. coli* en la flora gastrointestinal. En el resto de muestras siempre se aisló esta especie. En cuanto al grupo de niños alimentados con fórmula suplementada, excepto en la última muestra estudiada, en todas las edades anteriores hubo un porcentaje de niños con Enterobacterias diferentes a *E. coli*, llegando en el segundo periodo de muestreo, a los 26-29 días, a representar el 50% (**Figura 12**).

En la **Figura 13** se representa la prevalencia de las especies y combinación de especies de Enterobacterias diferentes a *E. coli* que aparecieron en la flora intestinal de los lactantes.

Excepto en una pequeña proporción de niños alimentados a pecho en el grupo de 12-15 y 26-29 días que estuvieron colonizados exclusivamente por la especie *Enterobacter cloacae*, en el resto de niños se aislaron especies del género *Klebsiella* formando parte de la flora gastrointestinal bien como flora única (100% de los niños alimentados con fórmula suplementada en el primer y tercer periodo de muestreo, y en el segundo periodo de los alimentados con fórmula estándar) o en combinación con otras especies.



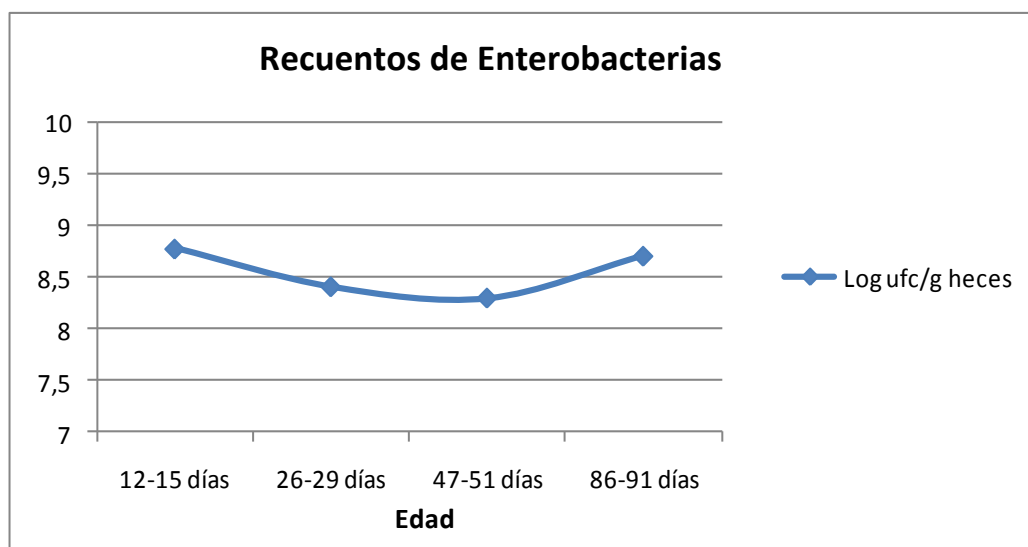


**Figura 13.** Niveles de colonización (%) por diferentes combinaciones de bacilos gramnegativos (BGN) diferentes a *E. coli* que constituían la flora de los neonatos a las edades de 12-15 días, 26-29 días, 47-51 días y 86-91 días y según tipo de alimentación. LM=Leche materna, FE=Fórmula estándar, FS=Fórmula suplementada.

## 2. ESTUDIO DE LA POBLACIÓN DE BACILOS GRAMNEGATIVOS EN LA FLORA FECAL DEL LACTANTE. INFLUENCIA DEL TIPO DE ALIMENTACIÓN.

### 2.1. Recuentos de bacilos gramnegativos en muestras fecales de lactantes.

Se determinó la concentración de bacilos gramnegativos, predominantemente Enterobacterias, en la flora fecal de los neonatos a las diferentes edades. Los recuentos obtenidos a lo largo de los cuatro periodos de muestreo fueron altos (**Figura 14**).



**Figura 14.** Recuento del total de bacilos gramnegativos (log ufc/g heces) en muestras fecales de niños con cultivos positivos. Valores promedio en cada intervalo de tiempo estudiado.

El recuento inicial fue de 8.8 log ufc/g, disminuyendo en el segundo y tercer periodo a 8.4 log ufc/g y 8.3 log ufc/g, respectivamente. Finalmente, en la última muestra recogida, aproximadamente a los tres meses de vida, la población de estos bacilos alcanzó niveles próximos a los iniciales (8.6 log ufc/g). En ningún caso las diferencias entre los recuentos a lo largo de los cuatro periodos de estudio fueron significativas.

Al estudiar la influencia del tipo de alimentación sobre la concentración de BGN en la flora intestinal, los recuentos más elevados se encontraron en el grupo de niños alimentados con fórmula estándar (FE), con una media de 9.19 log ufc/g heces. Las diferencias entre el recuento medio encontrado en este grupo de niños con respecto al encontrado en los otros dos grupos, fórmula suplementada (FS) y lactancia materna (LM), fueron estadísticamente significativas, 9.19 log ufc/g FE *versus* 8.46 log ufc/g LM, ( $p=0.007$ ); 9.19 log ufc/g FE *versus* 8.23 log ufc/g FS, ( $p=0.011$ ) (**Tabla 9**).

**Tabla 9.** Cuantificación de los bacilos gramnegativos (log ufc/g) de heces en muestras de heces procedentes de niños alimentados con leche materna, fórmula estándar y fórmula suplementada a las diferentes edades de muestreo.

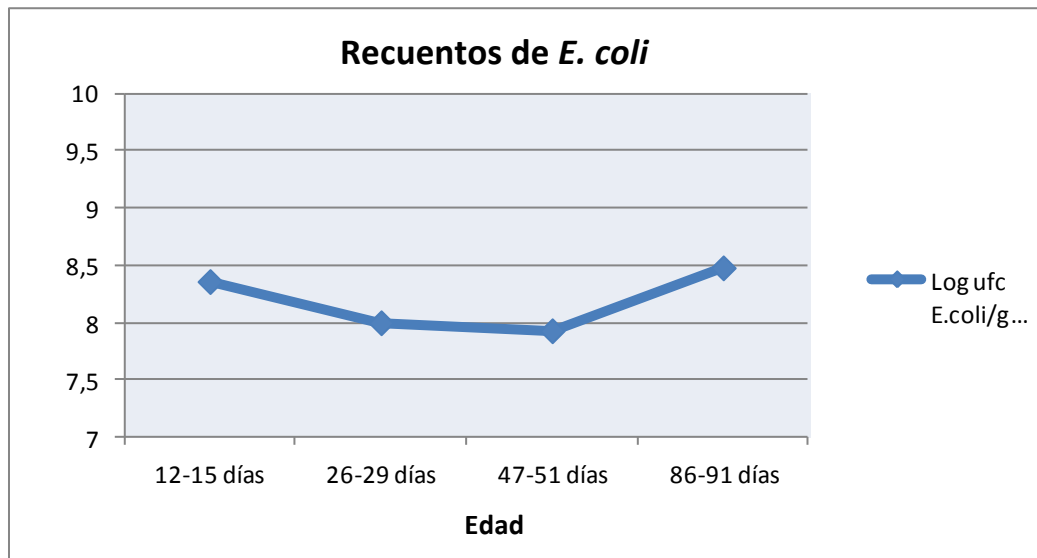
Edad del niño	Leche Materna		Fórmula estándar		Fórmula suplementada	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD
<b>12-15 días</b>	8.67	0.75	9.48	1.27	8.72	1.00
<b>26-29 días</b>	8.35	1.13	9.12	1.68	7.63	1.84
<b>47-51 días</b>	8.33	1.21	8.56	1.50	8.06	1.44
<b>86-91 días</b>	8.4 <sup>b</sup>	0.96	9.57 <sup>a</sup>	1.46	8.65 <sup>a,b</sup>	0.22
<b>Media</b>	<b>8.46<sup>b</sup></b>	1.07	<b>9.19<sup>a</sup></b>	1.45	<b>8.23<sup>b</sup></b>	1.27

<sup>a, b</sup> superíndices diferentes entre los grupos de alimentación indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Cuando se estudió la evolución en los recuentos de bacilos gramnegativos en las diferentes edades de los niños, a pesar de existir diferencias según el tipo de alimentación recibida, se encontró que, en los tres grupos, en segundo periodo de muestreo a los 26-29 días se produjo una disminución de la poblaciones de BGN, aumentando posteriormente y, llegando al final del periodo de estudio, aproximadamente a los 3 meses de edad, a unos valores próximos a los iniciales (**Tabla 9**). En este momento (86-91 días), se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de BGN entre el grupo de niños alimentados con fórmula estándar (FE) con respecto al grupo de leche materna (LM), (8.4 log ufc/g LM *versus* 9.57 log ufc/g FE,  $p=0.028$ ). Para las otras edades analizadas las diferencias entre los tres grupos no fueron significativas.

### 2.1.1. Recuentos de *E. coli* en la microflora del niño.

Con respecto, a la concentración de *E. coli* (**Figura 15**) se encontraron pequeñas variaciones entre las diferentes edades estudiadas, sin llegar en ningún caso a ser estadísticamente significativas.



**Figura 15.** Recuentos medios de *E. coli* (log ufc/g heces) en cada intervalo de edad del niño estudiado.

En la **tabla 10** se reflejan los recuentos de *E. coli* obtenidos en los diferentes grupos de alimentación a las diferentes edades de muestreo.

**Tabla 10.** Cuantificación en **log ufc** de *E. coli/g* de heces en muestras de heces procedentes de niños alimentados con leche materna, fórmula estándar y fórmula suplementada a las diferentes edades de muestreo.

Edad del niño	Leche Materna		Fórmula estándar		Fórmula suplementada	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD
<b>12-15 días</b>	8.3 <sup>b,c</sup>	1.16	9.2 <sup>a,b</sup>	1.31	7.3 <sup>c</sup>	1.56
<b>26-29 días</b>	7.8	1.68	8.5	2.01	8.6	0.50
<b>47-51 días</b>	7.9	1.21	8.1	1.37	7.6	1.58
<b>86-91 días</b>	8.3 <sup>b</sup>	0.89	9.2 <sup>a</sup>	1.38	7.7 <sup>b</sup>	1.12
<b>Media</b>	<b>8.1</b>	<b>1.11</b>	<b>8.8</b>	<b>1.52</b>	<b>7.7</b>	<b>1.28</b>

<sup>a, b, c</sup> superíndices diferentes entre los grupos de alimentación indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

En el grupo de niños alimentados con lactancia materna y fórmula estándar la trayectoria en los recuentos de *E. coli* fue similar a los recuentos globales reflejada en la **Figura 14**, con una disminución progresiva de las concentraciones en la segundo y tercer periodo de muestro y un aumento en la muestra final recogida a los 86-91 días, donde la concentración de *E. coli* aumentó hasta alcanzar valores similares a los iniciales. En todas las edades estudiadas las concentraciones de *E. coli* fueron superiores en el grupo de niños alimentados con fórmula estándar que en el de lactancia materna.

En el grupo de niños alimentados con fórmula suplementada además de que las concentraciones de *E. coli*, excepto en el segundo periodo de muestreo (8.6 log ufc/g heces), fueron inferiores a las de los otros dos grupos, la evolución también fue diferente, con un incremento importante de los recuentos de esta

especie a los 26-29 días de edad, manteniéndose muy similares en los otros periodos estudiados.

Las diferencias en los recuentos de *E. coli* en las diferentes edades estudiadas en cada uno de los grupos de alimentación no fueron estadísticamente significativas pero sí se encontraron diferencias al comparar los recuentos entre los tres tipos de alimentación. Así, en los primeros días de vida, los recuentos de *E. coli* en el grupo de niños alimentados con fórmula estándar fue significativamente superior al del grupo de fórmula suplementada (9.2 log ufc/g versus 7.3 log ufc/g,  $p=0.030$ ). A los tres meses de edad también se encontraron diferencias significativas entre los recuentos de niños alimentados con fórmula estándar (FE) y lactancia materna (LM), (9.2 log ufc/g FE versus 8.3 log ufc/g LM,  $p=0.046$ ) y entre los alimentados con fórmula estándar (FE) y fórmula suplementada (FS), (9.2 log ufc/g FE versus 7.7 log<sub>10</sub> ufc/g FS,  $p=0.020$ ).

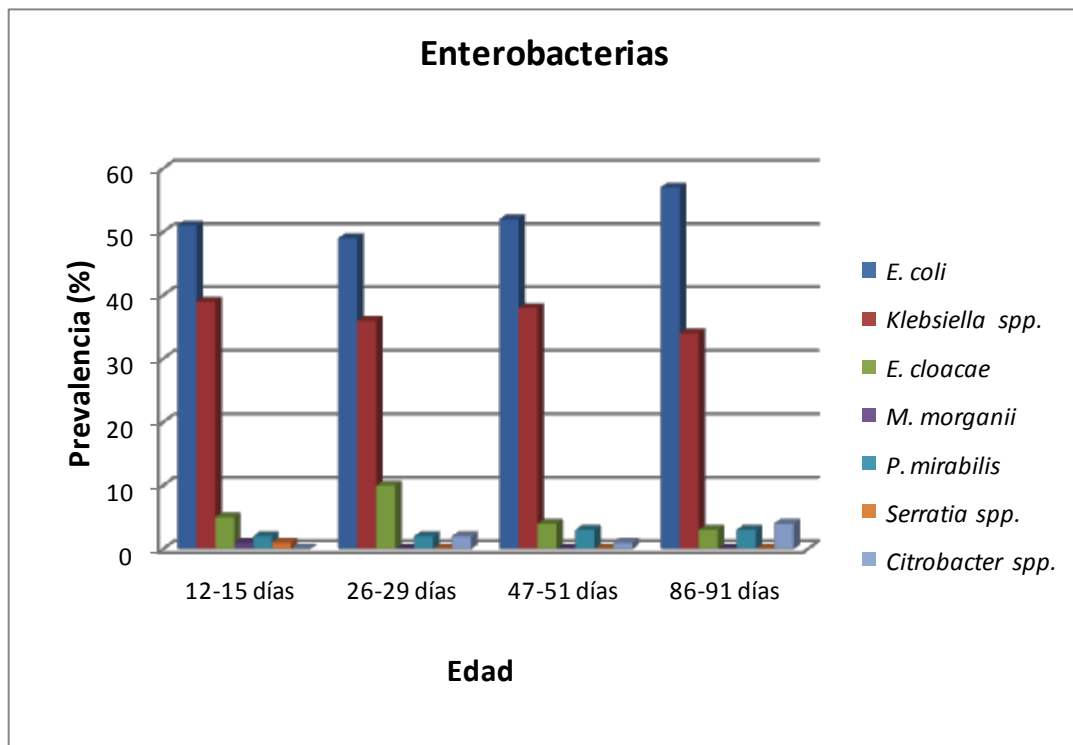
### 2.2. Estudio de la composición de la flora fecal de los lactantes.

Se aislaron un total de 328 cepas de bacilos gramnegativos, de las cuales 324 (98.8%) fueron Enterobacterias y 4 (2.2%) bacilos gramnegativos no fermentadores.

#### 2.2.1. Enterobacterias

La especie de Enterobacteria aislada con más frecuencia fue *Escherichia coli* que supuso un 52% del total de aislamientos. Un 38% de las cepas pertenecieron al género *Klebsiella* y el resto de especies aisladas en menor proporción, fueron: *Enterobacter cloacae* (5%), *Proteus mirabilis* (2%), *Citrobacter spp.* (2%) y *Morganella morganii* y *Serratia spp.* con un 0.5% respectivamente.

Por tanto, las especies *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae/oxytoca* representaron la práctica totalidad de las Enterobacterias, con casi el 90% del total. Los porcentajes de las diferentes especies de Enterobacterias aisladas en las diferentes edades se muestran en la **Figura 16**.



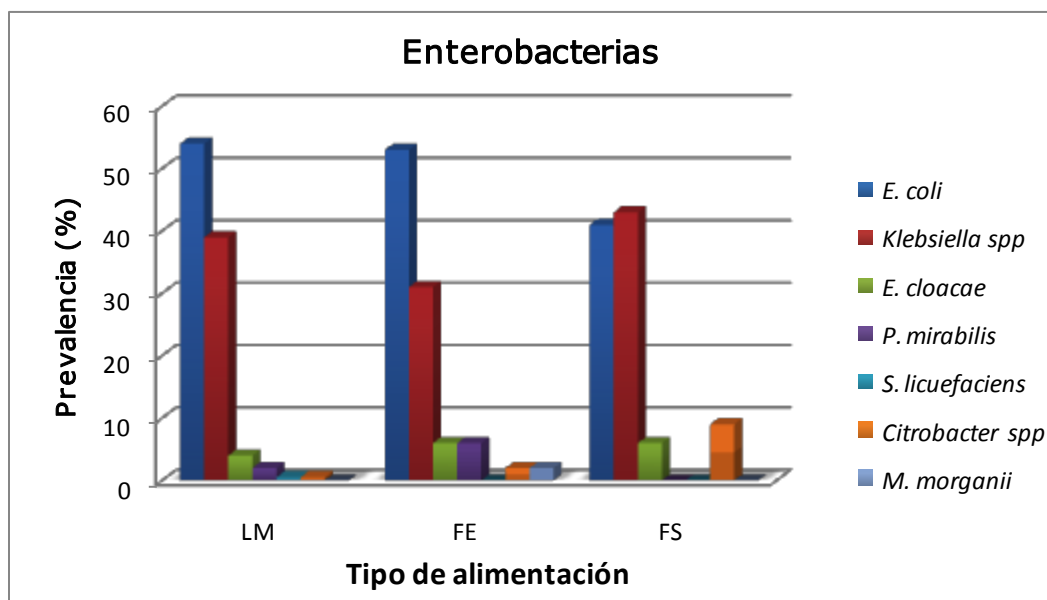
**Figura 16.** Prevalencia (%) de las diferentes especies de Enterobacterias aisladas en muestras fecales de neonatos en cada intervalo de edad estudiado.

Las especies *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter cloacae* y *Proteus mirabilis* se aislaron, en diferentes proporciones, en todas las edades de estudio, desde el primer periodo de muestreo hasta el último. *Morganella morganii* y *Serratia spp.* sólo se encontraron, de forma transitoria, en las muestras recogidas durante los primeros 12-15 días. En cambio, *Citrobacter spp.* se aisló a partir del segundo periodo de muestreo, entre los 26-29 días.

Dentro del género *Klebsiella spp.*, *K. pneumoniae* fue la especie aislada con más frecuencia, representando el 85%, 83%, 92% y 68% del total de aislamientos de *Klebsiella spp.* en las diferentes edades estudiadas.

Al comparar la prevalencia de las especies de *E. coli* y *Klebsiella* en las heces de los niños a las diferentes edades estudiadas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, siendo las diferencias más acusadas las encontradas entre el primer y último periodo estudiado en ambas especies (*E. coli* 51% (12-15 días) versus 57% (86-91 días) ( $p=0.494$ ); y *Klebsiella spp.* 39% (12-15 días) versus 34% (86-91 días) respectivamente ( $p=0.450$ ).

En la **figura 17** se muestran las diferentes especies de Enterobacterias aisladas en los grupos de niños alimentados con lactancia materna, fórmula estándar o fórmula suplementada a lo largo de todo el estudio.



**Figura 17.** Prevalencia (%) de las diferentes especies de Enterobacterias aisladas en muestras fecales de niños pertenecientes a los tres grupos de alimentación. (LM= Leche materna, FE= Fórmula estandar, FS= Fórmula suplementada).



En todos los niños independientemente del tipo de alimentación, las especies aisladas de forma mayoritaria en la flora fecal fueron *E. coli* y especies del género *Klebsiella spp.*

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de estas especies aisladas en las heces de niños alimentados con leche materna, fórmula estándar y fórmula suplementada, siendo las diferencias para *E. coli* entre el grupo de fórmula estándar *versus* lactancia materna (FE:53% vs LM:54%, ( $p=0.877$ ); entre el grupo fórmula suplementada *versus* fórmula estándar, FS:41% vs FE:53%, ( $p=0.220$ ); y grupo fórmula suplementada *versus* lactancia materna, FS:41% vs LM:54%, ( $p=0.108$ ). Para *Klebsiella spp.*, (grupo fórmula estándar *versus* lactancia materna, FE:31% vs LM:39%,  $p=0.215$ ; grupo fórmula suplementada *versus* fórmula estándar, FS:43% vs FE:31%,  $p=0.170$ ; y grupo fórmula suplementada *versus* lactancia materna, FS:43% vs LM:39%,  $p=0.596$ ).

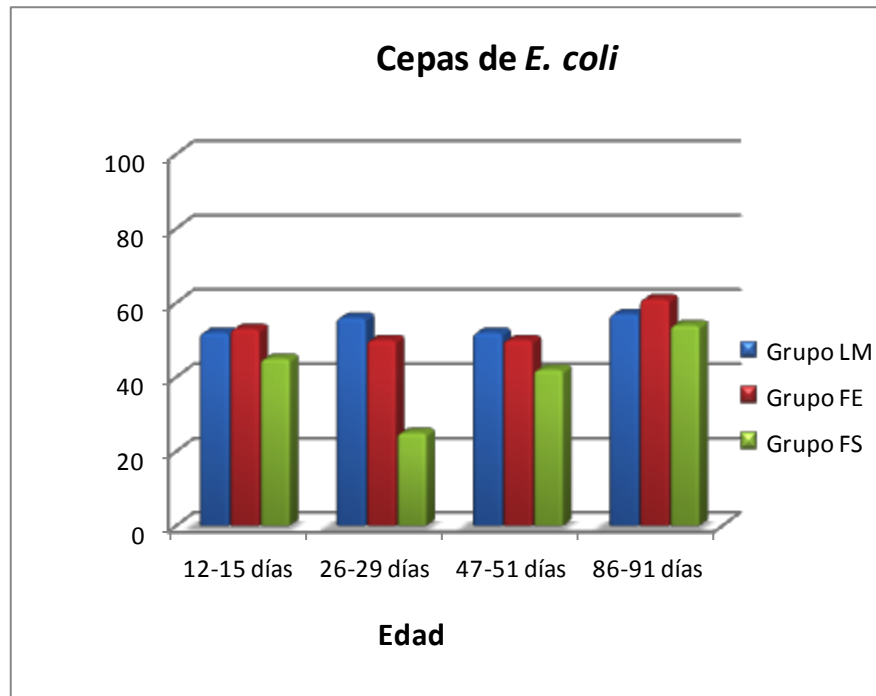
Si bien en el grupo de niños alimentados con lactancia materna y fórmula estándar *E. coli* fue la especie mayoritaria, representando un 54% y un 53% respectivamente del total de las Enterobacterias, en el grupo de alimentación con fórmula suplementada la especie *Klebsiella spp.* fue la mayoritaria representando un 43% del total. En este grupo *E. coli* supuso el 41%.

Las especies *E. cloacae* y *Citrobacter spp.* se encontraron también en los niños perteneciente a los tres grupos, pero en porcentajes muy inferiores al de las especies mayoritarias. *E. cloacae* representó el 4% del total de las Enterobacterias en el grupo de lactancia materna y el 6% en el grupo fórmula estándar y el grupo alimentado con fórmula suplementada. En este último grupo de alimentación, (FS), *Citrobacter spp.* se aisló en mayor proporción que *E. cloacae*, (9%), estando representados en un 50% por la especie *C. amanoliticus*, en un 25% por *C. braakii* y en un 25% por *C. freundii*. *Proteus mirabilis*, *Serratia spp.* y *M. morgani* se aislaron sólo en los niños alimentados con leche materna y

fórmula estándar, no encontrándose en aquellos niños alimentados con fórmula suplementada. La prevalencia de *P. mirabilis* fue de un 2% en niños lactados a pecho y de un 6% en alimentados con fórmula estándar respectivamente.

*Serratia spp.* y *M. morganii* se aislaron en la flora de aquellos niños que habían recibido lactancia materna y fórmula estándar, estando representadas por un 0.5% *S. licuefaciens* en el grupo de lactancia materna, y por un 2% *M. morganii* en el grupo que había recibido fórmula estándar.

La evolución de los porcentajes de las dos especies de Enterobacterias mayoritarias (*E. coli* y *Klebsiella spp.*), aisladas en los tres grupos de niños a lo largo del periodo estudiado, está representada en las **Figuras 18** (*E. coli*) y **19** (*Klebsiella spp.*).



**Figura 18.** Porcentaje (%) de cepas de *E. coli* aisladas en muestras fecales de niños pertenecientes a los tres grupos de alimentación. (LM= Leche materna, FE= Fórmula estándar, FS= Fórmula suplementada).

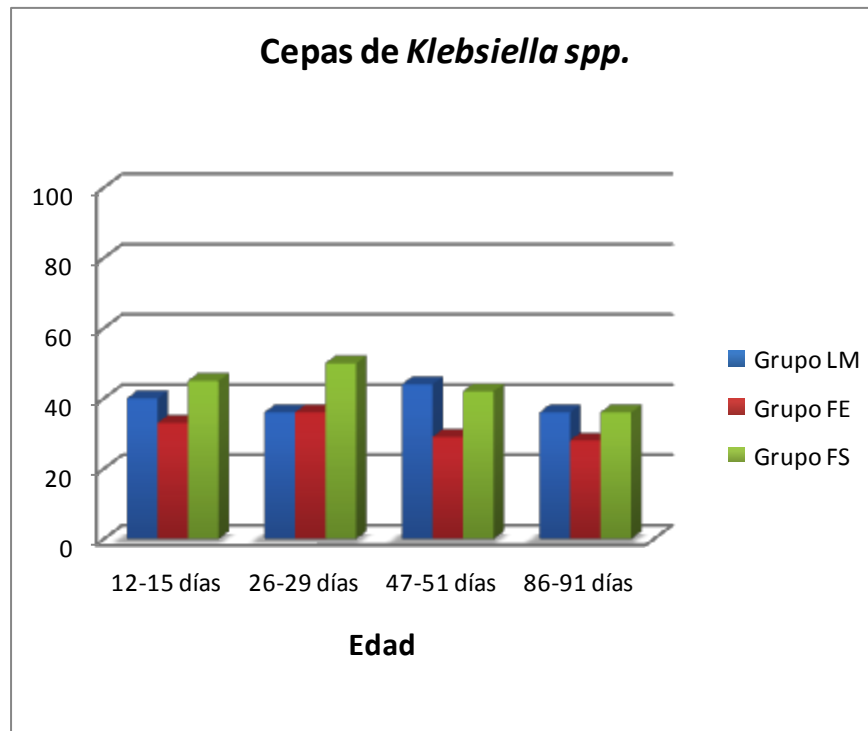
Los porcentajes de aislamientos de *E. coli* a los 12-15 días fueron similares en el grupo de niños alimentados a pecho (52%) y con fórmula estándar (53%). En el grupo de neonatos alimentados con fórmula suplementada el porcentaje de aislamiento de *E. coli* fue del 45%.

En el segundo periodo de muestreo, entre los 26-29 días de edad, es cuando se encontraron mayores diferencias en los porcentajes de *E. coli* entre los tres grupos de alimentación, sobre todo en el grupo de niños alimentados con fórmula suplementada donde se observó una disminución importante. Sin embargo las diferencias no fueron significativas.

En el tercer periodo de muestreo, entre los 47-51 días, en el grupo de alimentación con fórmula suplementada el porcentaje de cepas de *E. coli* volvió a recuperar valores próximos a los iniciales (45%), manteniéndose más o menos constante en el grupo de lactancia materna y en el de fórmula estándar.

Finalmente en el último intervalo de tiempo, sobre los tres meses, los porcentajes en los tres grupos fueron superiores al resto de los periodos de estudio, y con valores muy próximos, siendo del 61% en el grupo de alimentación fórmula estándar, el máximo porcentaje, y encontrándose un mínimo del 54% en el grupo de alimentación con fórmula suplementada.

A diferencia de *E. coli*, el porcentaje de cepas de *Klebsiella spp.* al final del estudio en los tres grupos de alimentación fue menor al del inicio, siendo incluso los porcentajes más bajos detectados de todo el periodo en el caso del grupo de fórmula estándar y fórmula suplementada, ya que en el de lactancia materna el porcentaje en el último periodo de estudio, a los 86-91 días, fue el mismo que en el segundo periodo, a los 26-29 días, con un 36% (**Figura 19**) .



**Figura 19.** Porcentaje (%) de cepas de *Klebsiella spp.* aisladas en muestras fecales de niños pertenecientes a los tres grupos de alimentación. (LM= Leche materna, FE= Fórmula estándar, FS= Fórmula suplementada).

En ambos grupos de fórmula infantil, fórmula estándar y fórmula suplementada, el porcentaje de las cepas de *Klebsiella spp.* a lo largo de los cuatro intervalos de edad del neonato variaron de igual forma, siendo superiores los del grupo de lactantes alimentados con fórmula suplementada. En este grupo, los porcentajes más altos de cepas de *Klebsiella spp.* se alcanzaron entre el primer y segundo periodo de muestreo, con un 45% y 50% respectivamente. Por el contrario en el grupo de niños alimentados con fórmula estándar, los menores porcentajes de cepas de *Klebsiella spp.* se alcanzaron en los posteriores periodos de estudio, es decir a los 47-51 días y a los 86-91 días con un 29% y 28% respectivamente. En ningún caso las diferencias en porcentaje entre ambos grupos de fórmula artificial fueron estadísticamente significativas.

### 2.2.2. Bacilos gramnegativos no fermentadores.

De las 328 cepas aisladas en la flora fecal de los niños cuatro se identificaron como bacilos gramnegativos no fermentadores, lo que supuso un 2.2% del total de las cepas. Las especies aisladas fueron *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter lowfii*. La colonización por estos bacilos gramnegativos no fermentadores se produjo de forma transitoria y siempre se aislaron como flora mixta junto con Enterobacterias.

Así, *S. maltophilia* se aisló en un niño alimentado con lactancia materna en la primera muestra, recogida entre los 12-15 días, junto a una cepa de *E. cloacae*.

*P. aeruginosa* se aisló en combinación con *E. coli* y *K. pneumoniae*, en otro niño alimentado con lactancia materna en el tercer periodo de muestreo, es decir a los 47-51 días de edad y, finalmente, *A. lowfii* en combinación con *E. coli* / *E. cloacae*, se aisló en 2 muestras consecutivas, en el segundo y tercer periodo de muestreo en un niño que había recibido fórmula infantil estándar.

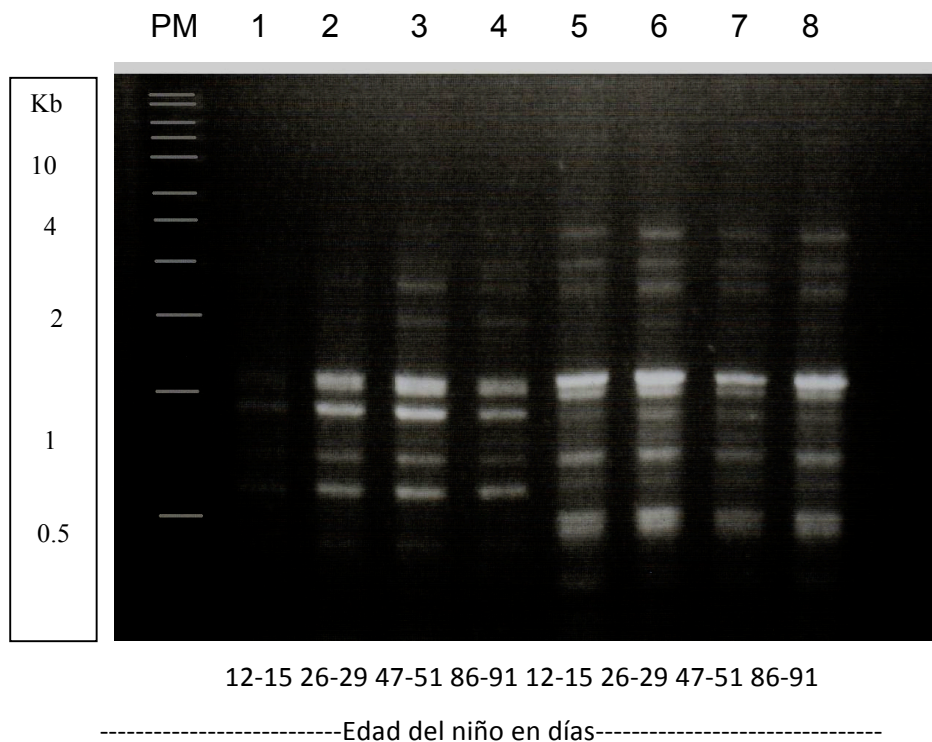
### 3. DINÁMICA DE COLONIZACIÓN POR *E. COLI*.

Con el objetivo de comprobar la dinámica de colonización intestinal por *E. coli* en cada niño a lo largo del periodo estudiado, se realizó la tipificación molecular de éstos aislamiento mediante la técnica REP-PCR (“Repetitive Extragenic Palindromic-PCR”). Se incluyeron tanto las cepas de *E. coli* aisladas en diferentes muestras de un niño como las procedentes de la misma muestra pero que presentaban características fenotípicas diferentes. No se compararon entre sí las cepas de *E. coli* procedentes de niños diferentes.

De las 169 cepas de *E. coli* aisladas en total, se realizó la tipificación molecular en 156 ya que 13 cepas procedían de niños en los que sólo había un

aislamiento de *E. coli*, bien porque sólo se había recibido la primera muestra o, porque en sólo una de las muestras recibidas del lactante se había aislado esta bacteria.

Del total de cepas analizadas (156), 59 presentaron patrones de bandas diferentes por lo que fueron consideradas como cepas genótipicamente diferentes. En la **Figura 20** se muestran los patrones de bandas obtenidos mediante REP-PCR del total de cepas de *E. coli* aislados en dos niños. La cepa de la calle 1-4 y la de la calle 5-8, estuvieron presentes en esos niños desde el primer muestreo, a los 12-15 días de edad del neonato, hasta el final del estudio, aproximadamente tres meses.



**Figura 20.** Patrones moleculares detectados mediante REP-PCR de 8 cepas de *E. coli* intestinales obtenidos de dos niños donde apareció *E. coli* en sus cuatro muestras reclutadas en los diferentes momentos. Calle M, marcador de peso molecular 1 Kb DNA ladder (Sigma). Calles 1-4, cepas de *E. coli* procedentes de un niño; Calles 5-8, cepas de *E. coli* de otro niño.

Se comprobó, que durante el periodo estudiado y en los niños en los que se había aislado *E. coli*, el 74% de los niños estuvieron colonizados por una sola cepa de *E. coli*, el 20% lo estaban por dos cepas y, finalmente un 5% estaban colonizados por tres cepas de *E. coli*. Por tanto, el número de cepas de *E. coli* por niño fue de 1.3.

La tipificación molecular permitió también clasificar las cepas de *E. coli* en residentes (aquellas que persistieron en la flora intestinal durante al menos 3 semanas) o cepas transitorias (cepas que aparecían puntualmente o en las que el tiempo de permanencia fue inferior). De esta forma, en el estudio de la dinámica de colonización de las cepas de *E. coli*, aquellas cepas de *E. coli* que aparecieron puntualmente sólo a los 12-15 días, a los 26-29 días, a los 47-51 días, o bien a los 86-91 días fueron consideradas como cepas transitorias, ya que si aparecían en más de un intervalo de tiempo el periodo transcurrido era superior a 3 semanas.

De esta forma, del total de cepas diferentes estudiadas, el 81.3% (48) pudieron ser clasificadas como residentes y el 18.6% (11) como transitorias. A su vez, el 52% (25) de las cepas residentes persistieron durante todo el periodo que duró el estudio (aproximadamente tres meses), es decir aparecieron en la primera toma de muestra, a los 12-15 días y en la última, a los 86-91 días. El resto de cepas residentes de *E. coli*, un 48% (23), persistieron durante un tiempo inferior: 10 cepas de *E. coli* aparecieron entre la primera y segunda toma de muestra, es decir persistieron una media de 13 días, 5 cepas aparecieron entre la primera, segunda y tercera muestra reclutada, es decir persistieron una media de 35 días, 1 cepa apareció entre la segunda y tercera muestra, por tanto persistió una media de 12 días, 1 cepa apareció en la segunda y cuarta muestra, es decir, persistió una media de 61 días. Finalmente 6 cepas aparecieron entre la tercera y cuarta muestra, por lo tanto persistieron una media de 40 días

Cuando se estudió la influencia del tipo de alimentación en la persistencia de las cepas de *E. coli*, se comprobó, que tanto en el grupo de niños lactados a

pecho como en el de alimentados con fórmula infantil suplementada, el porcentaje de cepas residentes fue muy superior al de cepas transitorias. En cambio en el grupo de niños alimentados con fórmula estándar los porcentajes entre ambos tipos de cepas fueron muy similares (**Tabla 11**). Estas diferencias observadas entre la prevalencia de cepas residentes y transitorias fueron estadísticamente significativas entre el grupo de lactancia materna y de fórmula estándar ( $p=0.011$ ), no así entre los grupos de fórmulas y entre el grupo de fórmula suplementada y lactancia materna.

**Tabla 11.** Porcentaje de cepas residentes y transitorias de *E. coli* aisladas de neonatos según tipo de alimentación, especificando el número de niños así como el número medio de cepas de *E. coli* por niño aisladas en cada grupo. (LM= Leche materna, FE= Fórmula estandar, FS= Fórmula suplementada).

Tipo alimentación	Nº niños	Nº cepas <i>E. coli</i>	Media cepas/niño	% cepas residentes (n)	% cepas transitoria (n)
<b>Lactancia Materna</b>	30	38	1,3	89.5 (34) <sup>a</sup>	10.5 (4) <sup>b</sup>
<b>Fórmula Estándar</b>	7	13	1,9	53.9 (7) <sup>b</sup>	46.1 (6) <sup>a</sup>
<b>Fórmula suplementada</b>	5	8	1,5	87.5 (7)	12.5 (1)

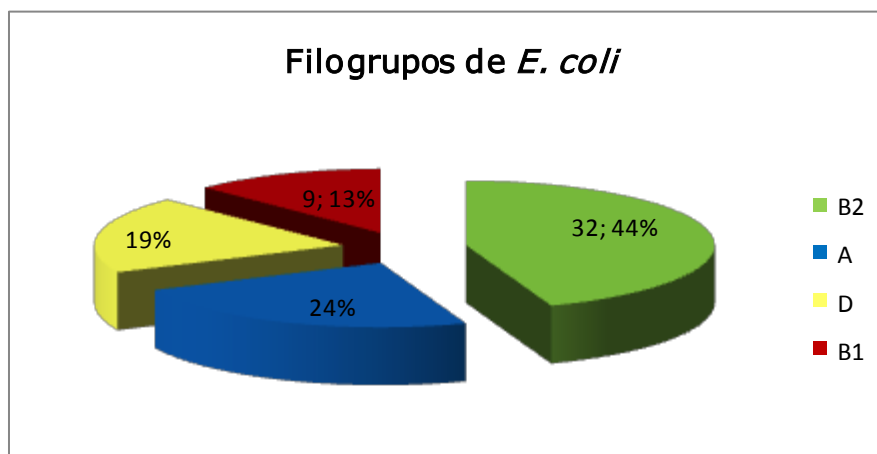
<sup>a, b, c</sup> superíndices diferentes entre los grupos de alimentación indican diferencias estadísticamente significativas ( $p<0.05$ ).



#### 4. CLASIFICACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS AISLADOS DE *E. COLI*.

Se determinó el grupo filogenético de *E. coli* en un total de 72 cepas, 59 cepas genótipicamente diferentes más las 13 cepas que procedían de niños que sólo habían tenido un aislamiento de *E. coli*, bien porque sólo se había recibido la primera muestra o, porque en sólo una de las muestras recibidas del neonato se aisló una única cepa de *E. coli*.

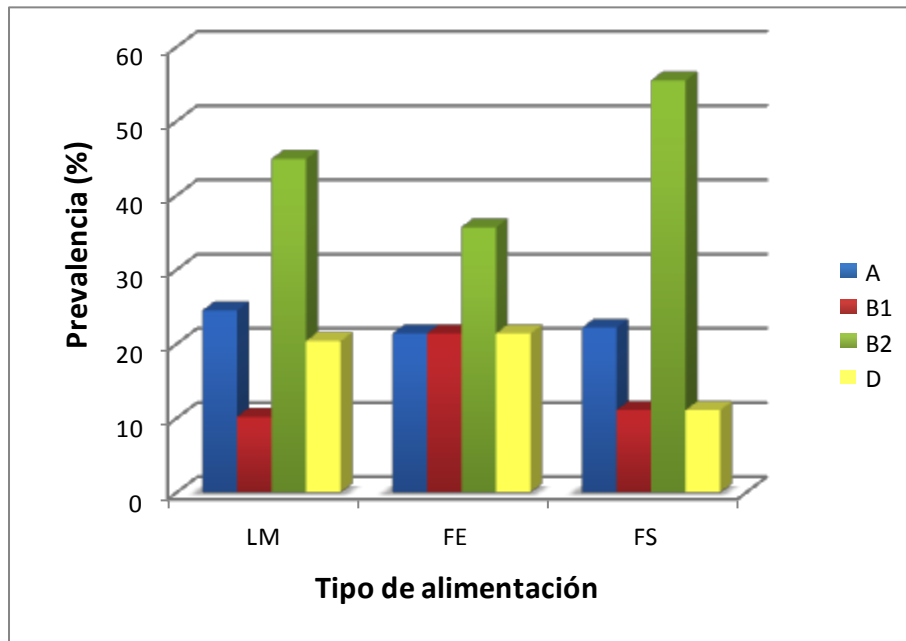
El filogrupo mayoritario fue el B2 con un 44% de los aislamientos, seguido en frecuencia por el filogrupo A y D con un 24 % y 19 % respectivamente. El menos frecuente fue el B1 con un 13% (**Figura 21**).



**Figura 21.** Distribución de los cuatro grupos filogenéticos, A, B1, B2 y D entre las cepas de *E. coli* comensales intestinales.

El filogrupo B2 fue el más frecuente independientemente de la alimentación recibida (**Figura 22**). En los niños alimentados con leche materna y fórmula suplementada, la distribución de los grupos filogenéticos fue similar siguiendo en orden de frecuencia al B2 los filogrupos A, D y B1.

Por el contrario, en el grupo de niños alimentados con fórmula estándar después del filogrupo B2, que fue el filogrupo mayoritario, no se encontraron diferencias en los porcentajes de los tres restantes filogrupos.



**Figura 22.** Distribución en los cuatro grupos filogenéticos (A, B1, B2 y D) de las cepas de *E. coli* aisladas de los diferentes neonatos según el tipo de alimentación recibida. LM= Leche materna, FE= Fórmula estándar, FS= Fórmula suplementada.

#### 4.1. Clasificación filogenética de cepas residentes y cepas transitorias

La clasificación en los cuatro grupos filogenéticos A, B1, B2 y D, de las cepas residentes y transitorias se refleja en la **Tabla 12**. No se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos, siendo el filogrupo B2 el mayoritario en ambos tipos de cepas con un 44% en cepas residentes y un 45% en cepas transitorias. El filogrupo D, el menos frecuente entre las cepas residentes (15%) fue el segundo en frecuencia entre las cepas transitorias (36%).

**Tabla 12.** Distribución filogenética de las cepas de *E. coli* residentes y transitorias en los cuatro filogrupos A, B1, B2 y D.

Filogrupos	% Cepas residentes (n)	% Cepas transitorias (n)	<sup>a</sup> p
<b>A</b>	25 (12)	9 (1)	0.426
<b>B1</b>	17 (8)	9 (1)	1.000
<b>B2</b>	44 (21)	45 (5)	1.000
<b>D</b>	15 (7)	36 (4)	0.191

Nota <sup>a</sup>p: Grado de significación estadística para cada filogrupo entre cepas residentes y transitorias.

## 5. ESTUDIO DE FACTORES DE VIRULENCIA EN AISLADOS DE *E. COLI*.

Mediante PCR múltiple se detectó la presencia en las cepas de *E. coli* de 6 genes que codifican para diferentes factores de virulencia: *sfa/foc* (codifica fimbrias S y F1C), *papA* y *papC* (subunidades estructurales de fimbrias), *afa/dra* (adhesinas Dr), *iutA* (aerobactina) y *kpsMT II* (síntesis de la cápsula). La presencia de  $\geq 2$  de estos factores permitió clasificar las cepas de *E. coli* en cepas patogénicas extraintestinales (ExPEC: *extraintestinal pathogenic Escherichia coli*), según los criterios de Johnson y col., (2004).

En 17 cepas (23.6%) no se detectó ninguno de los genes de virulencia. Con un único factor de virulencia se encontraron 33 cepas, que representaron el 45.8% del total, y el número de cepas de *E. coli* con  $\geq 2$  genes de virulencia fue de 22, lo que supuso el 30.5%. Por tanto, y atendiendo al criterio de Johnson, este último sería el porcentaje de cepas ExPEC aisladas en nuestro estudio.

El gen de virulencia más frecuente en el total de cepas de *E. coli* fue el *sfa/foc*, el 41.6% de las cepas fueron portadoras de ese gen. Por el contrario, el

gen *papC* fue el gen de virulencia menos detectado presente en sólo el 4.2% de las cepas. Es de destacar que el gen *papA*, que junto con el *papC* forman parte de subunidades estructurales de fimbrias, se detectó en el 20.8% de las cepas de *E. coli* (**Tabla 13**).

**Tabla 13.** Prevalencia de los diferentes genes de virulencia en el total de cepas de *E. coli* analizadas. Genes de virulencia: *papA* y *papC* (subunidades estructurales de fimbrias), *iutA* (aerobactina), *kpsMT II* (síntesis de la cápsula), *afa/dra* (adhesinas Dr), y *sfa/foc* (codifica fimbrias S y F1C).

Gen (factor de virulencia)	Nº de cepas de <i>E. coli</i> (%)
<i>papA</i>	10 (21)
<i>papC</i>	3 (4)
<i>iutA</i>	22 (30)
<i>kpsMT II</i>	7 (10)
<i>afa/dra</i>	6 (8)
<i>sfa/foc</i>	30 (42)

### 5.1. Clasificación filogenética de las cepas ExPEC y cepas no ExPEC.

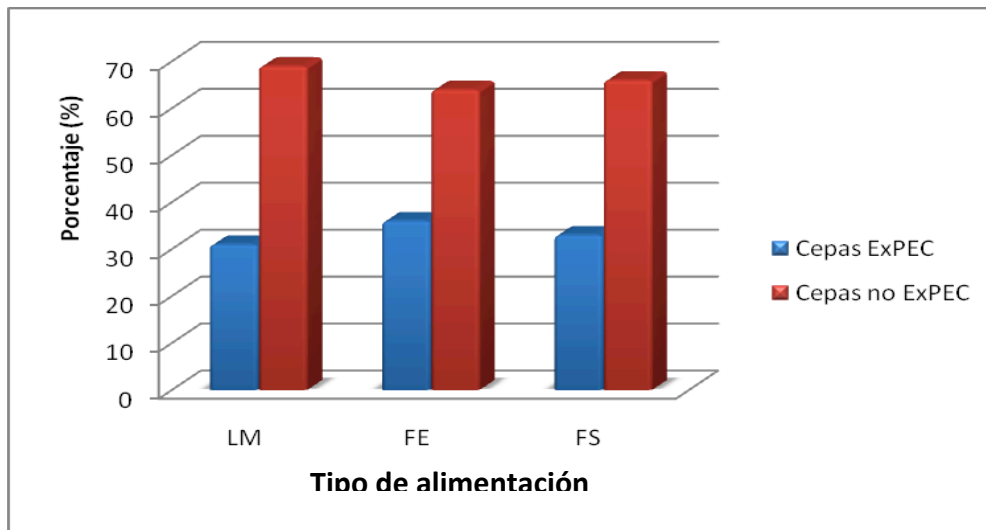
Entre las 22 cepas de *E. coli* clasificadas como ExPEC la distribución en grupos filogenéticos fue la siguiente: un 59% de las cepas (13) pertenecieron al filogrupo B2, un 27% de las cepas (6) pertenecieron al filogrupo D, un 9% (2) al filogrupo B1 y finalmente el 4% (1) al filogrupo A.

Por tanto el 86% de las cepas ExPEC intestinales de nuestro estudio estuvieron incluidas en los grupos filogenéticos B2 y D, considerados como los filogrupos más virulentos.

De las cepas no clasificadas como patógenas extraintestinales por presentar menos de 2 de los factores de virulencia estudiados (no ExPEC), nos encontramos con 17 cepas en las que no se detectaron factores de virulencia y con 33 en las que se detectó un solo factor de virulencia. En las 17 cepas sin factores de virulencia detectados, la mayoría perteneció al filogrupo A (47%), seguidas de los filogrupos B2, B1 y D, con un 23.5%, 18% y 12% respectivamente. Sin embargo en el grupo de las 33 cepas con un factor de virulencia detectado, el filogrupo mayoritario volvió a ser el B2 con un 45%, a éste le siguieron el filogrupo A, D y B1 con un 24%, 18% y 12%.

#### **5.1.1. Colonización por cepas ExPEC y cepas no ExPEC según tipo de alimentación.**

Cuando se estudió la prevalencia de colonización por cepas ExPEC y no ExPEC en niños alimentados con lactancia materna, fórmula estándar y fórmula suplementada se comprobó que la presencia de cepas ExPEC fue superior en el grupo de niños alimentados con fórmula estándar con un 36%, a éste le siguió el grupo de niños alimentados con fórmula suplementada con un 33.3% y, finalmente el grupo de niños lactados a pecho, con un 31% (**Figura 23**), aunque no existieron diferencias significativas entre los tres grupos de alimentación.



**Figura 23.** Porcentaje de cepas de *E. coli* patogénicas extraintestinales (ExPEC) y de cepas de *E. coli* no patogénicas extraintestinales (no ExPEC) aisladas en cada grupo de niños según tipo de alimentación (LM= Leche materna, FE= Fórmula estandar, FS= Fórmula suplementada).

## 5.2. Relación entre grupo filogenético y genes de virulencia en las cepas de *E. coli*

Se estudió la presencia de los diferentes genes de virulencia en las cepas de *E. coli* según su distribución en cada uno de los cuatro grupos filogenéticos. Se observó que las cepas pertenecientes a los grupos B2 y D portaban más factores de virulencia que las cepas de los grupos A y B1. El factor *iutA* fue más frecuentemente detectado en las cepas del filogrupo B1. El factor de virulencia más frecuente en las cepas del grupo B2 y del grupo D fue el *sfa/foc* (Tabla 14).

**Tabla 14.** Porcentaje y número de cepas de *E. coli* clasificadas según los cuatro grupos filogenéticos (A, B1, B2 y D) que presentaban cada uno de los genes de virulencia estudiados. Genes de virulencia: *papA* y *papC* (subunidades estructurales de fimbrias), *iutA* (aerobactina), *kpsMT II* (síntesis de la cápsula), *afa/dra* (adhesinas Dr), y *sfa/foc* (codifica fimbrias S y F1C).

Gen de virulencia	Porcentaje de cepas de <i>E. coli</i> (n)			
	Filogrupo A (n=17)	Filogrupo B1 (n=9)	Filogrupo B2 (n=32)	Filogrupo D (n=14)
<i>papA</i>	12 (2)	0	25 (8)	43 (6)
<i>papC</i>	6 (1)	0	0	14 (2)
<i>KpsMT II</i>	0	11 (1)	19 (6)	14 (2)
<i>iutA</i>	23 (4)	44 (4)	28 (9)	29 (4)
<i>afa/dra</i>	0	11(1)	16 (5)	0
<i>sfa/foc</i>	23 (4)	22 (2)	56 (18)	50 (7)

### 5.3. Distribución de los genes de virulencia en las cepas de *E. coli* residentes y cepas transitorias.

Al analizar la presencia de los genes de virulencia en las cepas clasificadas como residentes y transitorias se observó que los genes de la familia de adhesinas, *papA* y *papC*, fueron significativamente más frecuentes en cepas transitorias que en cepas residentes, con un 54% vs 16% para el gen *papA* y 18% vs 0% para el *papC*, respectivamente (**Tabla 15**). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la presencia del resto de factores de virulencia.

## V. Resultados

---

**Tabla 15.** Porcentaje y número de cepas de *E. coli* residentes y transitorias que presentaban cada uno de los genes de virulencia testados. Genes de virulencia: *papA* y *papC* (subunidades estructurales de fimbrias), *iutA* (aerobactina), *kpsMT II* (síntesis de la cápsula), *afa/dra* (adhesinas Dr), y *sfa/foc* (codifica fimbrias S y F1C).

Genes de virulencia	Porcentaje de cepas de <i>E. coli</i> (n)			
	Cepas totales	Cepas residentes (n=48)	Cepas transitorias (n=11)	<sup>a</sup> p
<i>papA</i>	14	17 (8)	54 (6)	<b>0.015</b>
<i>papC</i>	2	0	18 (2)	<b>0.032</b>
<i>kpsMT II</i>	10	12 (6)	36 (4)	0.079
<i>afa/dra</i>	5	8 (4)	9 (1)	1.0
<i>sfa/foc</i>	23	39 (19)	36 (4)	1.0
<i>iutA</i>	17	29 (14)	27 (3)	1.0

Nota <sup>a</sup>p: Grado de significación estadística para cada filogrupo entre cepas residentes y transitorias.

Como cepas ExPEC, clasificadas así por la presencia de más de dos de estos factores de virulencia, encontramos 6 cepas transitorias y 13 cepas residentes, de forma que el 54% de cepas transitorias fueron consideradas cepas ExPEC, frente al 27% de cepas residentes. Comparando estadísticamente estos valores, no se encontraron diferencias significativas.

Se comprobó la media del número de genes de virulencia en cepas residentes y transitorias obteniéndose valores de 1.1 y 1.8, respectivamente. La diferencia entre ambos valores no fue estadísticamente significativa.



#### 5.4. Clasificación filogenética de las cepas ExPEC residentes y transitorias.

En el grupo de cepas residentes, en total 13 cepas ExPEC, el filogrupo mayoritario fue el B2, representando el 54% (7) de las cepas, seguido del filogrupo D con un 23% (3). Al filogrupo B1 pertenecieron un 15% de las cepas y finalmente al filogrupo A, el menos detectado, un 8% (1). En el grupo de cepas transitorias, el número de cepas consideradas como cepas ExPEC fue de 6, estando éstas representadas en un 66% por el filogrupo B2 y en un 33% por el filogrupo D.

#### 6. ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE LAS ENTEROBACTERIAS COLONIZANTES EN NIÑOS.

Se estudió la actividad de diferentes antibióticos frente a los aislados de las Enterobacterias comensales (**Tabla 16**).

**Tabla 16.** Porcentaje de resistencia a diferentes antibióticos de Enterobacterias comensales así como porcentaje de cepas portadoras de BLEEs.

Antibióticos	<i>E. coli</i> (n=72)	<i>Klebsiella spp.</i> (n=123)	<i>Enterobacter</i> <i>spp.</i> (n=16)	<i>Citrobacter</i> <i>spp.</i> (n=6)
Ampicilina	47	100	100	100
Amoxicilina-clavulánico	8	0	100	100
Cefalotina	18	3	100	100
Cefuroxima	4	3	100	100
Cefotaxima	3	0	0	0
Cefatazidima	3	0	0	0
Cefepime	3	0	0	0

## V. Resultados

---

<b>Piperacilina-tazobactam</b>	1	0	0	0
<b>Ac. Nalidíxico</b>	25	0	6	0
<b>Ciprofloxacino</b>	10	0	0	0
<b>Cotrimoxazol</b>	25	0	0	0
<b>BLEEs</b>	3	0	0	0

Los antibióticos más activos frente a todas las especies estudiadas fueron los aminoglucósidos (gentamicina, tobramicina y amikacina) y los carbapenems (meropenem e imipenem) en los que la sensibilidad fue del 100% independientemente del tipo de Enterobacteria.

Las cepas de *E. coli* presentaron una alta tasa de resistencia a ampicilina ya que prácticamente la mitad de las cepas (47%) fueron resistentes a dicho antibiótico. Después de la ampicilina, fue la cefalotina el segundo betalactámico con más resistencias (18%), le siguieron la amoxicilina-clavulánico y la cefuroxima con un 8% y 4% respectivamente. Finalmente las resistencias frente a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación (cefotaxima, ceftazidima y cefepime) fueron del 3%, estando este porcentaje representado por las cepas de *E. coli* que fueron productoras de BLEEs (betalactamasas de espectro extendido).

En cuanto a la actividad de quinolonas, cabe destacar que el 25% de las cepas fueron resistentes al ácido nalidíxico, y de éstas, el 10% presentaron resistencia a ciprofloxacino. Un 25% de las cepas de *E. coli* fueron resistentes al cotrimoxazol. La tasa de resistencia más baja correspondió a la piperacilina-tazobactam, con un 1% de cepas resistentes a dicho antibiótico.

Del resto de especies aisladas, en su mayoría, las resistencias encontradas eran las correspondientes a sus fenotipos de resistencias intrínsecas, es decir, en el caso de *Klebsiella spp.* (n=123), el 100% resistentes a ampicilina, y

*E. cloacae* (n=16), *Citrobacter spp.* (n=6), *M. organii* (n=1), y *Serratia spp.* (n=1), el 100% resistentes a ampicilina, amoxicilina-clavulánico, cefalotina y cefuroxima. El 3% de las cepas de *Klebsiella spp.* fueron resistentes a cefalotina y cefuroxima. No se encontraron resistencias entre las cepas de *P. mirabilis* a ninguno de los antibióticos testados.

Cuando se estudiaron los perfiles de resistencia entre las cepas de *E. coli* comensales, sólo 29 (40%) fueron sensibles a todos los antibióticos testados y, por tanto un 60% presentaron resistencia a uno o más antibióticos. De las 15 cepas que presentaron resistencia a un sólo antibiótico (35%), un 12 % (9 aislamientos) lo fueron a ampicilina, un 3% (2 aislamientos) sólo resistentes a cotrimoxazol, y 5% (4 aislamientos) a ácido nalidíxico. Ninguna de estas cepas resistentes a ácido nalidíxico lo fueron a ciprofloxacino.

El resto de aislamientos de *E. coli* presentaban resistencias como mínimo a dos antibióticos. De esta forma, y frente a los antibióticos más comúnmente utilizados, encontramos resistencias a ampicilina y cotrimoxazol en 6 aislamientos (8%), y a ampicilina-ciprofloxacino en 1 aislamiento (1%). Solamente se encontró 1 cepa resistente a los tres antibióticos, lo que supuso un 1%. La triple resistencia se observó a ampicilina, cotrimoxazol y ciprofloxacino. Finalmente las cepas de *E. coli* resistentes a más de tres antibióticos fueron aquellas productoras de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEEs).

Se encontraron 2 cepas portadoras de BLEEs (3%). Se caracterizaron molecularmente por PCR, resultando en una cepa una BLEE tipo SHV, y en la otra cepa una BLEE tipo CTX-M y otra TEM. Tras la secuenciación, los tipos específicos de BLEEs resultaron una SHV-12 y una CTX-M 14, ya que la tipo TEM-1 no es considerada realmente una BLEE. Relacionando el tipo de alimentación con las resistencias, observamos que estas dos cepas portadoras de BLEEs se aislaron de la flora intestinal de neonatos que habían sido alimentados con lactancia materna.

### 6.1. Relación grupo filogenético-resistencia antimicrobiana.

Las resistencias a antibióticos de las cepas de *E. coli* fue analizada según el grupo filogenético (**Tabla 17**).

**Tabla 17.** Resistencias de cepas de *E. coli* según el filogrupo.

Antimicrobianos	Número (%) de <i>E. coli</i> comensales resistentes			
	Grupo A (n=17)	Grupo B1 (n=9)	Grupo B2 (n=32)	Grupo D (n=14)
<b>Ampicilina</b>	6 (46) <sup>b</sup>	3 (33) <sup>b</sup>	13 (41)	12 (86) <sup>a</sup>
<b>Ac. Nalidíxico</b>	3 (18)	3 (33)	7 (22)	5 (36)
<b>Ciprofloxacino</b>	1 (6)	2 (22)	3 (9)	1 (7)
<b>Cotrimoxazol</b>	4 (23)	2 (22)	5 (16) <sup>a</sup>	7 (50) <sup>b</sup>

<sup>a, b</sup> superíndices diferentes entre los grupos indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Las cepas pertenecientes al filogrupo D fueron las más resistentes, con el 86% de los aislamientos resistentes a ampicilina, el 36% a ácido nalidíxico y el 50% resistentes a cotrimoxazol. Hubo diferencias estadísticamente significativas con respecto a la sensibilidad entre las cepas pertenecientes a los filogrupo A-D y, B1-D, concretamente con la ampicilina (A-D,  $p=0,009$ , y B1-D,  $p=0,023$ ), y entre las cepas de los filogrupos B2-D con respecto al cotrimoxazol (D-B2,  $p=0,015$ ).

Además de comparar los porcentajes de resistencias entre los diferentes filogrupos, se estudió de forma individual si por pertenecer a algún filogrupo había una asociación estadísticamente significativa a la resistencia de algún

antibiótico concreto. Para ello se compararon los aislamientos sensibles y resistentes de cada antibiótico atendiendo al filogrupo (**Tabla 18**).

**Tabla 18.** Número y porcentaje de cepas de *E. coli* sensibles y resistentes a ampicilina, ácido nalidíxico, ciprofloxacino y cotrimoxazol en cada uno de los grupos filogenéticos.

Grupo filogenético	No. (%) de cepas/ ampicilina			No. (%) de cepas/ Ác. Nalidíxico		No. (%) de cepas/ ciprofloxacino		No. (%) de cepas/ cotrimoxazol		
	S (n=38)	R (n=34)	$p^b$	S (n=54)	R (n=18)	S (n=65)	R (n=7)	S (n=54)	R (n=18)	$p^b$
<b>A</b>	11(29)	6 (18)	NS	14(26)	3 (17)	16(25)	1(14)	13(24)	4(22)	NS
<b>B1</b>	6 (16)	3 (9)	NS	6 (11)	3 (17)	7 (11)	2(29)	7 (13)	2(11)	NS
<b>B2</b>	19(50)	13(38)	NS	25(46)	7 (39)	27(45)	3(43)	27(50)	5(28)	NS
<b>D</b>	2 (5)	12(35)	<b>0.002</b>	9 (17)	5 (28)	13(20)	1(14)	7 (13)	7(39)	<b>0.016</b>

Nota  $p^b$ : Grado de significación estadística para cada filogrupo entre cepas sensibles y resistentes.

Se comprobó que los aislamientos ampicilina-resistentes y los cotrimoxazol-resistentes estaban estadísticamente asociados con el grupo filogenético D (ampicilina  $p=0.002$ , y cotrimoxazol  $p=0.016$ ).

## 7. COMPARACIÓN DE CEPAS COMENSALES INTESTINALES DE *E. COLI* CON CEPAS PATÓGENAS AISLADAS DE BACTERIEMIAS EN NEONATOS.

Se realizó un estudio comparativo entre las características (resistencia a antibióticos, filogrupo y presencia de factores de virulencia) de dos grupos de cepas de *E. coli* aisladas en neonatos: 51 cepas comensales y 19 cepas aisladas de hemocultivos de niños con cuadros de sepsis.

### 7.1. Distribución de grupos filogenéticos y de factores de virulencia entre aislamientos comensales y patógenos de *E. coli*.

El filogrupo B2 fue el grupo más frecuente tanto en cepas comensales como en cepas patógenas (47% vs 63.2%), sin ser esta diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.231$ ). Tampoco existieron diferencias cuando se compararon los porcentajes de cepas pertenecientes a los filogrupos D y B1, en ambos grupos.

No se encontraron entre las cepas patógenas ninguna clasificada como filogrupo A, representado un 25.5% del total de cepas comensales ( $P= 0.014$ ) (Tabla 19).

La presencia de determinados factores de virulencia (*papA*, *papC*, *kpsMT II*, *afa/dra*, *sfa/foc* y *iutA*), fue variable dependiendo del grupo de cepas. Las cepas patógenas versus las cepas comensales, presentaron con más frecuencia los genes *papA* (31% vs. 18%), *papC* (47% vs. 0) y *iutA* (68% vs. 29%) y la combinación *papA* / *papC* (53% vs. 18%), siendo las diferencias significativas para *papC* ( $p < 0.000$ ), *iutA* ( $p=0.003$ ) y para la combinación *papA* / *papC* ( $p=0.003$ ). En contraste, los aislados comensales intestinales presentaban con más frecuencia que los aislados patógenos los genes de virulencia *KpsMT II*, *afa/dra* and *sfa/foc*, pero en este caso las diferencias entre ambos grupos no fueron significativas (Tabla 19).

**Tabla 19.** Número y porcentaje de cepas de *E. coli* comensales y patógenas que pertenecen a cada uno de los cuatro filogrupos, y número y porcentaje de cepas en ambos grupos que presentan cada uno de los genes de virulencia testados. Así como el grado de significación estadística obtenido al comparar las variables filogrupos y genes de virulencia en cepas comensales y patógenas.

Nº (%) de cepas de <i>E. coli</i>				
<b>Filogrupos</b>	<b>Total (n=70)</b>	<b>Cepas comensales (n=51)</b>	<b>Cepas patógenas (n=19)</b>	<b>P</b>
<b>A</b>	13 (18.6)	13 (25.5)	0 (0)	<b>0.014</b>
<b>B1</b>	9 (12.8)	6 (11.76)	3 (15.8)	0.696
<b>B2</b>	36 (51.4)	24 (47)	12 (63.2)	0.231
<b>D</b>	12 (17.1)	8 (15.6)	4(21)	0.723
<b>Genes de virulencia</b>	<b>Total (n=70)</b>	<b>Cepas comensales</b>	<b>Cepas patógenas</b>	<b>P</b>
<i>papA</i>	15 (21.4)	9 (18)	6 (31)	0.206
<i>papC</i>	9 (12.8)	0	9 (47)	<b>&lt; 0.000</b>
<i>kpsMT II</i>	8 (11.4)	6 (12)	2 (10)	1.000
<i>afa/dra</i>	6 (8.6)	5 (10)	1 (5)	1.000
<i>sfa/foc</i>	26 (37.1)	22 (43)	4 (21)	0.104
<i>lutA</i>	28 (40)	15 (29)	13 (68)	<b>0.003</b>
<i>papA y papC</i>	19 (27.1)	9 (18)	10 (53)	<b>0.003</b>

También se observaron diferencias en el número de genes de virulencia que cada grupo presentaba. La media obtenida en el grupo de aislados de sangre era significativamente más alta que la obtenida entre los aislamientos comensales intestinales (1.8 vs 1.1;  $p=0.002$ ).

## 7.2. Resistencias a antibióticos.

Se estudiaron las diferencias en porcentajes de resistencias a los siguientes antibióticos: ampicilina, cotrimoxazol, ácido nalidíxico y ciprofloxacino.

De las 51 cepas comensales, 24 (47%) fueron resistentes a ampicilina, 11 (21.6%) resistentes a cotrimoxazol, 12 (23.5%) resistentes a ácido nalidíxico y 5 (9.8%) resistentes a ciprofloxacino. En el grupo de cepas patógenas, 12 cepas fueron resistentes a ampicilina (63.2%), 5 resistentes a ácido nalidíxico (26.3%), y 4 cepas resistentes a ciprofloxacino (21%) y a cotrimoxazol (21%). Las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Además, en ambos grupos se detectaron cepas de *E. coli* productoras de BLEEs, un 2% en el grupo de cepas comensales y un 5.3% en el grupo de cepas patógenas. La caracterización de las BLEEs resultó una CTX-M14 y una SHV-12 en el grupo de cepas comensales, y una CTX-M14 en el grupo de las cepas patógenas. Tampoco existieron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la presencia de cepas productoras de BLEEs entre ambos grupos de cepas ( $p=0.472$ ).