

De los primeros microorganismos que proliferan en la flora intestinal se encuentran los pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, siendo bacterias aisladas comúnmente de las heces a los pocos días del nacimiento (Rotimi, 1981; Sakata y col., 1985).

Entre los niños incluidos en nuestro estudio, el 97% estaban colonizados por diferentes especies de Enterobacterias durante los primeros días de vida. Este elevado porcentaje de colonización se mantuvo prácticamente constante en los cuatro periodos de tiempo estudiados, desde el primero, realizado a los 12-15 días de vida del niño hasta el último, aproximadamente a los tres meses.

Además, se observó que el tipo de alimentación no influyó en los porcentajes de colonización por Enterobacterias, siendo estos similares en los tres grupos de niños estudiados que recibieron diferente alimentación, lactancia materna, fórmula estándar y fórmula suplementada. El mayor porcentaje de niños colonizados por bacilos gramnegativos se encontró en el grupo de niños alimentados con fórmula estándar alcanzando el 100% en todos los grupos de edad.

Habría que destacar que, a pesar de que las diferencias entre los porcentajes de niños colonizados por bacilos gramnegativos entre los diferentes grupos de alimentación no fueron estadísticamente significativas, se observó una tendencia en el grupo de niños alimentados con fórmula artificial, sobre todo con fórmula estándar, a poseer mayores porcentajes de colonización por Enterobacterias, tal y como otros autores refieren (Orrhage y Nord, 1999; Fanaro y col., 2003).

Estos estudios realizados sobre la flora intestinal de niños alimentados con lactancia materna o con fórmula artificial estándar no enriquecida describen que durante el inicio, en los primeros días de vida del neonato, la colonización por Enterobacterias es comparable en ambos grupos de alimentación, a

diferencia de lo que observan transcurrido el primer mes de vida, donde la colonización por Enterobacterias en el grupo de fórmula sigue siendo similar a la de los primeros días de vida, mientras que desciende en el grupo de lactancia materna, aumentando en este último grupo la colonización por Bifidobacterias. En una revisión sistemática realizada por Alderberth y Wold (2009) se muestra que 11 de los 20 estudios analizados encontraron porcentajes de colonización por Enterobacterias inferiores en el grupo de leche materna respecto a los alimentados con fórmula. Sin embargo en 9 estudios no aparecieron diferencias.

Entre las diferentes especies de Enterobacterias, *Escherichia coli* es una de las primeras especies que colonizan el tracto intestinal. En nuestro estudio se observó que en los primeros días de vida, el 74% de los recién nacidos habían adquirido *E. coli*. Si comparamos estos porcentajes de colonización con los descritos por otros autores, como por ejemplo Nowrouzian y col., (2003), que observaron un porcentaje de colonización a los 3 días de vida del 42%, o en los estudios de Hewitt y Rugby (1976), Feeney y col., (1980), donde observaron valores de colonización en torno al 70%, concluimos que el porcentaje de colonización por *E. coli* de los niños de nuestro ensayo fue ligeramente más elevado que en el estudios anteriores. Este alto porcentaje de colonización inicial por *E. coli* en los niños incluidos en nuestro estudio puede deberse a varios factores, entre ellos la adquisición a partir de la flora vaginal materna en el canal del parto, ya que todos los niños nacieron por vía vaginal, unido a la influencia de la exposición medioambiental.

La procedencia de las Enterobacterias, fundamentalmente de *E. coli* como principal componente del tracto intestinal del neonato es un aspecto discutido desde hace décadas. Varios autores demostraron que parte de las *cepas de E. coli* que adquirirían los recién nacidos procedían de sus madres (Gareau y col., 1959), y que era el tipo de parto el factor influyente en dicha adquisición, ya que Nowrouzian y col., (2003), observaron que un 45% de los niños nacidos por vía vaginal fueron colonizados por *E. coli* al tercer día de vida, frente al 12% de los

que nacieron por cesárea. Mändar y Milkersaar (1996), incluso describieron que en el 85% de las parejas madre/recién nacidos estudiadas se aislaban microorganismos similares. Otros autores sin embargo, señalan una baja tasa de transmisión de microorganismos de la madre al recién nacido, de manera que sólo un tercio de los niños estaban colonizados por cepas de *E. coli* de origen materno (Gotheffors y col., 1976).

Tras el periodo inicial, en el segundo periodo, a los 26-29 días de vida, el porcentaje de colonización por *E. coli* en los neonatos disminuyó, quizás resultado de una fase de adaptación entre las cepas adquiridas de la flora materna y la adquisición de flora ambiental. Posteriormente, en el resto de momentos estudiados, este porcentaje de colonización aumentó, desde el 78% en el tercer periodo, hasta finalmente, a los tres meses tras el nacimiento, un 90%, sin ser la diferencia con el porcentaje inicial (74%) estadísticamente significativa. Probablemente en periodos de tiempo más avanzados se habría alcanzado el 100% de colonización por *E. coli*, tal y como ocurrió en niños con un año de vida en el estudio de Nowrouzian y col., (2003), donde el porcentaje de colonización por *E. coli* en los niños aumentó progresivamente desde un 42% a los dos días del nacimiento, a un 61% a los dos meses, un 77% a los 6 meses y finalmente a un 99% en el primer año de vida.

Cuando se tuvo en cuenta la influencia del factor de la alimentación, en los porcentajes de colonización por *E. coli* a lo largo de los cuatro periodos de estudio, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, indicando que el tipo de alimentación no influía en la mayor o menor adquisición de cepas de *E. coli* en cada grupo de niños.

A pesar de observar en los primeros periodos de muestreo que los porcentajes de colonización por *E. coli* de los niños alimentados con fórmula suplementada fueron menores a los alimentados con fórmula estándar, y similares a los porcentajes de colonización de niños alimentados con lactancia materna, estas diferencias no se mantuvieron. Hay que resaltar que, en el último

periodo de estudio donde quizás los valores sean más concluyentes puesto que el efecto de la alimentación sobre la colonización sería más patente, los porcentajes de los tres grupos fueron prácticamente similares, siendo del 100%, tanto en el grupo de niños alimentados con fórmula estándar como con fórmula suplementada.

Las diferencias encontradas en los primeros periodos estudiados entre los porcentajes de colonización de los niños alimentados con lactancia materna, fórmula estándar y fórmula suplementada, coinciden con los encontrados por Penders y col., (2005) en neonatos al mes de vida, donde observaron que los niños alimentados con lactancia materna tenían menos *Clostridium difficile* y *E. coli* en sus heces comparados con los alimentados con una fórmula artificial no suplementada.

Cuando se estudió la composición de la flora intestinal de los neonatos se encontró que en ocasiones *E. coli* era la única especie de bacilo gramnegativo que formaba la flora intestinal, aunque en la mayoría de los niños *E. coli* formaba parte de una flora de bacilos gramnegativos mixta, acompañada por otras Enterobacterias.

Excepto en el grupo de niños alimentados con fórmula suplementada, donde siempre se encontró flora mixta de *E. coli* con otras Enterobacterias, en los otros dos grupos se observó que a medida que avanzaba el periodo de estudio los porcentajes de colonización por flora mixta iban en aumento. Estos porcentajes fueron siempre mayores en los grupos de niños alimentados con fórmulas artificiales, con respecto a los alimentados con lactancia materna.

En este sentido hay estudios que describieron que, tras la colonización inicial por determinadas Enterobacterias, la leche materna podría ejercer un efecto supresor a la hora de adquirir cepas adicionales para constituir flora mixta (Bullen y Willis, 1971; Bullen y col., 1972), contribuyendo a que cepas ya

establecidas interaccionarían desfavorablemente para las nuevas bacterias colonizantes (Goldman, 1981; Goldman , 1988).

Adicionalmente, la composición de Enterobacterias que formaba parte junto a *E. coli* de la flora intestinal de los niños, fue más heterogénea en el grupo de niños alimentados con fórmulas infantiles que en el de niños lactados a pecho. Previamente ya se había demostrado que niños alimentados con lactancia materna presentan una flora más homogénea, ya que suelen estar menos colonizados por otras Enterobacterias diferentes a *E. coli* que los alimentados con fórmula (Örskov y col., 1975; Balmer y Wharton, 1989). Así Balmer y Wharton, que estudiaron la flora fecal de niños alimentados con lactancia materna y de niños alimentados con fórmula artificial a los 4, 14 y 28 días de vida, observaron que mientras que en el grupo de lactancia materna otras Enterobacterias diferentes a *E. coli* no aparecieron hasta los 28 días, en el grupo de niños alimentados con fórmula a los 4 y 14 días ya se detectaron otras Enterobacterias.

Aunque lo frecuente fue encontrar *E. coli* en la flora intestinal de los neonatos hubo niños, tanto entre los alimentados con lactancia materna como entre los alimentados con fórmula artificial, en los que especies diferentes a *E. coli* formaban su flora intestinal.

Los recuentos de Enterobacterias en la flora intestinal de los niños a lo largo del periodo de estudio se situaron en torno a una media de 8.5 log ufc/g heces. Analizando los recuentos de Enterobacterias en los diferentes intervalos de tiempo, se observó que los valores variaron ligeramente pero sin llegar a ser significativas, por lo que se puede concluir que las poblaciones de Enterobacterias en las heces de los neonatos durante los tres primeros meses de vida permanecieron estables.

En los primeros días de vida, Fanaro y col., (2003), refirieron niveles iniciales de Enterobacterias en torno a 9 log ufc/g heces, valores por tanto

ligeramente superiores a los nuestros (8.8 log ufc/g heces). Otros autores (Nakamura y col., 2009), detectan recuentos inferiores que se sitúan en torno a 7.5 log ufc/g heces.

También destacar que, en el segundo periodo de muestreo, entre los 26 y 29 días tras el nacimiento, los recuentos poblacionales de Enterobacterias disminuyeron. Esta disminución pudo ser resultado de la fase de adaptación que la flora experimenta en el proceso inicial de la colonización, donde los componentes de la misma compiten e interaccionan entre sí para el establecimiento de una microflora estable. En este sentido hay estudios que describen que las poblaciones de las bacterias facultativas, como lo son las Enterobacterias, disminuyen a medida que la microflora anaeróbica llega a ser más compleja, y que este hecho ocurre alrededor de las primeras semanas de vida (Freter 1992, Adlerberth 1999). Este dato coincide con lo descrito en referencia a la flora fecal anaerobia de los neonatos de nuestro estudio (Vasallo, 2010), donde los recuentos de la población anaerobia en el segundo periodo de muestreo aumentaron coincidiendo en el tiempo con la disminución en los niveles de Enterobacterias.

Cuando se tuvo en cuenta la influencia de la alimentación sobre los recuentos de Enterobacterias entre los tres grupos de niños se encontraron algunas diferencias. Los recuentos más altos en los cuatro periodos de muestreo se alcanzaron en los niños alimentados con fórmula estándar, siendo esta diferencia estadísticamente significativa con respecto a los de lactancia materna al final del estudio, aproximadamente a los tres meses. Este hallazgo ya se observó en 1983, cuando Yoshioka y col., estudiaron el desarrollo de la flora fecal en niños alimentados con lactancia materna y con fórmula infantil desde el día 2 tras el nacimiento hasta el primer mes de vida, siendo además las diferencias significativas al final de su periodo de estudio, que fue de un mes. Posteriormente, otros autores también han corroborado estos datos de

recuentos de Enterobacterias más bajos en niños alimentados con lactancia materna (Balmer y Wharton, 1989; Penders y col., 2005; Penders y col., 2006).

Sin embargo los recuentos de Enterobacterias de los grupos de niños alimentados con leche materna y con fórmula suplementada fueron similares. Por tanto estos datos pueden sugerir que las fórmulas infantiles enriquecidas con ingredientes como la alfa-lactoalbúmina o los nucleótidos influyen en la colonización por estos microorganismos de una forma similar a como lo hace la alimentación con leche materna. De forma semejante, Rochat y col., (2007), en el estudio realizado con una fórmula enriquecida con alfa-lactoalbúmina no obtuvieron diferencias significativas en los recuentos de Enterobacterias entre los niños lactados a pecho y con la fórmula suplementada.

Entre los dos grupos de fórmula artificial, aunque no existieron diferencias significativas, los recuentos de Enterobacterias fueron claramente superiores en el grupo de fórmula estándar con respecto a la suplementada. En otros estudios realizados por Moro y col., (2002), y Fanaro y col., (2005), tampoco se encontraron diferencias significativas en el recuento de Enterobacterias entre dos grupos de fórmula, una suplementada con prebióticos (mezcla de GOS/FOS).

Sin embargo un estudio reciente en el que también se analizaban los recuentos de Enterobacterias entre tres grupos de alimentación similares a los nuestros, uno de lactancia materna, y otros de fórmula infantil control y otra enriquecida con carbohidratos prebióticos, observaron que al final de su periodo de estudio, cuya duración fue de 28 días, los recuentos de Enterobacterias fueron semejantes en todos los grupos de alimentación (Nakamura y col., 2009). Algo inesperado fue que al comienzo observaron niveles de Enterobacterias significativamente más altos en el grupo de niños alimentados con lactancia materna con respecto a los de fórmula, algo no descrito anteriormente en la literatura. Pero al final del estudio concluyeron que ni los carbohidratos prebióticos, ni los oligosacáridos de la leche materna influyeron en el

crecimiento de las Enterobacterias. Quizás si el estudio de Nakamura y col., (2009), se hubiera prolongado en el tiempo, más allá de los primeros 28 días de vida de los niños, los resultados podrían haber sido diferentes.

Los recuentos poblacionales de *E. coli*, aunque fueron inferiores, siguieron una evolución similar al de las Enterobacterias globales en los diferentes periodos estudiados. Cuando se analizó la influencia del tipo de alimentación se observaron algunas diferencias en dichos recuentos. Estas diferencias entre los recuentos de *E. coli* fueron significativas al inicio del estudio entre los dos grupos de niños alimentados con fórmula infantil. Al final del estudio, a los tres meses, se encontraron también diferencias significativas entre los grupos de lactancia materna y fórmula estándar, y entre los dos grupos de fórmula, estándar y suplementada. Los recuentos fueron siempre más altos en el grupo de niños alimentados con fórmula estándar, y los más bajos se encontraron en el grupo de fórmula suplementada.

Datos similares a estos fueron observados en el estudio de Brück y col., (2006), donde encuentran diferencias significativas para los recuentos de *E. coli* entre los niños alimentados con lactancia materna, una fórmula estándar, y otra suplementada, observando que los recuentos eran más altos en los niños alimentados con fórmula estándar, mientras que en su estudio los niños alimentados a pecho presentaban los recuentos más bajos. Sin embargo, Ben y col., (2004), no encontraron diferencias entre los recuentos de *E. coli* entre una fórmula suplementada y otra no suplementada.

Junto a *E. coli*, otras especies de Enterobacterias también colonizan el intestino del neonato durante las primeras semanas de vida. Anteriormente algunos autores describieron que además de *E. coli* otras especies de los géneros *Klebsiella* y *Enterobacter* se aíslan frecuentemente en heces de recién nacidos (Eriksson y col., 1982; Tullus y col., 1988). En nuestro estudio, aparte de las especies mayoritarias, que fueron *E. coli* y *Klebsiella spp.*, el resto de

Enterobacterias aisladas fueron *E. cloacae*, *P. mirabilis* y *Citrobacter spp.* También se aislaron especies como *M. morganii*, y *Serratia spp.*, pero éstas aparecieron de forma puntual.

En cuanto a la distribución por especies de Enterobacterias, *E. coli* y *Klebsiella spp.*, llegaron a representar la práctica totalidad de las enterobacterias, aproximadamente el 90%. De estas dos, el aislamiento de *E. coli* en las heces de los neonatos siempre fue superior al de *Klebsiella spp.* en todos los periodos de muestreo estudiados, representando el resto de especies de Enterobacterias aisladas porcentajes inferiores.

La colonización intestinal por diferentes especies de Enterobacterias está influenciada por diversos factores, entre los que figuran el tipo de parto, la edad gestacional, la hospitalización del neonato, el uso previo de antibióticos por el niño y el tipo de alimentación (Penders y col., 2006).

En un estudio llevado a cabo sobre niños pakistaníes nacidos por cesárea se demostró que eran colonizados además de por *E. coli*, por especies del género *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter* (Adlerberth y col., 1991).

La hospitalización también es un factor importante en la colonización por Enterobacterias diferentes a *E. coli*, así por ejemplo en un estudio sobre la epidemiología de las Enterobacterias de niños procedentes de unidades neonatales vieron que las cepas de *Klebsiella spp.* eran dos veces más común a las de *E. coli* como especies colonizantes intestinales (Tullus y col., 1988).

Otro factor es el uso previo de antibióticos en el neonato. Adlerberth (1999), observó que el principal efecto de éstos sobre el patrón de colonización intestinal en el neonato fue una importante supresión de bacterias anaerobias, con la excepción de *Clostridium spp.*, y un incremento en los niveles de especies del género *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, y *Pseudomonas*, y disminución en los niveles de *E. coli*.

Cuando se estudió la diferencia en la distribución de especies de Enterobacterias según el grupo de alimentación recibida, se observó que en los recién nacidos alimentados con lactancia materna los porcentajes de las dos especies mayoritarias, *E. coli* y *Klebsiella spp.*, fueron superiores a los encontrados en los recién nacidos alimentados con ambas fórmulas. Por tanto, en estos dos grupos, otras especies de Enterobacterias se aislaron en mayor proporción. La combinación de las dos especies mayoritarias representó el 93% del total de las Enterobacterias en el grupo de lactancia materna frente al 84% en los grupos de fórmula estándar y suplementada. Hay que destacar que en el grupo de niños alimentados con fórmula suplementada, el porcentaje de cepas de *Klebsiella spp.* aisladas durante los dos primeros intervalos de edad del neonato fue ligeramente superior al de *E. coli*. Respecto a otras Enterobacterias, algo común en los tres grupos fue la presencia de *E. cloacae* y *Citrobacter spp.*, apareciendo además en todos los intervalos de edad, desde el inicio hasta el final del estudio. Sin embargo, Adlerberth y col., en 1991, observaron que en niños que habían sido alimentados con lactancia materna durante los primeros días de vida, el riesgo de una temprana colonización por especies del tipo *Klebsiella/Enterobacter/Citrobacter* disminuía.

Durante los estudios de colonización realizados, aparte de todas las especies de Enterobacterias, otros bacilos gramnegativos aerobios fueron encontrados en las heces de algunos niños, aunque fue algo puntual. De las tres especies aisladas, *S. maltophilia*, *A. lowfii* y *P. aeruginosa*, y siempre formando parte de flora mixta con otras Enterobacterias, *S. maltophilia* y *P. aeruginosa* fueron aisladas de niños lactados a pecho, mientras que *A. lowfii* fue aislada de niños del grupo de fórmula estándar. Debido a la escasa frecuencia de aislamiento de estas especies de bacilos gramnegativos diferentes de Enterobacterias no se llegó a ninguna conclusión, más que a su excepcional presencia en las heces de algunos neonatos. Algunos autores hacen referencia a la presencia de *P. aeruginosa* como un colonizante intestinal (Feeney y col., 1980; Borderon y col., 1990; Ohara e Itoh, 2003).

En el presente estudio se caracterizaron y tipificaron las cepas de *E. coli* con el fin de conocer la media de cepas colonizadas por niño así como su dinámica de colonización o capacidad de persistencia en la microflora intestinal de los mismos. Una vez colonizados, el número medio de cepas de *E. coli* por niño durante los tres primeros meses de vida fue de 1.3, datos similares a los encontrados por Nowrouzian y col., (2003), que a los seis primeros meses de vida presentan una media de 1.5 cepas por niño. En contraste a ambos, otros estudios muestran una media muy superior, con valores de 4.2 (Kühn y col., 1986) y 8.5 (Adlerberth y col., 1998).

En relación a la dinámica de colonización, y sin tener en cuenta el factor alimentación, la mayoría de las cepas de *E. coli*, el 81%, fueron clasificadas como residentes, según los criterios de Nowrouzian, ya que el tiempo de permanencia en la flora intestinal fue superior a 3 semanas (Nowrouzian y col., 2003), por lo que claramente predominaron las cepas de *E. coli* residentes frente a las transitorias (81% vs 19%). De las cepas residentes, el 52% permanecieron en la flora de los neonatos durante todo el periodo de estudio. En conjunto con todos los datos anteriores, llegamos a la conclusión de que la mayoría de los niños de nuestro estudio a los tres meses de vida ya habían adquirido una flora estable de *E. coli*.

El tipo de alimentación tuvo influencia en la capacidad de persistencia de las cepas de *E. coli*. La dinámica de colonización por cepas de *E. coli* en niños alimentados con fórmula suplementada fue similar a la encontrada en el grupo de niños lactados a pecho. En ambos grupos los porcentajes de cepas residentes fueron muy superiores a los de cepas transitorias. Este hallazgo indicaría por tanto a una flora más estable y a su vez más homogénea en los neonatos alimentados con lactancia materna y fórmula suplementada, ya que la presencia de cepas transitorias, y por tanto de cepas que permanecen en la flora por un tiempo inferior a tres semanas, implica una cierta heterogeneidad en la flora intestinal. En el grupo de fórmula estándar, la diferencia entre los porcentajes de

cepas residentes y transitorias fue mínima. No existe hasta el momento ningún estudio que relacione la capacidad de persistencia de las cepas de *E. coli* con el tipo de alimentación.

Los clones de *E. coli* están clasificados en cuatro grupos filogenéticos denominados A, B1, B2 y D. Estos cuatro filogrupos fueron identificados en función de la variación alélica de genes codificantes de enzimas detectadas por “multilocus enzyme electrophoresis” (Herzer y col., 1990). La importancia de conocer la distribución filogenética de las cepas de *E. coli* radica en que se ha observado que las diferencias entre *E. coli* patógenas y comensales se correlacionan con sus antecedentes filogenéticos (Moreno y col., 2006).

En nuestro estudio, en la distribución filogenética de las cepas de *E. coli* de neonatos, observamos una alta proporción (44%) de las cepas pertenecientes al grupo filogenético B2, seguido por el filogrupo A (24%), D (19%) y finalmente el B1 (13%). Una posible explicación a que el filogrupo B2 sea el mayoritario es que se ha demostrado que las cepas de *E. coli* que colonizan la vagina de mujeres embarazadas predominantemente pertenecen a este filogrupo (Obata-Yasuoka y col., 2002). En este sentido parece que la vagina de la mujer embarazada y el líquido amniótico son dos barreras que favorecen la selección de poblaciones de *E. coli* del filogrupo B2 (Watt y col., 2003), por tanto, se deduce que en partos vía vaginal se favorecería la adquisición en el recién nacido de poblaciones de *E. coli* de este filogrupo.

A pesar de que la distribución filogenética de cepas de *E. coli* puede estar influenciada por varios factores tales como genéticos, geográficos, etc., una distribución similar a la obtenida en nuestros resultados fue descrita también en cepas de *E. coli* comensales intestinales de niños suecos (Nowrouzian y col., 2005). El predominio de cepas del filogrupo B2 en la flora intestinal, no sólo se ha observado en niños, sino que también se ha detectado en cepas de *E. coli* comensales procedentes de adultos (Zhang y col., 2002).

Sin embargo, otros estudios han encontrado que la microflora comensal intestinal está dominada por filogrupos de *E. coli* pertenecientes al A y B1 (Picard y col., 1999, Duriez y col., 2001).

Nowrouzian y col., (2006), demostraron que las cepas de *E. coli* pertenecientes al grupo B2, caracterizadas por presentar un número elevado de factores de virulencia contribuyendo así a su capacidad de patogenicidad extraintestinal, tenían a su vez una capacidad superior al resto de filogrupos para colonizar el intestino humano, y que en parte era debido a la acumulación de determinados factores de virulencia en las cepas de dicho filogrupo.

Relacionando la clasificación filogenética de las cepas de *E. coli* de nuestro estudio con la dinámica de colonización en la flora intestinal, se observó que tanto cepas residentes como transitorias pertenecían en su mayoría al grupo filogenético B2. Sin embargo este dato contrasta con lo que Nowrouzian y col., (2006) observaron en su estudio, ya que las cepas de *E. coli* que sólo aparecían transitoriamente en la flora intestinal pertenecieron a los filogrupos A y B1, filogrupos caracterizados por presentar menos factores de virulencia.

El tipo de alimentación no afectó a la distribución filogenética de las cepas de *E. coli*, siendo en los tres grupos el filogrupo B2 el mayoritario. Destacar que en el grupo de niños alimentados con fórmula estándar, el resto de filogrupos de las cepas de *E. coli*, A, B1 y D, se encontraron en igual proporción.

Se detectaron 6 genes de virulencia en las cepas de *E. coli* colonizantes intestinales de los neonatos. El gen más prevalente (42%) fue el *sfa/foc*, gen que codifica para fimbrias tipo S y tipo F1C, le siguió el *iutA* (30%) y finalmente el menos prevalente el *papC* (4%).

Determinados factores de virulencia suelen asociarse a cepas patógenas, es el caso de los genes de la familia de adhesinas *pap* que parecen jugar un papel

fundamental en la patogenia de la infección, y el gen *iutA*, considerado como un gen predictor de diversas patologías. Otros factores se relacionan más con cepas comensales. De nuestros datos concluimos que el gen *sfa/foc* fue uno de los más frecuentes en cepas comensales. En este sentido en un estudio llevado a cabo sobre cepas de *E. coli* patógenas, se observó que la prevalencia del *sfa/foc* en estas cepas era relativamente baja, inferior al 20% (Johnson y Stell, 2000). En cambio, otros autores cuando compararon la presencia de determinados genes de virulencia en cepas patógenas de bacteriemias con los de cepas de control comensales fecales, mostraron en sus resultados lo contrario (Johnson y col., 2002), es decir que en algunas cepas patógenas, el factor *sfa/foc* era significativamente más prevalente.

Cuando intentamos relacionar la presencia de los diferentes factores de virulencia testados entre cepas residentes y transitorias, observamos que en general la presencia de estos factores era más común en cepas transitorias que en cepas residentes, siendo estadísticamente significativos las diferencias en prevalencia en los factores de virulencia de la familia *pap*, que codifican para fimbrias P. Es de destacar por tanto que diversos autores hayan demostrado que factores de la familia de las adhesinas, como las fimbrias P suelen ser más frecuentes en cepas residentes, ya que se ha visto que las fimbrias P permiten a *E. coli* adherirse a las células epiteliales del colon contribuyendo a su persistencia (Wold y col., 1988; Adlerberth y col., 1995). Otros autores, por el contrario, demuestran que las cepas de *E. coli* con fimbria P fracasan a la hora de establecerse como flora intestinal (Johnson 1991; Johnson 1994; Connell y col., 1997), estando estos últimos en concordancia con nuestros resultados.

El porcentaje resultante de cepas de *E. coli* portadoras de dos o más de los factores de virulencia testados, y por lo tanto cepas de *E. coli* con capacidad patogénica extraintestinal, consideradas como ExPEC, fue de un 30%, un porcentaje ligeramente superior al referido por otros autores en la literatura, quienes definen a estas cepas ExPEC como aquellas que pueden colonizar

establemente el tracto intestinal del hospedador y que pueden llegar a constituir aproximadamente el 20% de las cepas intestinales de *E. coli* en hospedadores sanos (Johnson 1991; Siitonen 1992).

Aunque estas cepas ExPEC no causan enfermedades intestinales, si no que necesitan salir del intestino y penetrar en un territorio estéril para causar enfermedad, es importante resaltar que un 30% de las cepas de *E. coli* colonizantes intestinales de los neonatos de nuestro estudio pueden ser potencialmente patógenas en determinadas circunstancias.

En la distribución filogenética de las cepas ExPEC resultó que el 86% de las mismas pertenecían a los filogrupos considerados más virulentos, B2 y D. Un 60% pertenecieron al filogrupo B2 y un 28% al filogrupo D. Esta clasificación filogenética de las cepas ExPEC coincide con lo que otros autores han referido en la literatura, es decir que las cepas ExPEC derivan fundamentalmente de cepas de *E. coli* de grupo filogenético B2, y en menor medida del filogrupo D y de clones específicos dentro de estos grupos (Johnson y Russo, 2002). En este sentido, otro hallazgo que apoyaría dicha teoría se puso de manifiesto tras el estudio de la distribución filogenética de las cepas no ExPEC, ya que el filogrupo mayoritario de las cepas que no presentaron ningún factor de virulencia fue el filogrupo A con un 47%, y el menos frecuente el D, con un 12%.

El porcentaje de cepas ExPEC fue superior, sin llegar a ser estadísticamente significativo, en el grupo de cepas transitorias, 54% frente al 27% en cepas residentes, y en su mayoría pertenecieron al filogrupo B2. En un estudio previo se detectó lo contrario, es decir que los mayores porcentajes de cepas ExPEC pertenecieron a cepas residentes, un 36% comparado con el 5.3% de cepas ExPEC transitorias (Nowrouzian y col., 2003).

En cuanto a la influencia del tipo de alimentación en la presencia de cepas ExPEC, se observó que el grupo que presentaba mayor porcentaje de estas cepas fue el grupo alimentado con fórmula estándar, y el que menos fue el de lactancia

materna. Estos resultados coinciden con previos estudios que relacionaban alimentación y factores de virulencia, donde encontraron que niños alimentados con leche materna presentaban una disminución en la colonización de cepas de *E. coli* que portaban determinados factores de virulencia, concretamente el gen que codifica para el factor de virulencia de la cápsula K1, así como el gen que codifica el factor de fimbria P (Örskov y Sorensen, 1975; Tullus y col., 1988).

El impacto de las resistencias antimicrobianas sobre la colonización bacteriana intestinal en los neonatos ha sido poco estudiado. Es importante considerar que *E. coli*, uno de los microorganismos más frecuentemente encontrados en infecciones de humanos es también un colonizador universal del intestino humano. La colonización intestinal por microorganismos resistentes puede cambiar de una a otra localización geográfica. Se ha visto que las tasas de resistencias son más altas en países en vías de desarrollo, y esto se explica por el excesivo y mal uso de los antibióticos en esos países (Shlaes y col., 1997).

Apenas existen datos que describan las tasas de resistencias antimicrobianas en cepas colonizantes de *E. coli* de niños sanos. Los resultados de nuestro estudio demostraron la alta proporción de neonatos sanos que eran colonizados con cepas de *E. coli* resistentes, ya que el 60% de las cepas eran resistentes a uno o más antibióticos. Los mayores porcentajes de resistencia, con tasas superiores al 10%, se encontraron con la ampicilina, ácido nalidíxico, cotrimoxazol y cefalotina, siendo el porcentaje más elevado el de la ampicilina, con un 47% de *E. coli* resistentes. Aunque existen escasos datos de resistencias en cepas de neonatos sanos, si comparamos esta prevalencia de resistencia a ampicilina (47%) con la referida por otros autores, consideramos la resistencia a ampicilina de nuestro estudio como una prevalencia moderada frente al 59% de resistencia a ampicilina encontrada entre cepas de *E. coli* de niños españoles (Domínguez y col., 2002), o bien una alta prevalencia si la comparamos con el 12% descrita en cepas de *E. coli* de niños suecos (Karami y col., 2008). Valores

similares a los nuestros con un 52%, se encontraron en cepas de *E. coli* procedentes de cistitis no complicadas en mujeres españolas (Gobernado y col., 2007). A pesar de que las diferencias en resistencia a ampicilina fueron claras entre nuestro estudio y el de Dominguez y col., (2002), los porcentajes de resistencia a quinolonas fueron similares en el caso del ácido nalidíxico y ciprofloxacino, con valores del 25% y 22% respectivamente para el ácido nalidíxico y del 10% y 5% para el ciprofloxacino.

Es de destacar, el alto porcentaje de resistencias encontrado en nuestro estudio, ya que las cepas de *E. coli* se han aislado de un grupo de sujetos que no han consumido ningún grupo de antibióticos. Por tanto se deduce que estos porcentajes reflejan la resistencia de las cepas de origen materno. En este caso, el alto porcentaje a ciprofloxacino puede ser resultado del consumo elevado de fluorquinolonas en nuestra población, ya que se han usado como antibióticos de primera línea en España. De esta forma ha habido un significativo incremento de *E. coli* resistentes a las fluorquinolonas (Ena y col., 1998; Gobernado y col., 2007). Además es importante añadir que al igual que otros antibióticos, las quinolonas, no sólo ejercen su capacidad selectiva de resistencias en el ser humano, sino que el uso de antibióticos en animales, con fines terapéuticos o como promotores de crecimiento, selecciona igualmente resistencias que posteriormente pueden diseminarse al ser humano (Garau y col. 1999).

La prevalencia de neonatos sanos portadores de Enterobacterias productoras de BLEEs fue del 3.2%, valor muy similar al obtenido en un estudio en cepas colonizantes fecales de adultos procedentes de Barcelona 3.3% (Miró y col., 2005), cuyas muestras fecales se habían tomado al haber acudido en algún momento a la unidad de urgencias de un hospital, y ligeramente inferior si se comparaba con el 3.7% (Valverde y col., 2004) obtenido también de adultos sanos que durante al menos tres meses anteriores al muestreo no habían consumido antibióticos. Duman y col., (2005), detectaron las tasas de resistencias a betalactámicos en la flora fecal de tres grupos de recién nacidos, un grupo de neonatos ingresados en UCIs neonatales, otro grupo de neonatos

ingresados en otras unidades neonatales, y un último grupo de neonatos sanos, observando que en todos los grupos de neonatos del ensayo la tasa de colonización fecal por microorganismos productores de BLEEs, incluyendo cepas de *E. coli* y de *Klebsiella spp.*, fue relativamente elevada, concretamente en el grupo de niños sanos con un 48%.

En cuanto al tipo de BLEEs aisladas en nuestro ensayo, en una cepa de *E. coli* se detectaron genes *bla*_{CTX-M} y *bla*_{TEM}, y en la otra cepa se detectó el gen *bla*_{SHV}. En nuestro caso con sólo dos cepas productoras de BLEEs no podemos concluir cual es el tipo predominante, pero lo que sí se ha observado en otros estudios es que las BLEEs tipo CTX-M son las más frecuentes en portadores fecales (Mirelis y col., 2003; Valverde y col., 2004).

Aunque no se pudo realizar un estudio estadístico de la influencia del tipo de alimentación, las dos cepas productoras de BLEEs fueron aisladas de niños alimentados con lactancia materna. Por tanto, podríamos decir que la lactancia materna en este caso, no ha podido prevenir la colonización por estos microorganismos productores de BLEEs tal y como Duman y col., (2005) pusieron de manifiesto en su estudio, en el que observan un cierto papel protector de la leche materna frente a este tipo de microorganismos, viendo que el factor de riesgo más importante para la colonización fecal por estos microorganismos, una vez que los niños eran dados de alta y desaparecían los factores propios de la hospitalización, era el tipo de alimentación, y concretamente la falta de ingesta de leche materna.

También se aislaron otros microorganismos multirresistentes como *E. cloacae*, *Citrobacter spp.*, *M. morgani*, *S. maltophilia* y *Serratia spp.* en la flora de neonatos. En algunos estudios se ha demostrado que la flora intestinal de niños ingresados en unidades hospitalarias de cuidados intensivos es un gran reservorio de microorganismos multirresistentes como *E. cloacae*, *C. freundii*, *M. morgani* y *S. licuefaciens*, etc., y que la adquisición de las mismas ocurre

aproximadamente a las dos semanas de vida durante la estancia hospitalaria (Millar y col., 2008). Por tanto hay que destacar la presencia en la flora intestinal de neonatos sanos, y además desde el inicio del estudio, de este tipo de Enterobacterias multirresistentes, que frecuentemente son asociadas a estancias hospitalarias y raramente asociadas con un origen de la flora materna.

Estos microorganismos colonizantes de la flora intestinal pueden actuar como un reservorio de resistencias. Algunos autores (Smith y col., 2004, y Duman y col., 2005), consideraron que la colonización por microorganismos multirresistentes, como es el caso de los microorganismos productores de BLEEs y de otras Enterobacterias, es un prerrequisito para desarrollar una posterior infección. De ahí la importancia en la detección de microorganismos multirresistentes no sólo en poblaciones de pacientes cuando aparecen brotes, sino como estudios previos de colonización durante ingresos hospitalarios para desarrollar estrategias de control en posteriores infecciones. A su vez, también sería interesante estudios de colonización en personas sanas, ya que el incremento de portadores en la comunidad incrementa el riesgo de que otros individuos lleguen a ser portadores de bacterias resistentes como consecuencia de la transmisión humano a humano o a través del medio ambiente.

Finalmente se compararon los resultados de 51 cepas de *E. coli* comensales en la flora intestinal de neonatos sanos y 19 cepas de *E. coli* aisladas de bacteriemias en neonatos ingresados en el hospital. Se compararon los porcentajes de resistencia antibiótica entre cepas de *E. coli* comensales fecales de neonatos sanos y cepas aisladas de bacteriemias de neonatos ingresados en unidades neonatales, observando porcentajes de resistencia similares para los cuatro antibióticos testados entre ambos grupos de cepas de *E. coli*, comensales y patógenas. Llama por tanto la atención los resultados de nuestro estudio, al obtener porcentajes de resistencia en cepas comensales similares a los de cepas patógenas. Entre ellos el alto porcentaje de resistencia a ampicilina, que fue del 47% en cepas comensales, sin existir diferencias significativas con el 63% en cepas patógenas. El porcentaje de resistencia a ampicilina en cepas de *E. coli*

comensales de neonatos sanos referido por otros autores (Duman y col., 2005) se situó próximo al nuestro (40%).

Además de comparar las resistencias antimicrobianas entre el grupo de cepas de *E. coli* comensales y patógenas, también comparamos las características correspondientes a la distribución en grupos filogenéticos, A, B1, B2 y D, así como a la presencia de genes de virulencia en ambos grupos.

En relación a las cepas patógenas, el grupo filogenético más frecuente fue el B2 seguido del D y por último el B1. Entre las cepas comensales el filogrupo B2 volvió a ser el más frecuente seguido del A, el D y finalmente el B1. En la bibliografía algunos autores describen que normalmente las cepas patógenas pertenecen al grupo filogenético B2, y en menor medida al D, ya que estos filogrupos son los que presentan mayor número de factores de virulencia, mientras que las cepas comensales pertenecen principalmente a los grupos filogenéticos A y B1 (Johnson y col., 2002; Nowrouzian y col., 2005).

En nuestro estudio observamos por tanto que el grupo filogenético B2 fue el mayoritario tanto en cepas patógenas como comensales, este dato sugiere que las cepas de *E. coli* de grupo filogenético B2 tienen capacidad tanto de originar infecciones extraintestinales como de persistir como cepas comensales en la flora intestinal. De hecho hay autores que dan base a esta teoría con respecto a la capacidad de virulencia (Johnson y col., 2002; Picard y col., 1999) y con respecto a la capacidad de persistencia (Nowrouzian y col., 2005; Nowrouzian y col., 2006).

En relación a los genes de virulencia detectados en cada grupo de cepas de *E. coli*, observamos que la presencia de genes de virulencia era significativamente más común en el grupo de cepas patógenas con respecto a la de cepas comensales. Esto confirmaría que las cepas patógenas, en este caso las cepas de bacteriemias, lo son porque presentan un mayor número de factores de

virulencia que las cepas comensales. Estudiando la presencia individual de cada gen de virulencia en ambos grupos de cepas observamos que los genes *papA*, *papC* e *iutA* se detectaron más frecuentemente en cepas patógenas que en cepas comensales, siendo significativamente más frecuente el gen *papC* e *iutA*. La frecuencia del gen *KpsMT-II* fue similar en ambos grupos de cepas, mientras que los genes *sfa/foc* y *afa/dra* fueron dos veces más común en cepas comensales con respecto a las patógenas. Algunos autores han demostrado que ciertos genes de virulencia están asociados más frecuentemente a cepas patógenas que a cepas comensales. Así, los genes *papA*, *sfa/foc*, *kpsMT-II* han sido más frecuentemente encontrados en cepas aisladas de bacteriemia que en cepas comensales (Johnson y Stell, 2000). En general, parece que los genes de la familia de adhesinas *pap* juegan un papel patogénico (Johnson y col., 2002; Johnson y Stell, 2000). De hecho en nuestros resultados, ninguna de las cepas comensales portaban el gen de virulencia *papC*. Además Johnson y col., (2002) refieren que la presencia del gen de virulencia *iutA* ha sido identificada como un factor predictor de diversos procesos patológicos.

Con esta Tesis Doctoral hemos podido conocer la colonización intestinal por Enterobacterias, en los primeros tres meses de vida en tres grupos de niños, aportando que una fórmula infantil enriquecida influye sobre la flora intestinal del recién nacido de forma similar a la lactancia materna. Además hemos observado que los recién nacidos, desde sus primeros días de vida, son portadores fecales de especies de relevante interés clínico y epidemiológico, las Enterobacterias consideradas como potencialmente patógenas, y además en algunos caso portadores de especies multiresistentes.

