

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología II



TESIS DOCTORAL

**Resistencia, virulencia y estructura poblacional de *Escherichia coli*
uropatógeno**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Irene Merino Velasco

Directores

**Rafael Cantón Moreno
Patricia Ruiz Garbajosa**

Madrid, 2018

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Farmacia

Departamento de Microbiología



TESIS DOCTORAL

**“RESISTENCIA, VIRULENCIA Y ESTRUCTURA POBLACIONAL DE *Escherichia coli*
UROPATÓGENO”**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

IRENE MERINO VELASCO

DIRECTORES

Dr. Rafael Cantón Moreno

Dra. Patricia Ruiz Garbajosa

Madrid, 2017

©Irene Merino Velasco

La Dra. Patricia Ruiz Garbajosa, facultativo especialista de área del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal

El Dr. Rafael Cantón Moreno, Jefe de Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal

CERTIFICAN QUE:

IRENE MERINO VELASCO ha realizado en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal, bajo su dirección, el trabajo que presenta para optar al grado de doctor, titulado:

“RESISTENCIA, VIRULENCIA Y ESTRUCTURA POBLACIONAL DE *Escherichia coli* UROPATÓGENO”

Y para que así conste, firman la presente certificación en Madrid, 2017

Fdo.: Dr. Rafael Cantón Moreno

Fdo.: Dra. Patricia Ruiz Garbajosa



Financiado por PI13/02092

A mi madre,

A mi padre, a Manuel y a María

CODIGO DE TOGAKURE RYU

*Las estrellas son mis ojos
el viento mis oídos
la noche mi manto
el frío mi espíritu
la sombra mi morada
la determinación es mi fuerza
el respeto a mi maestro es mi preciado valor
mi personalidad es mi poder
el estoicismo y la perseverancia mi cuerpo
la supervivencia es mi ley
la imprudencia es mi enemigo
la razón de respetar o tomar la vida mi estrategia
las leyes del cosmos son mi universo
la adaptabilidad mi principio
la vacuidad mi táctica
la sensibilidad y el sentido del deber mis armaduras
el espíritu imperturbable mi fortaleza
el conocimiento de la mente sin apegos es mi espada*

“Aunque camine por cañadas oscuras, nada temo, porque Tú estás conmigo, Tu vara y Tu cayado me sosiegan”. (Sal 23, 4)

AGRADECIMIENTOS

詞韻波羅密大光明

“Shikin haramitsu daikomyo!!”

(Cada experiencia es una nueva vía para alcanzar el perfeccionamiento personal)

Con esta frase, repetida en cada entrenamiento, me he enfrentado a cada nuevo reto, a cada nueva situación desconocida. La verdadera batalla del *Bujin* es caminar por la vida sin desviarse del camino correcto. Por eso su principal enemigo es él mismo. En ese camino, lo importante no es llegar al final. No es superar los obstáculos como sea. Lo importante es el cómo se recorre ese camino, el cómo se enfrenta uno a cada obstáculo, a cada montaña a escalar. Esta tesis es una montaña más en el camino de mi vida profesional y personal. Pero una montaña que parece muy alta cuando se empieza a trepar. Sin embargo, he tenido la suerte de recibir la ayuda y el apoyo de muchas personas en este camino. A ellos mi más profunda gratitud.

Al Dr. Cantón, director de mi tesis y jefe de Servicio de Microbiología, donde realicé mi especialidad. Como bien dice a los afortunados especialistas que hemos sido formados en el Hospital Ramón y Cajal, llevamos el sello de este hospital. Yo me atrevería a decir, llevamos el sello de Rafael Cantón. Gracias por dar ejemplo de dedicación, profesionalidad y liderazgo. Y sobre todo, por estar siempre disponible para dar un consejo cuando más se necesita.

A la Dra. Patricia Ruiz Garbajosa, directora de mi tesis y mi tutora durante todo mi camino como investigadora. Gracias por darme la oportunidad de entrar en el mundo de la investigación, por apostar por una médico residente que quería hacer investigación. Por tu paciencia en tus enseñanzas y tu increíble capacidad de trabajo.

A Ana Sofía, maestra de maestras, mi *kohai* en el *Dojo* pero *Senpai* en la vida. El laboratorio no es lo mismo sin tu acento portugués. Gracias por ser como eres, por tu generosidad infinita que hace que lo mismo expliques una nueva técnica molecular, nos ayudes a aprender un nuevo programa informático o nos prepares deliciosos postres. Sin tu ayuda esta tesis no habría sido posible y sin tu amistad mi vida sería un poco más pobre. Nos veremos en los campos de tiro, campeona.

A Esther Torrecilla y Ana “Rizos” Sánchez, las personas más alegres que conozco, gracias por vuestra compañía y consejos, vuestra sonrisa siempre dispuesta y esos abrazos que curan todo.

A mis compañeros de laboratorio, a los que se fueron y los que vinieron, a Conchi, María, Aida, Marta, Merche, Jero, Val, Ricardo...y en especial a mis chicas “coli”: Irene, Marta y Blanca. Sin vuestra buena mano con los campos y las PCRs y vuestros ánimos esta tesis no habría llegado a buen puerto.

To Dr. James R. Johnson, his team (Brian, Stephen and Connie) and his family. To Tracy, David and little Beatrix, to Dr. Frank Rhame and his wife Beverly. Thank you for welcoming me to Minneapolis and your homes, allowing me to enjoy one of the best (and coldest!) experiences of my life.

A los adjuntos, residentes, personal técnico, de enfermería, administrativo y de limpieza del servicio de Microbiología, por los buenos ratos pasados durante los 4 años de residencia y los siguientes en el laboratorio. A Mario, María Gálvez, Laura, Desiree, Bea, Sergio, Adri, Ana Luisa, Claudio, Rubén, Lorena...sois muchos para ponerlos a todos, pero todos me habéis aportado algo. Y un abrazo muy especial a mis co-residentes, Juande y María, los mejores compañeros de residencia que se puede pedir.

A mis amigos. En especial a Ruth y a Vero: los verdaderos amigos son capaces de hablar después de años sin verse como si se hubiesen despedido ayer. También a mis amigos de Valladolid, en especial a Victoria, a los de Madrid, a los del *Dojo* y a los que con el tiempo se han ido esparciendo por el mundo.

Por último pero no menos importante, a mi familia: mis padres, mis hermanos y mi tía. A mi madre y a mi padre, gracias por educarme como lo hicisteis y por estar siempre cuando más lo necesitaba. A mi hermano y a mi hermana, por ser mis pilares de apoyo en la vida.

A todos aquellos, que aunque no consten aquí, me han ayudado de palabra u obra.

Y gracias a Dios por darme las oportunidades que me ha dado y la fuerza para seguir en este camino. A Él la acción de gracias y la gloria por siempre, amén.

どうもありがとうございます

Domo Arigato gozaimasu!!

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	ix
LISTADO DE FIGURAS	xv
LISTADO DE TABLAS	xix
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	xxi
RESUMEN	24
ABSTRACT.....	27
INTRODUCCIÓN.....	31
1. <i>Escherichia coli</i>	33
1.1. <i>E. coli</i> extraintestinal (ExPEC).....	34
1.2. <i>E. coli</i> uropatógeno	36
2. Factores de virulencia	37
2.1. Adhesinas	38
2.2. Sideróforos	42
2.3. Toxinas.....	44
2.4. Antígeno capsular.....	44
2.5. Colicinas.....	46
2.6. OmpT.....	46
2.7. Marcadores de islas de patogenicidad.....	47
3. Resistencias a antibióticos en <i>E. coli</i> uropatógeno	47
3.1. Resistencia a quinolonas: ácido nalidíxico y ciprofloxacino.....	48
3.2. Resistencia a betalactámicos	49
3.3. Resistencia a los aminoglucósidos	53

3.4.	Resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol (cotrimoxazol)	54
3.5.	Resistencia a fosfomicina	54
3.6.	Resistencia a colistina.....	55
4.	Clones de alto riesgo entre los UPEC: <i>E. coli</i> ST131	56
4.1.	Caracterización de los subclones de <i>E. coli</i> -ST131	56
4.2.	Factores de virulencia asociados a <i>E. coli</i> -ST131.....	57
4.3.	Epidemiología.....	59
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS		61
MATERIAL Y MÉTODOS		63
1.	Diseño de los estudios y cepas bacterianas	65
1.1.	Proyecto ITU-BRAS	65
1.2.	Proyecto R-GNOSIS.....	67
2.	Recogida y procesamiento de muestras	67
2.1.	Aislados invasivos.....	67
2.2.	Aislados de colonización	69
3.	Identificación de cepas.....	70
4.	Estudio de sensibilidad antibiótica y detección fenotípica de la producción de betalactamasas de espectro extendido	71
4.1.	Caracterización de betalactamasas de espectro extendido.....	72
5.	Análisis de la estructura poblacional de <i>E. coli</i>	76
5.1.	Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).....	76
5.2.	Caracterización de filogrupos y <i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST)	77
5.3.	Cribado de aislados <i>E. coli</i> -ST131 y tipado de subclones.	80
5.4.	Caracterización de alelos de <i>fimH</i> y O-tipado.	80

6.	Estudio de virulencia de <i>E. coli</i>	81
6.1.	Determinación del genotipo de virulencia: Índice de virulencia.....	81
6.2.	Modelo murino experimental de virulencia.....	85
7.	Análisis estadístico	87
	RESULTADOS	89
1.	<i>E. coli</i> -BLEE de origen invasivo: prevalencia y características microbiológicas.....	91
1.1.	Estructura poblacional de <i>E. coli</i> -BLEE	91
1.2.	Sensibilidad a antibióticos.....	94
1.3.	Caracterización molecular de BLEEs.....	95
1.4.	Genotipo de virulencia	96
2.	<i>E. coli</i> -ST131 de origen invasivo	101
2.1.	Estructura poblacional de <i>E. coli</i> -ST131	101
2.2.	Sensibilidad a antibióticos.....	104
2.3.	Análisis del genotipo de virulencia de los aislados <i>E. coli</i> -ST131 de origen invasivo 107	107
3.	Modelo murino experimental de virulencia	113
3.1.	Análisis del genotipo de virulencia de <i>E. coli</i> -ST131 de origen invasivo	114
3.2.	Virulencia experimental de <i>E. coli</i> -ST131 de origen invasivo.....	116
4.	<i>E. coli</i> -BLEE aislados de colonización intestinal de pacientes hospitalizados	118
4.1.	Estructura poblacional de <i>E. coli</i> -BLEE de origen no invasivo.....	118
4.2.	Sensibilidad antibiótica de <i>E. coli</i> -BLEE no invasivo	123
4.3.	Caracterización de BLEEs en <i>E. coli</i> -BLEE no invasivo	127
4.4.	Análisis del genotipo de virulencia en <i>E. coli</i> -BLEE de origen no invasivo	132
	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	139

1.	<i>E. coli</i> -BLEE de origen invasivo	141
1.1.	Resistencias a antibióticos y caracterización de BLEEs	142
1.2.	Análisis del genotipo de virulencia.....	144
2.	<i>E. coli</i> -ST131 de origen invasivo	146
2.1.	Resistencias a antibióticos y distribución de BLEE entre los subclones de <i>E. coli</i> -ST131	147
2.2.	Análisis del genotipo de virulencia.....	148
3.	Modelo murino de virulencia experimental	151
4.	Aislados de <i>E. coli</i> -BLEE-ST131 no invasivos	154
4.1.	Estudio de sensibilidad a antibióticos y caracterización de BLEEs.....	155
4.2.	Análisis del genotipo de virulencia.....	157
	CONCLUSIONES	159
	BIBLIOGRAFÍA.....	163
	ANEXOS	185

LISTADO DE FIGURAS

- **Figura 1:** Patogénesis de la ITU.
- **Figura 2:** Representación de los elementos que intervienen en la patogénesis de *E. coli*: Sideróforos, toxinas, proteínas de la cápsula y elementos de movilidad y adhesión (fimbrias y flagelos).
- **Figura 3:** Estructura del clúster de genes que codifican para las fimbrias tipo 1.
- **Figura 4:** Estructura del clúster de genes que codifican para las fimbrias tipo P.
- **Figura 4:** Captación de hierro por enterobacterias.
- **Figura 6:** Organización de los genes necesarios para la expresión de la cápsula del grupo 2.
- **Figura 7:** Porcentaje de aislados *E. coli* invasivos resistentes a cefalosporinas de tercera generación según los registros del ECDC.
- **Figura 8:** Diseminación del clon *E. coli*-ST131.
- **Figura 9:** Epidemiología de enterobacterias productoras de carbapenemasas en Europa.
- **Figura 10:** Análisis filogenético por SNPs de cepas *E. coli*-ST131 que muestra su estructura en subclones, con el clado *H30* (*H30Rx* y *H30 no-Rx*) frente a los aislados no-*H30*.
- **Figura 11:** Procedencia de los aislados invasivos del proyecto ITU-BRAS.
- **Figura 12:** Esquema del funcionamiento del MALDI-TOF.
- **Figura 13:** Cálculo del inóculo utilizado en el modelo experimental.
- **Figura 14:** Dendrograma y principales características de los aislados invasivos *E. coli*-BLEE incluidos en el proyecto ITU-BRAS.
- **Figura 15:** Porcentaje de aislados invasivos *E. coli*-BLEE resistentes (intermedio más resistente, I+R) a cada antibiótico recogidos en el proyecto ITU-BRAS.
- **Figura 16:** Porcentaje de aislados invasivos *E. coli*-BLEE ST131 y no-ST131 resistentes (I+R) a antibióticos recogidos en el proyecto ITUBRAS.
- **Figura 17:** Genes de virulencia detectados en aislados invasivos *E. coli*-BLEE recogidos en el proyecto ITU-BRAS.
- **Figura 18:** Gráfico de cajas y bigotes del índice de virulencia según filogrupo de los aislados invasivos *E. coli*-BLEE recogidos en el proyecto ITU-BRAS.
- **Figura 19:** Gráfico de cajas y bigotes del índice de virulencia según pertenencia al *E. coli*-ST131 de los aislados invasivos *E. coli*-BLEE recogidos en el proyecto ITU-BRAS.

- **Figura 20:** Gráfico de cajas y bigotes del índice de virulencia de los aislados invasivos *E. coli*-BLEE recogidos en el proyecto ITU-BRAS según su clasificación en ST131, ExPEC y UPEC.
- **Figura 21:** *Heatmap* con los genes de virulencia de los aislados invasivos *E. coli*-BLEE del proyecto ITU-BRAS.
- **Figura 22:** Tipificación de los aislados invasivos *E. coli*-ST131 recogidos en el proyecto ITU-BRAS.
- **Figura 23:** Dendrograma y características principales de los 75 aislados invasivos *E. coli*-ST131 recogidos en el proyecto ITU-BRAS.
- **Figura 24:** Porcentaje de aislados invasivos *E. coli*-ST131 resistentes (I+R) a antibióticos recogidos en el proyecto ITUBRAS.
- **Figura 25:** Porcentaje de aislados invasivos *E. coli*-ST131 resistentes (I+R) a antibióticos recogidos en el proyecto ITU-BRAS según subclón.
- **Figura 26:** Porcentaje de genes de virulencia detectados en los aislados invasivos *E. coli*-ST131 recogidos en el proyecto ITU-BRAS.
- **Figura 27:** Distribución por subclones de los genes de virulencia detectados en los aislados invasivos *E. coli*-ST131 del proyecto ITU-BRAS.
- **Figura 28:** Gráfico de violín para el índice de virulencia según subclón de los aislados invasivos *E. coli*-ST131 recogidos en el proyecto ITU-BRAS.
- **Figura 29:** Porcentaje de aislados *E. coli*-ST131 ExPEC y UPEC del proyecto ITU-BRAS según subclón.
- **Figura 30:** Gráfico de cajas y bigotes del índice de virulencia de los aislados invasivos *E. coli*-ST131 según la clasificación en ExPEC y subclón recogidos en el proyecto ITU-BRAS.
- **Figura 31:** *Heatmap* de los genes de virulencia estudiados en los aislados invasivos *E. coli*-ST131 recogidos en el proyecto ITU-BRAS.
- **Figura 32:** Dendrograma obtenido del análisis de los pulsotipos de los 48 *E. coli*-ST131 del proyecto ITUBRAS seleccionados para el estudio *in vivo*.
- **Figura 33:** Gráfico de cajas y bigotes del índice de virulencia según clasificación en ExPEC y subclón de los 48 aislados *E. coli*-ST131 del proyecto ITU-BRAS seleccionados para el estudio *in vivo*.
- **Figura 34:** *Heatmap* de los genes de virulencia estudiados en los 48 aislados *E. coli*-ST131 del proyecto ITUBRAS seleccionados para el estudio *in vivo*.

- **Figura 35:** Medianas de índice de virulencia y letalidad de los 22 perfiles de virulencia encontrados en los 48 aislados *E. coli*-ST131 seleccionados del proyecto ITU-BRAS para el estudio *in vivo*.
- **Figura 36:** Tipificación de los aislados de colonización *E. coli*-ST131 del proyecto R-GNOSIS.
- **Figura 37:** Tipificación de los aislados *E. coli*-ST131 de colonización por hospitales participantes en el proyecto R-GNOSIS.
- **Figura 38:** Dendrograma y características principales de los 139 aislados *E. coli*-BLEE ST131 recogidos en el proyecto R-GNOSIS.
- **Figura 39:** Porcentaje de aislados de colonización *E. coli*-BLEE ST131 resistentes a antibióticos del proyecto R-GNOSIS según hospital de procedencia.
- **Figura 40:** Porcentaje de aislados de colonización *E. coli*-BLEE ST131 resistentes (I+R) a antibióticos del proyecto R-GNOSIS según pertenencia al clado H30.
- **Figura 41:** Porcentaje de aislados resistentes (I+R) a antibióticos entre los *E. coli*-no-ST131 del proyecto R-GNOSIS según hospital de procedencia.
- **Figura 42:** Porcentaje de BLEEs encontradas en los aislados ST131 de cada hospital participante en el proyecto R-GNOSIS.
- **Figura 43:** Porcentaje de aislados de colonización *E. coli*-BLEE ST131 productores de CTX-M-15 y CTX-M-27 resistentes (I+R) a antibióticos del proyecto R-GNOSIS.
- **Figura 44:** Tipo de BLEE codificada por los aislados *E. coli*-no-ST131 seleccionados del proyecto R-GNOSIS.
- **Figura 45:** Número de aislados *E. coli*-BLEE de colonización del proyecto R-GNOSIS positivos a los genes de virulencia estudiados.
- **Figura 46:** Porcentaje de los aislados de colonización seleccionados del proyecto R-GNOSIS positivos para los genes de virulencia estudiados según pertenencia a ST131.
- **Figura 47:** Gráfico de cajas y bigotes del índice de virulencia de los aislados seleccionados del proyecto R-GNOSIS según subtipado.
- **Figura 48:** Gráfico de cajas y bigotes del índice de virulencia de los aislados seleccionados del proyecto R-GNOSIS según su clasificación en ExPEC y ST131.
- **Figura 49:** *Heatmap* de los genes de virulencia estudiados en los aislados de colonización *E. coli*-BLEE seleccionados del proyecto R-GNOSIS.

LISTADO DE TABLAS

- **Tabla 1:** Grupos de CTX-M y tipos más frecuentes.
- **Tabla 2:** Número de muestras recogidas en cada hospital participante en el proyecto ITU-BRAS.
- **Tabla 3:** Microorganismos aislados de hemocultivos procedentes de pacientes con bacteriemias de origen urinario recogidos en el proyecto ITU-BRAS.
- **Tabla 4:** Número de aislados *E. coli*-BLEE de pacientes colonizados de cada hospital participante en el estudio R-GNOSIS.
- **Tabla 5:** Antibióticos analizados en el estudio de sensibilidad antibiótica de los aislados de esta tesis y puntos de corte de sensibilidad utilizados.
- **Tabla 6:** Cebadores y condiciones de amplificación para la caracterización de BLEEs mediante PCR.
- **Tabla 7:** Algoritmo para la asignación de grupos filogenéticos.
- **Tabla 8:** Cebadores y condiciones de amplificación para la asignación de filogrupos.
- **Tabla 9:** Cebadores y condiciones de amplificación para las PCR de asignación de MLST
- **Tabla 10:** Cebadores y condiciones de amplificación para la detección de ST131 y su tipificación.
- **Tabla 11:** Cebadores y condiciones de amplificación para la secuenciación de *fimH* y el tipado de AgO.
- **Tabla 12:** Clase y función de los genes de virulencia estudiados.
- **Tabla 13:** Cebadores y condiciones de amplificación para la detección de genes de virulencia mediante PCR.
- **Tabla 14:** Cebadores y condiciones de amplificación para la detección de los genes que forman el algoritmo ExPEC y UPEC.
- **Tabla 15:** Prevalencia de *E. coli*-BLEE entre los aislados invasivos de cada hospital participante en el proyecto ITU-BRAS.
- **Tabla 16:** Grupo filogenético, ST y alelo *fimH* de los aislados invasivos recogidos en el proyecto ITU-BRAS.
- **Tabla 17:** Porcentaje de aislados *E. coli* resistentes (I+R) a antibióticos según el tipo de BLEE codificada del total de aislados invasivos *E. coli*-BLEE recogidos en el proyecto ITU-BRAS.

- **Tabla 18:** Prevalencia de ST131 entre los aislados *E. coli* invasivos de cada hospital participante en el proyecto ITU-BRAS.
- **Tabla 19:** Genes de virulencia detectados en los aislados invasivos *E. coli*-ST131 del proyecto ITU-BRAS según clado y subclón.
- **Tabla 20:** Genotipo de virulencia de los 48 aislados *E. coli*-ST131 de origen invasivo seleccionados para el estudio de virulencia experimental.
- **Tabla 21:** Aislados *E. coli*-BLEE ST131 y no-ST131 de colonización recogidos en cada hospital participante en el proyecto R-GNOSIS.
- **Tabla 22:** Número (%) de aislados *E. coli*-BLEE resistentes (I+R) a los antibióticos del proyecto R-GNOSIS.
- **Tabla 23:** Porcentaje de aislados resistentes a antibióticos entre los aislados de colonización *E. coli*-BLEE ST131 del proyecto R-GNOSIS según subclón.
- **Tabla 24:** Enzimas BLEE producidas por los aislados *E. coli*-BLEE de colonización del proyecto R-GNOSIS.
- **Tabla 25:** Número (%) de aislados de colonización de cada subclón de *E. coli*-ST131 productores de BLEE en cada hospital participante en el proyecto R-GNOSIS.
- **Tabla 26:** Número (%) de aislados de colonización *E. coli*-BLEE-ST131 positivos a los genes estudiados.

LISTADO DE ABREVIATURAS

- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- AgK: Antígeno K o antígeno capsular
- AgO: Antígeno O o antígeno somático
- AMC: Amoxicilina-clavulánico
- AMK: Amicacina
- APEC: *E. coli* patogénico aviar
- ARESC: Antimicrobial Resistance Epidemiological Survey on Cystitis
- ARNt: Ácido ribonucleico de transferencia
- BLEE: Betalactamasa de espectro extendido
- BOU: Bacteriemia de origen urinario
- CAZ: Ceftazidima
- CEP: Cefepima
- CIP: Ciprofloxacino
- CMI: Concentración mínima inhibitoria
- CTX: Cefotaxima
- DAEC: *E. coli* adherente difuso
- EAEC: *E. coli* enteroagregativo
- EARS-NET: *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*
- ECDC: *European Centre for Disease Prevention and Control*
- ECOFF: Punto de corte epidemiológico
- EE.UU: Estados Unidos
- EHEC: *E. coli* enterohemorrágico
- EIEC: *E. coli* enteroinvasivo
- EPEC: *E. coli* enteropatógeno
- EPINE: Estudio de prevalencia de las infecciones nosocomiales en España
- ETEC: *E. coli* enterotoxigénico
- EUCAST: *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing*
- ExPEC: *E. coli* enteropatógeno

FOX: Cefoxitina

FV: Factor de virulencia

GEN: Gentamicina

GT: Fenotipo de resistencia a gentamicina y tobramicina

I: Intermedio

IL: Índice de letalidad

IQR: Rango intercuartílico

ITU: Infección del tracto urinario

IV: Índice de virulencia

LPS: Lipopolisacárido

LS: Lethality score

MLST: *Multilocus Sequence Typing*

NAL: Ácido nalidíxico

NMEC: *Neonatal meningitis E. coli*

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAI: Islas de patogenicidad

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PFGE: Electroforesis en gel de campo pulsado

PMQR: Resistencia a quinolonas mediada por plásmidos

PTH: Proteína de Tamm-Horsfall

PTZ: Piperacilina-tazobactam

R: Resistente

S: Sensible

SNP: Polimorfismo de un único nucleótido

ST: Secuencia tipo

STX: Cotrimoxazol

TA: Fenotipo de resistencia a tobramicina y amicacina

TOB: Tobramicina

UPEC: *E. coli* uropatógeno

VF: Virulence factors

VS: Virulence score

RESUMEN

E. coli es el principal causante de infecciones del tracto urinario a nivel comunitario y hospitalario. La mayoría de estas infecciones están causadas por *E. coli* uropatógeno (UPEC), un patotipo específico dentro de la población de *E. coli* patogénico extraintestinal (ExPEC).

Numerosos estudios alertan de un incremento de la incidencia de sepsis de origen urinario causadas por *E. coli* multirresistente. Este incremento se ha asociado a la expansión mundial de un clon de alto riesgo, el clon *E. coli*-B2-ST131. Este clon presenta un gran número de factores de virulencia (FV) y los análisis de su estructura poblacional han mostrado que su expansión se debe a un linaje dentro de ST131 caracterizado por la expresión del alelo 30 de *fimH*. Este linaje se ha asociado a resistencia a quinolonas y engloba al subclón H30Rx, asociado a expresión de betalactamasas de espectro extendido (BLEEs), principalmente CTX-M-15. Los motivos del predominio del clon ST131 entre los aislados de *E. coli* UPEC no están bien esclarecidos y se postula que puede ser debido a ventajas adaptativas conferidas bien por su mayor número de FV que le permitirían colonizar o invadir con mayor eficacia o bien por ser resistente a múltiples familias de antibióticos.

Esta tesis plantea la **hipótesis** de que tanto los FV como la resistencia a antibióticos están implicados en la diseminación del clon ST131. Para probar esta hipótesis, el **objetivo principal** de esta tesis fue describir la estructura poblacional y los determinantes de resistencia y virulencia de *E. coli*-ST131 en una población de aislados invasivos y no invasivos.

En el **primer apartado** se estudió la población *E. coli* productora de BLEE en una colección de **aislados invasivos** procedentes de pacientes con urosepsis, recogidos durante el proyecto ITU-BRAS. La estructura poblacional se estudió mediante MLST y PFGE, asignando los grupos filogenéticos y los subclones dentro de ST131 mediante PCR. Este análisis reveló el predominio del subclón H30Rx-ST131. La caracterización de las BLEE por PCR y secuenciación mostró que este subclón era productor de CTX-M-15. La resistencia a antibióticos estudiada mediante difusión en disco indicó que este subclón se asociaba más a multirresistencia que los aislados no-ST131. El genotipo de virulencia se determinó mediante PCR y en base a éste se determinaron los índices de virulencia (IV, número de FV detectados), perfiles de virulencia y la clasificación en ExPEC y UPEC de los aislados. Se observó que en comparación con los aislados no-ST131, el clon ST131 mostraba un mayor IV y se asociaba a determinados FV agrupados en

una menor diversidad de perfiles y además se clasificaba en ExPEC y UPEC más frecuentemente. La definición de ExPEC y UPEC estaba también asociada a un mayor IV.

Ante el predominio del clon ST131 observado, en el **segundo apartado** se amplió el estudio a la detección de todos los aislados ***E. coli*-ST131 en aislados invasivos**. Utilizando la misma estrategia que en el apartado anterior, se observó un predominio del subclón *H30Rx* frente a los subclones *H30* no-Rx y no-*H30*. Este subclón se asoció a la resistencia a quinolonas, aminoglucósidos y combinaciones de betalactámicos con inhibidores de las betalactamasas. Por el contrario, destacó el bajo porcentaje de resistencias a betalactámicos y aminoglucósidos del subclón *H30* no-Rx, relacionado filogenéticamente con el primero. Igualmente, el subclón *H30Rx* mostró mayor IV y mayor número de aislados ExPEC mientras que el *H30* no-Rx presentó un IV incluso menor que el subclón no-*H30*. El análisis de los perfiles de virulencia mostró una vez más una menor diversidad de perfiles entre los aislados *H30Rx*. Además, las variantes de los FV *kpsII* y *pap* presentaron diferencias que sugerían una distribución específica por subclón.

En el **tercer apartado** se seleccionaron aislados ***E. coli*-ST131** (productores y no productores de BLEE) para su estudio en un **modelo murino de sepsis**. La virulencia experimental observada se evaluó con las variables índice de letalidad (IL) y rapidez de letalidad. Los resultados mostraron un IL muy variable entre los distintos aislados. Aunque las cepas clasificadas como ExPEC así como las productoras de BLEE se asociaron a mayor letalidad, lo que sugeriría que el subclón *H30Rx* era más virulento, no se observaron diferencias significativas entre subclones ni se asoció un mayor IL con mayor IV. Por tanto no se puede inferir una mayor letalidad de las cepas *E. coli*-ST131 en base a su mayor contenido en FV.

En el **cuarto apartado** se estudiaron las mismas características que en el primer apartado en una serie de aislados ***E. coli*-BLEE ST131 no invasivos** procedentes de pacientes de 4 hospitales europeos (proyecto R-GNOSIS). El clon ST131 mostró mayor porcentaje de resistencias a antibióticos y contenido de FV que una selección aleatoria de aislados *E. coli*-BLEE no-ST131. Al igual que en los aislados invasivos, el subclón *H30Rx* se asoció a mayor contenido de mecanismos de resistencia y mayor IV que el subclón *H30* no-Rx pero en este caso en este subclón se observó menor diversidad de perfiles, detectándose diferencias marcadas entre ambos subclones en cuanto a las variantes de *kpsII* y *pap*. Sin embargo, tanto la prevalencia del clon ST131 como la de sus subclones mostraron diferencias geográficas, que estuvieron también asociadas al tipo de BLEE más frecuentemente detectada en cada hospital. Así, en Madrid predominó el subclón *H30Rx*-CTX-M-15 mientras que en Ginebra fue el *H30* no-Rx-CTX-M-27. A diferencia de en los aislados invasivos, la enzima CTX-M-27 fue la segunda más

prevalente y representa la emergencia en Europa de esta enzima asociada al subclón *H30* no-Rx, con una incidencia importante en Suiza.

En **conclusión**, el subclón *H30x* productor de CTX-M-15 y asociado a resistencia a múltiples familias de antibióticos es el principal causante de bacteriemias de origen urinario en España. Este subclón tiene un alto contenido en genes de virulencia agrupados en perfiles específicos, pero no demuestra una virulencia experimental significativamente mayor que aislados *E. coli*-ST131 pertenecientes a otros subclones. Además, el subclón *H30Rx* predomina también entre los aislados no invasivos en nuestro país. Sin embargo, el subclón *H30* no-Rx asociado a la producción de CTX-M-27 está emergiendo en Europa, principalmente en Ginebra.

ABSTRACT

E. coli is the main agent of urinary tract infections in the community and hospital setting, mainly due to uropathogenic *E. coli* (UPEC), a specific pathotype found in the extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) population. Several studies have alerted of a rise in the incidence of urinary sepsis due to multidrug-resistant *E. coli*. This increase has been associated with the worldwide expansion of a high-risk clone, the *E. coli* B2-ST131. This clone shows a high content in virulence factors (VFs) and population structure analyses have demonstrated that its expansion is due to a lineage characterized by the expression of the allele 30 of the *fimH* gene. This lineage has been associated to quinolones resistance and includes subclone H30Rx, associated with production of extended spectrum betalactamases (ESBL), mainly CTX-M-15. The reason for the predominance of clone ST131 among UPEC isolates is not clear and it is postulated that it may be due to adaptive advantages conferred either by its greater number of VF that would allow it to better colonize or invade the host or by it's being resistant to several families of antimicrobials.

This thesis proposes the hypothesis that both the virulence factors and antimicrobial resistance are implicated in the dissemination of the ST131 clone. To prove this hypothesis, the main objective of this thesis was to describe the population structure and the virulence and resistance determinants of *E. coli*-ST131 in a population of invasive and non-invasive isolates.

In the **first chapter**, the **ESBL-*E. coli*** population was studied in a collection of **invasive isolates** from patients suffering from urosepsis obtained during the ITU-BRAS project. Population structure was studied by MLST and PFGE, assigning phylogenetic groups and ST131 subclones by PCR. This analysis revealed the predominance of the H30Rx-ST131 subclone, and the characterization of ESBLs by PCR and sequencing showed that this subclone was mainly a CTX-M-15 producer. Susceptibility testing was studied by the disk diffusion method and it indicated that subclone H30Rx was more frequently multidrug resistant than non-ST131 isolates. The virulence genotype was determined by PCR and according to it the virulence score (VS, number of VF detected), virulence profiles and ExPEC and UPEC classification was performed. The results showed that compared with non-ST131 isolates, the ST131 clone showed higher VS, it was associated with certain VF grouped in a less varied set of profiles and it was also classified more often as ExPEC and UPEC. These definitions were also associated with higher VS.

In view of the ST131 clone predominance, in the **second chapter** the study was broadened to detect all *E. coli*-ST131 among **invasive isolates**. Using the same strategies as the previous chapter, the predominance of *H30Rx* subclone *versus H30* non-Rx and non-*H30* subclones was observed. The *H30Rx* was associated with resistance to quinolones, aminoglycosides and betalactamases inhibitor-penicillin combinations. Conversely, in the *H30* non-Rx subclone the low percentage of resistant isolates to betalactams and aminoglycosides was predominant. Likewise, subclone *H30Rx* showed higher VS and higher number of isolates classified as ExPEC while subclone *H30* non-Rx showed lower VS even than the non-*H30* subclone. The analysis of virulence profiles revealed once again, lesser diversity of profiles among *H30Rx* isolates. Moreover, the variants of VF *kpsII* and *pap* presented differences that suggested a specific distribution according to subclone.

In the **third chapter**, ST131-*E. coli* isolates (both ESBL producers and non-producers) were selected for their study in a sepsis murine model. The observed experimental virulence was evaluated with variables lethality score (LS) and swiftness of lethality. Results showed highly varying LS among the isolates. Although ESBL production and ExPEC classification were associated with high LS, which would suggest that the *H30Rx* subclone was more virulent, no significant differences were observed among subclones and neither was LS associated with VS. Therefore, higher lethality in *E. coli*-ST131 isolates cannot be inferred based on its higher VF content.

In the **fourth chapter**, the same characteristics as in the first one were studied on a series of non-invasive ESBL-*E. coli* ST131 isolates of patients from 4 European hospitals. The ST131 clone showed a greater percentage of resistance to antimicrobials and higher VFs content than a random selection of ESBL-*E. coli* non-ST131. As in the invasive isolates, the *H30Rx* subclone was associated with a higher content in resistance mechanisms and VS than the *H30* non-Rx subclone, but in this case in the latter subclone less profile diversity was observed, and clear differences were observed among both subclones regarding variants of the *kpsII* and *pap* genes. However, both the ST131 clone prevalence and that of its subclones showed geographical differences that were also associated with the ESBL type more often detected in each hospital. Thus, *H30Rx*-CTX-M-15 isolates were more common in Madrid while in Geneva, the *H30* non-Rx-CTX-M-27 were more often detected. Different from in the invasive isolates, the CTX-M-27 enzyme was the second most prevalent enzyme and this represents the emergence in Europe of this enzyme, associated with the *H30* non-Rx subclones, with a relevant incidence in Switzerland.

In **conclusion**, the CTX-M-15 producer *H30Rx* subclone associated with multidrug resistance is the main cause of bacteraemia of urinary origin in Spain. This subclone showed a high content of virulence factors grouped in specific profiles, but it did not showed a significantly higher experimental virulence in comparison with other ST131 subclones. Moreover, the *H30Rx* subclone also predominated among non-invasive isolates in our country. However, the *H30 non-Rx* subclone associated with CTX-M-27 production is emerging in Europe, mainly in Geneva.

INTRODUCCIÓN

“Conoce al enemigo y concóctete a ti mismo y en cien batallas, no estarás jamás en peligro.”

Sun Tzu. “El Arte de la Guerra”

1. *Escherichia coli*

Escherichia coli es un bacilo Gram-negativo de la familia *Enterobacteriaceae*, dominio *Bacteria*, filo *Proteobacteria*, clase *Gammaproteobacteria*, y orden *Enterobacteriales*. Recibe su nombre de Theodore Escherich, que describió este microorganismo por primera vez en 1885 durante sus estudios de la microbiota fecal de neonatos (1)

E. coli es anaerobio facultativo no esporulado, generalmente móvil mediante flagelos peritricos, fermentador de glucosa y numerosos azúcares, reductor de nitratos a nitritos, catalasa positivo, oxidasa negativo, positivo en la prueba del indol y negativo en la de la ureasa. Crece bien en la mayoría de medios generales y selectivos para Gram-negativos y fermenta la lactosa en agar de MacConkey, aunque un 10% de las cepas de esta especie pueden ser lactosa-negativas.

Es una bacteria ubicua, cuyo principal nicho es el tracto gastrointestinal de mamíferos y pájaros, que son colonizados al poco de nacer. *E. coli* también se encuentra en el medio ambiente en el agua y la tierra, generalmente por contaminación a partir de materia fecal y de hecho su detección en aguas de uso humano se utiliza como marcador de contaminación fecal. En humanos es una de las bacterias comensales más frecuentemente encontradas en el tracto gastrointestinal (principalmente íleo distal y colon), con una densidad que oscila entre 10^6 y 10^8 células por gramo de contenido intestinal. No obstante, la microbiota intestinal no es homogénea y puede variar entre individuos y dentro de un mismo individuo, ya que puede ser afectada por la dieta, estado del sistema inmune, comorbilidades o el contacto con antibióticos.

Además de en el intestino *E. coli* puede encontrarse en otras localizaciones anatómicas, sobretudo en individuos con determinados factores de riesgo. Así, *E. coli* puede colonizar la orofaringe de pacientes ingresados en hospitales (2) o la vagina de mujeres postmenopáusicas o que usan como medio contraceptivo diafragmas y/o agentes espermicidas (3,4).

La población de *E. coli* se divide en tres grupos o patotipos en función de su impacto en la salud pública: comensal o no patógena, intestinal y extraintestinal. Estudios comparativos de cepas no patógenas con aquellas pertenecientes a los patotipos patógenos han demostrado que las cepas patógenas poseen determinados factores, que recibieron el nombre de factores de virulencia, específicos de cada patotipo (5).

El primer tipo, *E. coli* comensal, es microbiota habitual del intestino y tiene incluso efectos beneficiosos sobre el hospedador ya que la ocupación de la superficie intestinal por estas cepas limita la colonización por otras especies o incluso por distintas cepas de *E. coli*, por lo que tienen un papel protector frente a patógenos cuya puerta de entrada es el intestino. Estas cepas comensales no causan infección salvo en casos de un inóculo alto (generalmente por alteración de la barrera intestinal, como una perforación intestinal) o defectos en el sistema inmune (6).

El segundo tipo es el *E. coli* intestinal, causante de cuadros de diarrea de gravedad variable. Poseen unos factores de virulencia concretos que definen su patogénesis y permiten la clasificación de estas cepas en subpatotipos: ETEC (*Enterotoxigenic E. coli*), EHEC (*Enterohemorrhagic E. coli*), EPEC (*Enteropathogenic E. coli*), EIEC (*Enteroinvasive E. coli*), DAEC (*Diffuse Adhering E. coli*) y EAEC (*Enteraggative E. coli*) (7,8).

Por último, *E. coli* patógeno extraintestinal (ExPEC, *Extraintestinal pathogenic E. coli*) puede estar colonizando el tracto gastrointestinal del ser humano pero se caracteriza por infectar también localizaciones normalmente estériles. Estas cepas son las principales causantes de las infecciones extraintestinales por *E. coli*, incluidas las infecciones del tracto urinario (ITUs) y las bacteriemias. Por ello, tienen un impacto considerable en salud pública (9) y son un campo muy extendido de investigación (6).

Además, las cepas de *E. coli* se han clasificado en los grupos filogenéticos A, B1, B2, C, D y más recientemente, E, F y el clado críptico I (10,11). Estudios posteriores revelaron que las cepas de *E. coli* no se distribuían de manera aleatoria en estos grupos según su origen, sino que las cepas causantes de infección extraintestinal pertenecían generalmente a los filogrupos B2 o D y las comensales al A o B1. Además, estos estudios observaron la asociación de los filogrupos considerados “virulentos” (B2 y D) con las cepas que contenían un mayor número de factores de virulencia (12–14).

1.1. *E. coli* extraintestinal (ExPEC)

Una cepa de *E. coli* puede clasificarse como ExPEC en base a distintos criterios. El primero y más evidente es el origen de la muestra. Aislados procedentes de infecciones de localización extraintestinal serían entonces inmediatamente considerados ExPEC, mientras que cualquier aislado de colonización sería no-ExPEC. No obstante, como ya hemos dicho, es posible encontrar cepas colonizando el tracto intestinal que son clasificables como ExPEC (15) e igualmente, cepas no-ExPEC pueden causar infección extraintestinal en individuos

inmunodeprimidos. Por ello este criterio no es el más específico. El segundo criterio parece ser el más correcto, aunque poco práctico para su aplicación en grandes colecciones, laboratorios con alta carga de trabajo o en situaciones de brotes epidémicos dado que consiste en enfrentar los aislados estudiados a un modelo de infección experimental (16). Por último, el criterio más utilizado consiste en inferir su carácter patogénico extraintestinal en base a su contenido en genes de virulencia y su asignación un grupo filogenético considerado “virulento”, como son los filogrupos B2 o D. En la mayoría de estudios sobre cepas ExPEC en la literatura utilizan un algoritmo basado en la presencia de determinados genes de virulencia como adhesinas (*papA* y *papC*, *afa/dra* y *sfa/foc*), sideróforos (*iutA*) y determinantes capsulares (*kpsII*) (17) para clasificar las cepas.

Las cepas ExPEC poseen en gran número factores de virulencia que les permitan evadir la respuesta inmune, aumentar su supervivencia al suero o codificar para toxinas. Aunque se les ha denominado factores de virulencia (FV), dado que las cepas ExPEC portadoras de estos factores han sido encontradas como comensales sin causar aparente infección, se especula que estos factores favorecen la colonización y otorgan a las cepas ExPEC ventajas sobre otras cepas para colonizar y permanecer en el tracto gastrointestinal (18). Estos factores de virulencia, o de colonización, se encuentran codificados generalmente en plásmidos, bacteriófagos, o en zonas del cromosoma denominadas islas de patogenicidad (PAIs, *pathogenicity islands*) por contener agrupados varios de estos factores de virulencia (19,20).

Como se he mencionado anteriormente, al igual que se ha observado la agrupación de las cepas ExPEC en los grupos filogenéticos B2 y D, también se ha descrito la asociación de determinados factores de virulencia con esos filogrupos (5). Agrupaciones específicas o perfiles de factores de virulencia comunes en cepas de un mismo linaje sugieren transmisión vertical aunque se ha observado una gran diversidad de perfiles incluso dentro de cepas relacionadas entre sí, consistente con transmisión horizontal (21).

Entre las infecciones extraintestinales más comúnmente causadas por *E. coli* ExPEC se encuentran las bacteriemias, las infecciones urinarias, abdominales, respiratorias, del sistema nervioso central y de heridas quirúrgicas (21). En función del tipo de infección que causan con más frecuencia se han descrito varios subpatotipos dentro de *E. coli* ExPEC: *E. coli* uropatógeno (UPEC, *uropathogenic E. coli*), patógeno aviar (APEC, *avian pathogenic E. coli*) y las cepas causantes de meningitis y sepsis neonatal o NMEC (22).

Entre los posibles agentes causantes de bacteriemia *E. coli* es el microorganismo Gram-negativo más frecuentemente implicado en este tipo de infecciones, tanto comunitarias como nosocomiales (23). Además, el número de bacteriemias por *E. coli* ha aumentado en la última década, existiendo un estudio reciente a nivel europeo que ha informado de un incremento anual del 9% en el número de casos desde el año 2002 al 2008 (24). Este incremento fue en su mayoría a expensas de cepas ExPEC multirresistentes, con altas tasas de resistencia a fluoroquinolonas, aminoglucósidos y betalactámicos. Este incremento de resistencia en cepas ExPEC es actualmente considerado un problema de salud pública (25).

1.2. *E. coli* uropatógeno

Las cepas de *E. coli* UPEC constituyen un tipo específico de ExPEC caracterizados por un especial potencial patógeno sobre el aparato urinario. De la misma manera que describíamos los criterios para definir una cepa ExPEC, las cepas UPEC serían, según un criterio basado en su origen, aquellas aisladas de la orina de pacientes con ITU. Sin embargo, si este criterio tenía limitaciones en la definición de cepas ExPEC, esto es mucho más evidente en las UPEC. La definición de ITU complicada incluye cuadros de bacteriemia o sepsis de origen urinario, por lo que cepas aisladas de hemocultivos también podrían considerarse UPEC.

Al igual que para las cepas ExPEC, se han definido un algoritmo basado en la detección molecular de ciertos genes de virulencia (*vat*, *fyuA*, *yfcV* y *chuA*) para considerar una cepa de *E. coli* como UPEC (26). No obstante, otros factores de virulencia además de los descritos en ese algoritmo están también asociados a cepas UPEC, como *iutA*, *PAI* o *sat* (8). En base al contenido en genes de virulencia, y aplicando el criterio anteriormente descrito, cepas procedentes del tracto gastrointestinal de individuos sanos se han clasificado también como UPEC (15). Estos hechos ha llevado a postular la teoría de que el tracto gastrointestinal actúa de reservorio de cepas productoras de ITU (18,25,27). Se especula que cepas fecales colonizan el área periuretral, y llegan a la uretra por proximidad. Una vez en el tracto urinario colonizan la vejiga y cepas con los factores de virulencia adecuados son capaces de ascender hasta el riñón e incluso causar bacteriemia (Figura 1). Esto podría justificar en parte la mayor frecuencia de ITUs en mujeres, especialmente en aquellas en edad reproductiva.

Según el informe EPINE (Estudio de Prevalencia de Infecciones Nosocomiales en España) (EPINE 2016, <http://hws.vhebron.net/epine/>), la infección urinaria es la infección más frecuente tanto a nivel comunitario como nosocomial. *E. coli* uropatógeno es la primera causa de ITU adquirida en la comunidad, con un porcentaje estimado del 20% de mujeres mayores

de 18 años que sufrirán al menos una ITU en su vida (28). En España, la mayoría de las ITU se presentan como no complicadas, principalmente en mujeres jóvenes, estimándose una incidencia de 0.7 episodios por personas/año (29).

Aunque clásicamente se considera a *E. coli* un patógeno comunitario (al contrario que *Klebsiella spp.*) y es de hecho el principal causante de infecciones comunitarias, es también el responsable del 16% de las infecciones nosocomiales en España según el informe EPINE 2016.

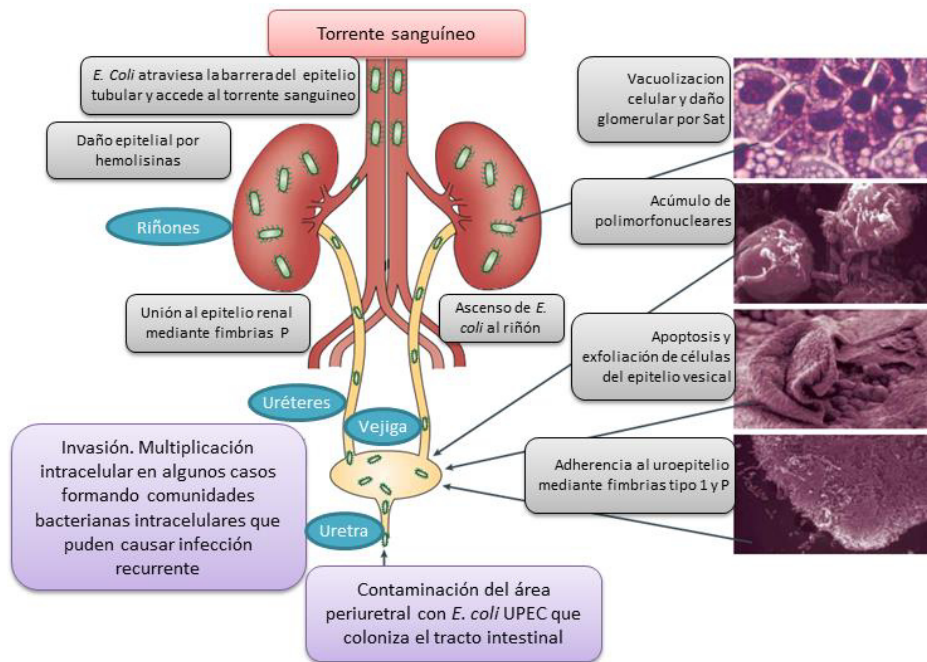


Figura 1. Patogénesis de la ITU.

A partir de la flora fecal, *E. coli* uropatógeno asciende hasta la vejiga, donde se adhiere a la pared mediante fimbrias (tipo 1 y P). Las cepas portadoras de fimbrias P tiene mayor facilidad para ascender hasta el riñón, donde la producción de toxinas (hemolisinas y citosinas) pueden dañar el epitelio lo suficiente para que *E. coli* acceda al torrente sanguíneo y cause bacteriemia. (Modificado de (8))

2. Factores de virulencia

Como hemos mencionado anteriormente, el estudio de los factores de virulencia de ExPEC es una de las herramientas fundamentales para su clasificación, así como para evaluar su potencial patógeno.

Los factores de virulencia que se han descrito hasta la actualidad en las cepas ExPEC pueden clasificarse según su función en adhesinas, sideróforos, toxinas y protectinas. El antígeno capsular o AgK y el antígeno somático del lipopolisacárido (AgO) (Figura 2) utilizados

clásicamente para el serotipado de *E. coli*, también contribuyen junto con estos factores a la patogenicidad de las cepas ExPEC.

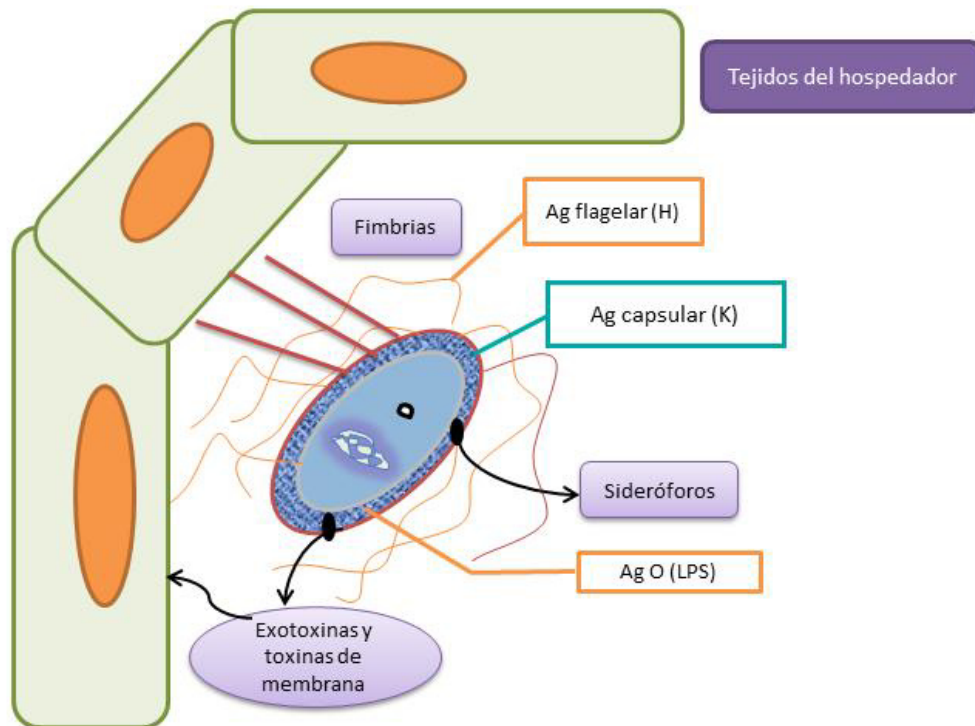


Figura 2. Representación de los elementos que intervienen en la patogénesis de *E. coli*: Sideróforos, toxinas, proteínas de la cápsula y elementos de movilidad y adhesión (fimbrias y flagelos).

LPS: Lipopolisacárido.

2.1. Adhesinas

Las adhesinas son moléculas de adhesión que permiten al microorganismo unirse a las superficies celulares a través de un receptor. Las adhesinas están situadas en los extremos de las fimbrias, que son apéndices filamentosos formados por subunidades proteicas ancladas a la membrana externa. Las cepas ExPEC y UPEC suelen codificar genes para varios tipos de fimbrias (30–32) que se describen brevemente a continuación.

Las **fimbrias tipo 1** (manosa-sensibles) son capaces de unirse a eritrocitos, células del epitelio vaginal, urinario, bucal e intestinal. La disminución de su adherencia a las células del uroepitelio en presencia de altas concentraciones de la proteína de Tamm-Horsfall (PTH) puede explicar el papel protector de esta proteína en las ITUs. Paradójicamente, bajas

concentraciones de PTH favorecen la adherencia de estas fimbrias (32). Las fimbrias de tipo 1 están codificadas por un clúster de genes (Figura 3) que incluye los genes que codifican para la subunidad estructural (la adhesina FimH), proteínas accesorias involucradas en el transporte, ensamblaje y anclaje de las subunidades, y proteínas reguladoras (33).

Los aislados clínicos contienen generalmente una única copia de este clúster de genes y en este tipo de aislados la expresión puede estar regulada por factores ambientales. Las fimbrias tipo 1 se han descrito tanto en cepas de *E. coli* uropatógenas como no uropatógenas, pero se ha visto que en la infección urinaria, las fimbrias tipo 1 contribuyen a colonizar la vejiga al adherirse a su superficie, aunque tienen un papel menor en la colonización e invasión del tracto urinario superior (30).

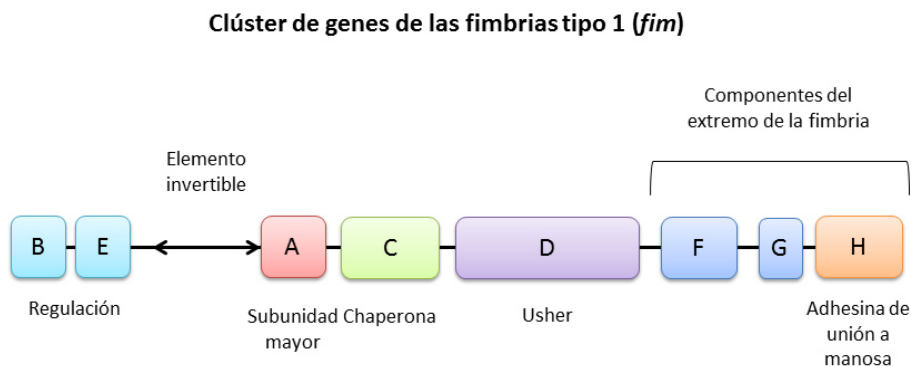


Figura 3. Estructura del clúster de genes que codifican para las fimbrias tipo 1

Modificado de (33). El gen *fimH* situado en el extremo codifica para la adhesina de unión a manosa. *fimA* codifica para la subunidad mayor que forma la fimbria, en cuyo extremo están las subunidades codificadas por *fimF* y *fimG*, que anclan la adhesina a la fimbria.

Las **fimbrias tipo P** están codificadas por un clúster de genes (Figura 4) denominados ***pap*** (***pyelonephritis associated pili***) y son características de las cepas UPEC (30,32). El clúster incluye el gen *papA*, que codifica para la subunidad estructural mayor, el gen *papC*, encargado del transporte de las subunidades al exterior de la célula y el ensamblaje de la fimbria, el gen *papE*, que une el complejo de adhesión *papF-G* a la fimbria, los genes *papF* y *papG* que codifican para el mínimo complejo de adhesión necesario, siendo *papG* la adhesina propiamente dicha, y el gen *papH* que interviene en el ensamblaje de las subunidades y su anclaje a la fimbria. Se conocen distintas variantes de la adhesina PapG caracterizadas en base a su capacidad de unión al receptor (clase I-IV). Las cepas portadoras de *pap* pueden tener múltiples copias de este clúster (32).

En ensayos con ratones, las fimbrias P causan inflamación local y son un determinante principal en la colonización e invasión del tracto urinario superior. De hecho causan enfermedad diseminada en ratones cuando las cepas portadoras de estas fimbrias son administradas por vía endovenosa (32). Por ello son una de las dianas estudiadas para una posible vacuna que proteja frente a ITUs.

Clúster de genes de las fimbrias tipo P (*pap*)

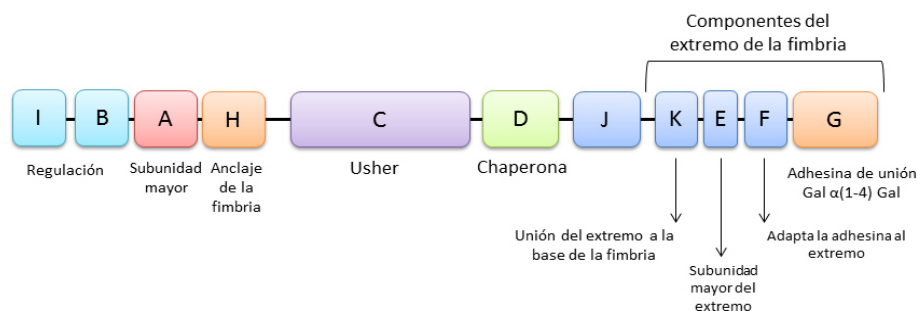


Figura 4. Estructura del clúster de genes que codifican para las fimbrias tipo P.
Modificado de (33)

Las **adhesinas no fimbriadas** reciben su nombre debido a su estructura, diferente de las fimbrias tipo 1 o P en que aparecen como una fina red o cobertura filamentosa en la superficie celular, difícil de apreciar incluso con microscopía electrónica (32). Estas adhesinas aglutinan eritrocitos humanos en presencia de D-manosa y están codificadas por una unidad de transcripción que contiene los genes *afaA*, *afaE*, *afaD*, *afaB* y *afaC*. Se han descrito 4 operones distintos (*afa1-4*), cada uno codificando para distintas adhesinas Afa I-IV. Afa I y Afa-III pertenecen a la familia de las hemaglutininas, que incluyen las adhesinas de la familia Dr. Mientras la región que contiene los genes *afaD*, *afaB* y *afaC* está muy conservada, existe una alta heterogeneidad en el gen *afaE*. Este gen codifica para el polipéptido de la adhesina Afa, mientras que el resto de genes codifica para proteínas de soporte implicadas en la expresión de *afa*. Esta adhesina se localiza en la superficie de la bacteria o en el sobrenadante de medios de cultivos sobrecrecidos en forma de agregado macromolecular (34).

Las adhesinas de la **familia Dr** reciben su nombre del receptor al que se unen, el antígeno del grupo sanguíneo Dr. Estas adhesinas se unen preferencialmente a la membrana basal de las células renales humanas, a la cápsula de Bowman y en menos grado a las células del epitelio vesical. El operón que codifica para estas adhesinas se llamó *dra* y está formado por los

genes *draA*, *draC*, *draD* y *draE*. El gen *draE* codifica para la subunidad estructural y para la estructura de adhesión al receptor DAF (*decay accelerating factor*). Estudios en modelos animales con mutantes para este operón mostraron persistencia de *E. coli dra+* en tejido renal mientras que *E. coli dra-* era eliminado progresivamente (30). No obstante, estas fimbrias se encuentran con menor frecuencia que otras familias de fimbrias en las cepas UPEC (34) aunque en otros estudios se han asociado, sin embargo, a cistitis (32).

Las adhesinas tipo S (fimbrias reconocedoras de galactósidos que contienen ácido siálico) son estructuralmente muy parecidas a las fimbrias tipo 1 o P, y están asociadas a cepas productoras de meningitis y sepsis (34,35). Están codificadas por un clúster de genes que contiene el gen *sfaS*, *sfaA*, *sfaG* y *sfaH*. El gen *sfaA* codifica para la subunidad proteica mayor, mientras que el resto de genes forman el complejo *sfa*, con *sfaS* codificando para la subunidad menor del complejo que actúa como la adhesina de unión al ácido siálico. Diversos estudios han informado de la prevalencia de estas adhesinas en cepas ExPEC, con porcentajes de hasta el 100% en cepas ExPEC en general y 50% en cepas UPEC (22,36).

Las **adhesinas de la familia F1C** (fimbrias del serotipo 1C) no confieren a las cepas portadoras la capacidad de hemaglutinar eritrocitos humanos, pero sin embargo sí permiten la adhesión al epitelio bucal, y colaboran en la adhesión a los túbulos colectores renales y al epitelio del túbulo distal. La síntesis de estas fimbrias está mediada por el clúster de genes *foc*: *focA*, *focC*, *focG*, *focH* y *focI*. El gen *focA* codifica para la subunidad estructural mayor, similar al producto codificado por *focI*. El gen *focC* es indispensable para la formación de la fimbria y el resto de genes codifican para subunidades menores. Este operón muestra una alta homología genética con el operón *sfa*, pero difieren en su especificidad de receptor.

Otras adhesinas estudiadas son: *iha*, *bmaE* y la fimbria *yfcV*. El gen *iha* codifica para una adhesina no hemaglutinina regulada por hierro y asociada a cepas UPEC. Fue descrita asociada a una isla de patogenicidad que contenía otros genes de virulencia y su introducción en *E. coli* no adherente confiere la capacidad de adherencia a células HeLa (37,38). El gen *bmaE* codifica para las fimbrias específicas del antígeno del grupo sanguíneo M y son poco frecuentes en cepas UPEC (32). El gen *yfcV* codifica para una fimbria poco estudiada, estructuralmente similar a la familia de fimbrias que incluye las fimbrias tipo 1 y P, y que se ha asociado a cepas UPEC (26,31).

2.2. Sideróforos

El hierro es esencial para la supervivencia de los microorganismos, pero suele estar secuestrado por el hospedador mediante moléculas como la transferrina, o incorporado en los grupos hemo. Los sideróforos son parte de los mecanismos que emplea la bacteria para asegurarse un suministro estable de hierro. Son moléculas quelantes con alta afinidad por hierro férrico, con baja masa molecular, que las bacterias liberan al ambiente para captar el hierro libre o el unido a proteínas. Los complejos hierro-sideróforo son reconocidos por receptores de la membrana externa de la bacteria e internalizados mediante distintos sistemas. Las cepas UPEC pueden ser capaces de producir hasta cuatro tipos de sideróforos distintos: enterobactina, salmoquelina, aerobactina y yersiniobactina (Figura 5). Los dos primeros sideróforos pertenecen a la familia de los catecolates, la aerobactina a la de los hidroxamatos y la yersiniobactina a una familia de sideróforos con anillo heterocíclico. Cada sideróforo tiene unas características específicas que confieren a las cepas ExPEC una gran capacidad de adaptación.

La **aerobactina** está codificada por un operón formado por 5 genes, cuatro involucrados en la síntesis (genes *iuc*) y un quinto que codifica para el receptor de membrana externa (*iut*). Este operón puede estar localizado en un plásmido o en el cromosoma, siendo más frecuente esta última localización en aislados clínicos (32). Además, este sistema suele acompañar al operón *pap* en cepas procedentes de ITU y urosepsis, aunque en este último caso solo si la localización es cromosómica (12), lo que sugiere que la localización en el genoma de la bacteria afecta a los FV asociados a la aerobactina. Cuando la aerobactina es codificada por un plásmido, suele acompañarse de genes de resistencia a antibióticos. Estudios clínicos han observado una mayor prevalencia de cepas con aerobactina en pacientes con pielonefritis (73%), cistitis (49%) o bacteriemia (58%) que en bacteriuria asintomática (38%) o cepas fecales (41%). No obstante, comparando cepas del medio ambiente con cepas fecales, se observa una mayor producción de aerobactina en estas últimas, lo que sugiere que la aerobactina facilita la colonización del tracto gastrointestinal (32).

La **enterobactina** y su derivado glicosilado la **salmoquelina** son sideróforos hidroxamatos. La salmoquelina permite evadir la lipocalina-2 (Figura 5), una molécula producida por los neutrófilos que se une a la enterobactina e impide la quelación de hierro por parte de la bacteria. Prácticamente todas las cepas *E. coli* producen enterobactina, y no se han encontrado diferencias entre cepas procedentes del tracto urinario y las de origen fecal pero la salmoquelina es más frecuente en cepas UPEC (30,39). Estos sideróforos son internalizados

por el receptor codificado por *iroN* que puede estar ubicado en el cromosoma o en plásmidos, junto al resto de genes implicados en la producción de salmoquelina (*iroB*, *iroC*, *iroD* y *iroE*).

La **yersiniobactina** es un sideróforo cuyo transporte al interior de la bacteria está mediado por el receptor *fyuA*. Su nombre deriva de haber sido identificada en una isla de patogenicidad procedente de *Yersinia spp.* (40). Su producción también es mayor en cepas UPEC comparada con cepas fecales, y se ha observado con frecuencia la coproducción de salmoquelina y yersiniobactina.

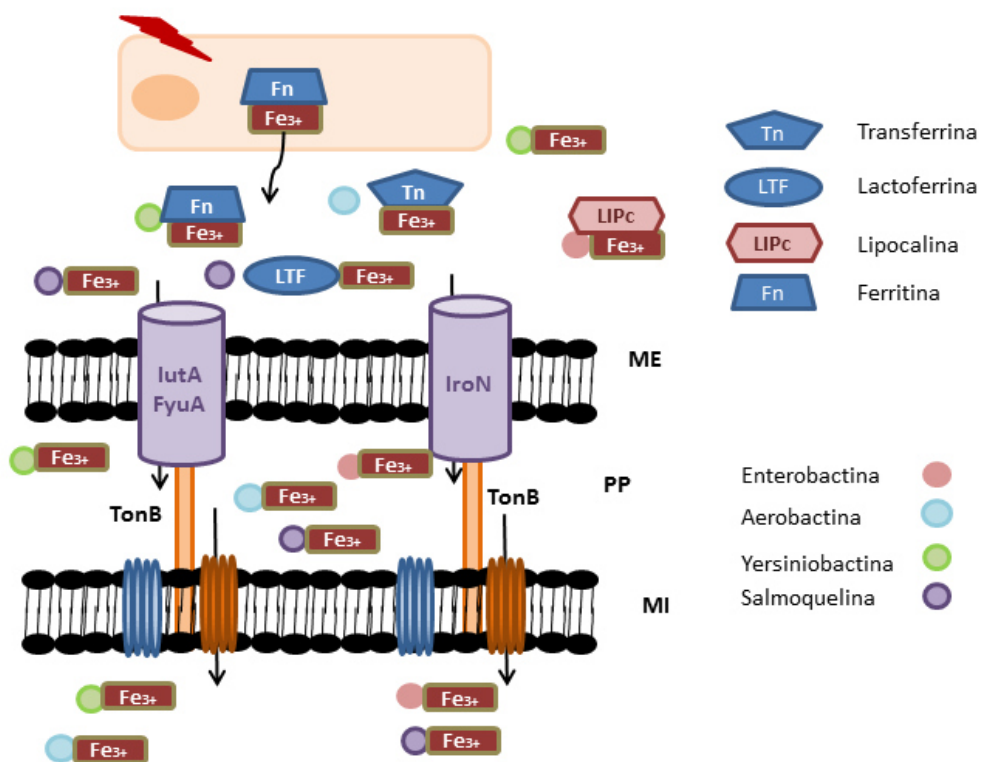


Figura 5. Captación de hierro por enterobacterias.

Durante la infección, las citotoxinas y hemolisinas liberan el hierro de las células ligado a ferritina y haptoglobina. Los sideróforos pueden captar el hierro de la transferrina, lactoferrina y la ferritina y los complejos sideróforos-hierro son captados por los receptores de la superficie bacteriana. Fn: Ferritina. TF: Transferrina. LTF: Lactoferrina. LIPc: lipocalina-2. ME: Membrana externa, PP: periplasma, MI: Membrana interna. [Modificado de (39)].

2.3. Toxinas

La producción de toxinas es frecuente en las cepas ExPEC. Entre ellas están el autotransportador secretado Sat y el autotransportador vacuolizante Vat.

Sat pertenece a la familia de las toxinas autotransportadores serin-proteasas de las Enterobacterias (SPATE, *serin-protease autotransporter toxins in Enterobacteriaceae*). Parece ser expresada con mayor frecuencia por cepas productoras de pielonefritis que por cepas fecales y produce vacuolización en las células del túbulo renal proximal pero no parece contribuir a una mejor adaptación de las cepas portadores en un modelo animal de ITU ascendente (30). El gen codificante *sat* suele encontrarse en islas de patogenicidad integradas en el cromosoma bacteriano (41).

La toxina codificada por **vat** es más parecida a la toxina Tsh, que no depende de serina. El gen *vat* se ha encontrado con frecuencia en *E. coli* de origen aviar.

2.4. Antígeno capsular

La cápsula de *E. coli* es una estructura formada por polisacáridos repetidos de alto peso molecular firmemente unidos a la célula bacteriana y que envuelven su superficie. Tienen funciones protectoras frente a la desecación, la opsonización, la fagocitosis y frente a la acción bactericida del complemento. Junto con el antígeno O, el antígeno capsular o antígeno K (AgK) es el único polisacárido de superficie específico de serotipo.

Los 80 serotipos capsulares de *E. coli* se clasificaron originalmente en base a sus propiedades serológicas (42), pero la incorporación de criterios bioquímicos y genéticos reorganizó estas estructuras en cuatro grupos (Grupo 1-4), con características comunes en cuanto a ensamblaje entre los grupos 1 y 4, y 2 y 3 respectivamente. Los determinantes capsulares del grupo 2 y 3 se encuentran en las cepas extraintestinales (particularmente el grupo 2) y en cuanto a ensamblaje y estructura se parecen a los determinantes capsulares de *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus influenzae*, mientras que los del grupo 1 y 4 son más frecuentes en las cepas intestinales y se parecen a la cápsula de *Klebsiella pneumoniae* (32,43).

La biosíntesis de la cápsula de los grupos 2 y 3 está mediada por los genes del loci *kps*, con diferencias entre ambos grupos en cuanto a organización genética y factores de regulación que proporcionan la capacidad de termorregulación característica de las cápsulas del grupo 2.

El loci cromosómico de *kps* tiene una estructura conservada formada por 3 regiones (Figura 6). La región central o región 2 es serotipo-específica y se encarga de la codificación de las glicosiltransferasas y las sintetasas implicadas en la síntesis de la cápsula. Mutaciones en esta región impiden la síntesis capsular, lo que sugiere que codifica enzimas que sintetizan los distintos antígenos del grupo 2 (por ejemplo K1, K2, K4, K5, K6, K12, K13, K14, K20, K51, K92 y K100) (32,42,43). Las regiones laterales 1 y 3 están conservadas en los distintos serotipos, son independientes de la región 2 y se encargan del ensamblaje de la cápsula en la superficie celular y del transporte, respectivamente. Se cree que el transportador encargado de la exportación del polímero de la cápsula a la superficie celular consiste en dos subunidades de KpsM (dominio transmembrana) y KpsT (dominio de unión a nucleótidos), codificadas en la región 3.

Cápsula de tipo 2



Figura 6. Organización de los genes necesarios para la expresión de la cápsula del grupo 2. Modificado de (43)

Numerosos estudios han analizado el papel de los antígenos capsulares en las infecciones urinarias como factores de virulencia, mostrando evidencias de su importancia en la patogénesis de estas infecciones. Un estudio con mutantes deficientes en K2 mostró que estas cepas presentaban una clara desventaja en supervivencia en vejiga y riñón de un modelo murino de ITU. Otro estudio mostró que K5 parecía proteger de la acción de los neutrófilos, mientras que K1 y K4 utilizaban su similitud con proteínas de los hospedadores vertebrados para evadir el sistema inmune (30,32).

Datos derivados de estudios epidemiológicos refirieron que determinados serotipos como K5 son más frecuentes en cepas de pacientes con infecciones urinarias, especialmente de pielonefritis, que en cepas de origen fecal. K1 es el antígeno más frecuentemente encontrado tanto en cepas fecales como urinarias (32) aunque también es frecuente en cepas productoras de meningitis, junto a otros factores de virulencia como las fimbrias tipo S y el sideróforo *iutA* (44).

2.5. Colicinas

Las colicinas y microcinas son moléculas antimicrobianas de espectro reducido del grupo de las bacteriocinas producidas por las propias bacterias para defenderse de otros microorganismos (45). La colicina o microcina V suele estar codificada en plásmidos tipo ColV. Estos plásmidos pertenecen al grupo de incompatibilidad IncF1 y su presencia se ha asociado a una mayor virulencia de las cepas portadoras. Se postula que esto se debe a que confieren una mayor resistencia al suero y a la fagocitosis, así como una mayor adherencia (32,46,47).

Estos plásmidos llevan con mayor frecuencia genes de virulencia en cepas ExPEC (48). El gen codificante de la colicina V (*cvuC*) se ha encontrado más frecuentemente en cepas causantes de pielonefritis que en infecciones del tracto urinario bajo (32,46) sugiriendo un papel importante de los genes localizados en ese plásmido en la patogenicidad de las cepas UPEC.

La resistencia al suero de las cepas portadoras de plásmidos ColV está asociada a la codificación de dos proteínas de membrana codificadas por los genes *iss* y *traT* (32,47). El gen *iss* (***increased serum survival***) codifica para una lipoproteína de membrana externa que se ha asociado a protección frente a la acción del complemento, a la supervivencia en suero e incrementa la virulencia de las cepas en modelos animales (32,47,49).

El gen *traT*, asociado a los plásmidos ColV pero también detectado en plásmidos de otros grupos de incompatibilidad distintos a IncF, codifica para una proteína externa de membrana de las bacterias implicada en fenómenos de exclusión de superficie (32,49). Esta proteína protege frente a la fagocitosis y también se ha implicado en una mayor supervivencia en suero (47).

2.6. OmpT

El gen *ompT* codifica para una aspartil-proteasa, una proteína de membrana externa considerada un factor de virulencia de las cepas UPEC. Experimentos en modelos *knockout* han

postulado que este gen está implicado en la adherencia e invasión de células del uroepitelio (especialmente el vesical) así como en la formación de comunidades bacterianas intracelulares y la producción de citoquinas (50–52). Estudios epidemiológicos han asociado funcionalmente esta proteína con otros factores de virulencia de UPEC como el determinante capsular o las fimbrias tipo S aunque no están asociados genéticamente (50).

2.7. Marcadores de islas de patogenicidad

Las islas de patogenicidad (*pathogenicity islands*, PAIs) son regiones del cromosoma bacteriano donde se agrupan genes implicados en la virulencia. Su contenido en guanina + citosina es marcadamente diferente del genoma *core* de la bacteria. Estas regiones son consideradas un subtipo de regiones genómicas adquiridas por transmisión horizontal mediante transducción, conjugación o transformación. Muchas veces están situadas cerca de genes de ARNt que se han identificado como puntos frecuentes de movilización de PAIs (7).

Se han descrito en un amplio espectro de especies bacterianas tanto Gram-positivas como Gram-negativas (8,19). El término PAI fue acuñado por Kaper *et al.* para describir dos regiones genómicas del cromosoma de cepas UPEC (53). Determinadas PAIs son específicas de una clase de cepa UPEC, mientras que otras son más promiscuas. La detección de algunos de los genes situados en estas regiones se ha utilizado como marcador subrogado de la presencia de islas de patogenicidad.

Usp (*uropathogenic-specific protein*): esta proteína de 356 aminoácidos fue descubierta en una isla de patogenicidad de cepas uropatógenas (54). La expresión del gen *usp* parecía aumentar la infectividad de las cepas en un modelo murino de ITU ascendente. Estudio posteriores revelaron que Usp podía actuar como una bacteriocina (54,55).

PAI (*malX*) es un marcador de islas de patogenicidad. El gen *malX* codifica para un sistema de enzimas fosfotransferasas que reconocen maltosa y glucosa y que son más frecuentes en cepas ExPEC (56).

3. Resistencias a antibióticos en *E. coli* uropatógeno

Debido a su gran plasticidad genética *Escherichia coli* es capaz de adquirir con gran facilidad resistencia a los antibióticos. Por ello, *E. coli* es uno de los microorganismos indicadores del incremento de resistencia a antibióticos en el estudio EARS-NET (*The European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*, http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial-resistance-and-consumption/antimicrobial_resistance/EARS-Net/Pages/EARS-Net.aspx) una

red europea de vigilancia de resistencia a antibióticos en aislados invasivos. Gracias a estos estudios, se ha observado en los últimos años un aumento de bacteriemias por *E. coli* a expensas de cepas resistentes (24). Se sabe también que el foco urinario es el principal responsable de este tipo de infecciones (57,58). El incremento en resistencias a los antibióticos utilizados comúnmente para la ITU dificulta su tratamiento (59), con el aumento de morbimortalidad y costes médicos que ello conlleva, sobre todo en los casos de urosepsis (60,61).

La expansión de cepas invasivas multirresistentes, sobretodo las productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), son un problema importante a nivel mundial. Hoy en día el tratamiento de la sepsis se ha complicado aún más con la aparición de cepas productoras de carbapenemasas, que hidrolizan a los betalactámicos carbapenémicos, una de las últimas línea de defensa antibiótica de la que disponemos para este tipo de infecciones (62,63). Entre las familias de antibióticos frente a las cuales han aumentado los porcentajes de resistencia están las quinolonas, los betalactámicos incluyendo los carbapenémicos, los aminoglucósidos, la colistina y la fosfomicina.

3.1. Resistencia a quinolonas: ácido nalidíxico y ciprofloxacino

La resistencia a las quinolonas está mediada principalmente por mutaciones puntuales en los genes codificantes de las dianas de las quinolonas, la topoisomerasa II o ADN girasa y la topoisomerasa IV. Ambas enzimas son heterotetrámeros formados por dos subunidades (A y B) codificadas, respectivamente, por los genes *gyrA* y *gyrB* para la girasa y *parC* y *parE* para la topoisomerasa IV. Son necesarias varias mutaciones en estos genes para que aparezca resistencia de alto nivel a las fluoroquinolonas. Sin embargo, el aumento de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para el ácido nalidíxico es un indicativo de que ya existe al menos resistencia de bajo nivel a las fluoroquinolonas, y la exposición a estos antibióticos podría llevar a resistencia de alto nivel a fluoroquinolonas. Otros mecanismos de resistencia a esta familia de antibióticos han sido descubiertos recientemente y están mediados por plásmidos (PMQR, *plasmid-mediated quinolone resistance*) (64). Estos incluyen el gen *qnr*, que protege a la girasa y la topoisomerasa de la acción de las quinolonas, una variante del gen de la enzima inactivante de aminoglucósidos *aac-(6′)-Ib-cr* y los genes *oqxAB* y *qepA* que codifican bombas de expulsión activa.

La resistencia a fluoroquinolonas en *E. coli* UPEC han aumentado de manera significativa. La OMS emitió un informe en 2014 (*“Antimicrobial resistance: global report on surveillance*

2014”(65)) en el que alertaba de tasas de más del 50% de aislados resistentes en muchos países, complicando el tratamiento de las ITUs. El estudio ARES (Antimicrobial Resistance Epidemiological Survey on Cystitis) analiza las resistencias a antibióticos de cepas uropatógenas procedente de ITUs no complicadas comunitarias. Este estudio informó de que España es uno de los países con mayor tasa de resistencia (mayor del 10%) a ciprofloxacino en *E. coli* (66). En ITUs de origen nosocomial o de repetición las tasas de resistencia pueden ser mayores, llegando al 30% (67).

3.2. Resistencia a betalactámicos

Los betalactámicos son una amplia familia de antibióticos bactericidas y uno de los grupos más numerosos y de mayor utilización en clínica. Incluyen las penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos, carbapenémicos y la combinación de penicilinas con inhibidores de las betalactamasas (amoxicilina-clavulánico y piperacilina-tazobactam, por ejemplo). La resistencia a estos antibióticos está mediada principalmente por betalactamasas, enzimas que hidrolizan e inactivan el anillo betalactámico responsable de la acción del antibiótico, y que pueden estar localizadas en plásmidos o en el cromosoma bacteriano. El nivel de resistencia que confieren depende de su nivel de expresión y está modulada por factores de permeabilidad.

Hoy en día, las resistencias de *E. coli* invasivo a los antibióticos de uso habitual en la sepsis como son las cefalosporinas de tercera generación (cefotaxima, ceftazidima y ceftriaxona) han alcanzado tasas de más del 30% en algunos países europeos como Bulgaria, Italia o la República Checa, según datos del ECDC (Figura 7). Según estos mismos datos, en España la prevalencia de aislados *E. coli* no-sensibles a cefalosporinas de tercera generación se sitúa en el 12%.

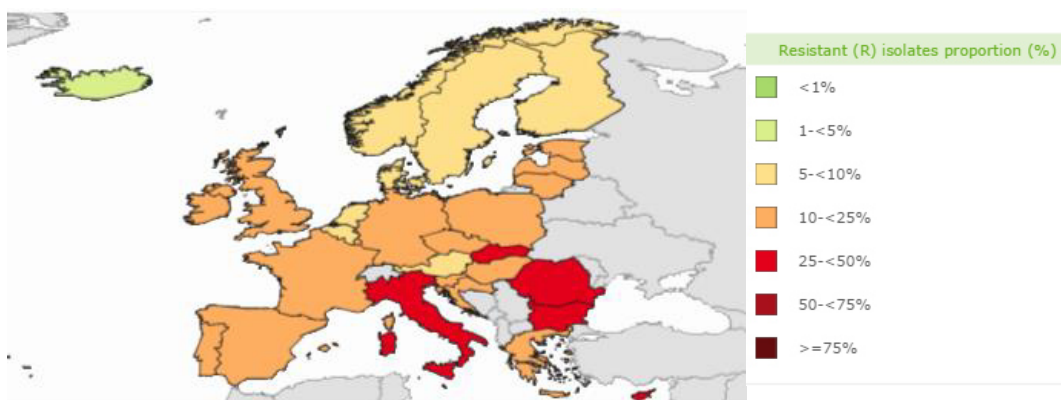


Figura 7. Porcentaje de aislados *E. coli* invasivos resistentes a cefalosporinas de tercera generación según los registros del ECDC (European Center for prevention and Disease Control).
<http://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx?Instance=GeneralAtlas>

Esta resistencia se debe principalmente a la producción de BLEE, que son aquellas enzimas capaces de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas (incluyendo las de amplio espectro) y monobactames, pero no cefamicinas ni carbapenémicos. Estas enzimas se inhiben con compuestos como el ácido clavulánico o el sulfactam. Giske *et al.* propusieron una clasificación de estas enzimas en tres grupos (68): BLEE_A, que incluye a las betalactamasas de clase 2b según el esquema de Bush, Jacoby y Medeiros (69) y que son las más frecuentes (TEM, SHV y CTX-M), BLEE_M y BLEE_{CARBA} que incluyen las AmpC plasmídicas y BLEE tipo OXA, y las carbapenemasas tipo metalo y serin-betalactamasas respectivamente.

Actualmente las enzimas tipo CTX-M son las más prevalentes a nivel mundial tanto en el ambiente comunitario como en el nosocomial (70). Estas enzimas tiene mayor actividad hidrolítica sobre la cefotaxima que sobre la ceftazidima (de ahí su nombre) y se dividen en varios grupos según su secuencia aminoacídica (71) con más de 180 variantes descritas de CTX-M (Tabla 1).

La expansión mundial observada en este grupo de enzimas desde principios del siglo XXI se debe tanto a su localización en elementos genéticos móviles ampliamente distribuidos como su introducción en clones con alto éxito de diseminación, como el clon de *E. coli* UPEC ST131. Además, CTX-M suele ir acompañada en el plásmido de otros elementos de resistencia (generalmente a tetraciclinas, sulfamidas, trimetoprim y aminoglucósidos) y es frecuente que las cepas productoras de CTX-M lo sean también a quinolonas. Estas enzimas pueden también acompañarse de otros tipos de enzimas como OXA-1 o cefalosporinasas plasmídicas (pAmpC) (70).

Tabla 1. Grupos de CTX-M y tipos más frecuentes.

Grupo de CTX-M	Tipo de CTX-M
CTX-M-1	CTX-M-1/3/10/12/15/22/23/32/55
CTX-M-2	CTX-M-2/4/5/6/7/20/76/77
CTX-M-8	CTX-M-8/40/63
CTX-M-9	CTX-M-9/14/16/17/18/19/
CTX-M-25	CTX-M-25/26/39/41/91
CTX-M-74	CTX-M-74
CTX-M-75	CTX-M-75

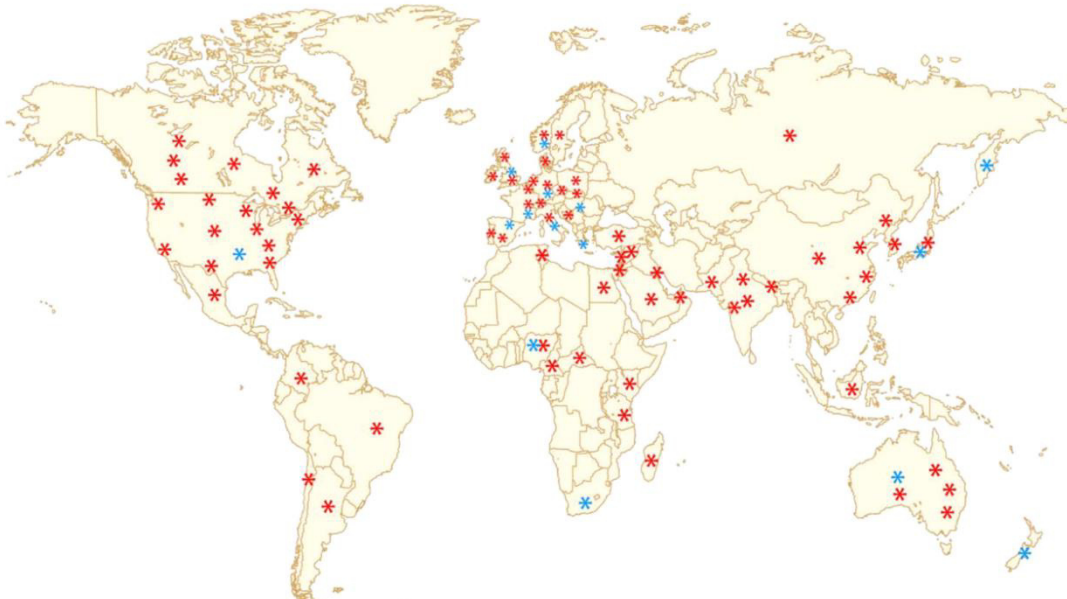


Figura 8. Diseminación del clon *E. coli*-ST131. Los asteriscos rojos indican descripción del clon ST131 entre aislados BLEE, los azules entre aislados resistentes a quinolonas. Tomado de (25).

La enzima más prevalente en las cepas *E. coli*-BLEE es CTX-M-15 (71). Este predominio se ha asociado a la expansión del clon de *E. coli* UPEC ST131, detectado hoy en día en todo el mundo (Figura 8) (72–74).

3.2.1. Resistencia a amoxicilina-clavulánico

Amoxicilina-clavulánico es uno de los antibióticos más consumidos en muchos países (75,76) y su consumo va en aumento, en particular en el sur de Europa (77). Debido a que el 90% de las cepas de *E. coli* uropatógeno son resistentes a amoxicilina, el uso de la combinación con clavulánico es muy común en la infección urinaria no complicada, sumado a la buena biodisponibilidad de este antibiótico por vía oral. El incremento del consumo de este antibiótico se ha visto ligado a un aumento de resistencias (78). La resistencia a amoxicilina-clavulánico puede deberse a distintos mecanismos, entre ellos la producción de betalactamasas tipo IRT (*inhibitor resistant TEM*), betalactamasas plasmídicas tipo OXA-1 o AmpC o la hiperproducción de betalactamasas plasmídicas de clase A (como la TEM-1) o cromosómicas como la AmpC (79,80).

El porcentaje de cepas resistentes a amoxicilina-clavulánico en cepas procedentes de ITU no complicada fue del 18% según el estudio ARESC (66). No obstante, en un estudio español sobre la prevalencia de aislados resistentes a amoxicilina-clavulánico en cepas de *E. coli* causantes de bacteriemia se observó un incremento de en torno al 6% desde el año 2003 al

2006, tanto en cepas comunitarias como en nosocomiales. Esta resistencia estaba significativamente asociada a resistencia a otras familias de antibióticos como las fluoroquinolonas, aminoglucósidos y otros betalactámicos (81). Estudios temporales más recientes en España mostraron una tasa de resistencia del 26% en cepas procedentes de hemocultivos en el año 2010 (82). El incremento de UPEC productores de CTX-M-15 a raíz de la expansión del clon de *E. coli*-ST131 puede haber influido en el aumento de cepas resistentes a amoxicilina-clavulánico, ya que las cepas *E. coli*-ST131-CTX-M-15 suelen llevar asociada la enzima OXA-1 (25).

3.2.1. Resistencia a carbapenémicos

Son los betalactámicos de mayor actividad frente a Gram-negativos, y una de las últimas alternativas terapéuticas para tratar infecciones graves por estos microorganismos. Los mecanismos de resistencia más frecuentes se deben a la producción de carbapenemasas, enzimas plasmídicas de la familia de las betalactamasas tipos A, C y D de Ambler (83) capaces de hidrolizar todos los betalactámicos, incluidos los carbapenémicos. Estas carbapenemasas están empezando a diseminarse (84), como hicieron en su día las BLEEs (Figura 9).

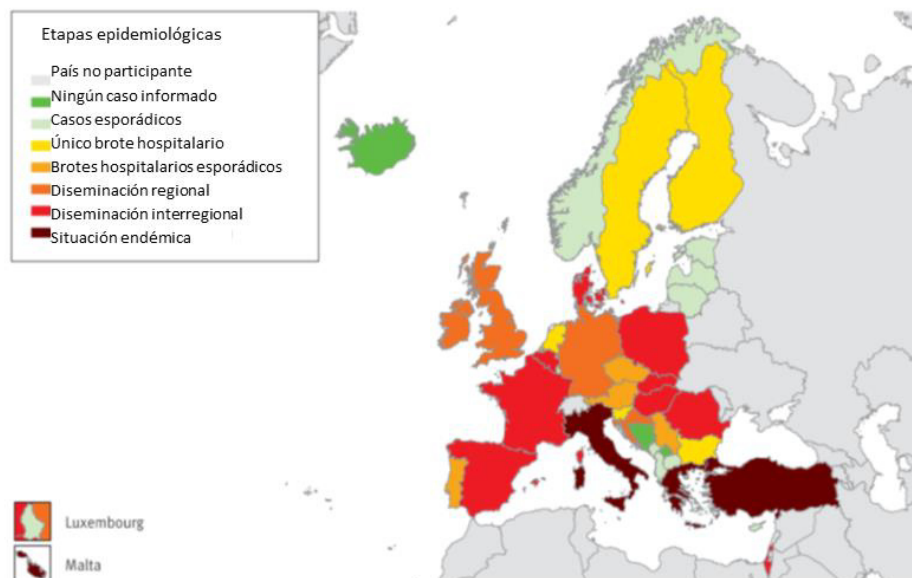


Figura 9. Epidemiología de enterobacterias productoras de carbapenemasas en Europa. Modificado de (84)

Las carbapenemas de clase A incluyen los tipos IMI y KPC, además de otros mucho menos frecuentes. Se inhiben mediante ácido borónico y su expresión está mediada por plásmidos (85,86). KPC es una de las carbapenemasas más prevalentes en Estados Unidos, Israel y América Latina y es endémica en Grecia e Italia (85). Las carbapenemasas de clase C o

metalobetalactamasas (MBL) necesitan zinc para actuar por lo que son inhibidas por quelantes de metales como el EDTA. Además se caracterizan por su baja actividad frente al aztreonam (87). Las MBL más prevalentes son del tipo VIM, IMP y NDM y son más frecuentes en Asia, donde principalmente predomina NDM (India y Pakistán), aunque en otros países como España o Méjico predomina el tipo VIM (87–89). Las carbapenemasas tipo D u oxacilinasas se inhiben *in vitro* por cloruro sódico y tienen una actividad hidrolítica frente a carbapenémicos muy variable, lo que dificulta su detección. Estas enzimas aparecieron primero en Turquía y se han diseminado a Oriente Medio y otras regiones de Asia, América Latina, Estados Unidos y Europa. Recientemente se ha observado un incremento mundial de las enzimas tipo OXA-48 (86,90,91).

Un estudio multicéntrico prospectivo detectó un 8.4% de aislados *E. coli* productores de carbapenemasas en España (91). Las carbapenemasas se diseminan principalmente mediante elementos genéticos móviles, pero otra causa de su diseminación es la adquisición de estos elementos portadores de estos genes por parte de “clones de alto riesgo”, término que designa poblaciones que acumulan determinantes de resistencia, tienen mayor capacidad de diseminación y suelen poseer factores de virulencia que facilitan la colonización y persistencia de los aislados, además de compensar el coste biológico de la adquisición de resistencias (65). Un ejemplo de clon de alto riesgo es el clon de UPEC ST131, portador de CTX-M-15. El estudio antes citado y otros han descrito al clon ST131 como portador de carbapenemasas (63,89).

3.3. Resistencia a los aminoglucósidos

La resistencia a aminoglucósidos está mediada en su mayoría por enzimas modificantes de aminoglucósidos de tipo acetiltransferasas (AAC), fosfotransferasas (APH), y nucleotidiltransferasas (ANT). En Asia son también frecuentes las metilasas de RNA ribosomal (Rmt, ArmA) que inactivan todos los aminoglucósidos (85). Estos mecanismos pueden combinarse también con alteraciones de la permeabilidad, lo que dificulta determinar el mecanismo genético de resistencia en base al fenotipo.

Las enzimas modificantes están frecuentemente asociadas a los plásmidos IncF portadores de CTX-M-15, sobretodo la enzima AAC(6′)-Ib-cr, que confiere resistencia a amicacina y tobramicina, pero no a gentamicina, y afecta también al ciprofloxacino aunque no al levofloxacino (18,25).

3.4. Resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol (cotrimoxazol)

El cotrimoxazol es una combinación sinérgica de dos antibióticos, el trimetoprim y el sulfametoxazol, en un ratio 1:5. El trimetoprim se une a la enzima dihidrofolato reductasa, con preferencia por la bacteriana frente a la humana, mientras que el sulfametoxazol es un análogo del ácido para-aminobenzoico, compitiendo con él en la síntesis de ácido dihidrofólico. La acción sinérgica de estos dos compuestos impide la síntesis bacteriana de ácido tetrahidrofólico. La disminución de este ácido inhibe la síntesis de ADN, pero la presencia de timina revierte la acción del antibiótico (92,93). Tiene una buena eficacia en el tratamiento de infecciones urinarias no complicadas y los mecanismos de resistencia más frecuentes son mutaciones cromosómicas que alteran la diana y disminuyen su susceptibilidad al antibiótico (92) o bien genes de resistencia transmitidos por plásmidos. Este último mecanismo es el más frecuente en *E. coli*.

Las tasas de resistencia a cotrimoxazol se han ido incrementando en la última década. Dado su uso en el tratamiento de la infección urinaria, numerosos estudios han analizado la prevalencia de la resistencia en aislados UPEC. El estudio ARESC describió un 30% de aislados resistentes a cotrimoxazol a nivel internacional (66), mientras que el 66% de las cepas de *E. coli* procedentes de España eran resistentes (94). En Estados Unidos un estudio en aislados de *E. coli* uropatógeno observó un 24% de resistencia (95).

3.5. Resistencia a fosfomicina

La emergencia de mecanismos de resistencia a casi todos los antibióticos disponibles ha hecho que antiguos antibióticos casi en desuso vuelvan a ser opciones terapéuticas. Entre ellos están la fosfomicina y la colistina. La fosfomicina es un antibiótico natural de naturaleza epoxídica con muy bajo peso molecular, aislado inicialmente del hongo *Streptomyces fradie* en España en 1969, aunque actualmente se sintetiza químicamente. Su acción bactericida se debe a la inhibición de la síntesis de la pared de bacterias en fase de crecimiento mediante la unión a MurA, enzima esencial para la síntesis del peptidoglicano. Los mecanismos de resistencia descritos son alteraciones del transporte a través de la pared celular, cambios en la diana o por hidrólisis enzimática de su anillo.

La fosfomicina es uno de los antibióticos más utilizados en infección urinaria no complicada, ya que debido a su hidrosolubilidad alcanza altas concentraciones en la orina (96,97). A pesar de que este antibiótico está asociado a una rápida adquisición de resistencias *in vitro*, esto no se correlaciona con altas tasas de resistencia *in vivo*, y estas han permanecido estables en *E.*

coli muchos años (98). No obstante, la emergencia de plásmidos portadores de determinantes de resistencia a fosfomicina (FosA y FosB) ha levantado la alarma acerca del aumento de resistencias frente a este antibiótico (99). Rodríguez-Baño *et al.* no encontraron ningún aislado resistente a fosfomicina en un estudio español de casos y controles con infecciones por *E. coli*-BLEE adquiridas en la comunidad (100), pero un estudio longitudinal español informó de un incremento significativo de resistencia a fosfomicina desde el año 2006 al 2012 (101). Otro estudio posterior confirmó este incremento en aislados *E. coli*-BLEE tanto de origen nosocomial como comunitario, encontrando una prevalencia de resistencia del 9% en general, mayor (15%) entre los aislados productores de CTX-M-15 (102). Actualmente se está llevando a cabo un estudio para evaluar si la fosfomicina es una alternativa válida al tratamiento con carbapenémicos de bacteriemias por microorganismos multirresistentes (6).

3.6. Resistencia a colistina

La colistina es un antibiótico de los años 50 del siglo pasado, cuyo uso en terapéutica se había limitado a casos excepcionales por su gran nefrotoxicidad, aunque su uso en veterinaria ha estado muy extendido. No obstante, la aparición de enterobacterias, en particular de *Klebsiella pneumoniae*, resistentes a carbapenémicos y a todas las familias de antibióticos excepto a la colistina, ha obligado a rescatar este antibiótico para su uso actual (6). La colistina actúa alterando la membrana externa mediante la unión al LPS. Mutaciones en los genes de localización cromosómica *mgrB* y *pmrB* llevan a variantes del LPS que impiden la acción de la colistina (103,104). Según datos del EARS-NET, los aislados resistentes a colistina mediante este mecanismo han aumentado en los últimos años, unidos al incremento de enterobacterias productoras de carbapenemasas, lo que ha alertado de que la última baza en el tratamiento de infecciones multirresistentes puede desaparecer. Sumado a esto, se detectó en el año 2016 en China un mecanismo de resistencia a colistina codificado en plásmidos, el gen *mcr-1* (105). Aunque no confiere altos niveles de resistencia a colistina, se ha diseminado rápidamente, y se ha observado también en otros países tanto en aislados humanos como animales, además de encontrarse ocasionalmente integrado en el cromosoma bacteriano (106). Su localización plasmídica implica capacidad de incorporación a clones altamente diseminados y de hecho, ya se han descrito aislados UPEC ST131 portadores de *mcr-1* (107). El peligro que supone su diseminación ha aumentado la necesidad de estudios de vigilancia epidemiológica de estos mecanismos de resistencia.

4. Clones de alto riesgo entre los UPEC: *E. coli* ST131

E. coli-ST131 es un grupo clonal de cepas multirresistentes que fue identificado en tres continentes en el año 2008 (72–74) y desde entonces se han distribuido a nivel mundial. Este clon está definido por las secuencias de 7 genes *housekeeping* usados en el tipado por *Multilocus Sequence Typing* (MLST) según el esquema de Achtman (108). *E. coli*-ST131 pertenece al grupo filogenético B2 subgrupo 1 y la mayoría de aislados de este clon presenta el serotipo O25b, con un menor porcentaje de cepas O16 (18,25). Su alto contenido en genes de virulencia, característico de cepas ExPEC, se suma a la alta tasa de resistencia a múltiples antibióticos que suele presentar, lo que le convierte en uno de los denominados “clones de alto riesgo” de importancia en salud pública.

4.1. Caracterización de los subclones de *E. coli*-ST131

Estudios mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) han mostrado una gran variabilidad de pulsotipos dentro de *E. coli*-ST131. El grupo de Johnson *et al.* analizó una colección de casi 600 *E. coli*-ST131 de distintos orígenes, incluyendo fuentes animales y ambientales, encontrando 170 pulsotipos distintos que agrupaban desde una cepa (105 pulsotipos) a 136 cepas (109). Esto sugiere que aunque existe una gran variabilidad clonal dentro del propio *E. coli*-ST131, algunos linajes son más frecuentes que otros (110), lo que hace del estudio de estos linajes una herramienta muy útil para entender el éxito de la diseminación de *E. coli*-ST131.

Se ha postulado que la rápida emergencia y diseminación de este clon se debe a un linaje de cepas en concreto, portadoras del alelo 30 del gen *fimH* (111) que se detectaron en torno al año 2000 y estaban asociadas a la resistencia a fluoroquinolonas. Además, esta resistencia se debía principalmente a las mismas mutaciones en los genes *gyrA* y *parC*, presentes en todas las cepas *fimH30* resistentes a fluoroquinolonas: *gyrA1AB* y *parC1aAB* (111,112).

Estudios posteriores mediante análisis de SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) de casi 2000 aislados de Estados Unidos y Alemania mostraron que dentro del clado *H30* existía un subclón mayoritario (Figura 10), asociado a la producción de CTX-M al que se llamó *H30Rx* por su multirresistencia (113). Petty *et al.* utilizaron herramientas de secuenciación para determinar que el clon *E. coli*-ST131 surgió antes del año 2000 a partir de un ancestro común, que dio lugar a la emergencia de un clado dominante caracterizado por el alelo 30 de *fimH* que ellos llamaron C, dentro del cual describieron los subtipos C1 y C2, con las mismas características que los subclones *H30* no-Rx y *H3Rx* descritos por Johnson y Price (112).

Estudios posteriores han determinado que ese ancestro común surgió en Estados Unidos entre 1930 y 1958, y que el subclón C2/H30Rx surgió en 1987 posteriormente a la adquisición por parte del clado C de las mutaciones que le confería alta resistencia a fluoroquinolonas (114,115).

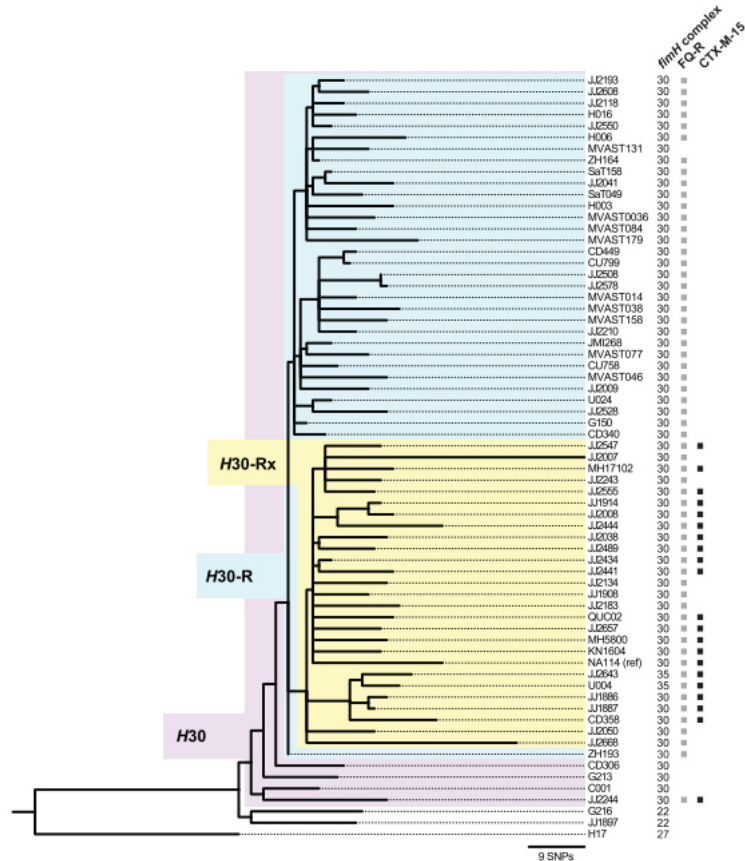


Figura 10. Análisis filogenético por SNPs de cepas *E. coli*-ST131 que muestra su estructura en subclones, con el clado H30 (H30Rx y H30 no-Rx) frente a los aislados no-H30. Tomado de (113)

4.2. Factores de virulencia asociados a *E. coli*-ST131

El clon *E. coli* ST131 pertenece al filogrupo B2, y por tanto su contenido en factores de virulencia es mayor que otras cepas no-ExPEC. Debido a su rápida diseminación, numerosos estudios han realizado análisis para evaluar si son estos factores los que le conceden ventajas frente a otras cepas. Estas ventajas podrían ser tanto una mayor adaptabilidad para la colonización intestinal o bien una mayor patogenicidad, lo que explicaría su predominio en aislados clínicos.

En estudios moleculares, las cepas de *E. coli*-ST131 han mostrado un mayor contenido de factores de virulencia que otras cepas patógenas (116,117). Cada subclón se ha relacionado con unos perfiles específicos de virulencia, que algunos autores han relacionado con una mayor letalidad en modelos animales, definiendo el término “virotipo” en base a la presencia o ausencia de determinados genes de virulencia y describiendo hasta 12 virotipos: A, B, C (tipos 1-3), D (con tipos 1-5), E y F (118–120). Estudios epidemiológicos que asocian al clon *E. coli*-ST131 y en concreto al subclón H30Rx con infecciones más graves podrían apoyar la idea de una mayor virulencia como factor coadyuvante a la exitosa diseminación de *E. coli*-ST131 (121) pero esta asociación no se ha encontrado en otros trabajos (122).

Numerosos estudios han analizado el contenido en genes de virulencia de las cepas *E. coli*-ST131, pero los análisis varían en cuanto al número y tipo de genes estudiados, el origen de las cepas (aislados clínicos o fecales, localización de la infección, etc.) y los grupos de comparación. En un estudio de España con 500 cepas de *E. coli* ExPEC, *E. coli*-ST131 se asoció con la presencia de *papEF*, *papGII*, *papGIII*, *kpsII*, *ibeA*, *PAI*, *usp* y un mayor número de aislados clasificados como ExPEC que el resto de aislados pertenecientes a otros grupos clonales (123). Otros genes encontrados frecuentemente son los implicados en la adquisición de hierro como el gen codificante para la yersiniobactina (*fyuA*), los receptores *iutA* y *iha*, toxinas (*sat*) y otros factores como *traT* y *ompT*. Otros hallazgos por el contrario asocian el clon *E. coli*-ST131 con la ausencia de genes *pap* y la presencia de *afa/dra* (25,124).

La variabilidad detectada, en cuanto a las asociaciones con determinados genes, se observó también en experimentos *in vivo*. Se han utilizado distintos modelos animales para evaluar la virulencia de *E. coli*-ST131, tanto en términos de capacidad de persistencia y colonización como de invasión y producción de enfermedad y/o muerte. Los modelos más utilizados han empleado ratones, pero también embriones de pez cebra, *Caenorhabditis elegans* y larvas de la polilla de la cera *Galleria melonella*.

Los resultados obtenidos en modelos murinos son diversos. Mientras Clermont *et al.* demostraron que las cuatro cepas *E. coli*-ST131 de su estudio eran altamente virulentas, sus resultados estaban limitados por el escaso número de cepas y el modelo utilizado, que inyectaba subcutáneamente las cepas en el peritoneo de los ratones y por tanto no replicaba adecuadamente la fisiopatología de la infección (72). Por otro lado, utilizando un modelo similar, otros estudios mostraron una gran variabilidad en la virulencia experimental de cepas *E. coli*-ST131, sin apreciarse asociación con letalidad (125). Esta variabilidad podría estar explicada por los virotipos descritos por Blanco *et al.*, que se asociaron a distintos grados de

virulencia (118–120). No obstante, sí que se encontraron asociados determinados genes de virulencia con una mayor virulencia experimental, como fueron *kpsII* y K1, *papAH* y *papGII* y *vat*(25).

En cuanto a otros tipos de modelos, un estudio en larvas de polilla mostró una mayor virulencia de cepas procedentes de urosepsis comparadas con las procedentes de ITU no complicada. Además, las cepas de este estudio que pertenecían a *E. coli*-ST131 estuvieron también asociadas a mayor letalidad (126). Aunque ciertos estudios han mostrado una buena correlación para diversos patógenos entre modelos de infección murinos y con *G. melonella* (127), otro estudio mostró falta de correlación en los resultados de virulencia estudiados en estos dos modelos simultáneamente (128). Igualmente, un estudio en paralelo de cepas *E. coli*-ST131 y no-ST131 en embriones de pez cebra y *C. elegans* mostró perfiles de virulencia marcadamente distintos según el modelo empleado para un mismo tipo de cepas (129).

En cuanto a la virulencia analizada según la supervivencia de pacientes infectados por *E. coli* uropatógeno, los resultados han sido discrepantes. Aunque ST131 parece más frecuente en cepas invasivas que no invasivas (130,131), en otros estudios no se han observado diferencias en la resolución de las bacteriemias causadas por *E. coli*-ST131 u otros grupos clonales (132). Por otro lado, estudios recientes parecen asociar las cepas *E. coli*-ST131 y en concreto el clado H30 con infecciones persistentes, necesidad de reingreso en el hospital e infecciones posteriores. Si estos resultados están en relación con la asociación descrita de H30 con uso previo de antibióticos o la infección de pacientes mayores, con alto consumo de antibióticos y comorbilidades no está claro (18,121).

4.3. Epidemiología

Aunque los primeros estudios detectaron el clon *E. coli*-ST131 en poblaciones productoras de BLEE y/o resistentes fluoroquinolonas, estudios posteriores lo han descrito en cepas menos resistentes, tanto procedentes de infecciones como de colonizaciones en individuos sanos y hospitalizados (18,25,111). Causa principalmente infecciones urinarias y bacteriemias (25,113), y está asociado a la resistencia a fluoroquinolonas y la producción de CTX-M-15, aunque se han encontrado también otras enzimas en aislados *E. coli*-ST131 productores de BLEE (133,134). Otros antibióticos a los cuales *E. coli*-ST131 ha mostrado ser frecuentemente resistente son cotrimoxazol, gentamicina y amoxicilina-clavulánico (18,25,135).

La prevalencia de *E. coli*-ST131 varía según la región geográfica y la población hospedadora estudiada. En aislados clínicos se han descrito prevalencias desde el 12% al 30% (18). En la

mayoría de estudios se ha asociado al ambiente hospitalario, al consumo previo de antibióticos, edad avanzada y estancia en centros de cuidados de larga estancia (124). Infecciones por *E. coli*-BLEE ST131 se han asociado también a viajes internacionales, y este clon está ampliamente diseminado en el medio ambiente y en animales, incluyendo los de compañía y los de consumo humano (18,136). Se han descrito casos de transmisión dentro de los miembros convivientes de una familia e incluso entre mascotas y sus dueños (137,138) aunque parece que la prevalencia de colonización en humanos es mayor que en animales (18).

No está claro si *E. coli*-ST131 es mejor colonizador que las cepas *E. coli*-no-ST131, aunque es una de las teorías que podrían explicar su diseminación. En estudios de prevalencia de *E. coli*-ST131 en aislados fecales productores de BLEE se han observado tasas muy variables, desde un 10% a un 44%(18,139,140) pero muy pocos estudios han buscado la prevalencia de *E. coli*-ST131 entre aislados fecales no seleccionados por resistencia, y los resultados varían mucho en función de la población estudiada. Kudinha *et al.* no encontraron ningún aislado *E. coli*-ST131 colonizando el tracto intestinal de hombres sanos y solo un 4% en el de mujeres en edad reproductiva, frente a un 19% y un 21% en el de pacientes con ITU (130,131). Sin embargo, otros estudios en pacientes de centros de cuidados de larga estancia colonizados por *E. coli* resistente a fluoroquinolonas mostraban una prevalencia de *E. coli*-ST131 de hasta 25% (18).

En España, en un estudio a nivel nacional que incluyó 5 hospitales de regiones diferentes, se encontró una prevalencia de aislados *E. coli*-ST131, independientemente del grupo de resistencia estudiado, del 12% (123). La prevalencia de *E. coli*-ST131 entre cepas de *E. coli*-BLEE se situó en el 23%, inferior a la encontrada en Estados Unidos (59%) o Reino Unido (62%) (25), pero un estudio de 2012 presentó una prevalencia de *E. coli*-ST131 en cepas *E. coli*-BLEE de hasta el 61% (141).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

E. coli es el principal patógeno aislado en las infecciones del tracto urinario a nivel comunitario y hospitalario. La mayoría de estas infecciones están causadas por *E. coli* uropatógeno (UPEC), un patotipo específico dentro de la población de *E. coli* patogénico extraintestinal (ExPEC). El aumento detectado en los últimos años en la incidencia de bacteriemia por UPEC multirresistente se ha asociado a la expansión a nivel mundial del clon de alto riesgo perteneciente a la secuencia tipo (ST) 131 productor de BLEEs y asociado con resistencia a las quinolonas. La razón de la expansión de este clon no es bien conocida, con diversas teorías que postulan que su alto contenido en factores de virulencia o bien su resistencia a múltiples familias de antibióticos le confieren ventajas adaptativas frente a otras cepas uropatógenas.

Esta tesis plantea la **hipótesis** de que tanto los factores de virulencia como la resistencia a los antibióticos, principalmente a los betalactámicos, podrían ser algunos de los principales motores de la diseminación de ST131 como patógeno urinario e importante agente causal de bacteriemia.

Para probar esta hipótesis, se propuso como objetivo principal el análisis de la estructura poblacional, de los fenotipos de resistencia a antibióticos incluyendo la caracterización de las BLEEs y de los perfiles de virulencia de aislados de *E. coli*-ST131 tanto productores de BLEE como no productores procedentes de los estudios ITU-BRAS y R-GNOSIS, obtenidos de pacientes con diagnóstico de bacteriemia de origen urinario y colonizados, respectivamente.

Para facilitar el desarrollo del estudio, el objetivo general de esta tesis doctoral se desglosó en varios **objetivos** secundarios:

1. Determinar la prevalencia de *E. coli*-BLEE, y en especial *E. coli*-ST131 (subclones no-H30, H30 no-Rx y H30Rx) procedentes de bacteriemias de origen urinario recogidos en ocho hospitales españoles de áreas geográficas distintas (proyecto ITU-BRAS).
2. Analizar los fenotipos de resistencia a diferentes antibióticos y caracterizar los tipos de BLEE, así como la virulencia (genotipo, perfil e índice de virulencia, asignación molecular de ExPEC y UPEC) de los aislados *E. coli*-BLEE y no-BLEE del clon ST131 y sus subclones incluidos en el proyecto ITU-BRAS.

3. Estudiar la virulencia *in vivo* en un modelo murino de sepsis de *E. coli*-ST131 procedentes del estudio ITU-BRAS (índice de letalidad y rapidez de letalidad) y relacionarla con las características microbiológicas de estos aislados (producción de BLEE, subclones y sus perfiles de virulencia).
4. Determinar la prevalencia de *E. coli*-ST131 y sus subclones no-H30, H30 no-Rx y H30Rx en pacientes colonizados por enterobacterias productoras de BLEE procedentes de cuatro hospitales europeos en Alemania, Suiza, Holanda y España (proyecto R-GNOSIS).
5. Analizar los fenotipos de resistencia a diversos antibióticos y caracterizar los tipos de BLEE, así como la virulencia (genotipo, perfil e índice de virulencia, asignación molecular de ExPEC y UPEC) de los aislados *E. coli*-BLEE ST131 y de un conjunto de aislados no-ST131 escogidos aleatoriamente procedentes del proyecto R-GNOSIS.

MATERIAL Y MÉTODOS

万変不驚

Banpen fugyo

(Cien mil cambios, ninguna sorpresa)

1. Diseño de los estudios y cepas bacterianas

Los aislados estudiados en esta tesis doctoral forman parte de dos colecciones procedentes de dos proyectos distintos: El proyecto ITU-BRAS, que proporcionó aislados invasivos, y el proyecto R-GNOSIS, que proporcionó aislados de colonización.

1.1. Proyecto ITU-BRAS

El proyecto “ITU-BRAS: Infecciones del tracto urinario bacteriémicas relacionadas con la asistencia sanitaria”, tenía como objetivo el estudio de las características epidemiológicas, clínicas y microbiológicas, y pronóstico de episodios de ITUs causantes de bacteriemia de origen urinario (BOU) en pacientes hospitalizados o que requirieron hospitalización. Este proyecto se diseñó como un estudio poblacional prospectivo observacional y se llevó a cabo desde octubre 2010 a junio 2011 en 8 hospitales de distintas zonas geográficas de España. Los hospitales participantes fueron Hospital Universitario Gregorio Marañón (Madrid), Hospital Universitario Ramón y Cajal (Madrid), Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla (Andalucía), Hospital del Mar y Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona (Cataluña), Hospital Universitario Mutua Tarrasa de Tarragona, (Cataluña); Complejo Sanitario de Pontevedra (Galicia), y Hospital Universitario Marqués de Valdecilla de Santander (Cantabria) (Figura 11).



Figura 11. Procedencia de los aislados invasivos del proyecto ITU-BRAS

La población a estudio fueron todos los pacientes consecutivos mayores de 16 años ingresados o que requirieron ingreso en los hospitales participantes con diagnóstico de BOU durante el periodo de estudio. Se consideraron BOUs los siguientes supuestos:

- La presencia de al menos un hemocultivo positivo para un uropatógeno y el aislamiento en orina de ese mismo uropatógeno, en ausencia de otro foco aparente.
- La presencia de al menos un hemocultivo positivo para un uropatógeno en presencia de datos clínicos de origen urinario, aunque el urocultivo fuese negativo, en ausencia de otro foco aparente.
- La presencia de un hemocultivo positivo para un uropatógeno, con evidencia de sepsis sin otra focalidad infecciosa evidente, en pacientes portadores de cualquier tipo de catéter urinario sin síntomas urinarios o en aquellos pacientes que presentaron una condición que pudiera impedir referir los síntomas urinarios.

Se consideraron datos clínicos de origen urinario la presentación aguda de uno o más de los siguientes síntomas: disuria, hematuria, polaquiuria, urgencia miccional, retención urinaria, dolor suprapúbico o en el área lumbar, o fiebre con sedimento urinario patológico con o sin clínica urinaria.

Se consideraron patógenos los siguientes microorganismos:

- *Escherichia coli*
- *Klebsiella* spp.
- *Citrobacter* spp.
- *Enterobacter* spp.
- *Serratia* spp.
- *Proteus* spp.
- *Morganella morganii*
- *Providencia* spp.
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Enterococcus* spp.
- *Streptococcus agalactiae*
- *Staphylococcus saprophyticus*

1.2. Proyecto R-GNOSIS

El proyecto R-GNOSIS (*“Resistance of Gram-Negative organisms: Studying Intervention Strategies”*) es un estudio multicéntrico europeo para el análisis de la colonización de pacientes hospitalizados por enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEEs). Los hospitales participantes estaban situados en Berlín (Alemania), Ginebra (Suiza), Madrid (España) y Utrecht (Holanda). El hospital participante de Madrid fue el Hospital Universitario Ramón y Cajal y fue el centro receptor de muestras. En esta tesis nos referiremos a los hospitales por la ciudad en la que están ubicados. Durante este proyecto, se recogieron muestras rectales con torundas con medio de Amies en pacientes hospitalizados en plantas médicas o quirúrgicas (pero no unidades de cuidados intensivos) desde marzo de 2014 a febrero de 2015. Las torundas se recogieron de cada paciente a su admisión, al alta y semanalmente si su estancia fue de más de tres días.

2. Recogida y procesamiento de muestras

2.1. Aislados invasivos

Se incluyeron finalmente un total de 637 pacientes con bacteriemia de origen urinario, de los cuales se recogieron 939 muestras: 658 hemocultivos y 281 urocultivos. La distribución de las muestras correspondientes a cada hospital está recogida en la Tabla 2. Los uropatógenos aislados en dichas muestras se encuentran recogidos en la Tabla 3.

Tabla 2. Número de muestras recogidas en cada hospital participante en el proyecto ITU-BRAS

Hospital	Nº. Pacientes	Nº. Muestras recogidas	Aislamientos de Hemocultivos	Aislamientos de Urocultivos
H. U. Gregorio Marañón	112	147	119	28
H. U. Ramón y Cajal	110	202	115	87
H. U. Virgen Macarena	54	55	55	0
H. U. Marqués de Valdecilla	60	84	64	20
H. del Mar	102	104	104	0
H. de la Santa Creu i Sant Pau	73	131	73	58
Complejo Hospitalario de Pontevedra	62	115	63	52
H. U. Mutua Terrasa	64	101	65	36
Total	637	939	658	281

Tabla 3. Microorganismos aislados de hemocultivos procedentes de pacientes con bacteriemias de origen urinario recogidos en el proyecto ITU-BRAS.

Microorganismo	Hemocultivos	Urocultivos	Total
<i>Escherichia coli</i>	457	191	648
<i>Klebsiella spp.</i>	70	31	101
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	63	29	92
<i>Klebsiella oxytoca</i>	7	2	9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38	18	56
<i>Proteus spp</i>	36	20	56
<i>P. mirabilis</i>	32	17	49
<i>P. vulgaris</i>	1	1	2
<i>Enterococcus spp</i>	29	13	43
<i>Enterococcus faecalis</i>	20	9	29
<i>Enterococcus faecium</i>	9	4	13
<i>E. avium</i>	1	0	1
<i>Enterobacter spp</i>	8	3	11
<i>E. cloacae</i>	6	2	8
<i>E. aerogenes</i>	2	1	3
<i>Morganella morganii</i>	8	1	9
<i>Citrobacter spp</i>	5	3	8
<i>C. freundii</i>	3	2	5
<i>C. amalonaticus</i>	1	1	2
<i>C. koseri</i>	1	0	1
<i>P. stuartii</i>	3	2	5
<i>Serratia marcescens</i>	3	0	3
<i>Salmonella typhimurium</i>	1	1	2
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	0	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	0	1

Se recibieron en el Hospital Universitario Ramón y Cajal los aislados procedentes de este estudio en torundas en medio de transporte de Amies (DeltaLab, Barcelona, España) con la información correspondiente a cada cepa: códigos de identificación de proyecto, identificación

de género y especie y los antibiogramas elaborados por cada hospital. Las torundas se sembraron en medio general Columbia agar con sangre de carnero plus (Oxoid LTD. Basingstoke, Hampshire, Reino Unido) y se incubaron 18h a 37°C.

Para el estudio de la hipótesis planteada en esta tesis, se seleccionaron los aislados de *E. coli* procedentes de hemocultivos. De los 457 aislados *E. coli* de la colección, 425 estuvieron disponibles para su análisis microbiológico.

2.2. Aislados de colonización

Las torundas rectales procedentes de los cuatro hospitales europeos se recibieron en el Hospital Universitario Ramón y Cajal. Estas torundas se sembraron en medio cromogénico para la detección de enterobacterias productoras de BLEE (ChromID-ESBL agar, BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia). Las placas se incubaron 48h a 37°C, con lecturas a las 24h y a las 48h, procediéndose entonces a una identificación presuntiva de las distintas enterobacterias según las instrucciones del fabricante. Esta identificación se confirmó como se explica más adelante en el apartado 3.3.

Los aislados productores de BLEE recogidos en cada uno de los hospitales se encuentran desglosados en la tabla 4. Del total de aislados recogidos se seleccionaron para esta tesis los aislados de *E. coli*, un total de 1009 aislados procedentes de 688 pacientes (Tabla 4). Para su posterior estudio se seleccionó un aislado por paciente.

Tabla 4. Número de aislados *E. coli*-BLEE de pacientes colonizados de cada hospital participante en el estudio R-GNOSIS

Hospitales	Pacientes	Aislados totales	Aislados <i>E. coli</i>	Aislados <i>E. coli</i> /paciente
Berlín	167	205	181	135
Ginebra	87	159	158	86
Madrid	405	591	404	295
Utrecht	89	588	266	172
Total	748	1543	1009	688

3. Identificación de cepas

Se confirmó la identificación de los aislados mediante espectrometría de masas usando el aparato MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Billerica, Massachusetts, EE.UU). Este aparato recibe su nombre por las siglas *Matrix-Assisted-Laser Desorption Ionization-Time of Flight*. Es un sistema de espectrometría de masas propuesto por Karas *et al.* (142) que utiliza energía láser para ionizar una muestra o una célula entera (aislado bacteriano). Estos iones, sometidos a un campo eléctrico, viajan en un tubo de vacío a distinta velocidad según su masa y su carga (Figura 12). Al llegar a un detector se genera una serie de picos en base al número de iones que detectó, a su masa y a su carga, generando un espectro específico de cada especie bacteriana equivalente a su huella digital.

Estos picos corresponden a proteínas o moléculas biológicas y su presencia se atribuye a diferencias en la expresión génica a nivel de género, especie e incluso cepa bacterianos. La huella digital generada o espectro se compara con una base de datos preexistente de otros espectros para averiguar, según el grado de similitud, a qué género o especie corresponde el aislado analizado.

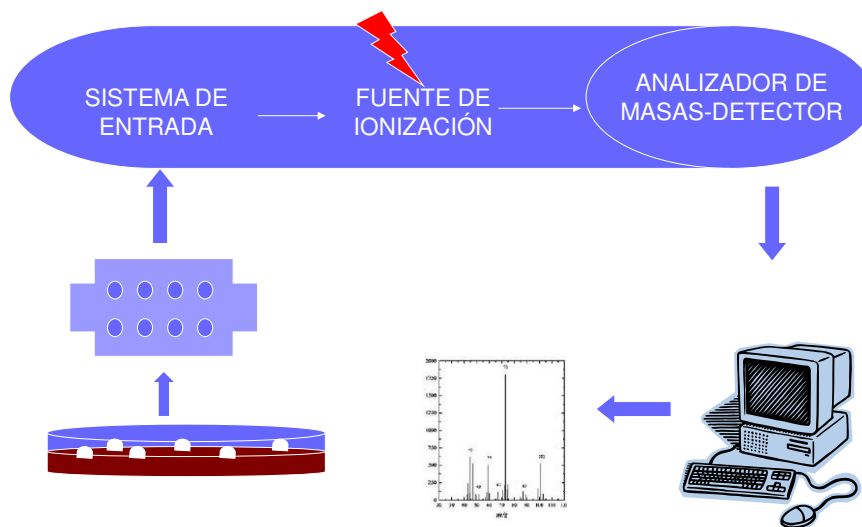


Figura 12. Esquema del funcionamiento del MALDI-TOF

Para la identificación, se tomó una porción de colonia de un cultivo puro de cada cepa a identificar y se depositaron en los distintos pocillos de la placa. Una vez secos se añadieron 0.7 µl de matriz (HCCA = ácido α-Ciano-4-hidroxicinámico, Bruker Daltonics, Billerica, Massachusetts, EE.UU) a cada pocillo y se dejaron secar a temperatura ambiente. Posteriormente se introdujeron en el aparato para su identificación. Se consideró la identificación de *E. coli* como válida si el software (Maldi Biotyper, versión 3.1, Bruker

Daltonics, Billerica, Massachusetts, EE.UU) proporcionó un índice o *score* igual o mayor a 2.3. Las cepas con la identificación confirmada se congelaron en caldo Luria-Bertani (caldo LB, Laboratorios Conda, Torrejón de Ardoz, Madrid, España) con glicerol al 20% a -60°C.

4. Estudio de sensibilidad antibiótica y detección fenotípica de la producción de betalactamasas de espectro extendido

El estudio de la resistencia a antibióticos se llevó a cabo mediante técnicas de difusión en disco. Para ello se prepararon inóculos con una turbidez similar a 0.5 de la escala de McFarland de las cepas a estudio y se sembraron en placas Petri cuadradas de 40ml de agar Mueller-Hinton (agar MH, Laboratorios Conda) en los que se colocaron discos (BioRad, Hercules, California, EE.UU) de los antibióticos escogidos (Tabla 5).

Tabla 5. Antibióticos analizados en el estudio de sensibilidad antibiótica de los aislados de esta tesis y puntos de corte de sensibilidad utilizados

Antibiótico	Abreviatura utilizada	Carga de antibiótico en el disco (µg)	Puntos de corte (mm)	
			S ≥	R <
Piperacilina-tazobactam	PTZ	30/6	20	17
Amoxicilina-clavulánico	AMC	20/10	19	19
Cefotaxima	CTX	5	20	17
Cefoxitina	FOX	30	19	19
Ceftazidima	CAZ	10	22	19
Cefepima	CEP	30	24	21
Imipenem	IMI	10	22	16
Meropenem	MER	10	22	16
Ácido Nalidíxico	NAL	30	NA ^a	NA ^a
Ciprofloxacino	CIP	5	22	19
Gentamicina	GEN	10	17	14
Tobramicina	TOB	10	17	14
Amicacina	AMK	30	18	15
Cotrimoxazol	STX	1.25/23.75	16	13

a. NA: No aplicable ya que no existen puntos de corte para este antibiótico.

La placas inoculadas se incubaron 24h a 37°C y se leyeron con el sistema de lectura semiautomático Adagio™ (ADAGIO™ Automated System, BioRad). Los resultados fueron interpretados según normas de EUCAST (*European Committee of antimicrobial susceptibility testing*, www.eucast.org), considerándose también como resistentes los aislados con punto de corte intermedio. Dado que para el ácido nalidíxico no existen puntos de corte definidos por EUCAST, se tomó el *epidemiological cut-off* (ECOFF, punto de corte epidemiológico) como punto de corte, siendo los aislados con un diámetro de halo mayor o igual de 19mm considerados sensibles.

Se identificó a los aislados de *E. coli* susceptibles de ser productores de BLEE mediante la lectura interpretada del antibiograma (resistencia a cefalosporinas de segunda y/o tercera generación, con sinergia en presencia de ácido clavulánico) en el caso del proyecto ITU-BRAS y mediante crecimiento en medio cromogénico para BLEEs en el caso del proyecto R-GNOSIS. Se confirmó el fenotipo de BLEE mediante el test de sinergia de disco con discos (Oxoid LTD. Basingstoke, Hampshire, Reino Unido) de amoxicilina-clavulánico (30µg), cefotaxima (5µg) y ceftazidima (10µg).

4.1. Caracterización de betalactamasas de espectro extendido

La caracterización de los genes codificadores de BLEE (*bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, y *bla_{CTX-M}*) se llevó a cabo mediante PCR y secuenciación (143–148) como se refiere más adelante (apartado 3.1.2). Cuando fue necesario se usaron secuencias de referencia obtenidas de la base de datos de la Clínica Lahey (<http://www.lahey.org/Studies/>). Los cebadores y las condiciones utilizados para la detección de estos genes se encuentran listados en la Tabla 6.

Para la extracción de ADN bacteriano se sembraron las cepas en placas de agar LB (Laboratorios Conda) y se incubaron 24h a 37°C. Del cultivo crecido se resuspendió una colonia en 200µl de buffer TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 8) y se calentó a 100°C durante 15 minutos para provocar la ruptura de la pared bacteriana. Posteriormente se centrifugó 10 minutos a 13.000rpm para sedimentar los restos de pared y orgánulos y se retiró el sobrenadante con el ADN solubilizado a un tubo limpio, que se archivó a 4°C hasta su uso.

En aquellos casos en los que la técnica molecular empleada requirió mayor pureza de ADN, se realizó la extracción mediante Kit comercial QiAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Redwood City, California, EE.UU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.1.1. Amplificación de genes mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección mediante amplificación de diversos genes a estudio. Las polimerasas utilizadas fueron: i) AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Norwalk, Connecticut, EEUU) de 1,5U, polimerasa de alta fidelidad y especificidad que debido a su activación a altas temperaturas, disminuye la posibilidad de formación de productos inespecíficos aumentando el rendimiento; y ii) GoTaq Green Hot Start Master Mix (Promega Biotech Iberica SL, Alcobendas, Madrid), polimerasa de activación rápida y que incorpora el buffer de carga y todos los reactivos necesarios para la amplificación en la master mix. Todas las reacciones se llevaron a cabo con un volumen total de 20µl en un termociclador T100 Thermal Cycler (BioRad) con las condiciones siguientes:

- Activación de la enzima. 94°C 10 minutos (AmpliTaQ Gold) o 5 minutos (GoTaq).
- 30-33 ciclos de los siguientes pasos:
 - > Desnaturalización del DNA: 94°C 30 segundos.
 - > Unión de cebadores: Ta 30 segundos.
 - > Extensión: 72°C t minutos.
- Extensión final: 72°C 10 minutos.

Donde Ta es la temperatura de anillamiento (*annealing*) o de unión de cada par de cebadores, calculada en base a la temperatura de *melting* de cada uno de los cebadores (temperatura a la cual la mitad del ADN está en forma de hebra simple) y t es el tiempo de extensión requerido para que la polimerasa pueda ampliar el fragmento deseado en función de su longitud (30 segundos cada 500 pares de bases aproximadamente dependiendo de las instrucciones de los fabricantes). Estas condiciones se encuentran referidas en cada apartado.

La determinación del tamaño de los productos de amplificación se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa (agarosa D1 Low EEO, Laboratorios Conda) al 1,5% con buffer TBE 0.5x (Tris-Borato-EDTA: 44.5 mM Tris base, 44.5 mM ácido bórico, 1 mM EDTA pH=8), utilizando el marcador de peso molecular λ-ladder 100bp (Takara Bio Inc., Kusatsu, Shiga, Japón). El tampón de carga utilizado para las reacciones con Amplitaq Gold fue 10x Loading Buffer (Takara Bio Inc., Japón). Los geles se tiñeron con GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain 10.000X (Biotium Inc., Fremont, California EE.UU). Este producto es un agente intercalante del DNA que permite visualizar las moléculas de ácidos nucleicos bajo luz ultravioleta. Se diluyeron 90µl de GelRed™ en 300ml de agua destilada, se visualizaron los

geles con luz ultravioleta (UV) y se fotografiaron usando el aparato ChemiDoc™ Imaging System (BioRad). Los amplicones de aquellos genes que requirieron secuenciación fueron sometidos a purificación usando ExoSAP-IT® *purification kit* (USB Corp, Cleveland, EE.UU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras purificadas junto con los cebadores requeridos para amplificación se enviaron a secuenciar a MacroGen Inc. (Seúl, Corea del Sur, www.macrogen.com). Las secuencias obtenidas mediante amplificación con los cebadores *forward* y *reverse* se ensamblaron mediante el software Vector NTI® versión 10.3.0 (Invitrogen, Carlsbrad, California, EE.UU), y se analizaron mediante blastn (blast.ncbi.nlm.nih.gov).

Tabla 6 Cebadores y condiciones de amplificación para la caracterización de BLEEs mediante PCR

PCR	Cebadores	Diana	Secuencias (5'-3')	Pb ^a	Ta ^b	t ^c	Referencia
Tipo de BLEE	TEM-164.SE	<i>bla_{TEM}</i>	TCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGA	445	60	2:00	(1413)
	TEM-165.AS		ACGCTCACCGGCTCCAGATTAT				
	<i>bla</i> -SHV.SE	<i>bla_{SHV}</i>	ATCGGTTATATTCGCCTGTG	747	60	2:00	(1413)
	<i>bla</i> -SHV.AS		TGCTTTGTTATTCGGGCCAA				
	CTX-M-U1	<i>bla_{CTX-M}</i>	ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC	593	60	2:00	(1413)
	CTX-M-U2		TGGTTRAAARTARGTSACCAGAAYCAGCGG				
Grupo de CTX-M	CTX-M-1-FW	<i>bla_{CTX-M}</i>	AAAAATCACTGGCCAGTTC	415	52	0:50	(145)
	CTX-M-1-RW		AGCTTATTCATCGCCACGTT				
	CTX-M-9-FW		CAAAGAGAGTGCAACGGATG				
	CTX-M-9-RW		ATTGAAAGCGTTCATCACC				
	CTX-M-9-RW		ATTGAAAGCGTTCATCACC				
Secuenciación	TEM-SEQ-F	<i>bla_{TEM}</i>	ATGAGTATTC AACATTTCCCG	1076	58	1:30	(147)
	TEM-SEQ-B		CTGACAGTTACCAATGCTTA				
	SHV1-SEQ-F	<i>bla_{SHV}</i>	TTATCTCCCTGTAGCCACC	800	55	0:40	(144)
	SHV1-SEQ-B		GATTTGCTGATTTGCTCGG				
	CTXM1-SEQ-F	<i>bla_{CTX-M}</i>	CCCATGGTTAAAAAATCACTGC	1000	60	1:00	(146)
	CTXM1-SEQ-B		CAGCGCTTTGCCGTCTAAG				
	CTXM9-SEQ-F		GTGACAAAAGAGAGTGCAACGG				
	CTXM9-SEQ-R	ATGATTTCTGCCGCTGAAGCC	856	62	1:00	(148)	

a. Tamaño del amplicón (pb). b. Temperatura de anillamiento (°C). c. Tiempo de extensión (minutos).

5. Análisis de la estructura poblacional de *E. coli*

5.1. Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)

Se analizó la clonalidad de los aislados mediante electroforesis en gel de campo pulsado tras digestión del ADN con la enzima *XbaI* (Takara Bio Inc., Kusatsu, Shiga, Japón), siguiendo una versión modificada del protocolo de Pulsenet (149), como se detalla a continuación.

Se seleccionó una colonia de cada aislado y se sembraron en estría en medio general agar LB (Laboratorios Conda) incubándose 18h a 37°C. Se resuspendió el aislado crecido en 2ml de buffer CSB (*C*ell *S*uspension *B*uffer: Tris 100mM, EDTA 100mM, pH 8) ajustándose la absorbancia de la suspensión mediante espectrofotómetro (densidad óptica de 1.45 a una longitud de onda de 600nm) para un volumen total de 400µl, mediante la fórmula: $V_o \times \text{Absorbancia} = 400\mu\text{l} \times 1.45$, y enrasando con buffer CSB hasta los 400µl. Posteriormente se añadieron 20µl de proteinasa K (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, EE.UU) a una concentración de 20mg/ml a cada suspensión celular.

Para la preparación de los bloques de agarosa se añadió a cada suspensión 400µl de agarosa D5 (Laboratorios Conda) al 1% en buffer TBE 0.5% con SDS 1% (*S*odium *D*ocedyl *S*ulfate) previamente fundida y atemperada a 50°C. Se distribuyó la mezcla en moldes y se dejó solidificar. Después se sumergió cada uno de los bloques obtenidos en 5ml de solución de lisis (Tris 50mM, EDTA 50mM, pH8, N-laurilsarcosinato de sodio o sarcosil 1%) con 25µl de proteinasa K (20mg/ml). Los tubos con los bloques en solución de lisis se mantuvieron toda la noche en un baño en agitación (150-175rpm) a 56°C.

Al día siguiente se lavaron los bloques, 2 lavados con 5ml de agua pura estéril atemperada a 56°C durante 15 minutos y otros dos lavados con buffer TE a 56°C durante 15 minutos. Los bloques resultantes se conservaron en 2ml de buffer TE a 4°C.

Para la realización de la electroforesis en gel de campo pulsado se cortó un tercio de cada bloque de los aislados a estudio y se cubrió con 100µl de solución de digestión preparada con 2µl de la enzima de restricción *XbaI* y un buffer adecuado (buffer 10X y BSA 0.1%), según las instrucciones del fabricante. Los tubos con los fragmentos de bloques en digestión se incubaron a 37°C durante un mínimo de 4h.

Pasado el tiempo de digestión, se cargaron los fragmentos de bloques en un gel de agarosa D5 (Laboratorios Conda) al 1% en TBE 0.5%. La separación de los fragmentos de ADN se llevó a cabo en el sistema CHEF-DRIII (BioRad) con 2L de buffer de TBE 0.5X con 20mg de tiourea

(Laboratorios Conda), con las siguientes condiciones: 6v/cm² con rampas de 2.2-54.2 segundos durante 22h. Como controles estándar del tamaño de los fragmentos se utilizó la cepa de *Salmonella* serotipo Braenderup (H9812) (150).

Una vez terminado el tiempo de corrida, se sumergió el gel en agua con colorante GelRed™ (90µl de colorante en 300ml de agua destilada) durante 10-30 minutos y se visualizó con iluminación por UV y fotografió usando el aparato ChemiDoc™ Imaging System (Biorad). El archivo generado se exportó para su análisis mediante el software Bionumerics (Applied Maths NV, Sint-Martens-Latem, Bélgica).

5.2. Caracterización de filogrupos y *Multilocus Sequence Typing* (MLST)

Los aislados del proyecto ITU-BRAS productores de BLEE que no pertenecían a la secuencia tipo 131 según la PCR de cribado (ver apartado 3.2.3) fueron analizados mediante PCR como se refiere en el apartado 3.1.2 para determinar su pertenencia a los grupos filogenéticos principales (A, B1, B2, C, D y E) (10). Se realizó una PCR cuádruplex y se aplicó el algoritmo de la Tabla 7 para asignar los aislados a un grupo filogenético.

Tabla 7. Algoritmo para la asignación de grupos filogenéticos. (Adaptado de Clermont *et al.* 2013)

<i>arpA</i>	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	<i>TspE4.C2</i>	Filogrupo	Algoritmo
+	-	-	-	A	
+	-	-	+	B1	
-	+	-	-	F	
-	+	+	-	B2	
-	+	+	+	B2	
-	+	-	+	B2	
+	-	+	-	A/C	PCR para C
+	+	-	-	D/E	PCR para E
+	+	-	+	D/E	PCR para E
+	+	+	-	E/Clado I	PCR para E
-	-	+	-	Clado I/II	Confirmar con cebadores específicos de clado ^a
-	*	-	-	Clado III/IV/V	Confirmar con cebadores específicos de clado ^a
-	-	-	+	Desconocido	Hacer MLST
-	-	+	+	Desconocido	Hacer MLST
+	-	+	+	Desconocido	Hacer MLST
+	+	+	+	Desconocido	Hacer MLST
-	-	-	-	Desconocido	Confirmar identificación de <i>E. coli</i> . Realizar PCR con cebadores específicos de clado ^a o hacer MLST.

*En vez del amplicón esperado de 288pb, si el aislado pertenece a los clados III, IV o V, se amplificará un fragmento de 476 pb. Confirmar la asignación con cebadores específicos. a. (10).

Posteriormente se determinó su secuencia tipo mediante PCR y secuenciación siguiendo el esquema *Multilocus sequence typing* (MLST) descrito por Achtman *et al.* (108), analizando las secuencias obtenidas en la página web <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/>. Las condiciones para estas amplificaciones, incluyendo las de la PCR para la determinación de filogrupos se encuentran en la Tabla 8 y 9.

Tabla 8. Cebadores y condiciones de amplificación para la asignación de filogrupos

PCR	Cebadores	Diana	Secuencias (5'-3')	Pb ^a	Ta ^b	t ^c	Referencia
Filogrupos	chuA.1	<i>chuA</i>	ATGGTACCGGACGAACCAAC	288			
	chuA.2	<i>chuA</i>	TGCCGCCAGTACCAAGACA				
	yjaA.1	<i>yjaA</i>	CAAACGTGAAGTGTCAAGGAG	211			
	yjaA.2	<i>yjaA</i>	AATGCGTTCCTCAACCTGTG		59	1:00	
	TspE4C2.1b	<i>TspE4.C2</i>	CACTATTCGTAAGGTCATCC	152			
	TspE4C2.2b	<i>TspE4.C2</i>	AGTTTATCGCTGCGGGTCGC				
	AceK.F	<i>arpA</i>	AACGCTATTCGCCAGCTTGC	400			(10)
	ArpA1.R	<i>arpA</i>	TCTCCCATACCGTACGCTA				
	ArpAgpE.F	<i>arpA</i>	GATTCATCTTGTCAAAATATGCC	301	57	0:30	
	ArpAgpE.F	<i>arpA</i>	GAAAAGAAAAAGAAATCCCAAGAG				
trpAgpC.1	<i>trpA</i>	AGTTTTATGCCAGTGGGAG	219	59	0:30		
trpAgpC.2	<i>trpA</i>	TCTGCGCCGGTCAAGCC					
trpBA.F	<i>trpA</i>	CGGCGATAAAGACATCTCAC	489	59	0:40		
trpBA.R	<i>trpA</i>	GCAACGCGCCTGGCGGAAG					

a. Tamaño del amplicón (pb). b. Temperatura de anillamiento (°C). c. Tiempo de extensión (minutos).

Tabla 9. Cebadores y condiciones de amplificación para las PCR de asignación de MLST

PCR	Cebadores	Diana	Secuencias (5'-3')	Pb ^a	T ^a ^b	t ^c	Referencia
MLST	adk-F	<i>adk</i>	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG	583	54	1:00	
	adk-R		CCGTCAACTTTCGGCTATTT				
	icd-F	<i>icd</i>	ATGGAAAAGTAAAAGTAGTTGTTCCGGCACA	878	54	1:00	
	icd-R		GGACGCAGCAGGATCTGTT				
	gyrB-F	<i>gyrB</i>	TCGGCGACACGGATGACGGC	911	60	1:00	
	gyrB-R		ATCAGGCCTTCACGGGCATC				
	fumC-F	<i>fumC</i>	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC	806	54	1:00	
	fumC-R		GTACGCAGCGAAAAAAGATTC				
	purA-F	<i>purA</i>	CGCGCTGATGAAAAGAGATGA	816	54	1:00	
	purA-R		CATACGGTAAGCCACGCAGA				
	mdh-F	<i>mdh</i>	ATGAAAAGTCGCAGTCTCGGCGCTGCTGGCGG	932	60	1:00	
	mdh-R		TTAACGAACTCTGCCCCAGAGCGATATCTTTCTT				
	recA-F	<i>recA</i>	CGCATTCGCTTTACCCCTGACC	780	58	1:00	
	recA-R		TCGTGAAAATCTACGGACCGGA				

a. Tamaño del amplicón (pb). b. Temperatura de anillamiento (°C). c. Tiempo de extensión (minutos).

5.3. Cribado de aislados *E. coli*-ST131 y tipado de subclones.

Se procedió a seleccionar entre los aislados a estudio aquellos pertenecientes a la ST131 mediante la detección por PCR (ver apartado 3.1.2) de polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) en los genes *mdh* y *gyrB* (151). Posteriormente se clasificaron en los subclones no-*H30*, *H30* no-Rx y *H30*Rx mediante la detección por PCR de SNPs específicos (152). Las condiciones para estas amplificaciones se encuentran en la Tabla 10.

Tabla 10. Cebadores y condiciones de amplificación para la detección de ST131 y su tipificación

PCR	Cebadores	Diana	Secuencias (5'-3')	Pb ^a	Ta ^b	t ^c	Referencia
Detección de ST131	mdh36-Fw	<i>mdh</i>	GTTTAACGTTAACGCCGGT	275	64.5	1:00	(151)
	mdh36-Rw		GGTAACACCAGAGTGACCA				
	gyrB47-Fw	<i>gyrB</i>	CGCGATAAGCGCGAC	132			
	gyrB47-Rw		ACCGTCTTTTTTCGGTGGAA				
Detección de aislados <i>H30</i>	H30-Fw	<i>fimH</i>	CCGCCAATGGTACCGCTATT	354	68	0:30	(152)
	H30-Rw		CAGCTTTAATCGCCACCCCA				
Detección de aislados <i>H30</i> Rx	APfor63	<i>ybbW</i>	GGTTGC GGTCTGGGCA	194	72	0:30	(152)
	APrev66		CAATATCCAGCACGTTCCAGGTG				

a. Tamaño del amplicón (pb). b. Temperatura de anillamiento (°C). c. Tiempo de extensión (minutos).

5.4. Caracterización de alelos de *fimH* y O-tipado.

En aquellos aislados que no fueron clasificados como *H30*, se procedió a determinar el alelo del gen *fimH* mediante PCR (153) y posterior secuenciación (ver el apartado 3.1.2). Las secuencias obtenidas se enfrentaron mediante blastn a una biblioteca de 448 alelos de *fimH* (comunicación personal del Dr. Johnson y B. Johnston).

Se buscaron las variantes de AgO más frecuentes en las cepas ST131 según la literatura (O25b y O16) mediante PCR multiplex (154) como se refiere en el apartado 3.1.2. Las condiciones para estas amplificaciones se encuentran en la Tabla 11.

Tabla 11. Cebadores y condiciones de amplificación para la secuenciación de *fimH* y el tipado de AgO

PCR	Cebadores	Diana	Secuencias (5'-3')	Pb ^a	Ta ^b	t ^c	Referencia
<i>fimH</i>	fimH-F		CACTCAGGGAACCATTCAGGCA				
	fimH-R	<i>fimH</i>	CTTATTGATAAACAAAAGTCAC	975	56	1:00	(153)
	fimH-mid*		CGTTGTTTATAATTCGAG				
Tipado O	trpA _{ST131-O16} -F	<i>trpA</i>	AAAACCGCGCCGTTACCT	145			
	trpA _{ST131-O16} -R		CCAGAAATCGCGCCCGCATT		63	0:30	(154)
	pabB _{ST131-O25b} -F	<i>pabB</i>	TCCAGCAGGTGCTGGATCGT	347			
	pabB _{ST131-O25b} -R		GCGAAATTTTCGCCGACTGT				

* Para mejorar el rendimiento de la secuenciación, no usado en la PCR de amplificación. a. Tamaño del amplicón (pb). b. Temperatura de anillamiento (°C). c. Tiempo de extensión (minutos).

6. Estudio de virulencia de *E. coli*

El análisis de los distintos factores determinantes de virulencia de *E. coli* se llevó a cabo mediante dos enfoques distintos. Por un lado, se determinó mediante PCR la presencia en las cepas analizadas de una serie de genes considerados factores de virulencia en la literatura. Por otro, se analizaron en un modelo murino de sepsis una selección de cepas procedentes de aislados invasivos, para evaluar su letalidad.

6.1. Determinación del genotipo de virulencia: Índice de virulencia

Se estudió la presencia de 27 genes de virulencia (incluyendo variantes) (12,128) mediante PCR como se refiere en el apartado 3.1.2. Los genes estudiados clasificados por categorías y su función están recogidos en la Tabla 12. Los cebadores utilizados para cada uno así como las condiciones de amplificación se encuentran en las Tabla 13 y 14. Se definió el índice de virulencia (IV) como la suma del total de genes detectados para cada aislado, ajustándose para la detección de múltiples variantes del gen *papG* y *kpsII*, de manera que la presencia de múltiples variantes del mismo gen en una misma cepa solo se contabilizó como un gen en el cálculo de IV (155). El gen *fimH*, estudiado por secuenciación, no se incluyó en el IV. Se consideraron portadores de la variante K2 del operón *KpsII* a aquellos aislados que amplificaron para los cebadores *kpsII*-F y *kpsII*-R pero no para los cebadores *kii*-F y *kii*-R (156).

Tabla 12. Clase y función de los genes de virulencia estudiados

Clase	Gen	Función
Adhesinas	<i>afa/dra</i>	Operón de la adhesina específica del Ag Dr
	<i>papG I, II y III</i>	
	<i>papA</i>	Subunidades de las fimbrias tipo P
	<i>papC</i>	
	<i>papEF</i>	
	<i>iha</i>	Adhesina regulada por hierro
	<i>bmaE</i>	Adhesina específica del grupo sanguíneo M
	<i>sfa/foc</i>	Región central de los operones de <i>sfa</i> (fimbria S) y <i>foc</i> (fimbria F1C)
<i>yfcV</i>	Proteína de adhesión “fimbria –like”	
Sideróforos	<i>iutA</i>	Receptor de la aerobactina
	<i>iroN</i>	Receptor de la salmoquelina
	<i>fyuA</i>	Receptor de la yersiniobactina
Protectinas	<i>kpsII (K1, K2, K5)</i>	Síntesis del polisacárido capsular del grupo 2 (variantes)
	K15	Determinante capsular
	<i>iss</i>	Factor de incremento de supervivencia en suero
	<i>cvaC</i>	Colicina V
	<i>traT</i>	Proteína de Resistencia al suero
Toxinas	<i>vat</i>	Autotransportador vacuolizante
	<i>sat</i>	Autotransportador de toxina secretada
Otros	<i>usp</i>	Proteína específica uropatogénica
	<i>ompT</i>	Proteína exterior de membrana T
	PAI	Marcador de isla de patogenicidad

Tabla 13. Cebadores y condiciones de amplificación para la detección de genes de virulencia mediante PCR

PCR	Cebadores	Diana	Secuencias (5'-3')	Pb ^a	Ta ^b	t ^c	Referencia
Genes de virulencia	papEF-F	<i>papEF</i>	GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT	336	63	0:30	(12)
	papEF-R		AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA				
	papGI-F	<i>papG I</i>	TCGTGCTCAGGTCCGGAATTT	461	63	0:30	
	papGI-R		TGGCATCCCCAACATTATCG				
	papGII-F	<i>papG II</i>	GGGATGAGCGGGCCTTTGAT	190	63	0:30	
	papGII-R		CGGGCCCCAAGTAACTCG				
	papGIII-F	<i>papG III</i>	GGCCTGCAATGGATTACCTGG	258	63	0:30	
	papGIII-R		CCACCAAATGACCATGCCAGAC				
	iha-F	<i>iha</i>	CTGGCGGAGGCTCTGAGATCA	827	63	1:00	
	iha-R		TCCTTAAGCTCCCGGGCTGA				
	bmaE-F	<i>bmaE</i>	ATGGCGCTAACTTGCCATGCTG	507	63	0:40	
	bmaE-R		AGGGGGACATATAGCCCCCTTC				
	iroN-F	<i>iroN</i>	AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG	665	63	0:45	
	iroN-R		GACGCCGACATTAAGACGCAG				
	usp-F	<i>usp</i>	ACATTCACGGCAAGCCTCAG	440	63	0:30	
	usp-R		AGCGAGTTCCTGGTGAAAGC				
	ompT-F	<i>ompT</i>	ATCTAGCCGAAGAAGGAGGC	559	63	0:40	
	ompT-R		CCCGGGTCATAGTGTTCATC				
	malX-F	<i>malX</i>	GGACATCCTGTTACAGCGCGCA	930	63	1:00	
	malX-R		TCGCCACCAATCACAGCCGAAC				
	iss-F	<i>iss</i>	CAGCAACCCGAACCACTTGATG	323	63	0:30	
	iss-R		AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA				
	cvaC-F	<i>cvaC</i>	CACACACAAACGGGAGCTGTT	680	63	0:45	
	cvaC-R		CTTCCCGCAGCATAGTCCAT				
	sat-F	<i>sat</i>	GCAGCTACCGCAATAGGAGGT	937	63	1:00	
	sat-R		CATTAGAGTACCGGGGCTTA				
	traT-F	<i>traT</i>	GGTGTGGTGCGATGAGCACAG	290	63	0:30	
	traT-R		CACGGTTCAGCCATCCCTGAG				
	fyuA-F	<i>fyuA</i>	TGATTAACCCCGCGACGGGAA	880	63	1:00	
	fyuA-R		CGCAGTAGGCACGATGTTGTA				
K15-F	K15	ACGGATTACGACAAAGCTC	581	63	0:40		
K15-R		GGCAAATATCGCTTGGGTTA					

a. Tamaño del amplicón (pb). b. Temperatura de anillamiento (°C). c. Tiempo de extensión (minutos).

Tabla 14. Cebadores y condiciones de amplificación para la detección de los genes que forman el algoritmo ExPEC y UPEC

PCR	Cebadores	Diana	Secuencias (5'-3')	Pb ^a	Ta ^b	t ^c	Referencia
ExPEC	papA-F	<i>papA</i>	ATGGCAGTGGTGTCTTTTGGTG	720	63	1:00	(128)
	papA-R		CGTCCCACCATACGTGCTCTTC				
	papC-F	<i>papC</i>	GTGGCAGTATGAGTAATGACCGTTA	200	63	0:30	
	papC-R		ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA				
	sfa/foc-F	<i>sfa/foc</i>	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC	410	63	0:30	
	sfa/foc-R		CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA				
	afa/dra-F	<i>afa/dra</i>	GGCAGAGGGCCGGCAACAGGC	559	63	0:40	
	afa/dra-R		CCCCTAACGCGCCAGCATCTC				
	KpsII-F	<i>kpsII</i>	GCGCATTTGCTGATACTGTTG	570	63	1:00	
	KpsII-R		AGGTAGTTCAGACTCACACCT				
	kii-F	<i>kii</i>	GCGCATTTGCTGATACTGTTG	272	63	0:30	
	kii-R		CATCCAGACGATAAGCATGAGCA				
	K1-F	K1	TAGCAAACGTTCTATTGGTGC	153	63	0:30	
	K1-R		CATCCAGACGATAAGCATGAGCA				
	K5-F	K5	GCCACCAACTGTCGCAAAA	809	63	1:00	
	K5-R		TGTCGCCCAAACAAAAGATT				
iutA-F	<i>iutA</i>	GGCTGGACATCATGGGAACTGG	300	63	0:30		
iutA-R		CGTCGGGAACGGGTAGAATCG					
UPEC	vat-F	<i>vat</i>	TCAGGACACGTTTCAGGCATTTCAGT	1100			
	vat-R		GGCCAGAACATTTGCTCCCTTGTT				
	fyuA-F	<i>fyuA</i>	GTAACAATCTTCCCGCTCGGCAT	850	63	1:30	
	fyuA-R		TGACGATTAACGAACCGGAAGGGA				
	chuA-F	<i>chuA</i>	CTGAAACCATGACCGTTACG	652			
	chuA-R		TTGTAGTAACGCACTAAACC				
	yfcV-F	<i>yfcV</i>	ACATGGAGACCACGTTCCACC	292			
	yfcV-R		GTAATCTGGAATGTGGTTCAGG				

a. Tamaño del amplicón (pb). b. Temperatura de anillamiento (°C). c. Tiempo de extensión (minutos).

6.1.1. Definiciones moleculares de Extraintestinal Pathogenic *E. coli* (ExPEC) y Uropathogenic *E. coli* (UPEC).

Se clasificaron los aislados como ExPEC si eran portadores de dos o más de los siguientes genes: *papA* y/o *papC* (contabilizando como uno), *sfa/focDE*, *afa/dra*, *iutA*, y *kpsII* (155). Se clasificaron como UPEC si eran portadores de 3 o más de los siguientes genes: *chuA*, *fyuA*, *vat* y

yfcV (26). Todos los genes del algoritmo de ExPEC y los genes *vat* y *yfcV* del de UPEC se incluyeron también en el cómputo del IV (ver apartado anterior).

6.1.2. Perfiles de virulencia

Con los genes detectados, se buscaron perfiles comunes entre las cepas, utilizando RStudio versión 1.0.44 (RStudio Team 2016, RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA) para generar un *heatmap* con el paquete *pheatmap*, que agrupa vectores según sus características definidas, en este caso, ausencia o presencia de genes. Se eliminaron para este análisis aquellos genes que no estaban presentes en ninguna cepa y aquellos que estaban en todas. Así mismo, se contabilizó solo una vez la presencia de distintas variantes del operón *pap* y *kpsII*.

6.2. **Modelo murino experimental de virulencia**

De los aislados procedentes del proyecto ITU-BRAS, se seleccionaron todos los aislados ST131 productores de BLEE (n = 21) y 27 aislados ST131 no productores de BLEE escogidos aleatoriamente, para el estudio *in vivo* de virulencia en un modelo murino de sepsis ya establecido (16). Los experimentos se llevaron a cabo en los laboratorios de investigación de la unidad de Enfermedades Infecciosas del Hospital de Veteranos de Minneapolis, en Minnesota (EEUU), al cargo del Dr. JR Johnson. Se siguieron las guías de experimentación de dicho hospital bajo el protocolo 120603, aprobado por el Comité Institucional de Uso y Cuidado Animal local (*Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC*). Los animales se mantuvieron en jaulas ventiladas con comida y agua *ad libitum*, siguiendo ciclos naturales de luz-oscuridad, con un número máximo de 10 ratones por jaula. Al finalizar los experimentos todos los ratones utilizados, incluyendo controles, fueron eutanizados mediante inhalación de dióxido de carbono, y tras comprobar la muerte, autoclavados.

El protocolo de experimentación empleado fue el siguiente: Hembras de ratón del tipo Swiss-Webster, libre de patógenos y *outbred*, con una media de edad de 60 días y una media de peso de 23g, fueron inoculados de forma subcutánea en la nuca con aproximadamente 10^9 UFC/ml de bacterias en fase logarítmica de crecimiento en 0.2ml de buffer PBS (*phosphated buffer saline*, tampón salino fosfatado). Se estudió la letalidad en los 3 días siguientes, dos veces al día, clasificándose a los ratones según su apariencia externa y su comportamiento en 5 estadios de afectación: 1 o sano, 2 o levemente enfermo, 3 o moderadamente enfermo, 4 o gravemente enfermo y 5 o muerto. Cada aislado se testó en cinco ratones inicialmente, seguido de otros cinco si los experimentos iniciales no arrojaron resultados concluyentes, es

decir, letalidad o supervivencia de 4 o 5 de los animales testados al final del experimento. Cada tanda de experimentos incluyó un control positivo, empleando el aislado CFT073, procedente de sepsis urinaria, que causa la muerte en el 80-100% de ratones testados a los 3 días post-inoculación, y un control negativo, la cepa de laboratorio MG1655, que no causa enfermedad aparente o letalidad.

Tras los tres días se determinó la media de estadios de afectación diarios de cada ratón testado con un aislado concreto, y la media de los estadios de los 5 ratones testados por cada aislado para hallar el índice de letalidad (IL) de cada aislado. Además, se utilizó como medidor de letalidad la variable “rapidez de letalidad”, siendo considerados “rápidos” aquellos aislados con $IL > 3$, que implicaba que todos los ratones testados estaban gravemente enfermos o muertos tras el primer día post-inoculación.

El inóculo fue preparado de la siguiente manera: Se sembraron las cepas a estudio en medio general de tripticasa-soja con 5% de sangre de carnero (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, EEUU) y se incubaron 48h a temperatura ambiente. Posteriormente se seleccionó una colonia de cada cepa y se inocularon en tubos con 10ml de caldo LB (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, EEUU) que se incubaron 24h *overnight*.

Del cultivo crecido se aspiraron 200 μ l que se inocularon en 20ml de caldo LB (Becton Dickinson), los cuales se procedió a incubar 3h a 37°C en agitación. Tras pasar las 3h, se centrifugó el cultivo a 15.000rpm durante 15 minutos y se desechó el sobrenadante. El pellet obtenido se lavó dos veces con 30ml de PBS, centrifugando tras cada lavado a 15.000rpm durante 15 minutos. El pellet resultante se resuspendió en 2ml de PBS y se ajustó la densidad óptica de la suspensión a 1.0-1.1. De la suspensión de bacterias resultante, se utilizó 200 μ l para inocular a los ratones.

Para comprobar que los inóculos utilizados estaban dentro de un mismo rango, se realizaron las siguientes comprobaciones. De los 2ml de inóculo preparados, se tomaron 10 μ l y se diluyeron en 10ml de PBS. Tras vortear, se tomaron de este tubo 10 μ l y se pasaron a un tubo con otros 10ml de PBS. Finalmente se tomó 1ml y se diluyó en 9ml de PBS, obteniéndose una dilución final de 1×10^7 .

De esta dilución se sembraron por duplicado 100 μ l en placas de agar tripticasa-soja con 5% de sangre de carnero. Estas placas se incubaron 24h a 37°C y se procedió al recuento de colonias crecidas, calculándose la concentración de cada inóculo (media de las

concentraciones de cada placa) y la dosis total administrada en los 200 μ l inoculados a los ratones (concentración por 200 μ l) (Figura 13).

La media del total de los inóculos utilizados fue de $1,11 \times 10^9$ UFC/ml con una desviación estándar de $6,77 \times 10^8$.

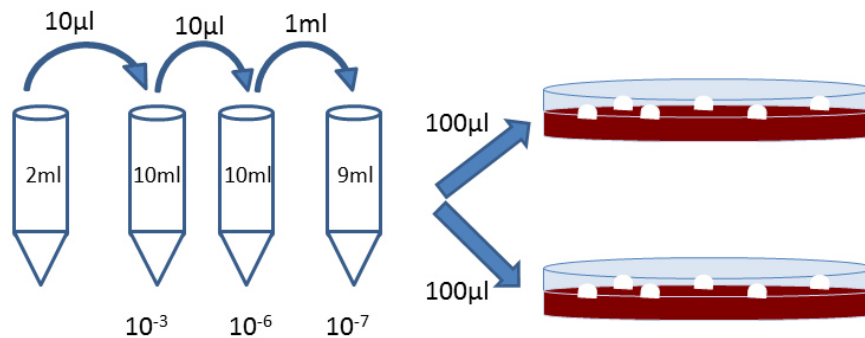


Figura 13. Cálculo del inóculo utilizado en el modelo experimental.

La concentración del inóculo fue igual a la media del recuento de colonias dividido por el volumen sembrado multiplicado por el factor de dilución.

7. Análisis estadístico

Las variables cualitativas dicotómicas se describieron mediante frecuencias y porcentajes y las variables cuantitativas fueron descritas con medias y desviación estándar o medianas y rango intercuartílico (IQR) según su distribución siguiese o no parámetros de normalidad. Las variables se compararon mediante chi cuadrado, test de Fisher, test de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis según sus características. El criterio para la significación estadística fue de $p < 0.05$. Para evitar el error de tipo I en caso de múltiples comparaciones se utilizó el método de corrección de Bonferroni. Las correlaciones se analizaron utilizando el método de Spearman. Los datos se analizaron mediante el software STATA versión 11 (Stata Statistical Software: Release 11. StataCorp LP, College Station, Texas, EE.UU).

RESULTADOS

“Descubre, entonces, los planes del enemigo y sabrás la estrategia que te será más eficaz”

Sun Tzu, “El Arte de la Guerra”

1. *E. coli*-BLEE de origen invasivo: prevalencia y características microbiológicas

En este capítulo se incluyen resultados derivados del desarrollo de parte de los objetivos 1 y 2. Entre los 425 aislados de *E. coli* causantes de bacteriemias de origen urinario recogidas en el seno del proyecto ITUBRAS se detectaron 39 aislados productores de BLEE (9.2%) y 75 *E. coli*-ST131 (18%). De entre los productores de BLEE, 21 eran ST131 por lo que este clon de alto riesgo representa el 54% de los *E. coli*-BLEE. El hospital con mayor porcentaje de BLEEs fue el Complejo Hospitalario de Pontevedra (15%), seguido del Hospital Universitario Ramón y Cajal (13%). Por el contrario, los hospitales universitarios Virgen Macarena y Hospital del Mar obtuvieron las menores tasas de prevalencia de BLEEs, con 3% y 4% respectivamente (Tabla 15).

Tabla 15. Prevalencia de *E. coli*-BLEE entre los aislados invasivos de cada hospital participante en el proyecto ITU-BRAS

Hospital	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> -BLEE (%)
H. U. Gregorio Marañón	71	8 (11)
H. U. Ramón y Cajal	62	8 (13)
H. U. Virgen Macarena	34	1 (3)
H. U. Marqués de Valdecilla	47	4 (8)
H. del Mar	76	3 (4)
H. de la Santa Creu i Sant Pau	37	4 (11)
Complejo Hospitalario de Pontevedra	53	8 (15)
H. U. Mutua Terrasa	45	3 (7)
Total	425	39 (9)

1.1. Estructura poblacional de *E. coli*-BLEE

De los 39 aislados productores de BLEEs, 21 (54%) pertenecían al filogrupo B2, siendo este filogrupo el más frecuente seguido del B1 con 9 (23%) aislados. El resto de aislados se distribuyó entre los filogramos A, C y D; con un aislado no tipable.

Todos los aislados clasificados en el filogrupo B2 se agruparon dentro de ST131. Por el contrario, en el resto de filogramos se observó una mayor diversidad poblacional, ya que los aislados del filogrupo B1 se agruparon en 6 STs (ST224, ST156, ST359, ST448, ST453 y ST57) y los aislados de los filogramos restantes se distribuyeron en 10 STs diferentes (Tabla 16).

La subtipificación de los 21 aislados ST131 puso de manifiesto que el 95% de estos pertenecían al subclón *H30Rx-O25b* y solo un aislado se clasificó como no-*H30* (*H41-O16*). Ningún aislado fue clasificado como *H30* no-Rx.

De los 18 aislados no-ST131, los pertenecientes al filogrupo A (n = 3) agruparon los dos aislados negativos para *fimH*, y un aislado *H54*. El filogrupo B1 incluyó una gran variedad de alelos (*H35*, *H38* y *H39* con dos aislados cada uno y *H24*, *H31* y *H61* con un aislado) mientras que el filogrupo D (n = 3) solo presentó dos alelos distintos, *H27* (n =2) y *H54*. Los dos únicos aislados del filogrupo C eran *H24* y el aislado cuyo filogrupo no pudo ser tipado (ST1011) codificó para el alelo *H30*.

Tabla 16. Grupo filogenético, ST y alelo *fimH* de los aislados invasivos recogidos en el proyecto ITU-BRAS

Filogrupo	ST	<i>fimH</i>	N° Aislados
A	ST167	<i>H54</i>	1
	ST361	Neg	1
	ST609	Neg	1
B1	ST57	<i>H24</i>	1
	ST156	<i>H38</i>	2
	ST224	<i>H38</i> (2)/ <i>H61</i>	3
	ST359	<i>H35</i>	1
	ST448	<i>H35</i>	1
	ST453	<i>H31</i>	1
B2	ST131	<i>H30</i>	21
C	ST410	<i>H24</i>	2
D	ST69	<i>H27</i>	1
	ST405	<i>H27</i>	1
	No tipable	<i>H54</i>	1
No tipable	ST1011	<i>H30</i>	1

El análisis de la clonalidad mediante PFGE mostró la agrupación de los aislados B2-ST131 en un clúster (Clúster A, n = 21) con 68% de similitud dentro del cual los aislados *H30Rx* estaban

agrupados entre sí (clúster A1, 71% de similitud) y separados del aislado no-H30 (Figura 14). Dentro del clúster A1 se observó la agrupación de todos los aislados ST131 del Hospital Ramón y Cajal con una similitud del 83%.

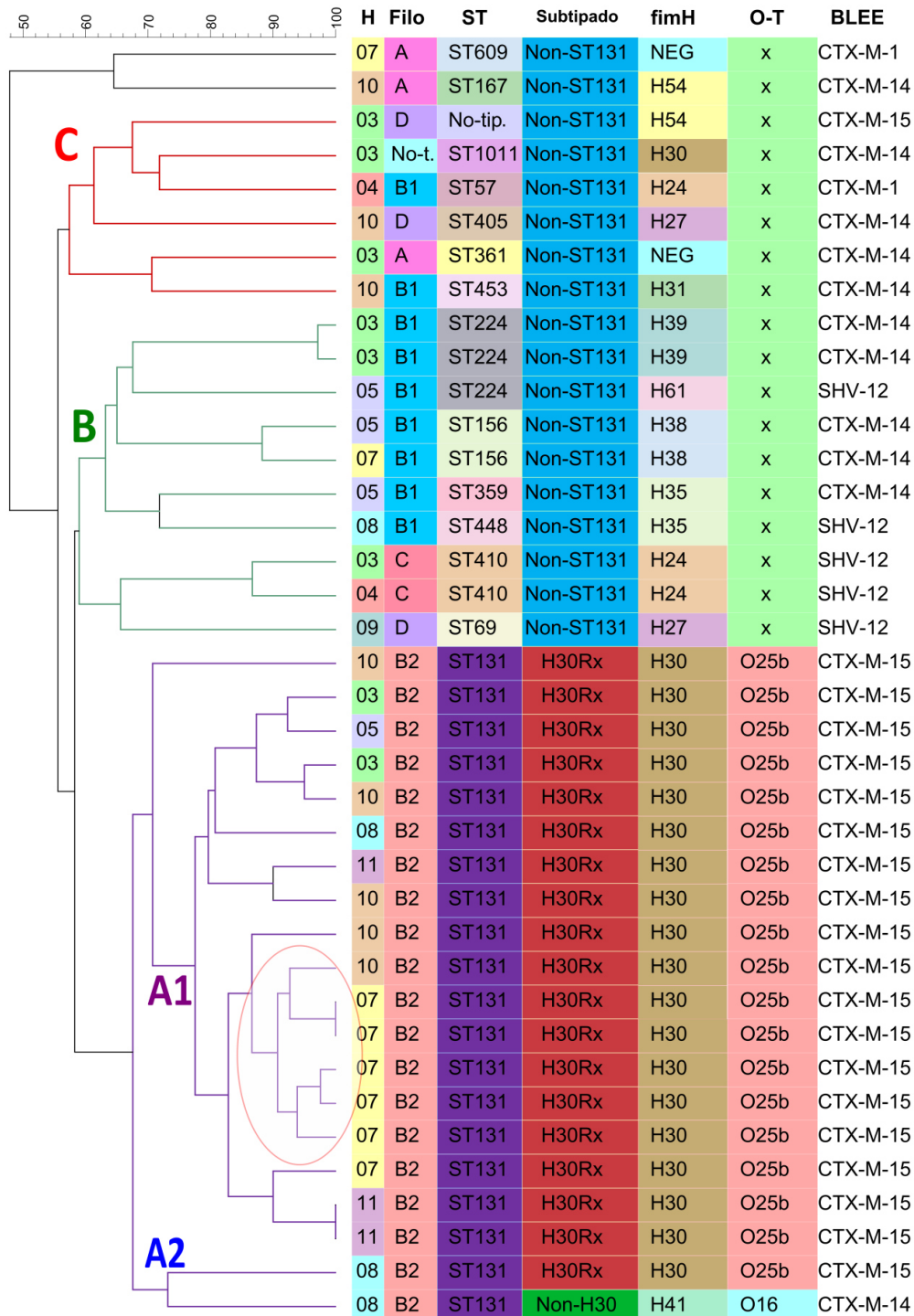


Figura 14. Dendrograma y principales características de los aislados invasivos *E. coli*-BLEE incluidos en el proyecto ITU-BRAS.

H (Hospital participante): 3= H. Gregorio Marañón; 4= H. del Mar; 5= H. Marqués de Valdecilla; 7= H. Ramón y Cajal; 8: H. de la Santa Creu; 9:H. Virgen Macarena; 10: Complejo Hospitalario de Pontevedra; 11= Mutua Terrassa. Filo: Grupo filogenético. O-T: Tipado de O (X = No disponible). No-tip/No-t.= No tipable. Un aislado no pudo ser tipado por PFGE. El círculo en rojo marca un clúster de aislados del H. Ramón y Cajal

Los aislados no-ST131 se agruparon principalmente en los clúster B (n = 10, 59% de similitud) y C (n = 6, 57% de similitud). La mayoría de aislados pertenecientes a los filogrupos B1 y C se incluyeron en el clúster B, mientras que el clúster C contenía aislados de los filogrupos A, D y B1.

1.2. Sensibilidad a antibióticos

Los porcentajes de resistencia a los distintos antibióticos fueron en general elevados (Figura 15), aunque todos los aislados fueron sensibles a tigeciclina, imipenem y meropenem. De la familia de los betalactámicos, el 90% (35/39) de los aislados fueron resistentes a cefotaxima, 59% (23/39) a cefepima, 54% (21/39) a ceftazidima y 8% (3/39) a cefoxitina. En cuanto a los inhibidores, el 33% (13/39) de los aislados fueron resistentes a amoxicilina-clavulánico y el 20% (8/39) a piperacilina-tazobactam. Los porcentajes de resistencia a quinolonas fueron también muy altos, tanto para el ácido nalidíxico (97%, 38/39) como para el ciprofloxacino (95%, 37/39). De los aminoglucósidos analizados, la tobramicina presentó el mayor porcentaje de resistencias (59%, 23/39) seguida de la gentamicina y la amicacina, ambas con el 31% (12/39) de los aislados resistentes. Se observaron diversos fenotipos, de los cuales el más frecuente fue el de sensibilidad a los 3 aminoglucósidos (41%). De los fenotipos de resistencia, fueron igualmente frecuentes (28%) los que mostraban resistencia a la tobramicina y amicacina pero no a la gentamicina (TA) y los que mostraban resistencia a gentamicina y tobramicina pero no a la amicacina (GT).

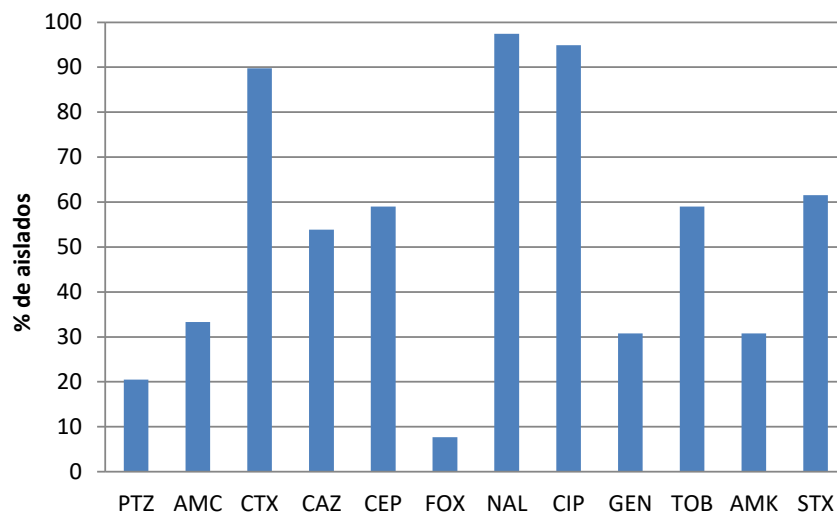


Figura 15. Porcentaje de aislados invasivos *E. coli*-BLEE resistentes (intermedio más resistente, I+R) a cada antibiótico recogidos en el proyecto ITU-BRAS.

PTZ: Piperacilina-Tazobactam. AMC: Amoxicilina-clavulánico. CTX: Cefotaxima. CAZ: Ceftazidima. CEP: Cefepima. FOX: Cefoxitina. NAL: Ácido nalidíxico. CIP: Ciprofloxacino. GEN: Gentamicina. TOB: Tobramicina. AMK: Amicacina. STX: Cotrimoxazol. Todos los aislados fueron sensibles a imipenem, meropenem y tigeciclina.

Los aislados pertenecientes al clon de alto riesgo *E. coli*-ST131 presentaron mayores porcentajes de resistencia a la mayoría de los antibióticos en comparación con los no-ST131, pero sin diferencias significativas excepto en la resistencia a tobramicina ($p < 0.001$) y amicacina ($p = 0.002$), donde los porcentajes de resistencia fueron mayores entre los ST131 (90%, 19/21 y 52%, 11/21) que entre los no ST131 (22%, 4/18 y 6%, 1/18) (Figura 16). El fenotipo de sensibilidad a los 3 aminoglucósidos fue más frecuente entre los no-ST131 (78%, 14/18 vs. 10%, 2/21), mientras que el fenotipo TA predominó entre los ST131 (48%, 10/21 vs. 6%, 1/18) ($p < 0.001$).

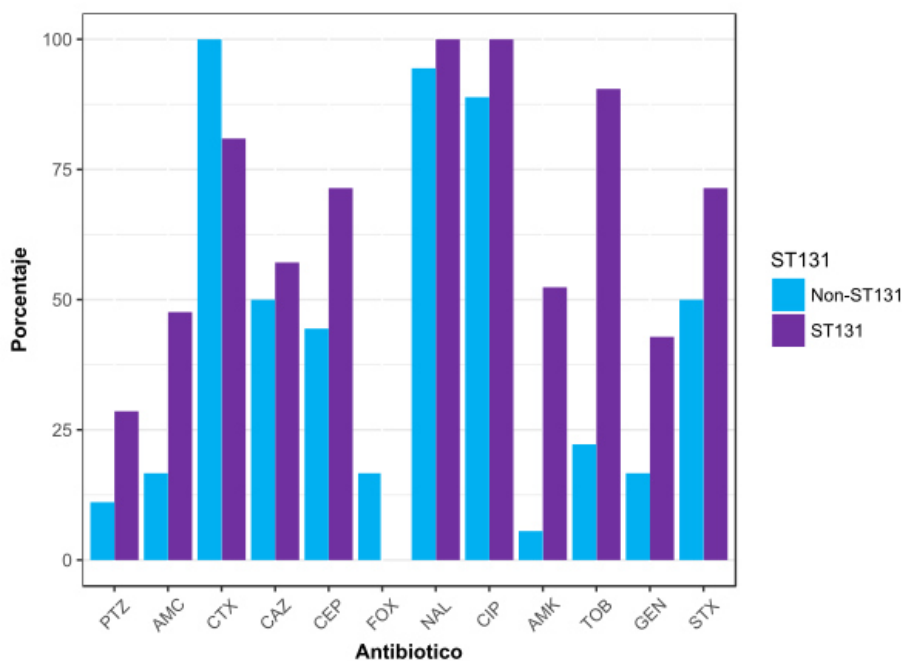


Figura 16. Porcentaje de aislados invasivos *E. coli*-BLEE ST131 y no-ST131 resistentes (I+R) a antibióticos recogidos en el proyecto ITUBRAS.

PTZ: Piperacilina-Tazobactam. AMC: Amoxicilina-clavulánico. CTX: Cefotaxima. CAZ: Ceftazidima. CEP: Cefepima. FOX: Cefoxitina. NAL: Ácido nalidíxico. CIP: Ciprofloxacino. GEN: Gentamicina. TOB: Tobramicina. AMK: Amicacina, STX: Cotrimoxazol. Todos los aislados fueron sensibles a imipenem, meropenem y tigeciclina.

1.3. Caracterización molecular de BLEEs

De entre los 39 aislados productores de BLEE, la enzima más frecuentemente codificada fue CTX-M-15 (21/39, 54%), seguida de CTX-M-14 (11/39, 28%), SHV-12 (5/39, 13%) y CTX-M-1 (2/39, 5%). CTX-M-15 fue significativamente más frecuente entre los ST131 (20/21, 95%) que en los no-ST131, mientras que en estos últimos predominó la CTX-M-14 (10/18, 56%) ($p < 0.01$). Es de resaltar que el único aislado ST131 que no producía CTX-M-15 era el perteneciente al subclón no-H30 y codificaba CTX-M-14. Además, los aislados que codificaban para CTX-M-15

presentaban mayor porcentaje de resistencia a amoxicilina-clavulánico y piperacilina-tazobactam (48% y 29% respectivamente), aminoglucósidos (gentamicina 43%, tobramicina 90% y amicacina 52%) y cotrimoxazol (76%) que aquellos que codificaban CTX-M-14 siendo estadísticamente significativas estas diferencias para tobramicina (Tabla 17).

Tabla 17. Porcentaje de aislados *E. coli* resistentes (I+R) a antibióticos según el tipo de BLEE codificada del total de aislados invasivos *E. coli*-BLEE recogidos en el proyecto ITU-BRAS

Antibióticos	Nº aislados (%) <i>E. coli</i> -BLEE no sensibles				valor de p ^{a*}	Valor de p ^{b*}
	CTX-M-15 n = 21	CTX-M-14 n = 11	SHV-12 n = 5	CTX-M-1 n = 2		
PTZ	6 (29)	1 (9)	1 (20)	0 (0)	0.67	0.37
AMC	10 (48)	1 (9)	2 (40)	0 (0)	0.12	0.05
CTX	17 (81)	11 (100)	5 (100)	2 (100)	0.46	0.27
CAZ	12 (57)	4 (36)	5 (100)	0 (0)	0.04	0.46
CEP	14 (67)	8 (73)	0 (0)	1 (50)	0.02	1.0
FOX	0 (0)	2 (18)	1 (20)	0 (0)	0.14	0.11
NAL	21 (100)	11 (100)	4 (80)	2 (100)	0.18	NA ^c
CIP	21 (100)	10 (91)	4 (80)	2 (100)	0.26	0.34
GEN	9 (43)	1 (9)	0 (0)	2 (100)	0.01	0.12
TOB	19 (90)	2 (18)	0 (0)	2 (100)	<0.001	<0.001
AMK	11 (52)	1 (9)	0 (0)	0 (0)	0.02	0.02
STX	16 (76)	6 (55)	2 (40)	0 (0)	0.09	0.25

^aComparación global. ^bComparación entre aislados productores de CTX-M-15 y CTX-M-14. ^cNA-No es aplicable la comparación por ser todos los aislados resistentes en ambos grupos. * Los valores de p estadísticamente significativos están en negrita. Se consideró significativo un valor de p < 0.01. PTZ: Piperacilina-Tazobactam. AMC: Amoxicilina-clavulánico. CTX: Cefotaxima. CAZ: Ceftazidima. CEP: Cefepima. FOX: Cefoxitina. NAL: Ácido nalidíxico. CIP: Ciprofloxacino. GEN: Gentamicina. TOB: Tobramicina. AMK: Amicacina, STX: Cotrimoxazol. Todos los aislados fueron sensibles a imipenem, meropenem y tigeciclina.

1.4. Genotipo de virulencia

Tras el análisis del genotipo de virulencia de los 39 aislados *E. coli*-BLEE, se observó la presencia de al menos un factor de virulencia (FV) en todos los aislados menos uno. En general, los FVs detectados con mayor frecuencia fueron *iutA* y *traT* con un 87% (34/39) y 80% (31/39) de aislados positivos respectivamente. Por el contrario, la presencia de los FV *bmaE*, *sfa/foc*, la variante K1 de *kpsII* y los alelos I y III de *papG* no se detectó en ningún aislado. De entre todos los FVs testados, 11 estaban asociados de forma significativa al clon de alto riesgo

ST131 (ST131 vs. no-ST131: *iha*: 100% vs. 17%, *usp*: 100% vs. 6%, *ompT*: 100% vs. 17%, *sat*: 100% vs. 0%, *papA*: 52% vs. 11%, *PAI*: 100% vs. 11%, *kpsII*: 95% vs. 28%, *K2*: 81% vs. 17%, *iutA*: 100% vs. 72%, *fyuA*: 100% vs. 44%, y *yfcV*: 100% vs. 6%) y solo dos, *iss* (10% vs. 50%) e *iroN* (10% vs. 61%) estaban asociados a no-ST131 (Figura 17).

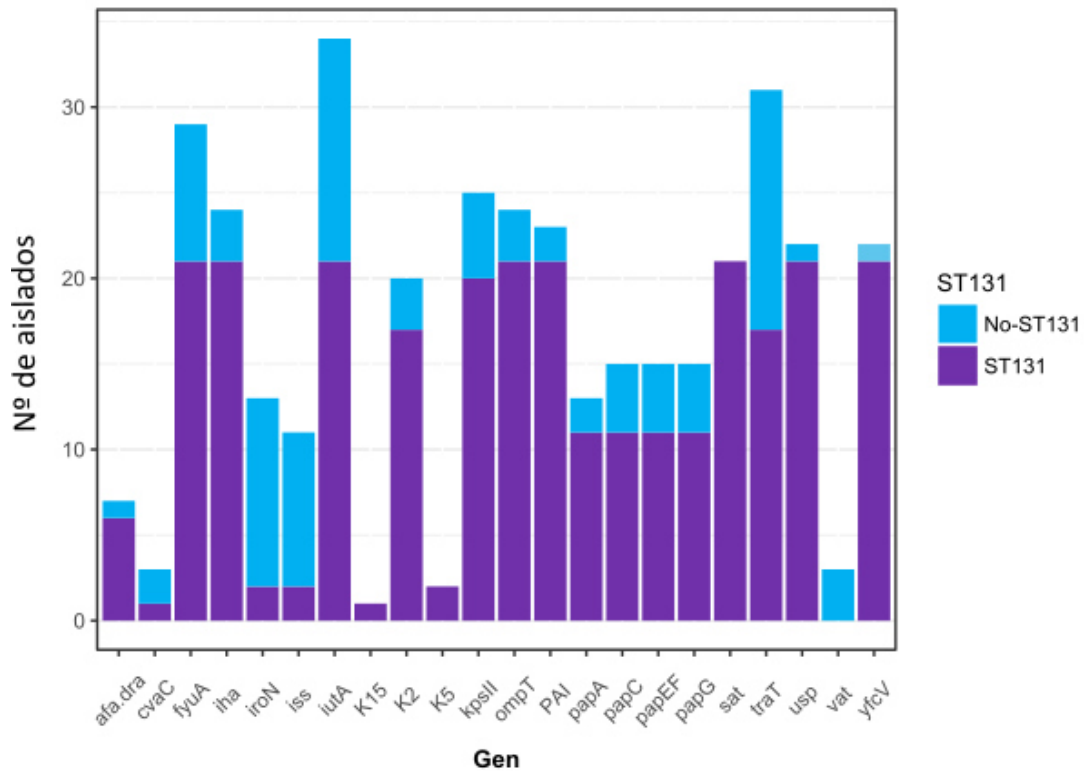


Figura 17. Genes de virulencia detectados en aislado invasivos *E. coli*-BLEE recogidos en el proyecto ITU-BRAS.

bmaE, *sfa/foc*, *K1*, y los alelos I y III de *papG* fueron negativos en todos los aislados.

1.4.1. Análisis del índice de virulencia

Globalmente, el índice de virulencia (IV) de los aislados *E. coli*-BLEE de origen invasivo fue alto, con una mediana de 10 (IQR 4-14). Al relacionar el IV con el grupo filogenético se observaron diferencias significativas entre los aislados agrupados en los distintos filogrupos ($p < 0.001$) siendo los aislados pertenecientes al filogrupo B2 aquellos que presentaron mayor IV (mediana 13, IQR 11-14) seguidos de los aislados del filogrupo D (mediana 9, IQR 8-11). El aislado cuyo filogrupo no pudo ser tipado presentaba también un IV alto (mediana 10) mientras que las medianas de IV de los aislados de los filogrupos A, B1 y C fueron todas menores de 5 (mediana de 2, 4 y 3.5 respectivamente) (Figura 18).

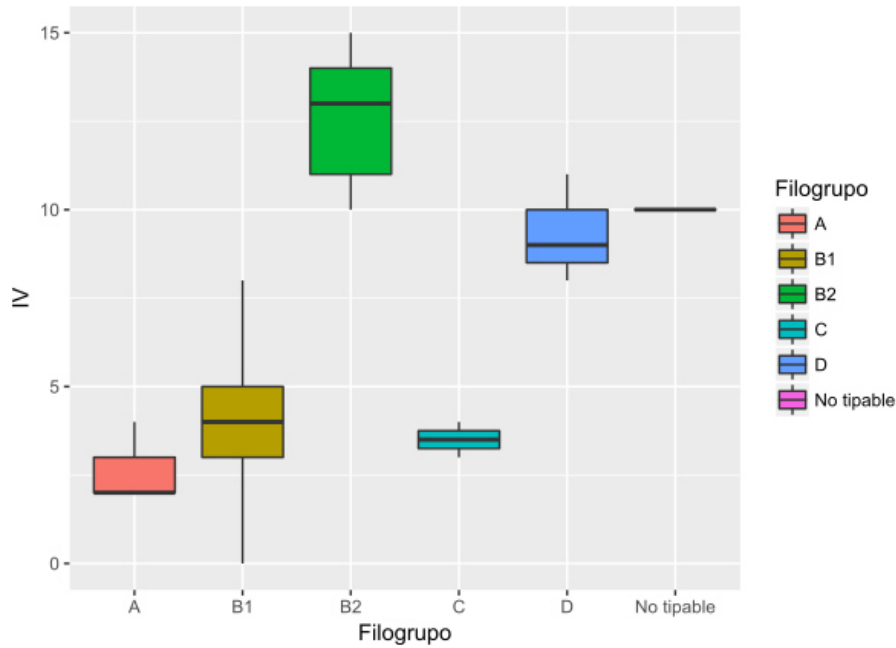


Figura 18. Gráfico de cajas y bigotes del índice de virulencia según filogrupos de los aislados invasivos *E. coli*-BLEE recogidos en el proyecto ITU-BRAS.

IV: Índice de virulencia

Igualmente, al relacionar el IV con las STs, se observaron diferencias significativas entre los aislados pertenecientes al clon de alto riesgo ST131 (mediana 13, IQR 11-14) y no-ST131 (mediana 4, IQR 3-8) ($p < 0.01$) (Figura 19). Dentro de la población de ST131, aunque el escaso número de aislados impidió una comparación adecuada entre los IV de los aislados *H30Rx* y el aislado no-*H30* ($p = 0.16$), los aislados pertenecientes al clado *H30* presentaron un IV mayor (mediana 13.5, IQR 11-14 *versus* mediana 10). Así mismo, los aislados productores de CTX-M-15 presentaron una mediana de IV mayor (13, IQR 11-14) que el resto de aislados que producían otros tipos de BLEE (mediana de IV de 4) ($p < 0.001$).

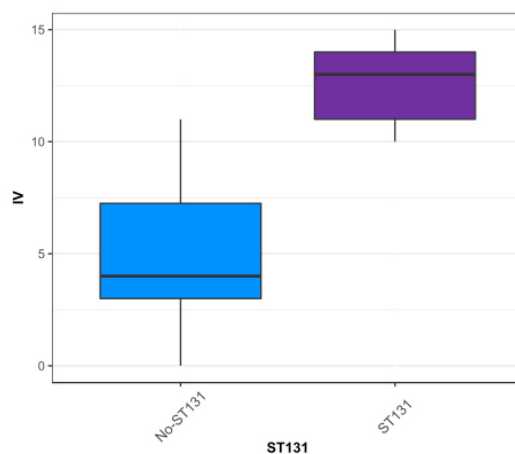


Figura 19. Gráfico de cajas y bigotes del índice de virulencia según pertenencia al *E. coli*-ST131 de los aislados invasivos *E. coli*-BLEE recogidos en el proyecto ITU-BRAS.

IV: Índice de virulencia.

1.4.2. Prevalencia de ExPEC y UPEC entre los aislados *E. coli*-BLEE de origen invasivo

Del total de aislados *E. coli*-BLEE, 67% (26/39) eran ExPEC y 59% (23/39) eran UPEC. De los 26 aislados ExPEC, a su vez, 85% (22/26) cumplían criterios de UPEC y un aislado UPEC no se clasificó como ExPEC. En función del grupo filogenético, todos los aislados del filogrupo D y el 95% (20/21) de los aislados del filogrupo B2 fueron clasificados como ExPEC, mientras que todos los aislados de los filogrupos A y C, y el 78% (7/9) de los aislados del filogrupo B1 se clasificaron como no-ExPEC ($p < 0.001$). Además, todos los aislados del filogrupo B2 y el 67% (2/3) de los aislados del filogrupo D se clasificaron como UPEC, mientras que ninguno de los aislados de los filogrupos A, B1 y C lo hizo ($p < 0.001$).

Todos los aislados *E. coli*-BLEE-ST131 se clasificaron como ExPEC menos el aislado perteneciente al subclón no-H30. Sin embargo, todos los aislados ST131, independientemente del subclón, se clasificaron como UPEC. De los aislados no-ST131 solo el 33% (6/18) se clasificaron como ExPEC y el 11% (2/18) como UPEC ($p < 0.01$ para ambas comparaciones).

Los aislados clasificados como ExPEC presentaron un IV mayor que los aislados no-ExPEC (mediana 11, IQR 10-14 *versus* mediana 3.5, IQR 2.5-4; $p < 0.001$). De la misma forma, los aislados considerados UPEC presentaron también un IV mayor (mediana 13 IQR 10-14 *versus* mediana 4, IQR 2.5-5.5; $p < 0.01$). Es de destacar que esto sucedía incluso entre los aislados no-ST131, de los cuales aquellos que fueron clasificados como ExPEC o UPEC presentaron una mediana de IV mayor que aquellos que no fueron clasificados en esos grupos (Figura 20).

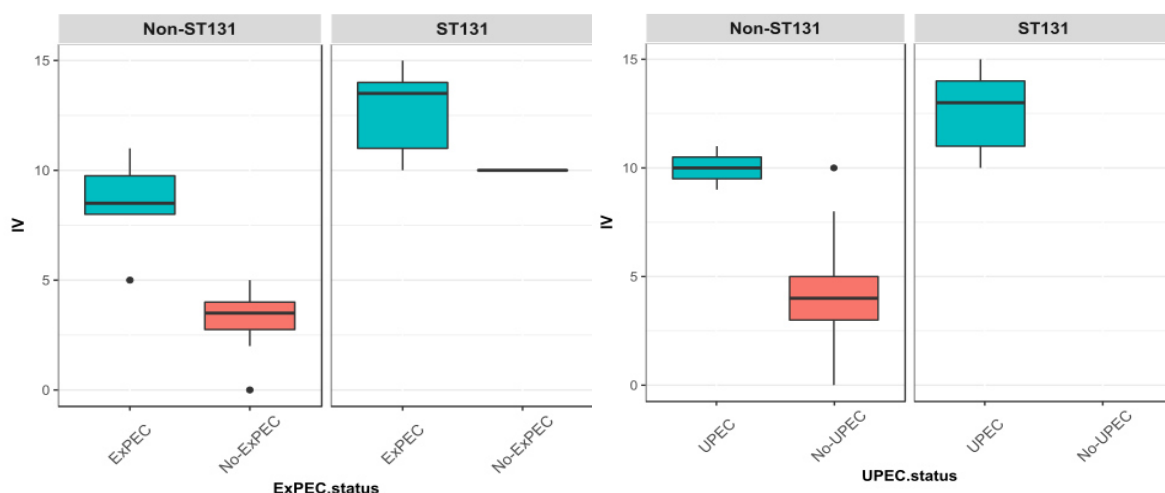


Figura 20. Gráfico de cajas y bigotes del índice de virulencia de los aislados invasivos *E. coli*-BLEE recogidos en el proyecto ITU-BRAS según su clasificación en ST131, ExPEC y UPEC.

1.4.3. Perfiles de virulencia

El análisis mediante *heatmap* representando los FVs estudiados mostró una gran variedad de perfiles de FV distintos (n = 24). De los 24 perfiles encontrados, 75% (18/24) estuvieron formados solo por un aislado, 4 perfiles estaban formados por dos aislados, un perfil por cuatro y otro por nueve aislados.

E. coli-BLEE no-ST131 se asoció con una mayor diversidad de perfiles (n =16) respecto a la población *E. coli*-BLEE-ST131 (n = 8). Dentro de ST131, en el subclón H30Rx se observó un perfil mayoritario (n = 9) caracterizado principalmente por la positividad del operón *pap* y *traT* y la ausencia de *afa/dra* frente a otros aislados ST131. Todos los perfiles de los aislados ST131 se agruparon en un clúster, mientras que los aislados no-ST131 se agruparon mayoritariamente en otro (Figura 21).

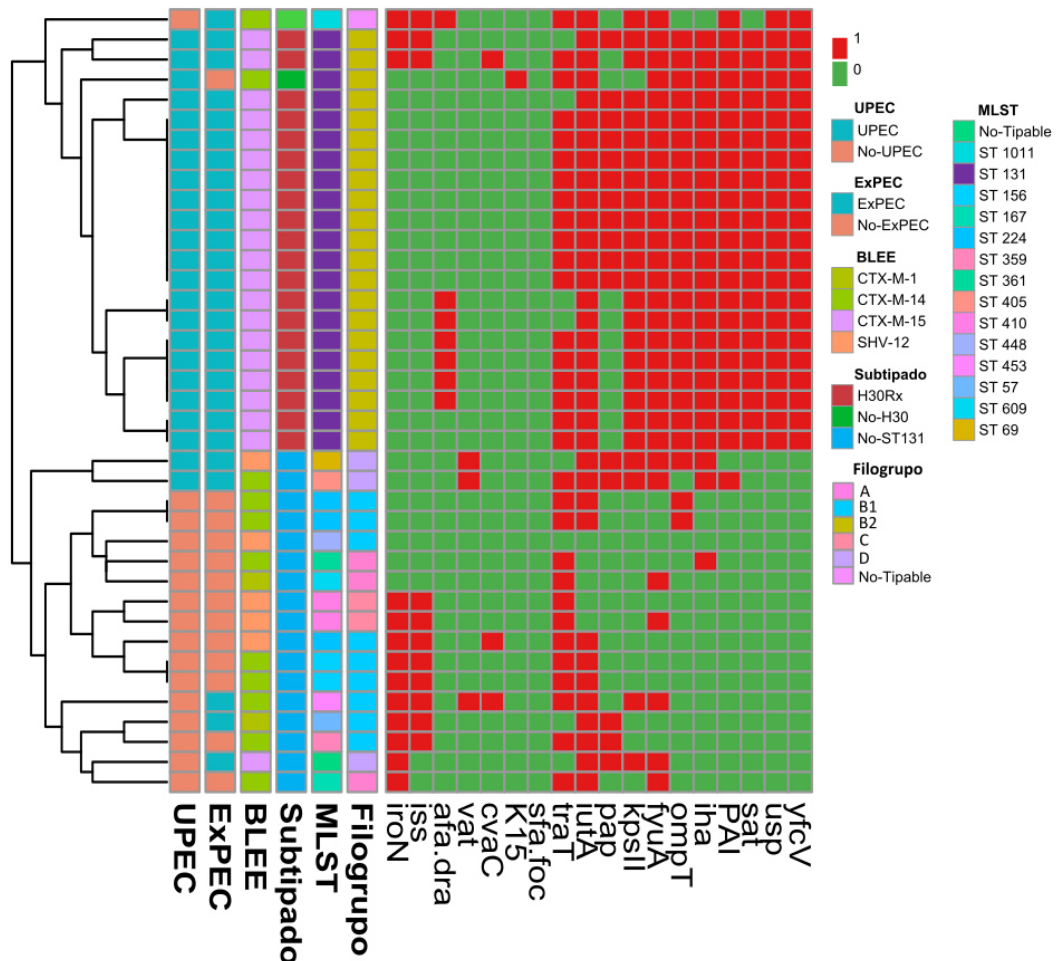


Figura 21. *Heatmap* con los genes de virulencia de los aislados invasivos *E. coli*-BLEE del proyecto ITU-BRAS.

Se excluyeron aquellos genes ausentes en todos los aislados. Se consideró *kpsII* positivo si el aislado fue positivo a *kpsII* o cualquiera de sus variantes. El operón *pap* se consideró positivo si el aislado fue positivo a *papA*, *papC*, *papEF* o *papG* (cualquiera de sus alelos). La presencia del gen estudiado está representada por el cuadrado rojo (1), y la ausencia por el cuadrado verde (0).

2. *E. coli*-ST131 de origen invasivo

En este apartado se incluyen resultados obtenidos en el desarrollo de parte de los objetivos 1 y 2. Dada la elevada prevalencia del clon de alto riesgo ST131 entre la población de *E. coli*-BLEE, el cribado de este clon se amplió al resto de aislados de la colección para estimar su prevalencia global independientemente de la presencia o no de BLEE.

Entre los 425 aislados de *E. coli* procedentes de bacteriemias de origen urinario del proyecto ITUBRAS se detectaron 75 *E. coli*-ST131 (17.6%) de los cuales 21 eran productores de BLEE y cuyas características microbiológicas se han descrito en el apartado 1. La prevalencia de ST131 fue variable según cada hospital, oscilando entre el 11% (8/71) en el Hospital Gregorio Marañón de Madrid al 30% (11/37) en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona (Cataluña) (Tabla 18).

Tabla 18. Prevalencia de ST131 entre los aislados *E. coli* invasivos de cada hospital participante en el proyecto ITU-BRAS

Hospital	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> -ST131 (%)*
H. U. Gregorio Marañón	71	8 (11)
H. U. Ramón y Cajal	62	13 (21)
H. U. Virgen Macarena	34	5 (15)
H. U. Marqués de Valdecilla	47	7 (15)
H. del Mar	76	12 (16)
H. de la Santa Creu i Sant Pau	37	11 (30)
Complejo Hospitalario de Pontevedra	53	13 (24)
H. U. Mutua Terrasa	45	6 (13)
Total	425	75 (18)

*Porcentaje de aislados ST131 de cada hospital

2.1. Estructura poblacional de *E. coli*-ST131

La subtipificación de los 75 aislados invasivos pertenecientes al clon de alto riesgo ST131 agrupó al 72% (54/75) de los aislados en el clado *H30* y al 28% (21/75) en el subclón no-*H30*. De los aislados *H30*, el 24% (13/54) fueron clasificados como *H30* no-Rx y el 76% (41/54) como *H30*Rx (Figura 22).

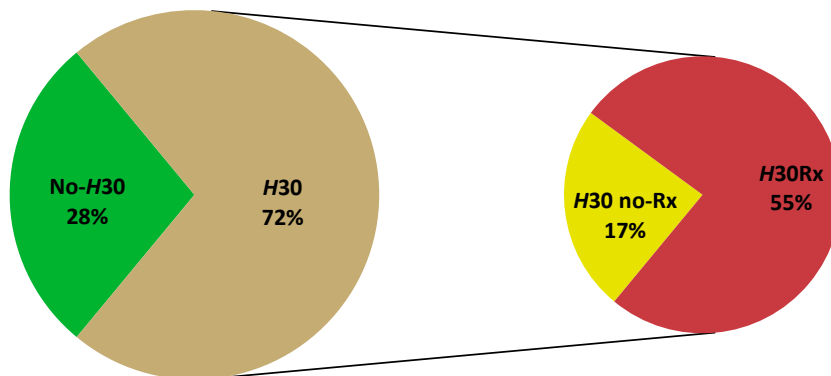


Figura 22. Tipificación de los aislados invasivos *E. coli*-ST131 recogidos en el proyecto ITU-BRAS

El análisis de la clonalidad por PFGE identificó un clúster arbitrariamente llamado Clúster A, (n = 27, 70% de similitud) que agrupaba al 61% (24/41) de los aislados *H30Rx*, mientras que los aislados *H30 no-Rx* se situaron junto con el resto de aislados *H30Rx* en el Clúster B (n = 26, 70% de similitud). En el Clúster A se agruparon todas las cepas de *E. coli*-BLEE productoras de CTX-M-15 descritas en el apartado anterior. Por el contrario, los aislados no-*H30* se distribuyeron en pequeños clústeres no relacionados entre sí (Figura 23), entre los que destacó el clúster C con casi todos los aislados no-*H30*-O16 (n = 8, 73% de similitud).

En cuanto a la caracterización del serotipo O y el alelo *fimH* se observó que la mayoría (85%, 64/75) de aislados de *E. coli*-ST131 pertenecían al serotipo O25 y tan solo un 11% (8/75) eran O16. Todos los aislados que codificaban el alelo *H30* de *fimH* (72%, 54/75) eran O25b. Entre los aislados no-*H30*, *H41* era el alelo más común (38%, 8/21), seguido de *H22* (29%, 6/21). Todos los aislados *H41* eran O16, todos los *H22* eran O25b mientras que el resto de aislados no-*H30* eran O25b excepto un aislado *H106* y los dos aislados *H27* que no fueron positivos para O25b ni para O16 (p < 0. 01).

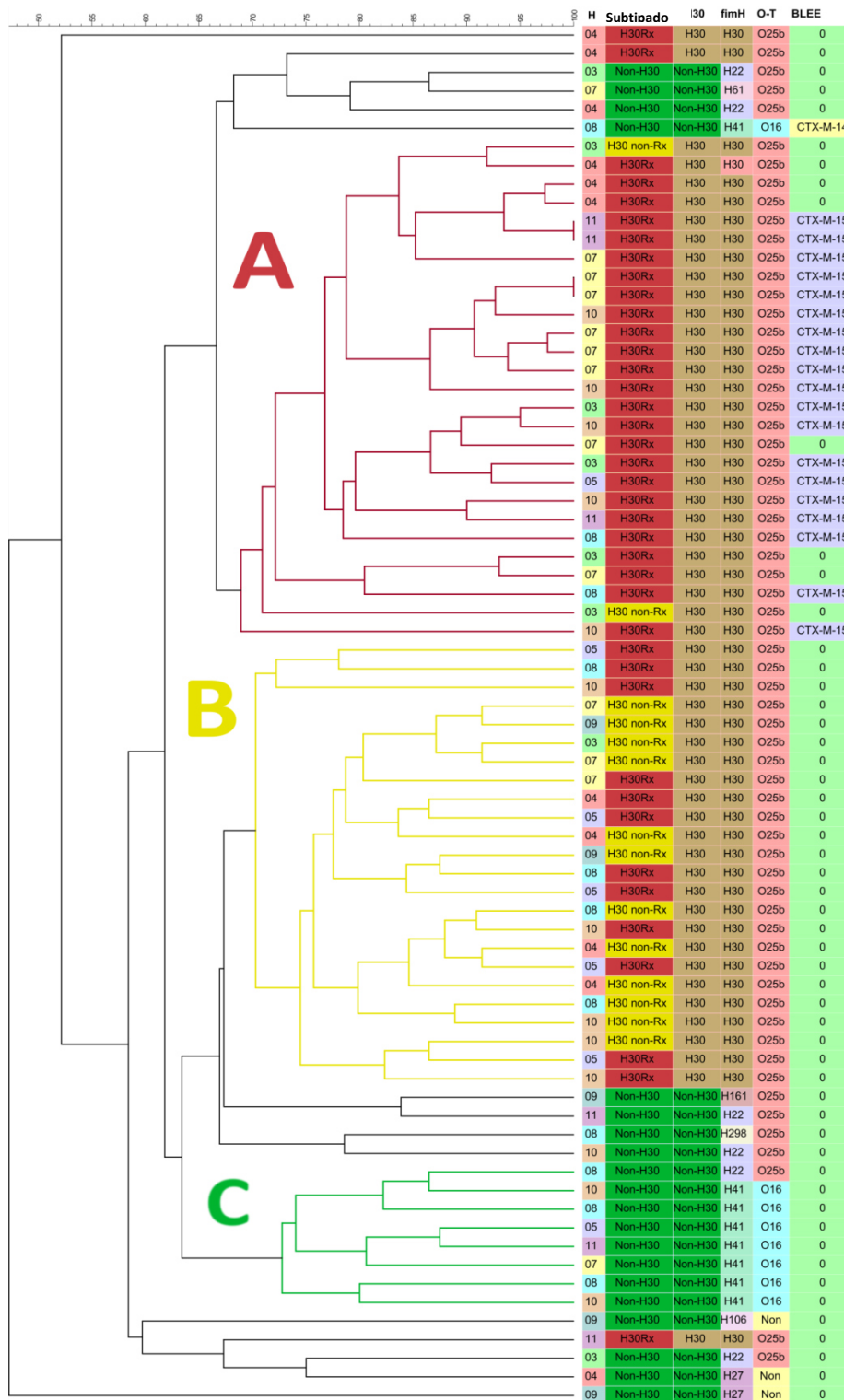


Figura 23. Dendrograma y características principales de los 75 aislados invasivos *E. coli*-ST131 recogidos en el proyecto ITU-BRAS. H (Hospital participante): 3= H. Gregorio Marañón; 4= H. del Mar; 5= H. Marqués de Valdecilla; 7= H. Ramón y Cajal; 8: H. de la Santa Creu; 9:H. Virgen Macarena; 10: Complejo Hospitalario de Pontevedra; 11= Mutua Terrassa. O-T: Tipado de O: Non= negativo para O25b y O16. BLEE: 0 (el aislado no codificaba para BLEE). Un aislado no pudo ser tipado por PFGE

2.2. Sensibilidad a antibióticos

Los aislados *E. coli*-ST131 de origen invasivo (incluyendo en el análisis a los productores de BLEE) presentaron en general un alto porcentaje de resistencia a quinolonas (ácido nalidíxico 92%, ciprofloxacino 76%), aminoglucósidos (tobramicina 48%, gentamicina 28% y ampicacina 21%) y cotrimoxazol (57%) (Figura 24). Por el contrario, todos los aislados fueron sensibles a cefoxitina, tigeciclina, imipenem y meropenem.

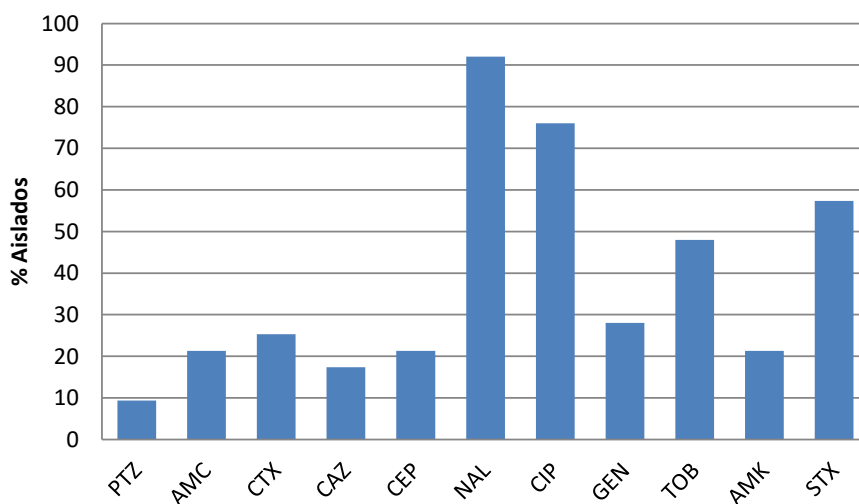


Figura 24 Porcentaje de aislados invasivos *E. coli*-ST131 resistentes (I+R) a antibióticos recogidos en el proyecto ITUBRAS.

PTZ: Piperacilina-Tazobactam. AMC: Amoxicilina-clavulánico. CTX: Cefotaxima. CAZ: Ceftazidima. CEP: Cefepima. NAL: Ácido nalidíxico. CIP: Ciprofloxacino. GEN: Gentamicina. TOB: Tobramicina. AMK: Ampicacina, STX: Cotrimoxazol. Todos los aislados fueron sensibles a cefoxitina, imipenem, meropenem y tigeciclina.

Se observaron variaciones en los porcentajes de resistencia a las diferentes familias de antimicrobianos entre los distintos clados de ST131. De esta forma, los aislados pertenecientes al clado *H30* (n = 54) fueron más resistentes a las cefalosporinas de amplio espectro (cefotaxima 33%, ceftazidima 24% y cefepima 28%) que los no-*H30* (cefotaxima 5%, ceftazidima 0% y cefepima 5%) con tendencia a la significación (p = 0.02 para cefotaxima y ceftazidima, p = 0.03 para cefepima, tras la corrección de Bonferroni se consideró significativo un valor de p < 0.01). Este resultado se relaciona con la mayor presencia de BLEE entre la subpoblación de *H30Rx* (49% de los aislados fueron productores de BLEE) que en los otros subclones. Igualmente, el predominio de aislados *H30* resistentes a amoxicilina-clavulánico y piperacilina-tazobactam fue a expensas principalmente de aislados *H30Rx* productores de BLEE (71% y 86% de los aislados del clado *H30* resistentes a amoxicilina-clavulánico y piperacilina-tazobactam respectivamente).

Además, los aislados *H30* presentaron mayores porcentajes de resistencia a quinolonas que los no-*H30* (ácido nalidíxico 100% vs. 71% y ciprofloxacino 100% vs. 14%, $p < 0.001$ ambas comparaciones). Esta diferencia se mantuvo significativa incluso al excluir del análisis los aislados productores de BLEE, ya que en este caso el 70% de aislados no-*H30* fueron resistentes al ácido nalidíxico frente al 100% de los aislados *H30* ($p = 0.002$), mientras que solo el 10% de aislados no-*H30* fueron resistentes a ciprofloxacino 10% frente al 100% de los aislados *H30* ($p < 0.001$).

Igualmente, las diferencias entre los aislados no-*H30* y *H30* en porcentajes de resistencia a aminoglucósidos (gentamicina 5% vs. 37%, amicacina 0% vs. 30% y tobramicina 5% vs. 65%) se mantuvieron significativas para gentamicina y tobramicina tanto incluyendo los aislados productores de BLEE ($p = 0.004$ para gentamicina y $p < 0.001$ para tobramicina) como sin incluirlos: gentamicina 5% vs. 32% ($p = 0.02$) y tobramicina 5% vs. 47% ($p = 0.002$). No ocurrió lo mismo con la amicacina: 0% vs 15% ($p = 0.14$).

Sin embargo, analizando los subclones incluidos en el clado *H30* por separado, se observó que los aislados *H30* no-Rx presentaron menores porcentajes de resistencia a cefalosporinas de amplio espectro que los *H30*Rx (cefotaxima, ceftazidima y cefepima 0% vs. 44%, 32% y 37% respectivamente, $p < 0.02$ para cefotaxima y cefepima, $p = 0.024$ para ceftazidima) e incluso menores que los de los aislados no-*H30* en el caso de cefotaxima y cefepima (5% ambos, $p > 0.05$) (Figura 25).

Además, no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de resistencia a quinolonas entre los aislados *H30*Rx y los no-Rx (ácido nalidíxico y ciprofloxacino ambos 100%), pero sí entre los aislados de estos subclones y los no-*H30* (ácido nalidíxico 71%, ciprofloxacino 15%, $p < 0.01$ en ambas comparaciones).

En el caso de los aminoglucósidos, los aislados del subclón *H30*Rx presentaron un porcentaje de resistencia a amicacina superior al de los otros subclones (39% vs. 0%, $p = 0.006$). Igualmente, los porcentajes de resistencia a tobramicina fueron significativamente mayores en los aislados *H30*Rx (68%) frente a los no-*H30* (5%, $p = 0.002$) aunque no frente a los *H30* no-Rx (54%, $p > 0.05$). Por el contrario, los aislados que presentaron mayor porcentaje de resistencia a gentamicina fueron los pertenecientes al subclón *H30* no-Rx (54%) pero las diferencias solo fueron significativas frente a los aislados no-*H30* (5%) ($p = 0.002$). Analizando los fenotipos de resistencia, se observó que los aislados resistentes a tobramicina y amicacina pero sensibles a gentamicina (fenotipo TA) representaban el 37% de los aislados *H30*Rx y no se

encontró este fenotipo en los otros subclones ($p < 0.01$). El fenotipo más frecuente en los no-*H30* fue el de sensibilidad a los tres antibióticos (S, 95%), mientras que los aislados *H30* no-Rx presentaron los fenotipos S (46%) y de resistencia a gentamicina y tobramicina (GT, 54%).

En cuanto a las resistencias a cotrimoxazol, no se observaron diferencias significativas entre clados ni entre subclones, aunque el subclón *H30*Rx agrupó mayor número de aislados resistentes (68%) mientras que solo el 31% de aislados del subclón *H30* no-Rx fueron resistentes a este antibiótico.

Los aislados *E. coli*-ST131 productores de BLEE ($n = 21$) se encontraron en su mayoría en el subclón *H30*Rx (95%, 20/21) representando casi la mitad (49%, 20/41) del total de aislados detectados de este subclón y codificando todos ellos CTX-M-15. Solo un aislado no-*H30* codificó CTX-M-14, mientras que no se detectó ningún aislado *H30* no-Rx productor de BLEE. Estos aislados han sido descritos en el apartado 1.3 de Resultados.

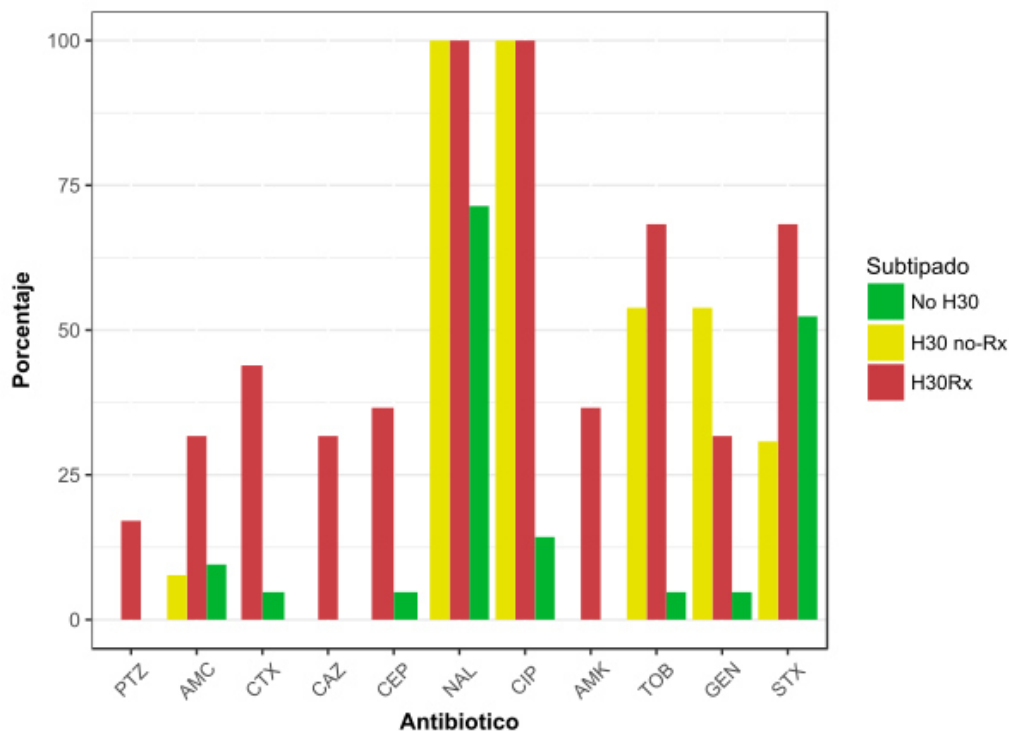


Figura 25. Porcentaje de aislados invasivos *E. coli*-ST131 resistentes (I+R) a antibióticos recogidos en el proyecto ITU-BRAS según subclón.

Todos los aislados fueron sensibles a cefoxitina, imipenem, meropenem y tigeciclina. PTZ: Piperacilina-Tazobactam. AMC: Amoxicilina-clavulánico. CTX: Cefotaxima. CAZ: Ceftazidima. CEP: Cefepima. NAL: Ácido nalidíxico. CIP: Ciprofloxacino. GEN: Gentamicina. TOB: Tobramicina. AMK: Amicacina, STX: Cotrimoxazol.

2.3. Análisis del genotipo de virulencia de los aislados *E. coli*-ST131 de origen invasivo

Todos los aislados *E. coli*-ST131 fueron positivos para al menos siete de los genes de virulencia estudiados. Los genes encontrados más frecuentemente fueron *yfcV* (99%, 74/75) y *fyuA* (96%, 72/75) mientras que por el contrario los FV *bmaE* y *papGI* no fueron positivo en ningún aislado (Figura 26).

En general, la mayoría de genes de virulencia estudiados fueron detectados con mayor frecuencia en los aislados del clado *H30* que los no-*H30* (Figura 27), pero solo los genes *PAI* (96%, 52/54 vs. 62%, 13/21), *sat* (87%, 47/54 vs. 52%, 11/21) e *iha* (70%, 38/54 vs. 19%, 4/21) presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.001$ para todas las comparaciones). Particularmente llamativa fue la ausencia de genes pertenecientes al operón *pap* en el subclón *H30* no-Rx, mientras que en el resto de aislados del clado *H30*, pero pertenecientes al subclón *H30*Rx, sí se detectaron estos genes en un porcentaje importante (36%, 15/41, $p = 0.01$), al igual que en los aislados no-*H30* (57%, 12/21, $p < 0.01$).

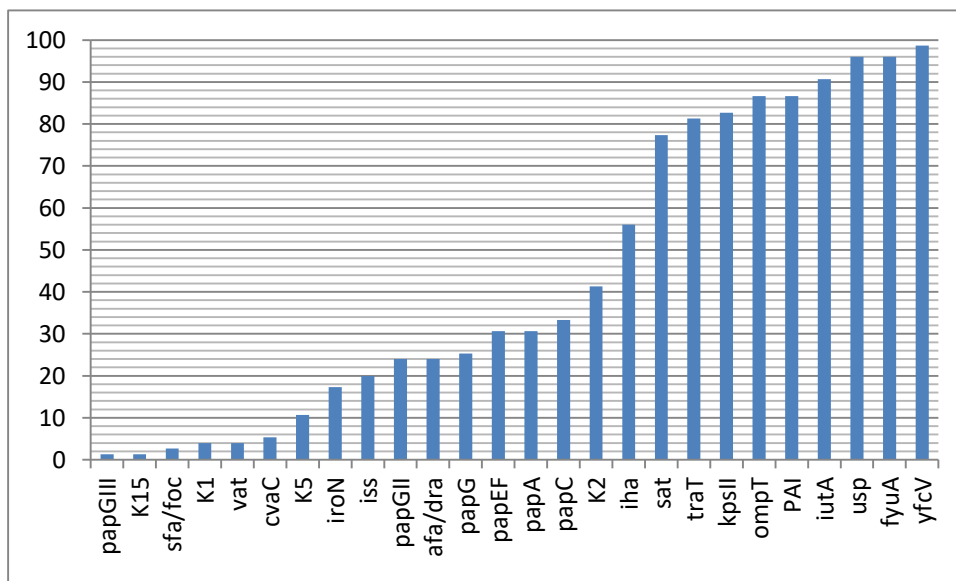


Figura 25. Porcentaje de genes de virulencia detectados en los aislados invasivos *E. coli*-ST131 recogidos en el proyecto ITU-BRAS.

bmaE y *papGI* no fueron positivos en ningún aislado. *papG* indica todos los aislados positivos para cualquier alelo.

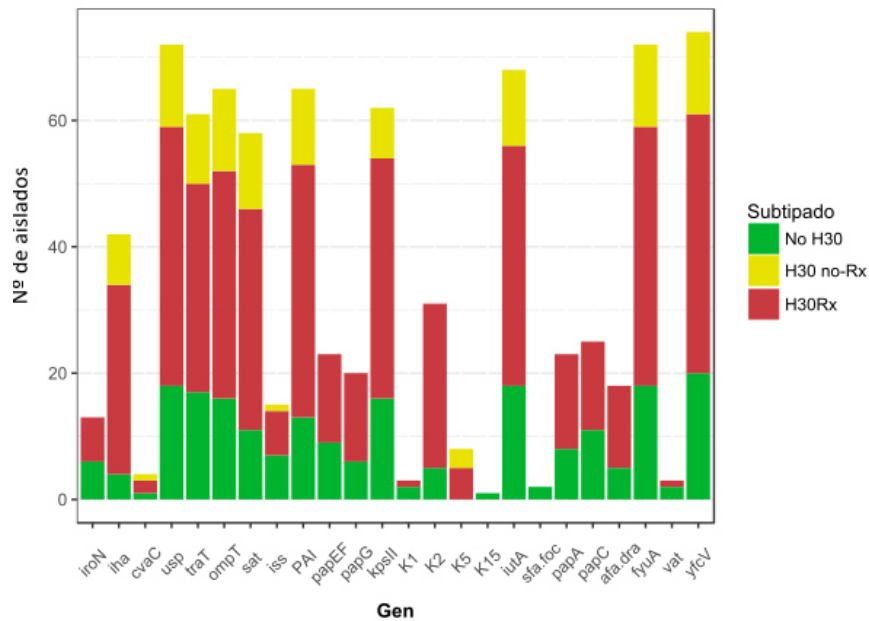


Figura 26. Distribución por subclones de los genes de virulencia detectados en los aislados invasivos *E. coli*-ST131 del proyecto ITU-BRAS. *papG* indica todos los aislados positivos para cualquier alelo.

Igualmente interesante fue la distribución de variantes de *kpsII* (K1, K2 y K5) entre los subclones. Mientras que los aislados *H30* no-Rx solo presentaron la variante K5 (n = 3), los aislados no-*H30* y *H30Rx* mostraron una mayor diversidad de variantes, si bien ningún aislado no-*H30* fue positivo a K5 (Tabla 19).

2.3.1. Índice de virulencia (IV) de *E. coli*-ST131 de origen invasivo

No hubo diferencias significativas en el IV entre los aislados no-*H30* (mediana 10, IQR 9-11) y los *H30* (mediana 10, IQR 9-13) (p = 0.27). Sin embargo los aislados *H30* no-Rx presentaron una mediana de IV menor (9, IQR 9-9) que los pertenecientes al subclón *H30Rx* (mediana 11, IQR 10-14) (p = 0.002) (Figura 28). Los aislados productores de BLEE presentaron mayor IV que los no productores (mediana de IV de 13 vs. 9, p < 0.001).

2.3.2. Prevalencia de ExPEC y UPEC en *E. coli*-ST131 de origen invasivo

La mayoría de aislados *E. coli*-ST131 fueron clasificados como ExPEC (84%, 63/75) y UPEC (99%, 74/75). Todos los aislados ExPEC menos uno (98%, 62/63) fueron clasificados como UPEC, pero 16% (12/74) de los aislados UPEC no se clasificaron como ExPEC. No hubo diferencias significativas entre el número de aislados clasificados como ExPEC comparando los clados no-H30 y H30 (86% vs. 82%, $p = 1.0$), pero solo el 54% de los aislados H30 no-Rx fueron clasificados como ExPEC vs. el 93% de los aislados H30Rx ($p = 0.004$) (Figura 29).

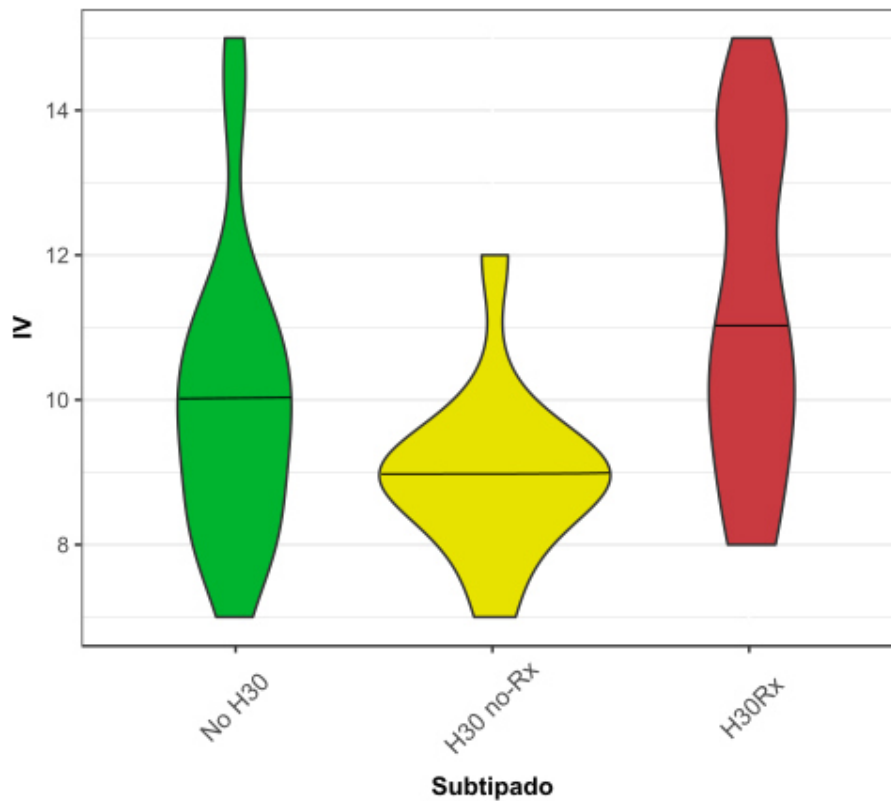


Figura 27. Gráfico de violín para el índice de virulencia según subclón de los aislados invasivos *E. coli*-ST131 recogidos en el proyecto ITU-BRAS. IV: Índice de virulencia.

Tabla 19. Genes de virulencia detectados en los aislados invasivos *E. coli*-ST131 del proyecto ITU-BRAS según clado y subclón

Genes de virulencia	Nº aislados (%) <i>E. coli</i> -ST131				valor de p*			
	No-H30 n = 21	H30 n = 54	H30 no-Rx n = 13	H30Rx n = 41	No-H30 vs. H30	No-H30 vs. H30 no-Rx	No-H30 vs. H30 Rx	H30 no- Rx vs. Rx
<i>afa/dra</i>	5 (24)	13 (24)	0 (0)	13 (32)	0.98	0.13	0.52	0.024
<i>papA</i>	8 (38)	15 (28)	0 (0)	15 (37)	0.38	0.013	0.91	0.011
<i>papC</i>	11 (52)	14 (26)	0 (0)	14 (34)	0.03	0.002	0.17	0.013
<i>papEF</i>	9 (43)	14 (26)	0 (0)	14 (34)	0.15	0.006	0.5	0.013
<i>papGII</i>	4 (19)	14 (26)	0 (0)	14 (34)	0.76	0.14	0.25	0.013
<i>papGIII</i>	1 (5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.28	1.0	0.34	NA
<i>iha</i>	4 (19)	38 (70)	8 (62)	30 (73)	< 0.001	0.025	< 0.001	0.42
<i>sfa/foc</i>	2 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.08	0.51	0.11	NA
<i>yfcV</i>	20 (95)	54 (100)	13 (100)	41 (100)	0.28	1.0	0.34	NA
<i>iutA</i>	18 (86)	50 (93)	12 (92)	13 (93)	0.39	1.0	0.4	1.0
<i>iroN</i>	6 (29)	7 (13)	0 (0)	7 (17)	0.11	0.06	0.29	0.18
<i>fyuA</i>	18 (86)	54 (100)	13 (100)	41 (100)	0.02	0.27	0.035	NA
<i>kpsII</i>	17 (81)	46 (85)	8 (62)	38 (93)	0.73	0.25	0.21	0.015
K1	2 (10)	1 (2)	0 (0)	1 (2)	0.19	0.51	0.26	1.0
K2	5 (24)	26 (48)	0 (0)	26 (63)	0.06	0.13	0.003	< 0.001
K5	0 (0)	8 (15)	3 (23)	5 (12)	0.1	0.05	0.16	0.38
K15	1 (5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.28	1.0	0.34	NA
<i>iss</i>	7 (33)	8 (15)	1 (8)	7 (17)	0.11	0.12	0.15	0.66
<i>cvaC</i>	1 (5)	3 (6)	1 (8)	2 (5)	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>traT</i>	17 (81)	44 (82)	11 (85)	33 (81)	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>vat</i>	2 (10)	1 (2)	0 (0)	1 (2)	0.19	0.51	0.26	1.0
<i>sat</i>	11 (52)	47 (87)	12 (92)	35 (85)	0.001	0.024	0.005	1.0
<i>usp</i>	18 (86)	54 (100)	13 (100)	41 (100)	0.02	0.27	0.035	NA
<i>ompT</i>	16 (76)	49 (91)	13 (100)	36 (88)	0.1	0.13	0.24	0.32
PAI	13 (62)	52 (96)	12 (92)	40 (98)	< 0.001	0.12	< 0.001	0.43

El gen *bmaE* y *papGI* fueron negativos en todos los aislados y por tanto no están representados en la tabla. *Los valores de p estadísticamente significativos están en negrita. Tras la corrección de Bonferroni se consideró significativo un valor de $p < 0.0125$.

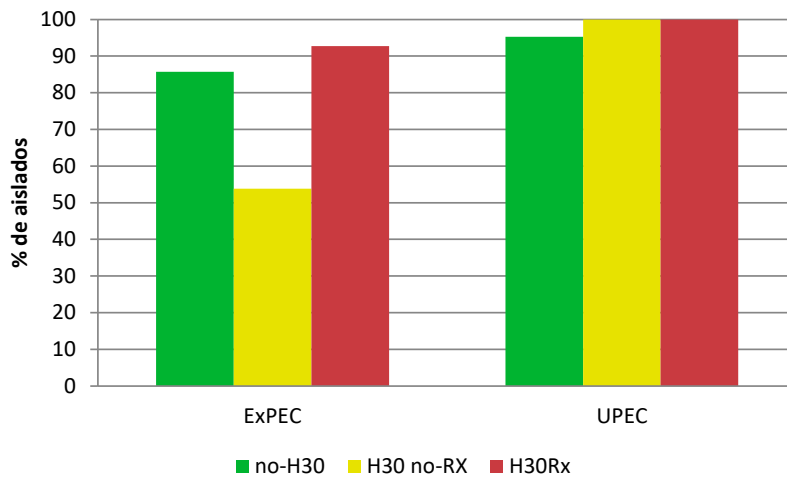


Figura 28. Porcentaje de aislados *E. coli*-ST131 ExPEC y UPEC del proyecto ITU-BRAS según subclón

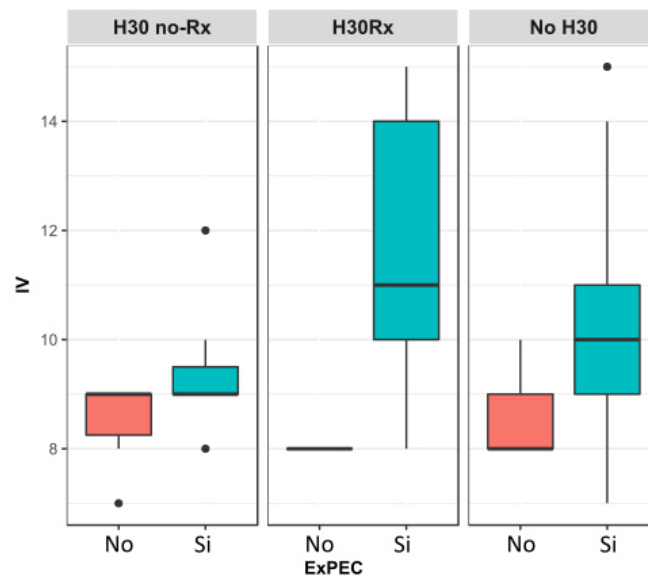


Figura 29. Gráfico de cajas y bigotes del índice de virulencia de los aislados invasivos *E. coli*-ST131 según la clasificación en ExPEC y subclón recogidos en el proyecto ITU-BRAS. IV: Índice de virulencia.

Los aislados clasificados como ExPEC presentaron mayor IV que los no-ExPEC (mediana 10, IQR 9-13 vs. mediana 8, IQR 8-9, $p < 0.001$). Por el contrario, no hubo diferencias significativas entre el IV del único aislado no-UPEC (IV= 8) y los aislados UPEC (mediana 10, IQR 9-12, $p = 0.16$). En cada subclón, los aislados no-H30, H30 no-Rx y H30Rx clasificados como ExPEC

presentaron igualmente mayor IV que los no-ExPEC (mediana 10, 9 y 11 vs. 8, 9 y 8 respectivamente) (Figura 30).

2.3.3. Perfiles de virulencia

El *heatmap* de los genes de virulencia de los 75 *E. coli*-ST131 mostró 39 perfiles distintos. La mayoría de los perfiles de virulencia (74%, 29/39) estaban representados por un único aislado. Los perfiles de virulencia que más aislados agrupaban fueron los perfiles (llamados de forma arbitraria) PV.1 (n = 10), PV.2 (n = 7), PV.3 (n = 7) y PV.4 (n = 7) (Figura 31).

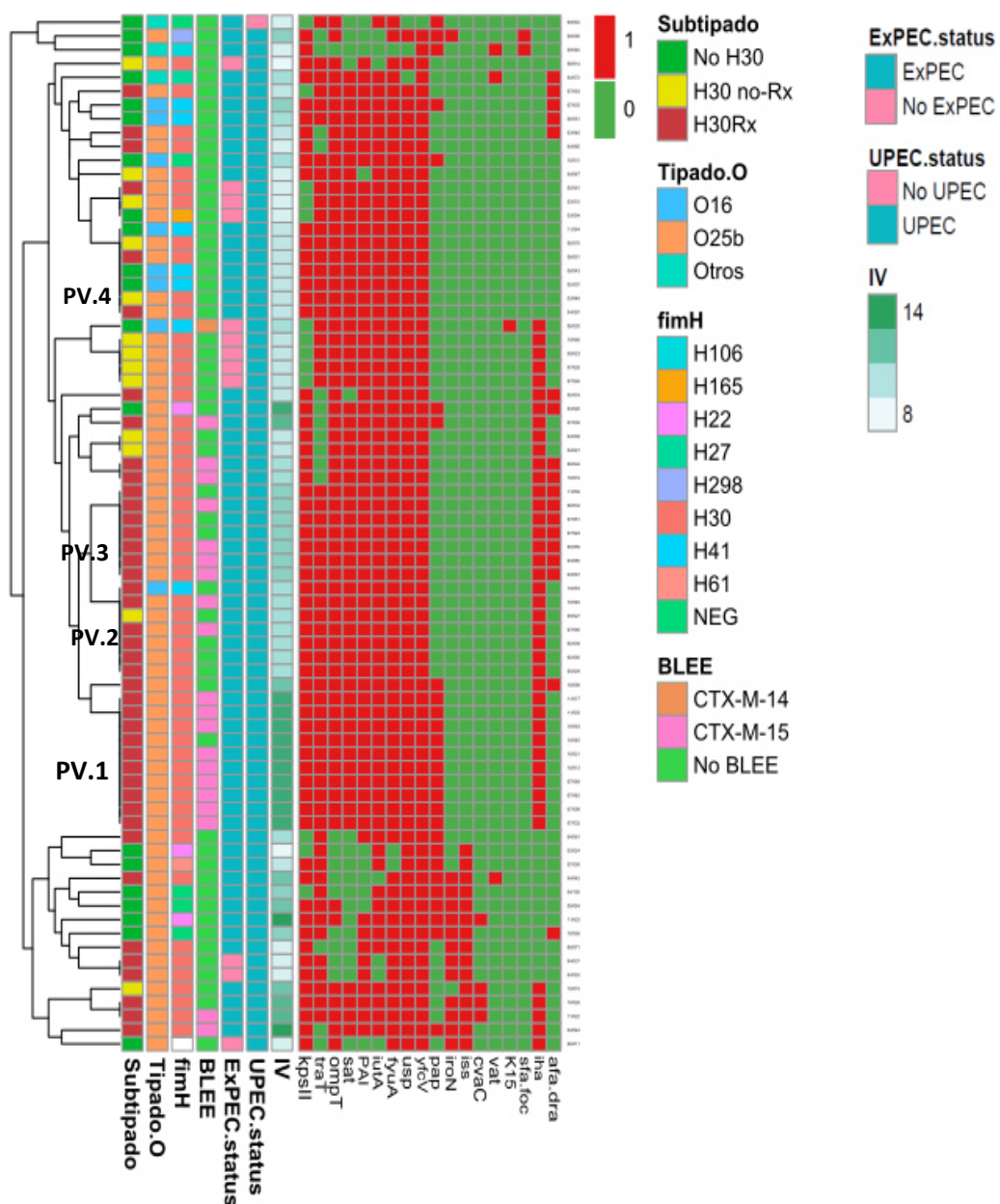


Figura 30. *Heatmap* de los genes de virulencia estudiados en los aislados invasivos *E. coli*-ST131 recogidos en el proyecto ITU-BRAS. Se excluyeron aquellos genes ausentes en todos los aislados. Se consideró *kpsII* positivo si el aislado fue positivo a *kpsII* o cualquiera de sus variantes. Se consideró *pap* positivo si el aislado fue positivo a *papA*, *papC*, *papEF* o *papG* (cualquiera de sus alelos). La presencia del gen estudiado está representada por el cuadrado rojo y la ausencia por el cuadrado verde.

De los aislados incluidos en estos perfiles (n = 31 aislados en total), 25 (81%) pertenecían al subclón H30Rx. De manera notable, estos aislados se diferenciaron entre sí principalmente por los genes *iha*, *afa/dra*, y *pap*. Los aislados no-H30 se agruparon en 19 perfiles, los H30 no-Rx en 8 y los H30Rx en 17.

3. Modelo murino experimental de virulencia

Este apartado expone los resultados obtenidos del desarrollo del objetivo 5. Se dispuso de 48 aislados *E. coli*-ST131 para el estudio experimental *in vivo* en un modelo murino de sepsis. Se escogieron todos los aislados ST131 productores de BLEE (n = 21) y 27 aislados ST131 no productores de BLEE seleccionados aleatoriamente. La estructura poblacional de estos 48 aislados y sus características se muestran en la Figura 32.

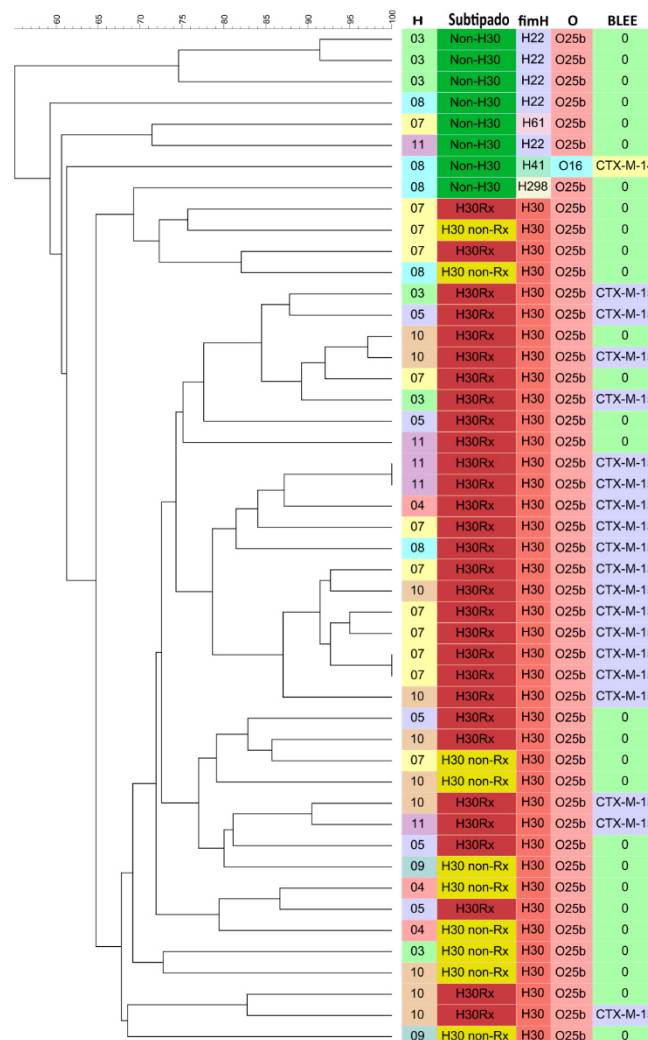


Figura 31. Dendrograma obtenido del análisis de los pulsotipos de los 48 *E. coli*-ST131 del proyecto ITUBRAS seleccionados para el estudio *in vivo*.

H (Hospital participante): 03= H. Gregorio Marañón; 04= H. del Mar; 05= H. Marqués de Valdecilla; 07= H. Ramón y Cajal; 08= H. de la Santa Creu; 09:H. Virgen Macarena; 10: Complejo Hospitalario de Pontevedra; 11= Mutua Terrassa. Filo: Grupo filogenético. O: Tipado de O. BLEE = 0: No productor.

El análisis del genotipo de virulencia se ha incluido en este apartado para su comparación con los resultados de virulencia experimental.

3.1. Análisis del genotipo de virulencia de *E. coli*-ST131 de origen invasivo

El análisis del genotipo de virulencia de estas cepas se ha realizado en el apartado 2 y se incluye un breve resumen en este apartado. Los aislados positivos a cada gen y clasificados como ExPEC se recogen en la Tabla 20.

En cuanto al índice de virulencia (IV), los IV de las cepas incluidas en el estudio de virulencia experimental fueron en general altos (mediana 11, IQR 9-14). El IV más alto encontrado fue de 15 y el más bajo de 7. Se observaron diferencias llamativas comparando los tres subclones entre sí ($p = 0.007$). En concreto, el subclón *H30* no-Rx presentó el IV más bajo de los tres subclones (mediana 9, IQR 9-9), significativamente más bajo que los aislados del mismo clado pero *H30*Rx (mediana de 11, IQR 10-14, $p < 0.01$) o que el resto de aislados en conjunto (mediana de 11, IQR 10-14, $p = 0.004$). Además los IV fueron mayores en los aislados productores de BLEE que en los no productores (medianas 13 vs. 10, $p < 0.001$).

Los aislados ExPEC presentaron un IV mayor que los no-ExPEC (mediana 11 vs. 9, $p < 0.001$). Además, en cada subclón (a excepción de en el *H30*Rx, donde todos los aislados fueron ExPEC) la mediana de IV fue mayor en los ExPEC (mediana de 11 y 9,5 en los aislados no-*H30* y los *H30* no-Rx respectivamente) que en los no-ExPEC (medianas de 9 en ambos casos) (Figura 33) aunque las diferencias no fueron suficientemente significativas ($p > 0.01$ para los dos subclones).

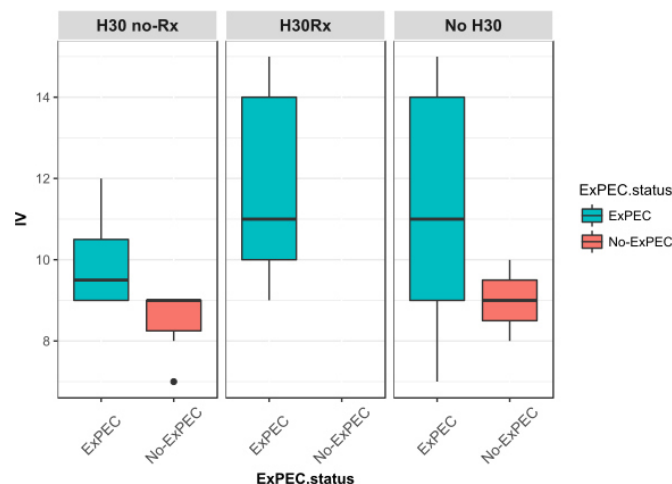


Figura 32. Gráfico de cajas y bigotes del índice de virulencia según clasificación en ExPEC y subclón de los 48 aislados *E. coli*-ST131 del proyecto ITU-BRAS seleccionados para el estudio *in vivo*. IV: Índice de virulencia.

Tabla 20. Genotipo de virulencia de los 48 aislados *E. coli*-ST131 de origen invasivo seleccionados para el estudio de virulencia experimental

Aislados <i>E. coli</i> -ST131					
	no-H30 n = 7	H30 n = 41	H30 no-Rx n = 10	H30Rx n = 31	Total n = 48
<i>pap</i>	5 (71)	13 (32)	0 (0)	13 (42)	18 (38)
<i>papC</i>	5 (71)	12 (29)	0 (0)	12 (39)	17 (35)
<i>papA</i>	4 (57)	13 (32)	0 (0)	13 (42)	17 (35)
<i>papEF</i>	5 (71)	12 (29)	0 (0)	12 (39)	17 (35)
<i>papG</i>	3 (43)	12 (29)	0 (0)	12 (39)	15 (31)
<i>papGI</i>	1 (14)	12 (29)	0 (0)	12 (39)	13 (27)
<i>papGIII</i>	1 (14)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (2)
<i>KpsII calc</i>	5 (71)	35 (85)	5 (50)	30 (97)	40 (83)
<i>kpsII</i>	5 (71)	35 (85)	5 (50)	30 (97)	40 (83)
K1	1 (14)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (2)
K2	3 (43)	23 (56)	0 (0)	23 (74)	26 (54)
K5	0 (0)	8 (29)	3 (30)	5 (16)	8 (17)
<i>sfa/foc</i>	1 (14)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (2)
<i>afa/dra</i>	1 (14)	12 (29)	0 (0)	12 (39)	13 (27)
<i>iutA</i>	5 (71)	40 (98)	9 (90)	31 (100)	45 (94)
<i>iha</i>	3 (43)	38 (93)	8 (80)	30 (97)	41 (85)
<i>iroN</i>	3 (43)	3 (7)	0 (0)	3 (10)	6 (12)
<i>iss</i>	4 (57)	4 (10)	1 (10)	3 (10)	8 (17)
<i>fyuA</i>	5 (71)	41 (100)	10 (100)	31 (100)	46 (96)
<i>ompT</i>	5 (71)	41 (100)	10 (100)	31 (100)	46 (96)
<i>traT</i>	4 (57)	34 (32)	8 (80)	26 (84)	38 (79)
<i>sat</i>	2 (29)	39 (95)	9 (90)	30 (97)	41 (85)
PAI	3 (43)	41 (100)	10 (100)	31 (100)	44 (92)
<i>cvaC</i>	1 (14)	3 (7)	1 (10)	2 (6)	4 (8)
ExPEC	5 (71)	35 (85)	4 (40)	31 (100)	40 (83)

Los genes *yfcV* y *usp* se detectaron en todos los aislados, y los genes *papGI*, *vat*, y *bmaE* no se detectaron en ninguno, por lo que no están representados en la tabla. Todos los aislados se clasificaron como UPEC

3.2. Virulencia experimental de *E. coli*-ST131 de origen invasivo

Los índices de letalidad (IL) de los aislados estudiados fueron en general altos pero muy variables (mediana de IL 4.3, IQR 2.8-4.7) oscilando entre valores de 1.3 y 4.9. El subclón no-*H30* agrupó los aislados con mayor IL (mediana 4.4, IQR 2.3-4.7). Por el contrario, los aislados del subclón *H30* no-Rx mostraron un IL menor que los subclones no-*H30* y *H30*Rx (mediana de IL 2.75 vs. 4.4 y 4.3 respectivamente, $p = 0.11$) y de hecho, menor que el resto de aislados en conjunto (medianas de IL de 2.75 vs. 4.3, $p = 0.04$). Por otra parte, los aislados productores de BLEE mostraron un IL mayor que los no productores (mediana de 4.4 vs. 4.1, $p = 0.04$).

De los 48 aislados estudiados, 69% (33/48) fueron clasificados como rápidamente letales. El subclón con mayor porcentaje de aislados rápidamente letales fue el *H30*Rx (77%, 24/31) seguido del no-*H30* (71%, 5/7). Solo el 40% (4/10) de los aislados *H30* no-Rx fueron rápidamente letales ($p = 0.05$ frente al resto de aislados). Además, los aislados productores de BLEE fueron rápidamente letales en mayor porcentaje que los no-BLEE (86% vs. 56%, $p = 0.03$).

Los aislados clasificados como ExPEC fueron más rápidamente letales que los no-ExPEC (75% vs. 38%, $p = 0.09$). Sin embargo, los aislados rápidos no mostraron diferencias significativas en IV respecto a los no-rápidos (medianas 11 vs. 10, $p = 0.15$). Los aislados positivos a K2 fueron más frecuentemente rápidos que los negativos (85% vs. 50%, $p = 0.014$).

Se incluyeron las variables IL y rapidez de letalidad en el análisis mediante *heatmap*. Se observaron 22 perfiles de genes de virulencia distintos. La mayoría de estos perfiles (68%, 15/22) estuvieron formados por un solo aislado. Los perfiles de virulencia que más aislados agrupaban fueron los perfiles (llamados de forma arbitraria) PV.01 ($n = 6$), PV.02 ($n = 7$) y PV.03 ($n = 10$) (Figura 34). Estos tres perfiles agrupaban entre ellos a la mayoría de aislados *H30*Rx (71%, 22/31) y se diferenciaban entre sí principalmente por los genes *afa/dra* y el operón *pap*. No obstante, no se observó agrupación según el IL.

La correlación entre el índice de letalidad y el de virulencia fue débil (coeficiente rho = 0.27 según el método de Spearman). Aquellos aislados positivos para *pap* (mediana de 4.4 vs. 4.1, $p = 0.048$) y K2 (mediana 4.45 vs. 3.35, $p = 0.003$) presentaron un mayor IL. El IL de los aislados clasificados como ExPEC fue mayor que los no-ExPEC: mediana de IL 4.3 (IQR 3.1-4.7) vs. mediana de 2.7 (IQR 1.6-4.1) ($p = 0.03$). No hubo diferencias significativas en los IL de los distintos perfiles de virulencia observados (Figura 35).

4. *E. coli*-BLEE aislados de colonización intestinal de pacientes hospitalizados

Este apartado recoge los resultados obtenidos del desarrollo de los objetivos 3 y 4. A partir de los cultivos de vigilancia epidemiológica, se aislaron 1009 *E. coli*-BLEE. Para el posterior cribado del clon ST131 se seleccionó un solo aislado por paciente (n = 688). En el caso de aquellos pacientes con más de un aislado de *E. coli*-BLEE ST131, el estudio de clonalidad por PFGE en todos los casos identificó el mismo clon. En este grupo de pacientes (n = 139) sólo se incluyó el primer aislado en el estudio. En la Tabla 21 se describe la distribución de los aislados de *E. coli*-BLEE en los distintos hospitales

La tasa de prevalencia global de *E. coli*-ST131 fue del 20% (139/688), oscilando entre el 14.9% en Madrid y el 38.4% en Ginebra (Tabla 21). Además, de entre los 688 *E. coli*-BLEE de la colección se seleccionaron aleatoriamente 30 aislados no-ST131 para hacer el estudio comparativo. Para la selección se mantuvo el porcentaje de prevalencia de aislados de cada hospital sobre el total de aislados, aplicado a los 30 aislados.

Tabla 21. Aislados *E. coli*-BLEE ST131 y no-ST131 de colonización recogidos en cada hospital participante en el proyecto R-GNOSIS

Hospitales	Aislados (%)*	Aislados (%)**	Aislados
	<i>E. coli</i> n = 688	<i>E. coli</i> -ST131 n = 139	<i>E. coli</i> -no-ST131 n = 30
Berlín	135 (20)	31 (23)	6 (20)
Ginebra	86 (12.5)	33 (38.4)	2 (12.5)
Madrid	295 (43)	44 (14.9)	14 (43)
Utrecht	172 (25)	31 (18)	8 (25)

*Porcentaje sobre el total de aislados ** Porcentaje sobre el total de aislados de cada hospital.

4.1. Estructura poblacional de *E. coli*-BLEE de origen no invasivo

De los 139 aislados *E. coli*-ST131, 45 (32.4%) pertenecían al subclón no-H30, 44 (31.6%) al H30 no-Rx y 50 (36%) al H30Rx (Figura 36). El 75.5% (105/139) de los aislados ST131 eran O25b y 17% (24/139) eran O16. De los 45 aislados no-H30, el alelo de *fimH* más frecuente fue H41 (29%, 22/45) seguido de H27 (7%, 3/45). Otros alelos fueron detectados de forma esporádica

(Figura 38). El 27% (12/45) de los aislados no-*H30* fueron *fimH* negativos. Todos los aislados *H30* eran O25b y todos los *H41* eran O16 ($p < 0.001$).

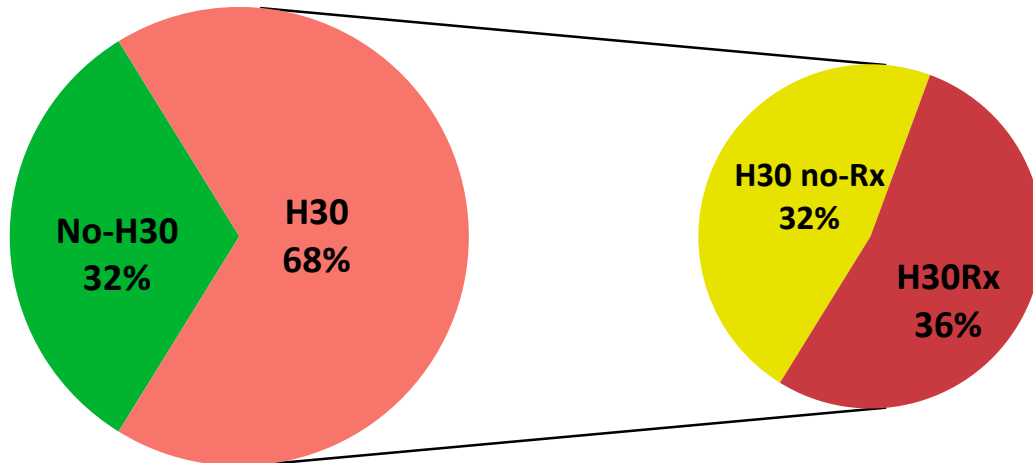


Figura 35. Tipificación de los aislados de colonización *E. coli*-ST131 del proyecto R-GNOSIS

Los alelos de *fimH* detectados en los 30 aislados no-ST131 fueron muy variables, siendo los más comúnmente detectados *H27* y *H54* ($n = 3$ cada uno) seguidos de *H29*, *H30*, *H41* y *H312* ($n = 2$ cada uno). No se detectó el gen *fimH* en 7 de los 30 aislados no-ST131.

Cabe destacar las diferencias encontradas en la distribución de los subclones de ST131 en los diferentes hospitales. Aunque en general, los aislados *H30* predominaron en todos ellos (Figura 37A), a nivel de subclón *E. coli*-BLEE no-*H30* predominó entre la población de Berlín y Utrecht, mientras que en Ginebra y en Madrid los subclones *H30* no-Rx y *H30Rx* respectivamente fueron mayoritarios ($p < 0.001$) (Figura 37B). Además, el subclón *H30* no-Rx fue el segundo más frecuente en el resto de hospitales de los países participantes.

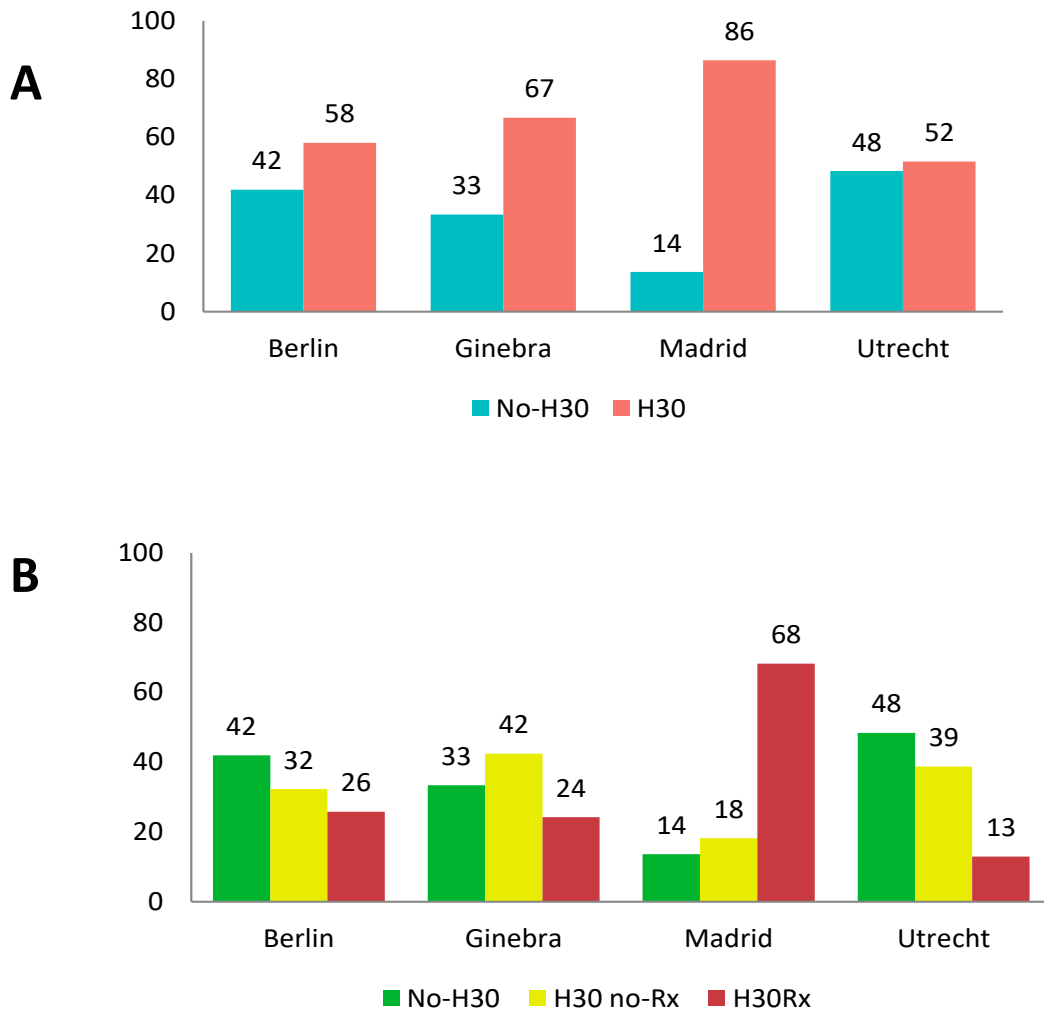


Figura 36. Tipificación de los aislados *E. coli*-ST131 de colonización de cada hospital participante en el proyecto R-GNOSIS.

A) Según clado. B) Según subclón

El análisis clonal mediante PFGE reveló un gran clúster, al que se denominó C1 (n = 87, 66% de similitud) que englobaba a prácticamente todos los aislados *H30* (89%, 84/94), mientras que los aislados no-*H30* se distribuyeron en varios clústeres sin gran relación entre sí (Figura 38). De estos, el más grande (clúster 2, n = 31, 69% de similitud) agrupaba a la mayoría de aislados *H41-O16*.

Dentro del clúster C1 se observaron tres subclústeres. Los subclústeres 1A (n = 18, 73% de similitud) y 1B (n = 18, 77% de similitud) agrupaban en su mayoría aislados *H30Rx*, mientras que el subclúster 1C (n = 35, 75% de similitud) agrupaba principalmente a aislados *H30* no-Rx. No se observó agrupación de aislados por hospitales (Figura 38).

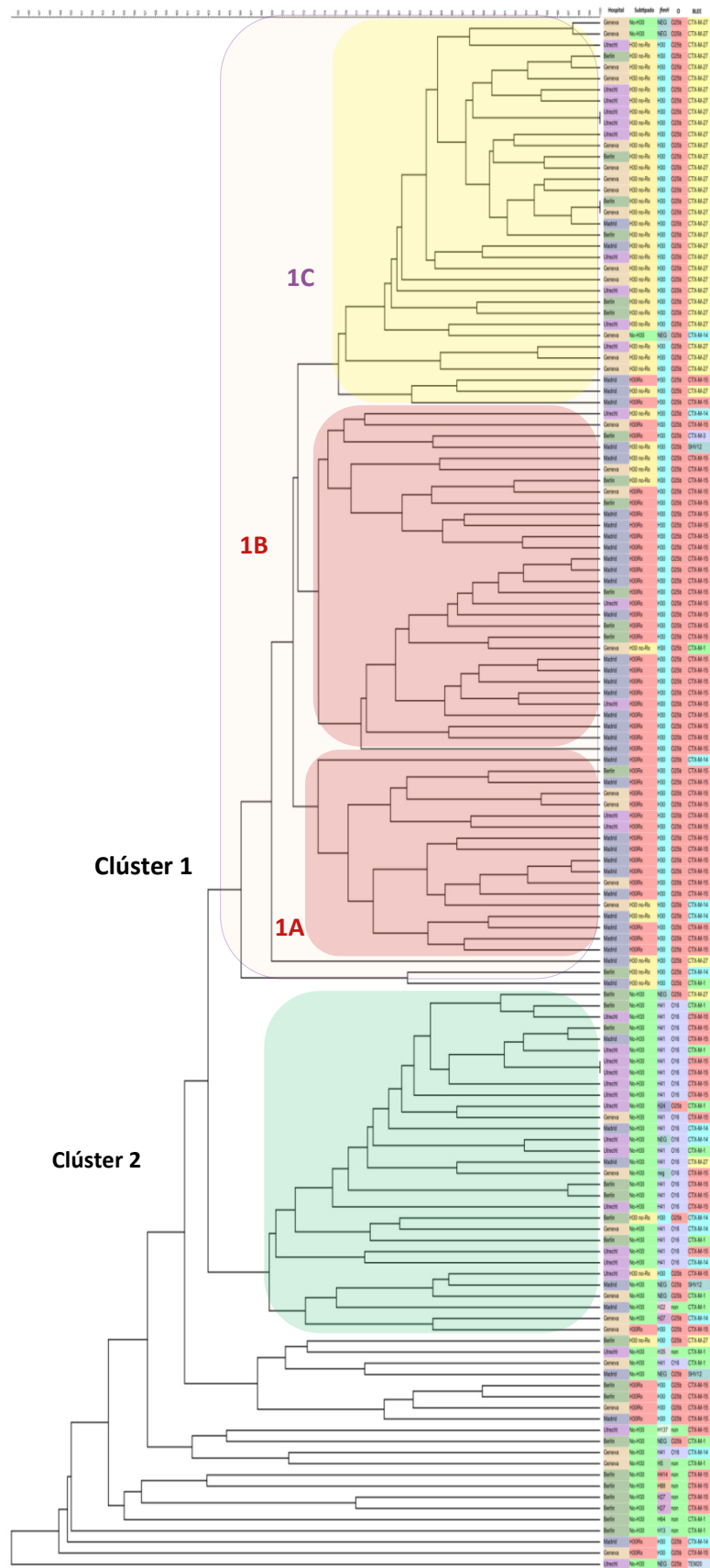


Figura 37. Dendrograma y características principales de los 139 aislados *E coli*-LEE ST131 recogidos en el proyecto R-GNOSIS.

O: Tipado molecular del AgO. Non: No-O25b, no-O16. Colores: **No-H30**, **H30 no-Rx**, **H30Rx**, **CTX-M-15**, **CTX-M-27**

4.2. Sensibilidad antibiótica de *E. coli*-BLEE no invasivo

En general, entre los 169 aislados estudiados (139 *E. coli*-BLEE-ST131 y 30 *E. coli*-BLEE no ST131) se observaron altas tasas de resistencia a betalactámicos, quinolonas (ácido nalidíxico y ciprofloxacino) y cotrimoxazol (Tabla 22). Los aislados ST131 presentaron mayores tasas de resistencia a cefotaxima que los no-ST131 (100% vs. 87%, $p = 0.001$). Por el contrario, los aislados no-ST131 ($n = 30$) presentaron mayor porcentaje de resistencia a cefepima que los no-ST131 (90% vs. 55%, $p < 0.001$). De los 30 aislados no-ST131, 4 fueron resistentes a cefoxitina.

Tabla 22. Número (%) de aislados *E. coli*-BLEE resistentes (I+R) a los antibióticos del proyecto R-GNOSIS

	Aislados <i>E. coli</i> n = 169	<i>E. coli</i> -no-ST131 n = 30	<i>E. coli</i> -ST131 n = 139	valor de p*
PTZ	27 (16)	6 (20)	21 (15)	0.51
AMC	30 (18)	7 (23)	23 (17)	0.38
CTX	165 (98)	26 (87)	139 (100)	0.001
FOX	4 (2)	4 (13)	0 (0)	0.001
CAZ	106 (63)	21 (70)	85 (61)	0.36
CEP	103 (61)	27 (90)	76 (55)	< 0.001
NAL	145 (86)	20 (67)	125 (90)	0.001
CIP	116 (69)	17 (57)	99 (71)	0.13
GEN	55 (32)	10 (33)	45 (32)	0.92
TOB	75 (44)	12 (40)	63 (45)	0.6
AMK	23 (14)	3 (10)	20 (14)	0.52
STX	85 (50)	16 (53)	69 (50)	0.71

*Los valores de p estadísticamente significativos están en negrita. PTZ: Piperacilina-tazobactam. AMC: Amoxicilina-clavulánico. CTX: Cefotaxima. FOX: Cefoxitina. CAZ: Ceftazidima. CEP: Cefepima. NAL: Ácido nalidíxico. CIP: Ciprofloxacino. GEN: Gentamicina. TOB: Tobramicina. AMK: Amicacina. STX: Cotrimoxazol. Todos los aislados fueron sensibles a imipenem, meropenem y tigeciclina.

En los aislados *E. coli*-ST131 se observaron diferencias en las tasas de resistencia entre hospitales distintos (Figura 39). Los aislados de Madrid presentaron el mayor porcentaje de aislados resistentes a amoxicilina-clavulánico (36%) y piperacilina-tazobactam (32%) ($p < 0.01$). Igualmente, los aislados ST131 de Madrid presentaron un porcentaje de resistencia a amicacina mayor (30%) que los de Berlín (10%), Utrecht (10%) y Ginebra (3%) ($p < 0.01$). Por otro lado, los aislados de Berlín mostraron un mayor porcentaje de resistencia a ceftazidima (81%) que los aislados de Madrid (71%), Ginebra (45%) y Utrecht (45%) ($p = 0.004$).

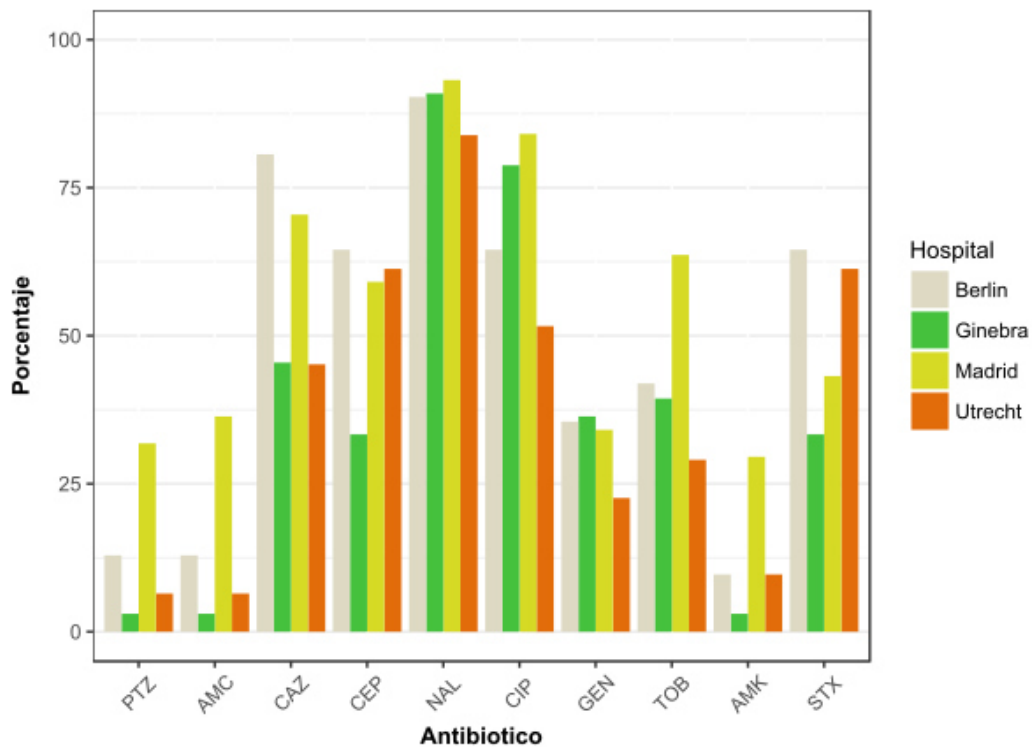


Figura 38. Porcentaje de aislados de colonización *E. coli*-BLEE ST131 resistentes a antibióticos del proyecto R-GNOSIS según hospital de procedencia.

PTZ: Piperacilina-tazobactam. AMC: Amoxicilina-clavulánico. CAZ: Ceftazidima. CEP: Cefepima. NAL: Ácido nalidíxico. CIP: Ciprofloxacino. GEN: Gentamicina. TOB: Tobramicina. AMK: Amicacina. STX: Cotrimoxazol. Todos los aislados fueron sensibles a imipenem, meropenem, cefoxitina y tigeciclina y resistentes a cefotaxima por lo que no están representados.

En el análisis según clado de los aislados ST131, los aislados *H30* fueron generalmente más resistentes a todos los antibióticos que los no-*H30* (Figura 40) excepto a cefepima (46% vs. 73%, $p = 0.002$).

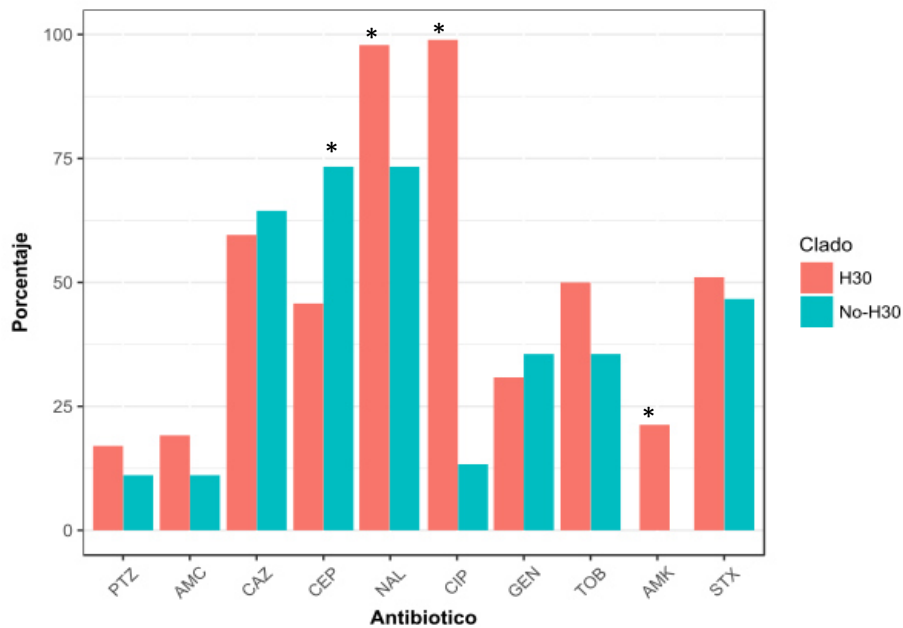


Figura 39. Porcentaje de aislados de colonización *E. coli*-BLEE ST131 resistentes (I+R) a antibióticos del proyecto R-GNOSIS según pertenencia al clado H30.

PTZ: Piperacilina-tazobactam. AMC: Amoxicilina-clavulánico. CAZ: Ceftazidima. CEP: Cefepima. NAL: Ácido nalidíxico. CIP: Ciprofloxacino. GEN: Gentamicina. TOB: Tobramicina. AMK: Amicacina. STX: Cotrimoxazol. Todos los aislados fueron sensibles a imipenem, meropenem, ceftoxitina y tigeciclina y resistentes a cefotaxima por lo que no están representados. * Diferencia estadísticamente significativa, $p < 0.01$.

Sin embargo, analizando los tres subclones entre sí, se observó que los aislados H30 no-Rx presentaron un menor porcentaje de resistencias a la mayoría de antibióticos, menor incluso que los no-H30 (Tabla 23). Estos aislados fueron todos sensibles a las combinaciones de betalactámicos con inhibidores, y presentaron bajos porcentajes de resistencia a aminoglucósidos (gentamicina 11%, tobramicina 14% y amicacina 5%). Los aislados H30Rx, por el contrario, fueron más frecuentemente resistentes que los otros subclones a todos los antibióticos, excepto a ciprofloxacino y cotrimoxazol, donde su porcentaje de resistencia fue muy parecido al de los aislados H30 no-Rx (98% vs. 100% y 50% vs. 52%, respectivamente, $p > 0.05$) y a cefepima, al cual fueron resistentes en un mayor porcentaje los aislados no-H30 (64% vs 73%, $p > 0.05$).

Tabla 23. Porcentaje de aislados resistentes a antibióticos entre los aislados de colonización *E. coli*-BLEE ST131 del proyecto R-GNOSIS según subclón

	Aislados <i>E. coli</i> -ST131			valores de p*			
	no-H30	H30 no-Rx	H30Rx	no-H30 vs. H30 no-Rx	no-H30 vs. H30Rx	H30 no-Rx vs. H30Rx	no-H30 vs. H30 no-Rx vs. H30Rx
	n = 45	n = 44	n = 50				
PTZ	5 (11)	0 (0)	16 (32)	0.06	0.01	< 0.001	< 0.001
AMC	5 (11)	0 (0)	18 (36)	0.06	0.005	< 0.001	< 0.001
CAZ	29 (64)	23 (53)	33 (66)	0.24	0.87	0.18	0.34
CEP	33 (73)	11 (25)	32 (64)	< 0.001	0.33	< 0.001	< 0.001
NAL	33 (73)	43 (98)	49 (98)	0.002	0.001	1.0	< 0.001
CIP	6 (13)	44 (100)	49 (98)	< 0.001	< 0.001	1.0	< 0.001
GEN	16 (36)	5 (11)	24 (48)	0.007	0.22	< 0.001	0.001
TOB	16 (36)	6 (14)	41 (82)	0.02	< 0.001	< 0.001	< 0.001
AMK	0 (0)	2 (5)	18 (36)	0.24	< 0.001	< 0.001	< 0.001
STX	21 (47)	23 (52)	25 (50)	0.60	0.74	0.83	0.87

*Los valores de p estadísticamente significativos están en negrita. Se consideró significativo un valor de $p < 0.0125$. PTZ: Piperacilina-tazobactam. AMC: Amoxicilina-clavulánico. CAZ: Cefotazidima. CEP: Cefepima. NAL: Ácido nalidíxico. CIP: Ciprofloxacino. GEN: Gentamicina. TOB: Tobramicina. AMK: Amicacina. STX: Cotrimoxazol. Todos los aislados fueron sensibles a imipenem, meropenem, ceftoxitina y tigeciclina y todos los aislados fueron resistentes a cefotaxima por lo que no están representados.

Estas diferencias entre subclones en cuanto a porcentajes de resistencia a antibióticos se mantuvieron similares en los cuatro hospitales participantes, con pequeñas diferencias locales.

En cuanto a la resistencia a ciprofloxacino, en los cuatro hospitales se observó el predominio esperado de aislados resistentes entre los aislados H30 frente a los no-H30 ($p < 0.001$ en los cuatro hospitales). Es de destacar que el 15% y el 36% de los aislados no-H30 de Berlín y Ginebra fueron resistentes a ciprofloxacino mientras que en Madrid y Utrecht no se encontraron aislados no-H30 resistentes a este antibiótico ($p = 0.04$). No obstante, el porcentaje de resistencia a ácido nalidíxico fue alto en los aislados no-H30 de todos los hospitales participantes (67% en Utrecht, 73% en Ginebra, 77% en Berlín y 83% en Madrid, $p > 0.05$).

Los menores porcentajes de resistencia a piperacilina-tazobactam y amoxicilina-clavulánico observados entre los aislados H30 no-Rx en comparación con los otros subclones se

mantuvieron en los cuatro hospitales. Sin embargo, estas diferencias solo fueron significativas en Madrid (0% vs. 39% para piperacilina-tazobactam, y 0% vs. 44% para amoxicilina-clavulánico, $p = 0.04$).

Los aislados no-*H30* de los hospitales de Berlín y Utrecht presentaron mayores porcentajes de resistencia a cefepima que el resto de subclones (92% vs. 30% *H30* no-Rx y 62% *H30*Rx, $p = 0.007$ para Berlín y 93% vs. 25% *H30* no-Rx y 50% *H30*Rx, $p = 0.001$ para Utrecht). Sin embargo, en los hospitales de Ginebra y Madrid fueron los aislados *H30*Rx los que presentaron mayor porcentaje de resistencia a cefepima (62% y 67% respectivamente), aunque las diferencias con el resto de aislados no fueron significativas.

Cada aminoglucósido estudiado mostró resultados diferentes en la comparación de aislados resistentes de cada subclón en los cuatro hospitales. No se observaron diferencias significativas en los porcentajes de aislados resistentes a gentamicina de cada subclón en ninguno de los cuatro hospitales. Para la tobramicina, los aislados *H30* no-Rx fueron significativamente menos resistentes que el resto de aislados en Ginebra (14% vs. 58%, $p < 0.02$), en Madrid (25% vs. 72%, $p < 0.02$) y en Utrecht (0% vs. 47%, $p < 0.01$). En Berlín no hubo diferencias significativas (20% vs. 52%, $p = 0.13$). Por último, los aislados resistentes a amicacina fueron muy escasos en Berlín (10%, 3 aislados todos ellos *H30*Rx, $p = 0.01$), Ginebra (3%, 1 aislado *H30*Rx, $p = 0.24$) y Utrecht (10%, 2 aislados *H30*Rx y uno no-Rx). Sin embargo, en Madrid se encontraron un 30% de aislados resistentes, la mayoría *H30*Rx (40% vs. 7%, $p = 0.04$).

Entre los aislados no-ST131, no se observaron diferencias significativas en resistencias a los antibióticos entre los distintos países (Figura 41), con excepción del predominio entre los aislados no-ST131 de Madrid de aislados resistentes a ácido nalidíxico (93% vs. 44%) y ciprofloxacino (79% vs. 38%) frente al resto de países en conjunto ($p < 0.05$).

4.3. Caracterización de BLEEs en *E. coli*-BLEE no invasivo

En cuanto a la caracterización de la BLEEs, la enzima más frecuentemente codificada por los aislados ST131 fue CTX-M-15 (49.6%, 69/139) seguida de CTX-M-27 (25.9%, 36/139). Por el contrario, los aislados no-ST131 produjeron con mayor frecuencia CTX-M-14 (27%, 8/30) seguida de CTX-M-15 (23%, 7/30). El resto de enzimas BLEEs encontradas en este estudio se refieren en la Tabla 24.

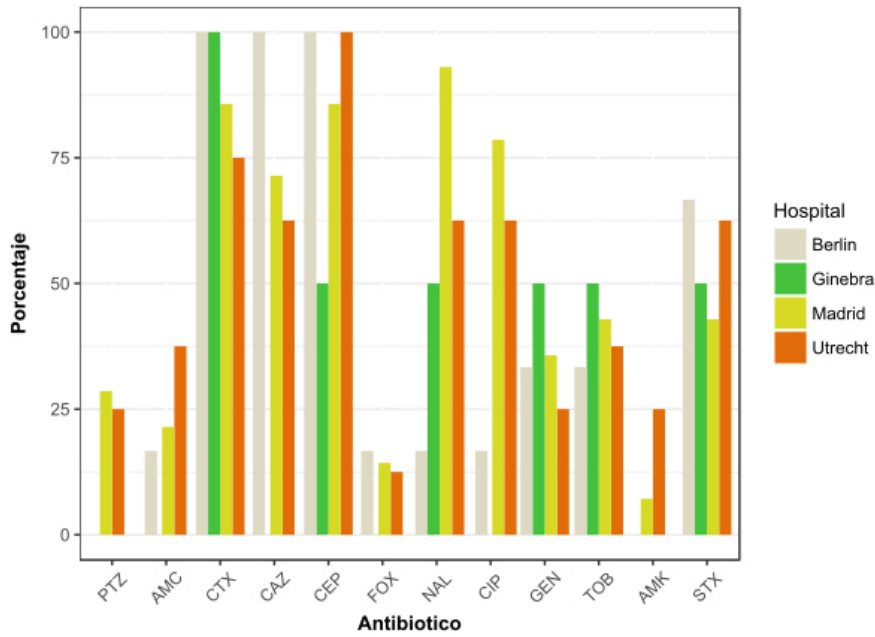


Figura 40. Porcentaje de aislados resistentes (I+R) a antibióticos entre los *E. coli*-No-ST131 del proyecto R-GNOSIS según hospital de procedencia.

PTZ: Piperacilina-tazobactam. AMC: Amoxicilina-clavulánico. CTX: Cefotaxima CAZ: Ceftazidima. CEP: Cefepima. FOX: Cefoxitina. NAL: Ácido nalidíxico. CIP: Ciprofloxacino. GEN: Gentamicina. TOB: Tobramicina. AMK: Amicacina. STX: Cotrimoxazol. Todos los aislados fueron sensibles a imipenem, meropenem y tigeciclina.

Tabla 24. Enzimas BLEE producidas por los aislados *E. coli*-BLEE de colonización del proyecto R-GNOSIS

Tipo de BLEE	Total de aislados (%) n = 169	<i>E. coli</i> -no-ST131 (%) n = 30	<i>E. coli</i> -ST131 (%) n = 139
CTX-M-15	76 (50)	7 (23)	69 (49.6)
CTX-M-27	38 (22.5)	2 (7)	36 (25.9)
CTX-M-14	22 (13)	8 (27)	14 (10.1)
CTX-M-1	19 (11.2)	4 (13)	15 (10.8)
CTX-M-3	4 (2.4)	3 (10)	1 (0.7)
SHV-12	5 (3)	2 (7)	3 (2.2)
TEM-20	1 (0.6)	0 (0)	1 (0.7)
CTX-M-24	1 (0.6)	1 (3)	0 (0)
CTX-M-32	1 (0.6)	1 (3)	0 (0)
CTX-M-55	1 (0.6)	1 (3)	0 (0)

Una de las enzimas BLEE de los aislados no-ST131 no pudo ser tipada pese a comprobarse fenotípicamente su producción.

CTX-M-15 y CTX-M-27 fueron las dos enzimas más frecuentemente codificadas por los aislados ST131 en todos los hospitales participantes (Figura 42). No obstante, mientras en Berlín, Madrid y Utrecht predominaron los aislados productores de CTX-M-15, en Ginebra fueron más frecuentes los aislados productores de CTX-M-27 ($p = 0.01$), además de ser la segunda enzima más frecuentemente encontrada en todos los hospitales.

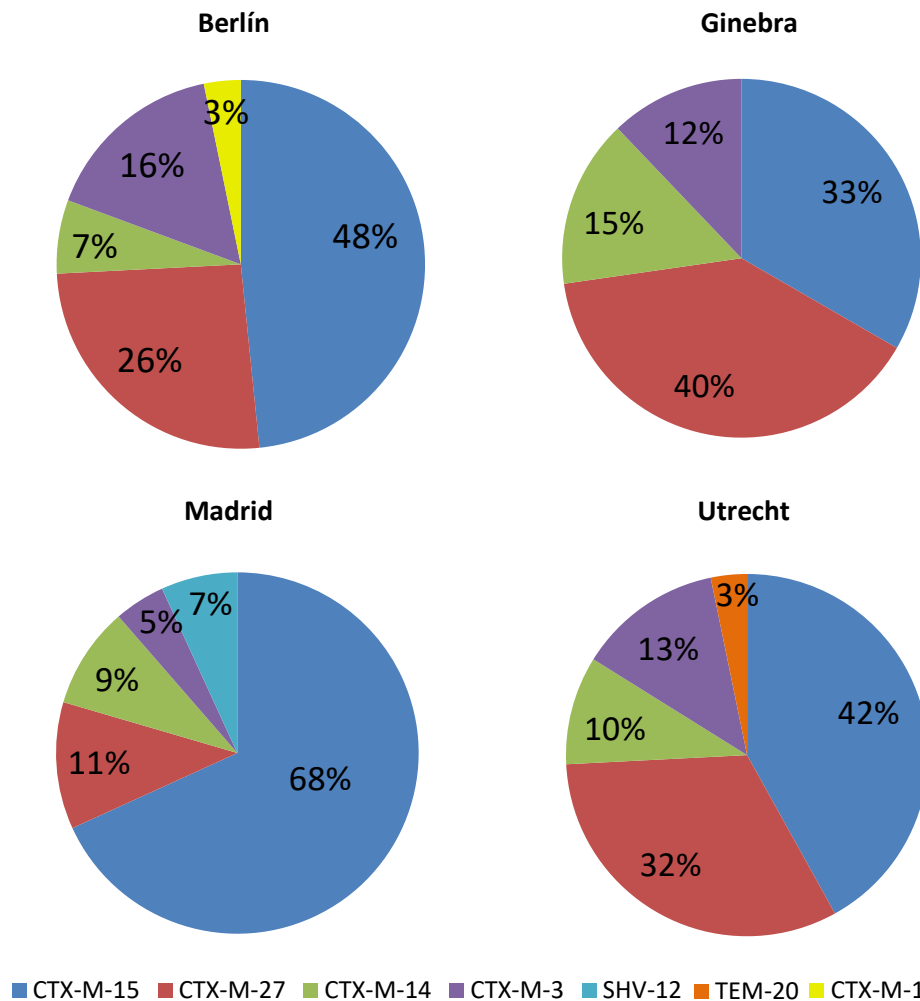


Figura 41. Porcentaje de BLEEs encontradas en los aislados ST131 de cada hospital participante en el proyecto R-GNOSIS

El análisis de las enzimas codificadas por los aislados ST131 según subclón mostró el predominio de las enzimas CTX-M-15 en los aislados *H30Rx* (97%, 47/50, $p < 0.001$) y, aunque no de forma significativa, en los aislados *no-H30* (40%, 18/45, $p = 0.12$). Por el contrario, las enzimas CTX-M-27 fueron mucho más frecuentes entre los aislados *H30 no-Rx* (73%, 32/44, $p < 0.001$). El predominio de estas enzimas en cada subclón se mantuvo en los cuatro hospitales participantes (Tabla 25).

Tabla 25. Número (%) de aislados de colonización de cada subclón de *E. coli*-ST131 productores de BLEE en cada hospital participante en el proyecto R-GNOSIS

Tipo de BLEE	Berlín (n = 31)			Ginebra (n = 33)			Madrid (n = 44)			Utrecht (n = 31)		
	no-H30	H30	Rx	no-H30	H30	Rx	no-H30	H30	Rx	no-H30	H30	Rx
CTX-M-15	7 (54)	1 (10)	7 (88)	2 (18)	1 (7)	8 (100)	1 (17)	1 (12)	28 (93)	8 (53)	1 (8)	4 (100)
CTX-M-27	1 (8)	7 (70)	0 (0)	2 (18)	11 (79)	0 (0)	1 (17)	4 (50)	0 (0)	0 (0)	10 (83)	0 (0)
CTX-M-14	0 (0)	2 (20)	0 (0)	4 (36)	1 (7)	0 (0)	1 (17)	1 (12)	2 (7)	2 (13)	1 (8)	0 (0)
CTX-M-1	5 (38)	0 (0)	0 (0)	3 (27)	1 (7)	0 (0)	1 (17)	1 (12)	0 (0)	4 (27)	0 (0)	0 (0)
CTX-M-3	0 (0)	0 (0)	1 (12)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
SHV-12	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (33)	1 (12)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
TEM-20	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (7)	0 (0)	0 (0)
Total	13	10	8	11	14	8	6	8	30	15	12	4

Comparando entre sí los aislados ST131 productores de CTX-M-15 y CTX-M-27, se encontraron diferencias entre los porcentajes de resistencia a los distintos antibióticos. Los aislados productores de CTX-M-15 fueron resistentes a piperacilina-tazobactam y amoxicilina-clavulánico en un 22% y 25% respectivamente, mientras que ninguno de los aislados productores de CTX-M-27 fue resistente a estos antibióticos ($p < 0.01$). Además los aislados productores de CTX-M-15 fueron resistentes a ceftazidima y cefepima en un mayor porcentaje de aislados que los productores de CTX-M-27 ($p < 0.01$) (Figura 43).

Curiosamente, aunque los porcentajes de resistencia a ácido nalidíxico fueron iguales en los aislados productores de ambos tipos de BLEE, los aislados que codificaban para CTX-M-27 fueron más frecuentemente (94%) resistentes a ciprofloxacino que los que codificaban para CTX-M-15 (75%, $p = 0.02$).

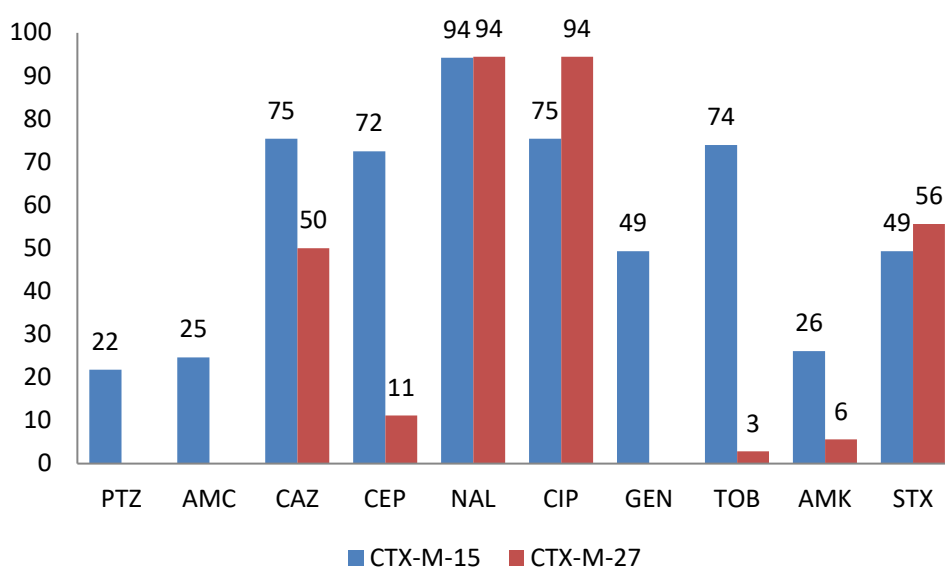


Figura 42. Porcentaje de aislados de colonización *E. coli*-BLEE ST131 productores de CTX-M-15 y CTX-M-27 resistentes (I+R) a antibióticos del proyecto R-GNOSIS.

PTZ: Piperacilina-tazobactam. AMC: Amoxicilina-clavulánico. CAZ: Ceftazidima. CEP: Cefepima. NAL: Ácido nalidíxico. CIP: Ciprofloxacino. GEN: Gentamicina. TOB: Tobramicina. AMK: Amicacina. STX: Cotrimoxazol.

Por último, se observaron grandes diferencias en los porcentajes de resistencia a los tres aminoglucósidos estudiados. Estas diferencias fueron particularmente notables en la resistencia a gentamicina y tobramicina donde predominaron los aislados productores de CTX-M-15 (49% vs. 0% y 74% vs. 3%, respectivamente, $p < 0.001$) mientras que las diferencias de porcentaje de aislados resistentes a amicacina entre los productores de las distintas enzimas fueron menos llamativas (26% vs. 6%, $p = 0.02$).

En cuanto a los aislados no-ST131, se observaron grandes diferencias en cuanto a las enzimas codificadas por los aislados de cada país, en gran parte debido a la mayor diversidad de enzimas respecto a los aislados ST131 (Figura 44). En Berlín predominaron los aislados con CTX-M-1 (67%, 4/6) seguidos de CTX-M-15 y CTX-M-14 (17%, 1/6 cada una). En Madrid en cambio predominaron los aislados productores de CTX-M-14 (43%, 6/14) seguidos de CTX-M-15 (21%, 3/14). En Utrecht se encontró CTX-M-15 en el 38% (3/8) de los aislados. Por último, los dos aislados no-ST131 de Ginebra codificaron para enzimas del grupo 9, uno CTX-M-27 y otro CTX-M-14.

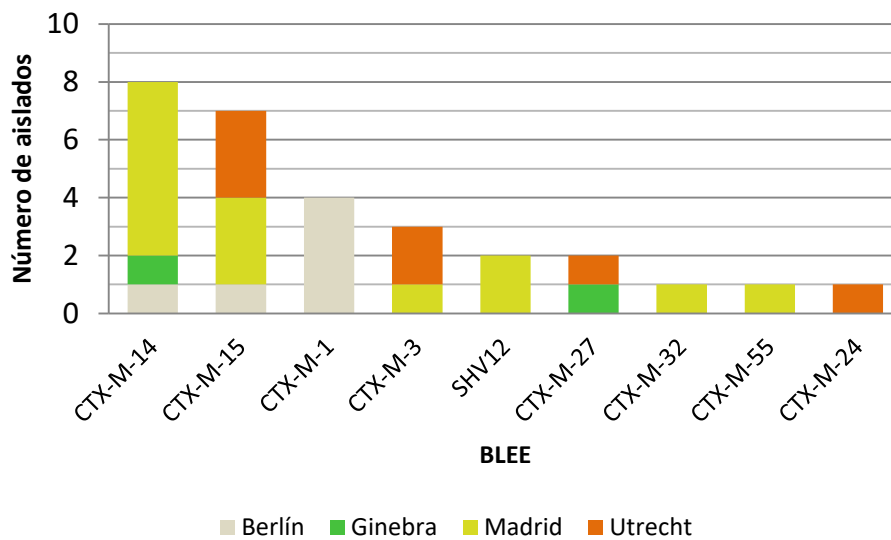


Figura 43. Tipo de BLEE codificada por los aislados *E. coli*-no-ST131 seleccionados del proyecto R-GNOSIS.

4.4. Análisis del genotipo de virulencia en *E. coli*-BLEE de origen no invasivo

Para el estudio del genotipo de virulencia, se seleccionaron 120 aislados BLEE del proyecto R-GNOSIS: 30 aislados de cada subclón perteneciente a ST131 (n = 90) y 30 aislados no-ST131. Se mantuvo en cada subgrupo el porcentaje de aislados de cada país observado en el total de aislados estudiado.

El gen de virulencia más frecuentemente encontrado fue *fyuA* (88.3%, 106/120) seguido de *yfcV* (84.2%, 101/120). Los genes *bmaE*, *papGI* y K15 no fueron detectados en ningún aislado (Figura 45).

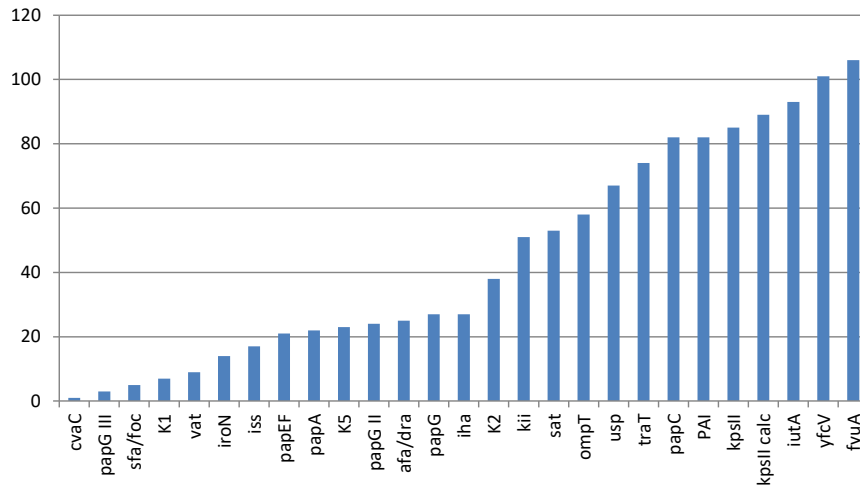


Figura 45. Número de aislados *E. coli*-BLEE de colonización del proyecto R-GNOSIS positivos a los genes de virulencia estudiados.

Todos los aislados fueron negativos a *bmaE*, K15 y el alelo I de *papG*. *KpsII calc*: Aislados positivos para los cebadores para *kpsII*, *kii*, y/o cualquiera de las variantes K1, K2 o K5.

Se observó una asociación estadísticamente significativa entre los aislados ST131 y la presencia de los genes *pap* (aislados positivos a cualquier variante), *papC*, *kpsII* (tanto cualquier variante como el operón detectado con los cebadores *kpsII*), K2, K5, *yfcV*, *iutA*, *iha*, *fyuA*, *usp*, *ompT*, *PAI*, *sat* y *traT* ($p < 0.05$). Por el contrario, los aislados no-ST131 fueron más frecuentemente positivos a *iss* y *iroN* ($p < 0.05$) (Figura 46).

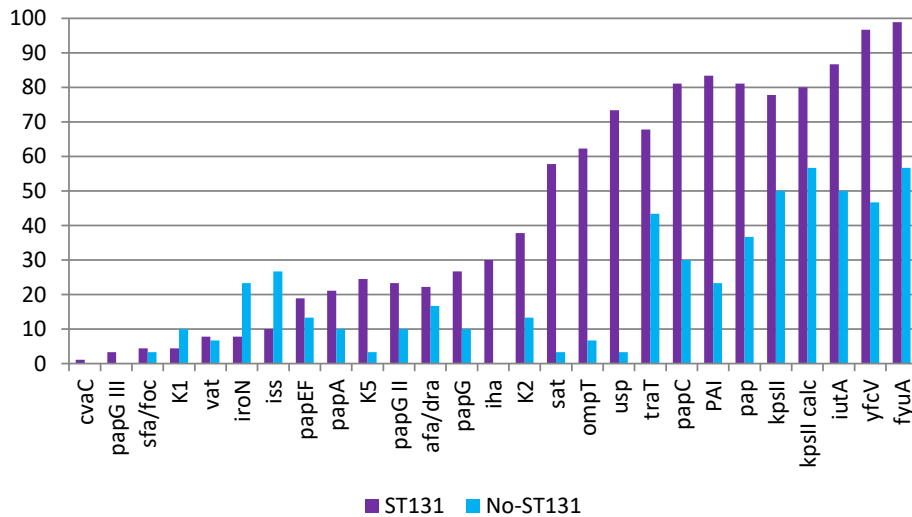


Figura 46. Porcentaje de los aislados de colonización seleccionados del proyecto R-GNOSIS positivos para los genes de virulencia estudiados según pertenencia a ST131. Ningún aislado fue positivo para *bmaE*, *papGI* o K15. *KpsII calc*: Aislados positivos para los cebadores para *kpsII*, *kii*, y/o cualquiera de las variantes K1, K2 o K5.

A nivel de subclón, aunque los aislados *H30* fueron positivos para el gen *kpsII* (cualquier variante) con mayor frecuencia que los no-*H30* (83% vs. 63%, $p = 0.01$), los aislados no-*H30* fueron más frecuentemente positivos a K1 (13% vs. 0%, $p = 0.01$) mientras que los aislados *H30* lo fueron a K5 (33% vs. 7%, $p = 0.01$). Además, los aislados no-*H30* fueron positivos en un porcentaje significativamente mayor a *vat* y a *iroN* (20% vs. 1% y 23% vs. 0% respectivamente, $p \leq 0.01$ para ambas comparaciones).

Al comparar los subclones entre sí, destacó el bajo número de aislados *H30* no-Rx positivos a *papA*, *papG* o *papEF* comparados con el resto de aislados ST131 ($p < 0.01$ en todas las comparaciones). Por otro lado los aislados no-*H30* y *H30Rx* presentaron porcentajes de positividad similares ($p > 0.01$) para todas las variantes del operón *pap* excepto para *papA*, donde fue significativamente mayor el porcentaje de aislados positivos en el subclón *H30Rx*. Curiosamente, no se observaron diferencias para *papC* (Tabla 27).

Otras diferencias fueron observadas entre los subclones perteneciente al clado *H30*: los aislado *H30* no-Rx se caracterizaron por un porcentaje significativamente mayor de aislados positivos a *ompT* (93% vs. 40%, $p < 0.01$) y *sat* (90% vs. 40%, $p < 0.01$) mientras que los *H30Rx* fueron positivos con mayor frecuencia a *afa/dra* (30% vs. 3%, $p = 0.01$).

Las únicas asociaciones significativas encontradas entre la pertenencia a un hospital concreto y la presencia de algún FV, fueron la pertenencia a Madrid y la positividad a K2 y *iha* (68% vs. 24% y 54% vs. 19% respectivamente, $p < 0.01$). Esto fue debido probablemente por el alto porcentaje de aislados *H30Rx* de Madrid (63% del total de aislados de ese clon).

Del total de aislados analizados, 80% (96/120) fueron clasificados como ExPEC y 78% (94/120) como UPEC. De los 96 aislados ExPEC, 86 fueron también clasificados como UPEC pero 8 aislados clasificados como UPEC no cumplieron los criterios de la definición molecular de ExPEC. Se observaron diferencias significativas en el porcentaje de aislados ExPEC y UPEC entre los aislados ST131 % y no-ST131 (92% vs. 43% y 96% vs. 27% respectivamente, $p < 0.001$). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre subclones u hospitales.

Se observaron diferencias significativas entre subclones para las variantes de *kpsII*. Mientras K1 se encontró únicamente en los aislados no-*H30* (13% vs. 0%, $p < 0.01$), K2 fue más frecuente entre los aislados *H30Rx* (73% vs. 27%, $p < 0.01$) y K5 entre los *H30* no-Rx (82% vs. 18%, $p < 0.01$).

Tabla 26. Número (%) de aislados de colonización *E. coli*-BLEE-ST131 positivos a los genes estudiados

	Aislados <i>E. coli</i> -ST131				valores de p*			
	no-H30	H30	H30 no-Rx	H30Rx	no-H30	no-H30	H30Rx	
	n = 30	n = 60	n = 30	n = 30	vs. H30	vs. H30Rx	vs. H30Rx	vs. H30 no-Rx
<i>pap</i>	20 (67)	53 (88)	26 (87)	27 (90)	0.013	0.12	0.06	1.0
<i>papC</i>	20 (67)	53 (88)	26 (87)	27 (90)	0.013	0.12	0.06	1.0
<i>papA</i>	4 (13)	15 (25)	1 (3)	14 (47)	0.28	0.35	0.01	< 0.01
<i>papEF</i>	4 (13)	13 (22)	1 (3)	12 (40)	0.41	0.35	0.04	< 0.01
<i>papG</i>	10 (33)	14 (23)	1 (3)	13 (43)	0.31	< 0.01	0.43	< 0.01
<i>papGII</i>	7 (23)	14 (23)	1 (3)	13 (43)	1.0	0.05	0.1	< 0.01
<i>papGIII</i>	3 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.04	0.24	0.24	NA
<i>KpsII calc</i>	19 (63)	53 (88)	25 (83)	28 (93)	< 0.01	0.08	0.01	0.42
<i>kpsII</i>	19 (63)	51 (85)	24 (80)	27 (90)	0.02	0.15	0.03	0.47
K1	4 (13)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	< 0.01	0.11	0.11	NA
K2	11 (37)	23 (38)	1 (3)	22(73)	0.88	< 0.01	< 0.01	< 0.01
K5	2 (7)	20 (33)	18 (69)	2 (7)	< 0.01	< 0.01	1.0	< 0.01
<i>vat</i>	6 (20)	1 (2)	1 (3)	0 (0)	< 0.01	0.10	0.02	1.0
<i>yfcV</i>	28 (93)	59 (98)	30 (100)	29 (97)	0.26	0.49	1.0	1.0
<i>sfa/foc</i>	0 (0)	4 (7)	2 (7)	2 (7)	0.15	0.49	0.49	1.0
<i>afa/dra</i>	10 (33)	10 (17)	1 (3)	9 (30)	0.07	< 0.01	0.78	0.01
<i>iutA</i>	22 (73)	56 (93)	28 (93)	28 (93)	0.02	0.08	0.08	1.0
<i>iha</i>	4 (13)	23 (38)	7 (23)	16 (53)	0.02	0.32	< 0.01	0.02
<i>iroN</i>	7 (23)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	< 0.01	< 0.01	0.01	NA
<i>iss</i>	5 (17)	4 (7)	2 (7)	2 (7)	0.15	0.42	0.42	1.0
<i>fyuA</i>	30 (100)	59 (98)	30 (100)	29 (97)	1.0	NA	1.0	1.0
<i>ompT</i>	1 (3)	40 (67)	28 (93)	12 (40)	0.25	< 0.01	0.3	< 0.01
<i>traT</i>	22 (73)	39 (65)	22 (73)	17 (57)	0.42	1.0	0.18	0.18
<i>usp</i>	26 (87)	40 (67)	21 (70)	19 (63)	0.05	0.21	0.07	0.58
<i>sat</i>	13 (43)	39 (65)	27 (90)	12 (40)	0.05	< 0.01	1.0	< 0.01
PAI	26 (87)	49 (82)	26 (87)	23 (77)	0.76	1.0	0.51	0.32
<i>cvaC</i>	1 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.33	1.0	1.0	NA

*Los valores de p estadísticamente significativos están en negrita. Se consideraron significativos valores de p ≤ 0.01. NA: Comparación no aplicable. Ningún aislado fue positivo para *bmaE*, *papGI* o K15. *KpsII calc*: Aislados positivos para los cebadores para *kpsII*, *kii*, y/o cualquiera de las variantes K1, K2 o K5.

El IV del total de aislados de colonización presentó una mediana de 9 (IQR 6-10), existiendo un rango muy amplio de valores (mínimo 0 máximo 13). Se observó una diferencia

estadísticamente significativa entre el IV de los aislados ST131 y los no-ST131: medianas de IV 10 (IQR 9-11) vs. 4.5 (IQR 2-6).

Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el IV entre los distintos subclones, aunque los aislados H30Rx presentaron un IV mayor (Figura 47). Igualmente, no se encontraron diferencias significativas entre los aislados de diferentes hospitales, ni según produjeran un tipo de BLEE u otro.

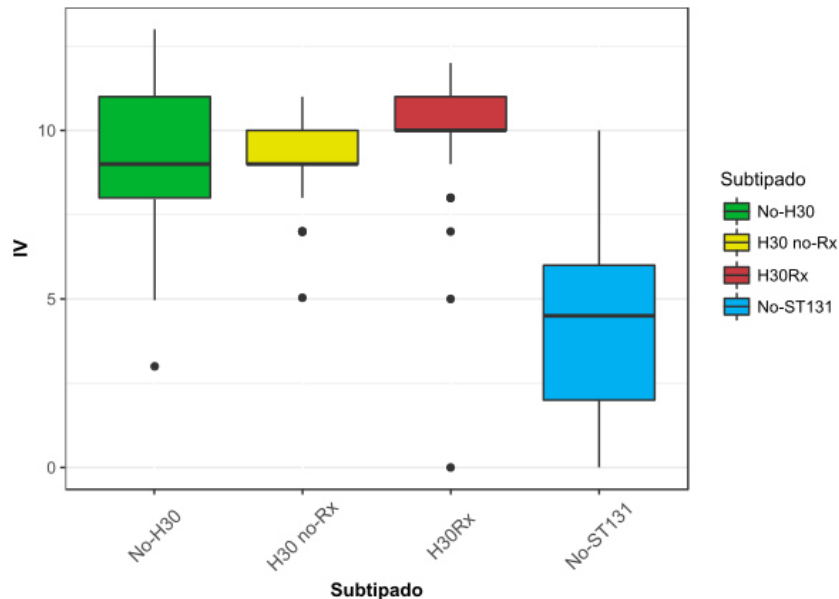


Figura 47. Gráfico de cajas y bigotes del índice de virulencia de los aislados seleccionados del proyecto R-GNOSIS según subtipo.

IV: índice de virulencia.

Por el contrario, los aislados ExPEC sí estuvieron asociados a un IV mayor que los aislados no-ExPEC: mediana de 9.5 (IQR 8.5-11) vs. mediana de IV en los aislados no-ExPEC de 3 (IQR 2-6). Esto ocurrió tanto entre los aislados no-ST131 como entre los ST131 y sus subclones (Figura 48).

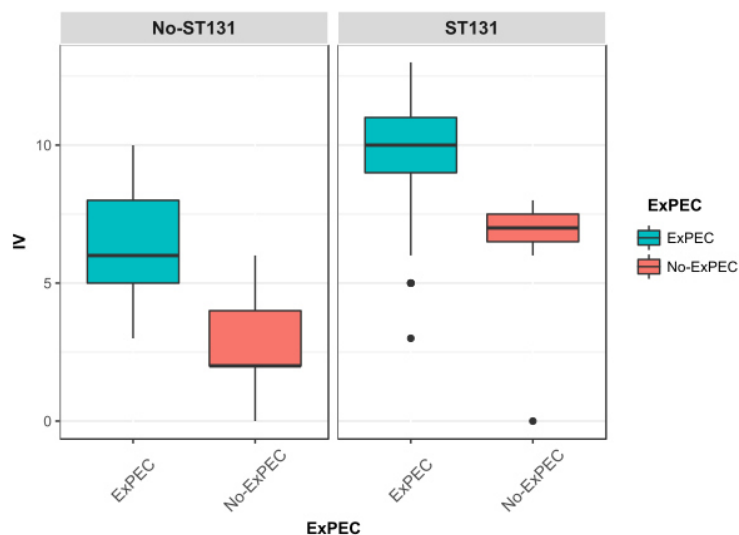


Figura 448. Gráfico de cajas y bigotes del índice de virulencia de los aislados seleccionados del proyecto R-GNOSIS según su clasificación en ExPEC y ST131. IV: índice de virulencia.

Lo mismo ocurrió con los aislados clasificados como UPEC, cuyo IV fue mayor que los no-UPEC (mediana de IV de 10 vs. 3, $p < 0.001$). Los aislados ST131 clasificados como UPEC presentaron un IV mayor (mediana de IV de 7) que los que no se clasificaron como UPEC (mediana de 3, $p < 0.05$). Igualmente ocurrió entre los no-ST131 (mediana de IV de los aislados UPEC de 6 vs. mediana de 2 en los no-UPEC) ($p < 0.05$).

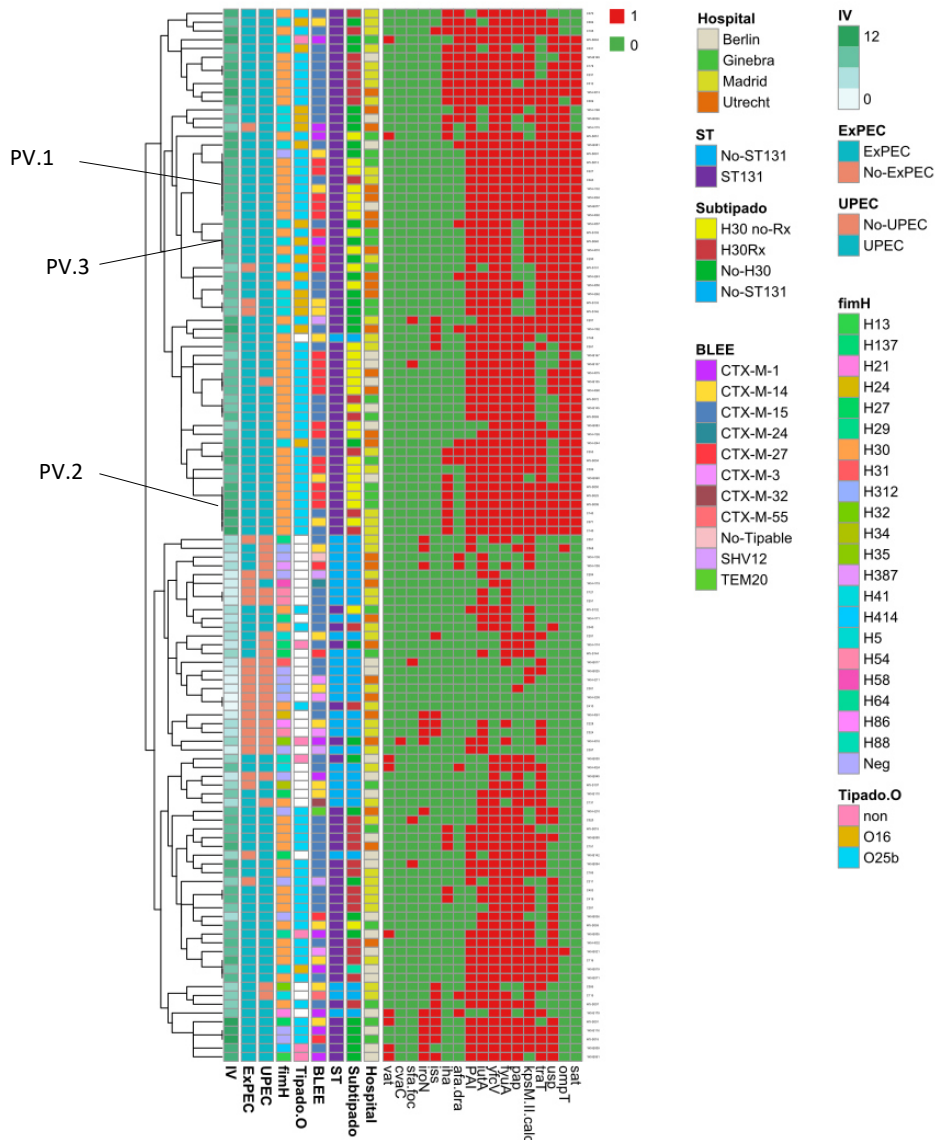


Figura 49. Heatmap de los genes de virulencia estudiados en los aislados de colonización *E. coli*-BLEE seleccionados del proyecto R-GNOSIS.

Se excluyeron aquellos genes ausentes en todos los aislados. Se consideró *kpsII* positivo (*kpsII* calc) si el aislado fue positivo a *kspII* o cualquiera de sus variantes. El operón *pap* se consideró positivo si el aislado fue positivo a *papA*, *papC*, *papEF* o *papG* (cualquiera de sus alelos). La presencia del gen estudiado está representada por el cuadrado rojo (1), y la ausencia por el cuadrado verde (0).

El análisis mediante *heatmap* representando los FV estudiados mostró 95 perfiles distintos. La mayoría de ellos (81%, 77/95) solo agrupaban un aislado. Los perfiles de virulencia que más aislados agrupaban fueron los perfiles (llamados de forma arbitraria) PV.1 (n = 8), PV.2 (n = 6), y PV.3 (n = 4) (Figura 49), diferenciándose entre sí por los genes *pap*, *afa/dra* e *iha*. Los aislados no-ST131 se agruparon en 29 perfiles diferentes mientras que los ST131 se agruparon en 63. De entre los aislados ST131, los pertenecientes al subclón no-H30 presentaron 26 perfiles distintos, los H30 no-Rx 18 y los H30Rx 25 perfiles. Los tres perfiles con el mayor número de aislados (n = 18 en total) agrupaban principalmente aislados H30 no-Rx (61%, 11/18) pero ninguno de esos tres perfiles estaba formado por aislados de un único subclón. No se observó asociación entre perfiles y hospitales.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

忍法一貫真心に勝れ

“Ninpō Ikkan Magokoro ni Masare”

(Seguiré los principios del Ninpo con toda la sinceridad de mi corazón)

Esta tesis ha analizado la prevalencia y características microbiológicas de *E. coli*-ST131 en una colección de aislados procedentes de bacteriemia de origen urinario, incluyendo un análisis de virulencia in vivo en un modelo murino de sepsis. Además, se ha analizado la población ST131 productor de BLEE aislados a partir de muestras rectales (aislados no invasivos) de pacientes procedentes de 4 hospitales europeos, lo que permite comparar las características microbiológicas de aislados invasivos y no invasivos.

1. *E. coli*-BLEE de origen invasivo

La prevalencia de aislados *E. coli*-BLEE encontrada fue de 9.2%, similar a la referida en estudios previos en España y otros países europeos (123,157,158). Más de la mitad (54%) de los aislados *E. coli*-BLEE pertenecían al filogrupo B2 y el 23% al B1, mientras que la presencia del filogrupo D fue minoritaria (5%). El filogrupo B1 se ha considerado clásicamente un filogrupo no virulento, cuyas cepas son en su mayoría comensales. No obstante, el aumento de la prevalencia de *E. coli* productor de BLEE perteneciente al filogrupo B1 en infecciones extraintestinales ha sido documentado en otros estudios (124,159). Esta elevada prevalencia de *E. coli* del filogrupo B1 podría deberse al origen urinario de las cepas estudiadas. Diversos estudios han postulado que el tracto intestinal actúa como reservorio de cepas con potencial uropatógeno por lo que aislados de filogrupos comensales se encontrarían con cierta frecuencia causando ITUs (15,160). Otra teoría defendida es que algunas cepas comensales adquieren genes de virulencia que les permitan convertirse en patógenas (8,14). Sin embargo, las cepas encontradas en nuestro estudio que pertenecían a los filogrupos A, B1 y C presentaron índices de virulencia significativamente más bajos que las de los filogrupos considerados virulentos (B2 y D), como se ha descrito en otros estudios (124,131). Esto indicaría que su capacidad de producir bacteriemias de origen urinario (BOU) no estaría directamente relacionado con la presencia de mayor número de factores de virulencia. Otros autores han propuesto que son factores del hospedador los que favorecen que cepas supuestamente no virulentas causen infecciones invasivas (124,128).

Todos los aislados B2 pertenecieron al clon de alto riesgo ST131, lo que representa una prevalencia de *E. coli*-BLEE ST131 del 54%. Sin embargo el resto de filogrupos mostraron una gran diversidad de STs, de los cuales los más frecuentes fueron B1-ST224, B1-ST156 y C-ST410 (n = 7 en total). Estas STs se han descrito ya en la literatura tanto en cepas de procedencia animal como en humanos (161–164).

Trabajos previos han demostrado un incremento progresivo de la prevalencia de *E. coli*-ST131 en aislados productores de BLEE en España (9% en 2004 hasta 61% en 2012). Nuestros

resultados mostraron una prevalencia de ST131 entre *E. coli*-BLEE del 54%, que, aunque inferior a la encontrada por Dahbi *et al.* en 2012 (61%), denota el incremento mencionado anteriormente (141,165).

La mayoría de aislados *E. coli*-BLEE-ST131 pertenecían al subclón O25b-H30Rx. Estos resultados sugieren que el subclón, H30Rx, que en nuestro estudio representa el 51% de los aislados productores de BLEE, ha emergido en los últimos años entre los *E. coli*-BLEE causantes de bacteriemia de origen urinario en nuestro país. Hasta donde sabemos, solo otro estudio español ha mostrado el predominio de este subclón entre los aislados *E. coli*-BLEE en España (120). El predominio de este subclón entre los aislados ST131 es bien conocido (113) y un motivo de preocupación por su asociación con resistencia a múltiples familias de antibióticos (117).

1.1. Resistencias a antibióticos y caracterización de BLEEs

El porcentaje de resistencias a los distintos antibióticos observado en los aislados *E. coli*-BLEE invasivos fue preocupante. La elevada prevalencia de *E. coli* ST131 y en particular del subclón H30Rx podría explicar los mayores porcentajes de resistencia observados en los aislados del filogrupa B2, en contra de la teoría clásica de que los aislados de los filogrupos virulentos B2 y D se asocian a menor resistencia a antibióticos y viceversa (13,166). El clon de alto riesgo ST131 se ha visto asociado a un mayor contenido tanto de factores de virulencia como de determinantes de resistencia a múltiples familias de antibióticos (25).

Una de las familias de antibióticos frente a la que se observó un mayor porcentaje de aislados resistentes fue la de las quinolonas (97% de aislados resistentes a ácido nalidíxico). Este alto porcentaje podría deberse al predominio de cepas *E. coli*-ST131, que está asociado a resistencia a quinolonas, pero no se observaron diferencias significativas entre aislados *E. coli*-ST131 y no-ST131. Estas cifras son superiores a las de otros estudios en *E. coli*-BLEE en España (124). Otros estudios de *E. coli*-BLEE realizados en diferentes países europeos han encontrado porcentajes elevados de resistencia a ciprofloxacino (Suecia 77% en 2007 y 49% en 2011; 96% en la República Checa)(167,168).

Los porcentajes de resistencia a betalactámicos fueron muy elevados, como era esperable en microorganismos productores de BLEE. No obstante, llaman la atención los porcentajes de aislados sensibles a ceftazidima y cefepima (46% y 41% respectivamente). Dado el predominio de CTX-M-15 entre los aislados estudiados, podría explicarse por una mayor actividad hidrolítica de esta enzima frente a cefotaxima que frente a ceftazidima o cefepima. Sin

embargo, los aislados ST131, que codificaban más frecuentemente CTX-M-15 que los no-ST131, mostraron un porcentaje menor de resistencia a cefotaxima y por el contrario fueron más frecuentemente resistentes a ceftazidima y cefepime. Otros mecanismos podrían estar implicados en estas diferencias, como producción de enzimas tipo OXA, hiperproducción de IRT o alteraciones de la permeabilidad (169).

Las tasas relativamente bajas de resistencia a las combinaciones de inhibidores con betalactámicos permiten apoyar la propuesta hecha por Rodríguez-Baño *et al.* de que estos antibióticos son una posible opción terapéutica de las bacteriemias por *E. coli*-BLEE (170). Los porcentajes observados en nuestros aislados (33% resistentes a amoxicilina-clavulánico y 20% a piperacilina-tazobactam) son similares a los encontrados en un estudio español con aislados de *E. coli* de bacteriemias recogidas entre 2003 y 2006 pero inferiores a los de un estudio similar en el Reino Unido (>50%) (81,157). Aunque las diferencias no fueron significativas, los aislados ST131 presentaron mayores porcentajes de resistencia a amoxicilina-clavulánico y piperacilina-tazobactam, una observación que se repite en los estudios realizados sobre resistencia a antibióticos comparando aislados ST131 con no-ST131 (135,171) y que se ha relacionado con la presencia del gen para la enzima OXA-1 en el plásmido que porta el gen para la CTX-M-15, encontrado más frecuentemente entre los aislados ST131 (169).

Por el contrario, se encontraron tasas elevadas de resistencia a cotrimoxazol por lo que no se aconseja su uso para el tratamiento de infecciones por *E. coli*-BLEE. Aunque otros estudios han mostrados tasas más bajas, la mayoría muestran que la resistencia a cotrimoxazol suele estar presente en cepas con mecanismos de resistencia frente a otras familias de antibióticos (81,158). Aunque algunos estudios muestran una asociación de la resistencia a cotrimoxazol con ST131 (25), nuestros resultados no mostraron diferencias significativas.

Tal y como se ha observado en otros estudios, la resistencia a los aminoglucósidos varió según el antibiótico estudiado siendo la tobramicina el antibiótico que presentó mayores niveles de resistencia. Los aislados resistentes a tobramicina y amicacina fueron significativamente más frecuentes entre los aislados ST131 que los no-ST131 (135,171). Este fenotipo de resistencia es compatible con el descrito para la enzima modificante de aminoglucósidos AAC-6'-(Ib)-cr, que se ha asociado con el clon ST131 y que confiere resistencia a tobramicina y amicacina pero no a gentamicina además de afectar a algunas quinolonas (172). Independientemente, las altas tasas de resistencia observadas alertan de la posible ineficacia de un tratamiento empírico de la urosepsis con estos antibióticos.

En cuanto a las enzimas BLEE detectadas, la enzima más prevalente entre nuestros aislados fue la CTX-M-15 (54%), seguida de la CTX-M-14 (28%), en consonancia con los datos de otros países (70). Estos resultados denotan un cambio en la epidemiología de las BLEE en España, donde la enzima más frecuente fue CTX-M-14 hasta la expansión de la CTX-M-15 (158,173,174). Los aislados productores de CTX-M-15 eran en su mayoría *E. coli*-ST131 y por el contrario los productores de CTX-M-14 eran principalmente no-ST131, la mayoría de ellos (55%) pertenecientes al filogrupa B1. Es de destacar que el único aislado no-H30 encontrado codificaba para CTX-M-14. Aunque el clon ST131 se ha asociado principalmente a CTX-M-15, esto es debido al predominio dentro de este clon del linaje H30Rx, que codifica principalmente este tipo de CTX-M (111). No obstante, otros autores han descrito la presencia de otros tipos de enzimas BLEE en los aislados ST131, tanto del grupo CTX-M-1 como del 9 (133,134,165).

1.2. Análisis del genotipo de virulencia

El estudio de los factores de virulencia (FV) en los aislados *E. coli*-BLEE mostró una gran variabilidad en el número de FV detectados, pero determinados genes como *fyuA*, *traT* y *iutA* se encontraron en la mayoría de aislados (más del 70%) lo que sugiere que estos FV podrían estar implicados en la patogénesis de la bacteriemia. El hecho de que dos de estos genes (*fyuA* y *iutA*) estén implicados en el metabolismo del hierro subraya la importancia de esta faceta del metabolismo bacteriano, y orientaría los esfuerzos dedicados a la búsqueda de una vacuna para las ITUs de repetición (152). Otros estudios han evaluado la presencia de estos genes en aislados *E. coli* causantes de urosepsis, encontrando un alto porcentaje de aislados con *fyuA* y *traT* especialmente entre aislados del filogrupa B2 (12). Esto podría sugerir que los aislados B2 adquirieron este gen muy temprano en su evolución, o bien que son altamente móviles y se han diseminado por múltiples eventos de transmisión horizontal.

Además, los dos FVs (*fyuA* y *iutA*) estaban asociados a los aislados pertenecientes al clon ST131 junto con otros FVs también frecuentemente detectados entre los aislados *E. coli*-BLEE (*iha*, *usp*, *ompT*, *sat*, *PAI*, *kpsII* y *yfcV* entre otros). Esto podría indicar una mejor adaptación de los aislados ST131 al nicho urinario a la par que una mayor capacidad de traspasar las defensas del hospedador y alcanzar el torrente sanguíneo. Diversos estudios han observado una mayor presencia de *iutA* en cepas UPEC frente a cepas fecales, y en estas frente a cepas del medio ambiente (32). Esto sugiere que el receptor para el sideróforo aerobactina codificado por *iutA* favorece la colonización intestinal y colabora también en la patogénesis de la ITU y la bacteriemia. Además, estudios moleculares han asociado su presencia en plásmidos cuando estos eran portadores de genes de resistencia (32). Eso explicaría su asociación con los aislados

ST131, cuya producción de CTX-M-15 está asociada a plásmidos con múltiples mecanismos de resistencia (158). El mayor número de cepas productoras de yersiniobactina tampoco es de extrañar, ya que este sideróforo se ha asociado también a cepas UPEC en general y aislados *E. coli*-ST131 en particular (12,26,117).

De los aislados estudiados solo un 41% fueron positivos para alguna variante de *pap* y solo *papA* se asoció con aislados *E. coli*-ST131. Las variantes del operón *pap*, que codifica para las fimbrias de tipo P, se han asociado de manera dispar con las cepas UPEC. Mientras que un estudio de cepas ExPEC mostró un mayor porcentaje de cepas con *papA* y *papGII* en cepas productoras de BOU frente a cepas que solo producían pielonefritis o bacteriemia de un origen distinto (175), otros estudios han mostrado una asociación negativa de este operón con los aislados H30-ST131 (152). Este mismo estudio observó la asociación de la variante K2 del determinante capsular *KpsII* con los aislados H30Rx y la ausencia de los genes *iss* y *iroN*, resultados similares a los nuestros.

Todos los genes asociados a ST131 en nuestro estudio han sido previamente asociados a este clon en la literatura. Los genes *fyuA*, *sat*, *usp*, *PAI*, *iha*, *kpsII*, *iutA* y *ompT* fueron encontrados en más del 90% de aislados *E. coli*-ST131 de distintos países en uno de los estudios que primero describió la aparición del clon ST131 (73). Igualmente, *iss* y *iroN* se encontraron en menos del 12% de las cepas, resultados consistentes con los observados en nuestro estudio (9% *iss*, 12% *iroN*). El papel individual de cada uno de estos FV no está bien definido pero cada vez más autores postulan que no es el número total de FV lo que otorga al clon ST131 ventajas para su diseminación sino una combinación específica (118). Curiosamente, mientras *iutA*, *fyuA* y *yfcV* forman parte de algoritmos descritos para la identificación de cepas ExPEC y UPEC (26,155), ninguno de los otros genes se han considerado dianas para la detección de cepas *E. coli* virulentas.

A pesar de que todos los aislados estudiados provenían de hemocultivos de pacientes con BOU, un 33% de nuestros aislados no se clasificó como ExPEC, y el porcentaje ascendió al 41% para la clasificación en UPEC. Como era de esperar, la mayoría de aislados ExPEC eran de los filogrupos considerados virulentos (B2 y D) mientras que los otros filogrupos se clasificaron más frecuentemente como no-ExPEC.

En consonancia con esto, el índice de virulencia (IV) de los filogrupos B2 y D fue mayor que el resto, siendo el IV de los aislados *E. coli*-ST131 el más alto de los estudiados. Es de destacar que todos los aislados B2-ST131 se clasificaron como UPEC y solo uno, el aislado no-H30, no

fue clasificado como ExPEC. Estos resultados confirman lo ya descrito por prácticamente todos los estudios realizados sobre ST131, en cuanto a que es un clon de *E. coli* con alto contenido en genes de virulencia y característicamente UPEC (65,117,176).

Independientemente de su pertenencia al clon ST131, los aislados clasificados como ExPEC y/o UPEC tenían mayor IV a pesar de ser muy escasos. No obstante, los perfiles de virulencia de las cepas ExPEC no-ST131 eran muy variados frente a la menor diversidad en los ST131, lo que sugiere que determinados perfiles en concreto son más favorables para la diseminación de las cepas portadoras, ya sea por una mejor adaptación al nicho intestinal o por una mayor capacidad de invasión del torrente sanguíneo, lo cual permite la selección y diseminación de esas cepas. Observaciones similares se han realizado en otros estudios en los que se estudiaron perfiles de virulencia (177,178).

Aunque no se disponían de suficientes cepas no-H30 como para que la comparación con el subclón H30Rx tuviese potencia estadística, el hecho de que presentase claras diferencias de tipado (alelo H41 y Ag O O16) y de sensibilidad antibiótica (CTX-M-14) sugiere que podría mostrar también diferencias en el genotipo de virulencia, como de hecho se observa en el análisis de su perfil, claramente alejado de los perfiles mayoritarios observados en el resto de aislados ST131. Por el contrario, los aislados H30Rx mostraron un perfil de virulencia más conservado que el resto de aislados, con un perfil mayoritario y otros menores altamente relacionados con él. Estos resultados sugieren una selección positiva sobre determinados FV, con movilizaciones horizontales puntuales, datos que corroboran los numerosos estudios que refieren un perfil de virulencia conservado en los aislados ST131 (118,177,179).

2. *E. coli*-ST131 de origen invasivo

Ante el predominio del clon *E. coli*-ST131 como causante de bacteriemias observado en los aislados productores de BLEE, se decidió estudiar este clon en toda la colección, detectando una prevalencia global de *E. coli*-ST131 de 17.6%. Esta prevalencia es superior a la encontrada por López-Cerero *et al.* en un amplio estudio con aislados clínicos de *E. coli* de un hospital español, donde la prevalencia encontrada fue de 12.5% (180). No obstante, este estudio solo buscó aislados O25b e incluía muestras de localizaciones distintas a la urinaria. Por el contrario, nuestros aislados provenían exclusivamente de bacteriemias de origen urinario y además estaban recogidas en 8 hospitales de regiones geográficas distintas. En otro estudio multicéntrico español que incluía aislados *E. coli* UPEC y ExPEC productores y no productores de BLEE se encontró una prevalencia de ST131 de 16%, similar a la encontrada en este estudio

(120). No se observaron diferencias significativas en la prevalencia de ST131 entre los hospitales participantes.

Dentro de la población de ST131 el subclón más prevalente fue el *H30Rx* (55%), aunque su prevalencia fue menor que la descrita por Dahbi *et al.* (62%), quizá porque el porcentaje de aislados *E. coli*-BLEE incluidos en ese estudio era mayor (38%) (120). Paradójicamente, la prevalencia del subclón *H30* no-Rx fue inferior a la prevalencia del subclón no-*H30*. Además, el análisis mediante PFGE mostró una mayor similitud entre aislados no-*H30* que entre los *H30* no-Rx. Esto podría sugerir que la expansión de los aislados *H30* en España se ha realizado principalmente a expensas del subclón *H30Rx*, bien diferenciado del subclón no-*H30*. La asociación observada dentro de los aislados no-*H30* del alelo *H41* con O16 y la prevalencia del alelo *H22* se ha descrito en otros estudios (25,120).

2.1. Resistencias a antibióticos y distribución de BLEE entre los subclones de *E. coli*-ST131

Tal y como está descrito en la literatura (115,181), nuestros aislados invasivos *E. coli*-ST131 estaban asociados con la resistencia a quinolonas (92% a ácido nalidíxico y 76% a ciprofloxacino). Esta asociación se debía a los aislados *H30*, que fueron significativamente más resistentes a quinolonas que los no-*H30*, con igual porcentaje entre aislados *H30Rx* y no-Rx. La asociación entre el clon ST131 y la resistencia a quinolonas se ha descrito desde la emergencia de este clon y podría ser una de las causas de su diseminación (73,111). Estudios moleculares posteriores han determinado que la emergencia del clon ST131 se produjo a partir de una cepa que adquirió resistencia a fluoroquinolonas mediante mutaciones específicas en *gyrA* y *parC* y que dio lugar al clado *H30* (114,115). Este hecho coincidió con la introducción de las fluoroquinolonas en la clínica (*circa* 1986) lo que probablemente otorgó una ventaja a este clado y explicaría su expansión.

La resistencia a antibióticos betalactámicos observada fue mayor en los aislados *H30*, debido probablemente a que el 28% (21/75) de los aislados fueron productores de BLEE (principalmente CTX-M-15), y todos ellos menos uno pertenecían al subclón *H30Rx*. Los aislados de los subclones no-*H30* y *H30* no-Rx presentaron porcentajes mínimos de resistencia a betalactámicos, lo que indica que la resistencia a estos antibióticos se debe mayoritariamente al subclón *H30Rx* y por tanto podrían ser una opción terapéutica si se descarta este linaje multirresistente.

Además, aunque las diferencias no fueron significativas, los aislados resistentes a amoxicilina-clavulánico y/o piperacilina-tazobactam fueron más frecuentes entre los aislados H30Rx. Este subclón se ha asociado a multirresistencia, agrupando aislados productores de BLEE y a la vez resistentes a amoxicilina-clavulánico (152,179). El mecanismo de resistencia a estos antibióticos suele ser enzimas tipo OXA-1 codificadas por genes localizados en el mismo plásmido que el gen codificante de BLEE (82).

Por otra parte, ningún aislado *E. coli*-ST131 presentó resistencia frente a los carbapenémicos estudiados. A pesar de que cada vez hay más estudios que demuestran que ese clon puede ser portador de carbapenemasas, generalmente de tipo KPC y por parte de aislados del clado H30 (63,91), no fue el caso en este estudio. Oteo *et al.* describieron una prevalencia de 8.4% de *E. coli* productores de carbapenemasas en un estudio multicéntrico español pero la recogida de muestras tuvo lugar en 2013 (91). Es posible que en 2010, fecha de recogida de los aislados de nuestro estudio, la prevalencia de carbapenemasas en España y en particular en *E. coli* fuese menor. En España el tipo de carbapenemasa más frecuente es el tipo VIM (87), aunque la reciente aparición de varios brotes hospitalarios de OXA-48, principalmente en *Klebsiella pneumoniae*, representa un nuevo cambio en la epidemiología de las carbapenemasas en España (91).

En cuanto a los aminoglucósidos, en general el fenotipo más frecuente fue el de sensibilidad a los 3 antibióticos analizados (fenotipo S), pero se observaron claras diferencias entre subclones. Los aislados H30Rx se asociaron con mayor resistencia a tobramicina y amicacina. Este fenotipo de resistencia solo se encontró entre estos aislados, lo que sugiere que podría ser debido a la presencia de la enzima AAC-6'-(Ib)-cr. Una vez más, es el subclón H30Rx el responsable de la multirresistencia asociada al clon ST131 (111,117), generalmente mediada por plásmidos, como se ha descrito para la enzima antes citada (172). No obstante, los porcentajes de resistencia a gentamicina y tobramicina fueron superiores en los aislados H30 independientemente de la producción de BLEE, lo que podría indicar otros mecanismos de resistencia a aminoglucósidos no relacionados con el plásmido portador del gen *bla_{BLEE}* y/o el gen *aac-6'-(Ib)-cr*.

2.2. Análisis del genotipo de virulencia

En *E. coli*-ST131 se ha observado la presencia de numerosos genes de virulencia, entre ellos los genes *yfcV*, *fyuA*, *usp* y *iutA*. Todos estos genes se han descrito también asociados al clon ST131 entre los aislados portadores de BLEE caracterizados en el apartado anterior. Este

predominio podría indicar que están implicados en la patogénesis de la bacteriemia de origen urinario, y por tanto su asociación con el clon ST131 explicaría el predominio de los aislados de este clon frente a los aislados no-ST131 observado entre los *E. coli*-BLEE.

Nuestros resultados son muy similares a los descritos en uno de los estudios internacionales que describieron por primera vez la aparición intercontinental del clon ST131 (73). Al igual que en ese estudio, los genes *sat*, *traT*, *kpsII*, *ompT*, *PAI*, *iutA*, *usp* y *fyuA* mostraron una prevalencia mayor del 70%, pero *iss* y *iroN* presentaron un porcentaje mucho menor. El gen *yfcV* no fue analizado en el estudio anteriormente descrito, pero se ha asociado a los aislados UPEC (31,128,136). Nuestros resultados muestran por primera vez la alta prevalencia de este gen entre los aislados *E. coli*-ST131 en España. Solo los genes *PAI*, *iha* y *sat* fueron significativamente más frecuentes en los aislados del clado *H30* que en los aislados no-*H30*, sin claras diferencias entre los subclones *H30Rx* y no-Rx. Estos resultados sugieren perfiles diferenciados formados por estos genes según clados, mientras que las diferencias entre subclones son mucho más sutiles, principalmente debido a las variantes de *kpsII* y *pap*.

De las variantes del antígeno capsular *kpsII* analizados, K1 y K5 se encontraron en poco aislados (4% y 11% respectivamente) en comparación con K2 (41%). Además, se apreció una tendencia a la segregación de variantes por subclones. Los aislados positivos para K1 fueron principalmente no-*H30*, mientras que los positivos para K2 fueron *H30Rx*. Más de la mitad de los aislados K5 eran *H30Rx* (62%) y el resto fueron *H30* no-Rx. Aunque algunos autores han observado una gran variabilidad de determinantes capsulares en el subclón *H30Rx* (182), se han observado resultados similares a los obtenidos en nuestro estudio en otros trabajos (179). Estos resultados sugieren que la prevalencia de estas variantes del gen *kpsII* en los aislados ST131 se debe a transmisión vertical dentro de cada subclón, aunque son necesarios más estudios para profundizar en la posible ventaja en la colonización o patogénesis que estos *FV* confieren.

Además de las diferencias en el antígeno capsular, se observó que los aislados del clado *H30* se diferenciaban en la codificación para fimbrias tipo P, que está asociadas a colonización e invasión del tracto urinario superior (32). Mientras los aislados *H30Rx* fueron positivos para alguna variante del operón *pap* entre un 34%-37% de los casos, ningún aislado *H30* no-Rx fue positivo. Estos resultados sugieren que el subclón *H30Rx* es más virulento que el subclón *H30* no-Rx, a pesar de pertenecer al mismo clado, y que este es incluso menos virulento que los aislados no-*H30*. Estudios moleculares han sugerido que la expansión del clon ST131 se ha producido a expensas de su clado *H30* (116) y que la adquisición de genes de virulencia fue

uno de los motivos claves de su éxito (115). No obstante, esos mismos estudios confirmaron que la expansión del clon ST131 englobó tanto a cepas *H30Rx* como no-Rx. Dada la diferencia en genes de virulencia observada en nuestros resultados, el genotipo de virulencia puede no haber sido el determinante de expansión que se había considerado. Otras posibles explicaciones son la pérdida de genes por parte del subclón *H30* no-Rx posterior a su expansión, o bien la presencia de otros genes en este subclón que compensan la falta de fimbrias P aumentando la virulencia por otras vías.

Por otro lado, ningún aislado presentó los genes *bmaE* o *papGI*. Esto corrobora los resultados de otros estudios en los que no se encontró ningún aislado con el gen *bmaE* entre los *E. coli* pertenecientes al filogrupo B2, al que pertenece el clon ST131 (12). El gen *papGI* no fue detectado en un estudio en el que se comparaba el genotipo de virulencia de aislados *E. coli* causantes de urosepsis, pielonefritis o bacteriemia de origen distinto al urinario (175).

Evaluando los FV en conjunto mediante el IV, se observó un contenido significativamente mayor en FV en los aislados *H30Rx* que en los no-Rx, y una tendencia a la significación en la diferencia de IV entre los aislados *H30Rx* y los no-*H30*. Estos resultados apoyan las observaciones anteriores de que los subclones dentro del clado *H30* muestran diferencias significativas en cuanto a FV que indican una evolución divergente. El mayor contenido en FV del subclón *H30Rx* es un dato bien conocido y que se reproduce en muchos de los estudios que lo analizan (18,179).

Prácticamente todos los aislados ST131 fueron clasificados como UPEC según el algoritmo descrito en el apartado de material y métodos. Por otro lado, mientras que el 93% de aislados *H30Rx* y el 86% de los no-*H30* se clasificaron como ExPEC, poco más de la mitad de aislados *H30* no-Rx (55%) se clasificaron como tal. Sin embargo, todos los aislados procedían de bacteriemias de origen urinario. Estos resultados sugieren que si bien el algoritmo para detectar UPEC tiene una alta especificidad desde el punto de vista del origen de la cepa, el algoritmo para ExPEC es algo inferior. No obstante, la clasificación como ExPEC estuvo claramente relacionada con un mayor contenido de FV, lo que explicaría el bajo porcentaje de aislados ExPEC entre los *H30* no-Rx. Por tanto, el *status* de ExPEC es un buen indicador de alto contenido en FV pero que no necesariamente se traduce en capacidad de producir infección invasiva, como muestra el 16% de aislados no-ExPEC causantes de BOU de nuestro estudio. En la literatura, los aislados ExPEC (y por tanto los UPEC) se han asociado frecuentemente con mayor contenido en FV (183) pero también se han encontrado como microbiota intestinal en individuos completamente sanos (15).

Paradójicamente, la clasificación en UPEC englobó a casi todos los aislados clasificados como ExPEC, cuando lo esperable sería lo contrario. Dado que el algoritmo para la detección de UPEC incluye el gen *chuA*, presente en todos los aislados del filogrupo B2 según la clasificación de Clermont *et al.* (10), no es de extrañar que los aislados pertenecientes al clon ST131 se clasifiquen más frecuentemente como UPEC. Tanto el gen *fyuA* como *yfcV* son también altamente prevalentes en estas cepas, mientras que la prevalencia del gen *vat* fue muy baja en estos aislados. Por otro lado, de los genes incluidos en el algoritmo para ExPEC (*kpsII*, *iutA*, *papA* y/o *papC*, *sfa/foc* y *afa/dra*) solo *kpsII* y *iutA* están consistentemente asociados a ST131 (73) y fueron altamente prevalentes en nuestra colección. Por el contrario, los genes del operón *pap* solo fueron frecuentes en los subclones no-*H30* y *H30Rx* y *sfa/foc* y *afa/dra* fueron positivos solo en el 3% y 24% de aislados respectivamente. Estos dos últimos genes muestran una prevalencia variable en aislados *E. coli*-ST131 según la literatura, lo que sugiere movilidad horizontal. Esta variabilidad en los diferentes genes de virulencia asociados con los algoritmos ExPEC y UPEC entre los aislados pertenecientes al clon ST131 podría explicar el menor porcentaje de aislados ExPEC respecto a los UPEC encontrado en este estudio.

El análisis de los perfiles de virulencia mostró una gran variabilidad, con más del 70% de los perfiles representados por solo un aislado. No obstante, los aislados *H30Rx*, especialmente los portadores de CTX-M-15, mostraron menor diversidad de perfiles. Además, los perfiles más frecuentes correspondían mayoritariamente con aislados de este subclón. Otros autores han observado perfiles característicos en el clon ST131 y los han asociado a pulsotipos frecuentes dentro de este. Blanco *et al.* definió estos perfiles como virotipos y determinó un algoritmo para definirlos (119). Estudios posteriores encontraron una buena correlación entre el análisis de clonalidad mediante PFGE y los perfiles de virulencia, lo que sugiere una base clonal para las diferencias de perfiles de FV entre los subclones. Nuestros resultados apoyan esa teoría al menos en cuanto al subclón *H30Rx* se refiere.

3. Modelo murino de virulencia experimental

El uso de un modelo de ratón para evaluar la virulencia experimental de aislados ExPEC se encuentra bien establecido (13). Con diversas modificaciones, varios trabajos han utilizado el modelo murino diseñado por Picard *et al.* para evaluar la virulencia de aislados *E. coli*-ST131 con resultados diversos (72,118,125).

Para este estudio se seleccionaron todos los aislados *E. coli*-BLEE ST131 y 27 aislados *E. coli*-ST131 no productores de BLEE. Esta selección de cepas mostró características microbiológicas en consonancia con lo encontrado en apartados anteriores. La mayoría de aislados

pertenecían al subclón *H30Rx*, en particular los productores de BLEE. Las características de sensibilidad y genotipo de virulencia fueron las descritas anteriormente.

En cuanto a la virulencia experimental observada, se observó una letalidad muy variada, aunque la mediana global fue alta. Estos resultados apoyarían lo observado por estudios previos que refieren una mayor letalidad del clon ST131 en este modelo experimental (72,119). Otros estudios han referido también una letalidad muy variada entre aislados pertenecientes al clon ST131 (118,125). Se observó un índice de letalidad (IL) alto entre los aislados del subclón *H30Rx*, pero paradójicamente, los aislados no-*H30* presentaron un IL mayor que los *H30* no-Rx, al contrario de lo que sería esperable dada la relación filogenética de los subclones pertenecientes al clado *H30*. Esta diferencia entre los distintos subclones podría explicar por qué en estudios comparativos entre aislados ST131 y no-ST131 no se han encontrado diferencias significativas en cuanto a letalidad. Es posible que sean los aislados *H30Rx* los responsables de la mayor letalidad atribuida al clon ST131 en conjunto. Este subclón se ha asociado a casos de sepsis con mayor frecuencia que el resto de subclones (113).

Solo dos genes se encontraron asociados a una mayor virulencia experimental: la variante K2 del gen *kpsII* y el gen *pap*, entendiendo este como positivo si alguna de sus variantes (*papA*, *papC*, *papEF* o *papG*) estaba presente en el aislado. Sin embargo, ninguna de las variantes del operón *pap* en concreto ni el gen *kpsII* como operón se asoció con una mayor letalidad. Estos resultados contradicen en parte lo expuesto por Johnson *et al.* en su estudio del genotipo de virulencia de aislados ExPEC y la relación con su letalidad en un modelo murino similar al utilizado en esta tesis. En este estudio los autores encontraron relación entre letalidad y variantes de *kpsII* y *pap*, pero fueron K1, *papA* y *papGIII* los genes asociados a mayor letalidad, además del gen *vat* (125). Otros estudios sin embargo han sugerido que K2 podría conferir mayor letalidad (120).

La correlación observada entre el IV y el IL fue débil, en contra de lo que sería esperable dado que los aislados *H30Rx* presentaban tanto mayor IV como un alto IL. Existen resultados dispares en la literatura. Mientras un estudio con aislados ExPEC tanto ST131 como no-ST131 encontró relación entre el IV y la letalidad en un modelo murino (125,128), otros estudios no encontraron esa asociación entre aislados *E. coli*-O16-ST131 (120,154).

Por otro lado, la clasificación en ExPEC fue un buen marcador de letalidad de nuestros aislados en el modelo murino. Estos resultados corroboran los encontrados por otros estudios, en los que la clasificación por ExPEC se asoció con letalidad tanto entre aislados ST131 como

no ST131 (120,125). Paradójicamente, los aislados ExPEC presentaron un mayor IV independientemente del subclón, lo que indicaría una posible correlación positiva entre IL e IV, correlación que no se encontró. No obstante, los mayores IV e IL observados en cepas ExPEC explicarían los resultados del estudio de Johnson *et al.* en los que sí se encontró esa asociación, ya que todos los aislados incluidos en ese estudio eran ExPEC (125). Dado que los dos únicos FV asociados a un mayor IL están relacionados con el algoritmo que describe ExPEC, estos resultados sugieren que son FV específicos y/o la combinación entre ellos y no el acúmulo de FV en una cepa lo que confiere mayor virulencia experimental. Otros autores han sugerido esta teoría (16,118).

En resumen, la virulencia experimental de los aislados analizados en este estudio fue muy variable, pero se encontraron asociaciones entre el IL y determinados FVs y sus combinaciones. Es interesante destacar que los aislados analizados provenían todos de infecciones sistémicas establecidas. A falta de datos epidemiológicos y clínicos de los pacientes que sufrieron estas infecciones y que hagan suponer un estado inmunológico que facilite a cepas menos virulentas causar infección, se puede suponer que estos aislados ya han probado su virulencia, al ser capaces de causar urosepsis. Y sin embargo, la virulencia experimental observada no es consistente en todas las cepas, lo que concuerda con la observación de otros autores de que cepas de origen invasivo no necesariamente muestran mayor letalidad en los modelos experimentales (128).

Las variaciones observadas en el modelo animal podrían deberse a otros factores. Para empezar, el modelo utilizado no evalúa las etapas de la infección urinaria, ya que se inocula la cepa a estudio a los ratones de forma subcutánea en la zona cervical. Por tanto, características que podrían suponer una mayor capacidad de producir infección (adherencia al uroepitelio, producción de toxinas o síntesis de fimbrias) no son apropiadamente evaluadas en este modelo y podrían sesgar los resultados. Por otro lado, el hecho de no incluir aislados no-ST131 en el estudio de virulencia experimental limita las conclusiones que se pueden extraer de los resultados al no poder comprobar si el clon ST131 o alguno de sus subclones presenta mayor virulencia experimental que los aislados que no pertenecen a este clon. Además, en estos modelos no es posible evaluar la influencia de factores procedentes del hospedador. En un estudio en el que se analizó la virulencia experimental de cepas productoras de BOU y en el que se incluyeron datos clínicos de los pacientes que proporcionaron las cepas se observó que la virulencia experimental coincidía tanto con características bacteriana como del hospedador

(128). Estos resultados sugieren que la letalidad es resultado de la interacción de múltiples factores, tanto de la cepa como del hospedador.

4. Aislados de *E. coli*-BLEE-ST131 no invasivos

Numerosos estudios han evaluado la prevalencia del clon ST131 en colecciones de aislados clínicos (6,18,25) pero se disponen de poco datos acerca de su prevalencia como colonizador. Varios autores han propuesto que el tracto intestinal es un reservorio de cepas capaces de producir infección urinaria (15,183) y por tanto el clon ST131 no sería una excepción. Una de las teorías propuestas para explicar su diseminación es que posee FV que facilitan la colonización del intestino en detrimento de otras cepas (125). La asociación del clon ST131 con la diseminación mundial de las BLEE tipo CTX-M (71) hace de su estudio una herramienta muy útil para conocer la prevalencia de un problema considerado de amenaza para la salud pública por la OMS (65).

Se observó una prevalencia de *E. coli*-BLEE-ST131 del 20% en las muestras rectales de pacientes hospitalizados, algo inferior a la prevalencia del 26% encontrada por Birgy *et al.* en un estudio longitudinal francés de prevalencia de enterobacterias productoras de BLEE en niños menores de 2 años desde 2010 a 2015 (184). En un estudio similar anterior estos mismos autores encontraron una prevalencia mucho más baja (9%) (139) lo que sugiere que el clon ST131 ha aumentado progresivamente su prevalencia como colonizador a la par que se ha visto incrementada su prevalencia entre aislados clínicos. Esta progresión se observó también entre aislados resistentes a fluoroquinolonas procedentes de colonización intestinal de pacientes hospitalizados en hospitales universitarios de EE.UU entre 2002 y 2004, observándose un incremento en la prevalencia del clon ST131 desde un 8% a un 50% (185). La prevalencia del clon ST131 fue mayor en un estudio de colonización por enterobacterias multirresistentes, donde se encontró un 38% de aislados del clon ST131 entre los *E. coli* (186). Igualmente, el clon ST131 se encontró en el 41% de los aislados *E. coli* resistentes a cefalosporinas de amplio espectro recogidos en cinco centros de rehabilitación de cuatro países (161). En general, la prevalencia de aislados ST131 colonizadores descrita en la literatura es muy variable y refleja las diferencias en poblaciones estudiadas. Son necesarios estudios epidemiológicos más completos para definir con mayor exactitud la prevalencia de este clon en la microbiota intestinal humana.

Aunque el clado H30 fue predominante entre los aislados estudiados, los tres subclones mostraron porcentajes similares (32% de aislados no-H30 y H30 no-Rx y 36% de aislados H30Rx). Muy pocos estudios han analizado la estructura a nivel de subclón de los aislados

ST131 fecales. En el estudio francés antes referido de colonización en niños se observó el predominio de los aislados O25b-H30 (77%) frente a los O16-H41 (23%) (184) y en el estudio de EE.UU todos los aislados ST131 pertenecían al clado H30, de los cuales solo el 33% eran aislados H30Rx (185). Nuestros resultados sugieren que así como el subclón H30Rx se asocia a producción de infecciones invasivas y se encuentra mayoritariamente en los estudios con aislados clínicos (6,113), todos los subclones de ST131 tienen las mismas capacidades de colonización intestinal.

Se observaron diferencias importantes en la prevalencia de *E. coli*-ST131 entre los distintos hospitales incluidos en el estudio. Fue particularmente llamativa la prevalencia de los aislados H30Rx en el hospital de Madrid y la de los aislados H30 no-Rx en Ginebra. Solo un estudio de prevalencia de colonización por ST131 resistente a cefalosporinas de amplio espectro en la literatura incluye cepas españolas (161) y observó una prevalencia de 25% de aislados ST131 pero no se especificó el subclón. Igualmente, un 26% de aislados recogidos en un estudio suizo sobre colonización de pacientes de atención primaria por enterobacterias productoras de BLEE pertenecían al clon ST131 (187) pero tampoco en este caso se tiparon los subclones. Nuestros resultados sugieren que subclones distintos predominan en regiones geográficas distintas y una posible explicación es la existencia de distinta presión selectiva en cada país por diferencias en el consumo de antibióticos.

Además, aunque las diferencias no fueron totalmente significativas, se observó un mayor número de aislados del subclón no-H30 en Berlín y Utrecht. En una revisión de la literatura no se encontraron estudios de prevalencia de colonización por *E. coli*-ST131 en Alemania u Holanda que analizaran la estructura poblacional a nivel de subclón, aunque en general se observó una mayor prevalencia de aislados del clado H30 (188–190). Por tanto, esta es la primera descripción de una mayor prevalencia del subclón no-H30 entre aislados *E. coli*-BLEE de colonización Alemania y Países Bajos.

4.1. Estudio de sensibilidad a antibióticos y caracterización de BLEEs

No se observaron grandes diferencias en las resistencias a antibióticos entre los aislados *E. coli*-ST131 y no-ST131, aunque esta comparación está limitada por el escaso número de aislados *E. coli*-BLEE no-ST131 incluidas. Es de destacar el porcentaje de aislados ST131 resistentes a cefepima (55%), muy inferior al observado en los aislados ST131-BLEE productores de BOU (71%). Por otro lado, los aislados no-ST131 mostraron menor porcentaje de resistencia a cefepima entre la población invasiva (44%) que la no invasiva (90%). Estas

diferencias fueron particularmente marcadas en los aislados no-ST131 no invasivos de Berlín y Utrecht. Es probable que exista algún factor específico de los aislados de esos hospitales que explique esa prevalencia, como puede ser las diferencias en el tipo de BLEE codificada o sus niveles de expresión, así como la existencia de otros mecanismos de resistencia diferentes a los presentes en los aislados productores de BOU, como por ejemplo alteraciones de la permeabilidad o producción de OXA-1 (169).

Los aislados de cada subclón de *E. coli*-ST131 mostraron características similares en cuanto a sensibilidad a las observadas en los aislados invasivos. En comparación con los otros subclones, el subclón *H30* no-Rx mostró un menor porcentaje de aislados resistentes a todos los antibióticos excepto a quinolonas y cotrimoxazol, mientras que el subclón *H30*Rx agrupó aislados con mayor porcentaje de resistencia a todas las familias de antibióticos. La alta prevalencia de aislados *H30*Rx en Madrid y de *H30* no-Rx en Ginebra supuso que los aislados con mayor tasa de resistencias a la mayoría de antibióticos se acumularan en Madrid mientras que los aislados de Ginebra mostraron bajos porcentajes de resistencia en general. También es de destacar la alta prevalencia de aislados resistentes a ceftazidima y cefepima en Berlín tanto entre los aislados ST131 como los no-ST131, a pesar de que el subclón más común en ese hospital fue el no-*H30*. Estas diferencias podrían explicarse por el tipo de enzima asociada a cada subclón en los distintos hospitales del estudio.

Las diferencias geográficas marcaron también la caracterización de las BLEEs. Aunque la enzima CTX-M-15 fue la más prevalente entre los aislados *E. coli*-ST131 de colonización al igual que en los invasivos, la enzima CTX-M-27 fue la segunda en frecuencia, y la más frecuente en Ginebra, a pesar de no haberse detectado en aislados invasivos. Esta enzima se ha detectado ya en otros estudios entre aislados ST131 (133,161,168,191,192) y se ha detectado un aumento en países asiáticos (134,193). En los aislados *E. coli*-no-ST131 estudiados, por el contrario, se observó un porcentaje mucho menor de aislados productores de CTX-M-27, siendo más frecuentes en estos aislados las enzimas CTX-M-14 (27%) y CTX-M-15 (23%). Entre los aislados *E. coli*-ST131 la enzima CTX-M-27 se encontró asociada al subclón *H30* no-Rx y un menor porcentaje de resistencias a betalactámicos (incluyendo amoxicilina-clavulánico y piperacilina-tazobactam) y aminoglucósidos, lo que explica los bajos porcentajes de resistencia a estos antibióticos observados tanto en el subclón *H30* no-Rx como en Ginebra. Estos resultados sugieren que la CTX-M-27 se ha introducido en Europa, probablemente desde Asia, y se está expandiendo gracias al subclón *H30* no-Rx, de manera similar a como lo ha hecho la CTX-M-15 con el subclón *H30*Rx. La ausencia de multirresistencia en este subclón podría

suponer una desventaja frente a otras cepas más resistentes, lo que explicaría su ausencia entre aislados invasivos.

Igualmente, se encontró una asociación importante entre el subclón *H30Rx* y la producción de la enzima CTX-M-15, observándose un predominio muy marcado de ambos entre los aislados *E. coli*-BLEE ST131 de Madrid. Estos resultados sugieren que este subclón multirresistente tiene un reservorio en el intestino de pacientes hospitalizados, lo que explicaría el predominio observado entre los aislados *E. coli*-BLEE de origen invasivo del subclón CTX-M-15-*H30Rx*, ya que el 41% (16/39) de los aislados productores de BLEE detectados procedían de hospitales de Madrid.

La explicación a estas variaciones geográficas probablemente sea multifactorial. Un posible factor influyente es la presión selectiva ejercida por el uso de antibióticos tanto en terapéutica humana como en veterinaria. Las diferencias en políticas y consumo de antibióticos en los distintos países podría ser la causa de la selección de un subclón u otro. Se ha alertado de un incremento del consumo de amoxicilina-clavulánico en España que se ha asociado al incremento de las tasas de resistencia a este antibiótico (81) lo que podría seleccionar para los aislados del subclón *H30Rx*. En un estudio ambiental en Suiza de prevalencia de enterobacterias productoras de BLEE se detectó CTX-M-27-ST131 en una planta de reciclaje de agua destinada a riego de cultivos (194). Se ha descrito la presencia del clon ST131 en alimentos de consumo humano en varios países incluido Suiza (25,136,195), por lo que podría representar una fuente de colonización humana. Estos hechos refuerzan la importancia de estudios epidemiológicos para detectar la presencia de estos clones de alto riesgo e impedir su diseminación.

4.2. Análisis del genotipo de virulencia

En cuanto a virulencia, los genotipos fueron muy similares a los observados entre aislados invasivos, lo que apoya la teoría de que las cepas UPEC tienen un reservorio en el intestino (15) y los factores de factores de virulencia son probablemente factores de colonización y persistencia (196). Las diferencias observadas en cada subclón respecto a variantes del antígeno capsular y de las fimbrias P son interesantes, y podrían explicar las diferencias de patogenicidad de los subclones. Además, podrían ser dianas potenciales para el desarrollo de vacunas frente a la ITU.

Las variaciones en el contenido de FV entre aislados no-invasivos de los distintos hospitales se debían principalmente al predominio de un determinado subclón en distintas zonas

geográficas. Así, la mayor prevalencia de aislados portadores de la variante K2 del antígeno capsular en Madrid se debe al gran porcentaje de cepas de ese hospital que se clasifican en el subclón *H30Rx*, el cual está asociado con esa variante antigénica. La alta tasa de colonización en Madrid por este subclón, que presenta un alto contenido de FV, podría explicar su predominio entre los aislados invasivos, aunque el papel que desempeñan estos FV no está bien definido.

El IV global fue muy variable, como ocurría en los aislados invasivos, pero en este caso no se observaron diferencias entre subclones lo que podría indicar que el subclón *H30Rx* no es necesariamente más virulento que el resto, y su presencia predominante como causante de BOU se debe a otros factores (124,128). Por el contrario, la clasificación en UPEC y ExPEC fue buen predictor de un mayor contenido en FV tanto en aislados *E. coli*-ST131 como no-ST131. Al igual que ocurría en los aislados invasivos, un mayor número de aislados fueron UPEC que ExPEC y un 15% de aislados mostraron resultados discordantes (UPEC pero no-ExPEC o viceversa) lo que indica que estas definiciones no son completamente específicas en cuanto al origen del aislado.

La variabilidad de perfiles de virulencia fue mayor entre los aislados de colonización que en los invasivos. Curiosamente, fueron los aislados *H30* no-Rx los que parecieron mostrar una menor diversidad de perfiles, al contrario que en los aislados invasivos, donde fue el subclón *H30Rx* el que mostró menor diversidad. Son necesarios más estudios para evaluar el papel de estos perfiles en la colonización del intestino y si realmente los perfiles encontrados en los aislados invasivos son más letales que los encontrados en los colonizadores.

CONCLUSIONES

“Quiero misericordia y no sacrificios, conocimiento de Dios más que holocaustos.”

Oseas 6:6

1. La prevalencia de *Escherichia coli* productor de BLEE entre los aislados causantes de bacteriemia de origen urinario (8.6%) es similar a la encontrada en otros estudios españoles. Estos aislados se acompañan de altas tasas de resistencia a otras familias de antibióticos, como quinolonas, aminoglucósidos y cotrimoxazol.
2. CTX-M-15 es la enzima detectada con mayor frecuencia (54%) entre los aislados de *E. coli*-BLEE causantes de bacteriemia de origen urinario, seguida de CTX-M-14.
3. El análisis de la estructura poblacional de *E. coli*-BLEE demostró la expansión del clon de alto riesgo ST131 y en particular de su subclón H30Rx como causante de bacteriemias de origen urinario. ST131-H30Rx se ha asociado con la producción de CTX-M-15 y resistencia a las combinaciones de penicilinas con inhibidores de betalactamasas, quinolonas y a los aminoglucósidos (tobramicina y ampicilina). Por el contrario, otros clones de *E. coli*-BLEE presentaron mayor diversidad de enzimas con predominio de CTX-M-14.
4. El cribado del clon ST131 en toda la colección de *E. coli* de origen invasivo identificó su presencia tanto en cepas productoras como no productoras de BLEE, y fue el causante del 17.6% de los episodios de bacteriemias de origen urinario. Entre la población de *E. coli*-ST131 no productor de BLEE también se observó un predominio del subclón H30Rx, mientras que las poblaciones H30 no-Rx y no-H30 fueron minoritarias.
5. El análisis mediante PFGE identificó la presencia de un clúster (Clúster A) que agrupó todas las cepas de *E. coli*-ST131-H30Rx productoras de CTX-M-15, indicando la diseminación interhospitalaria de un particular linaje de *E. coli*-ST131.
6. En general, los aislados *E. coli*-BLEE de origen invasivo presentan un alto contenido en genes de virulencia, agrupados en un alto número de perfiles, con la excepción de *E. coli*-ST131 H30Rx. Esta observación, indicaría la posible selección de un linaje epidémico de H30Rx en nuestro país (Clúster A) con perfiles de virulencia característicos.
7. Las diferencias de prevalencia de los distintos factores de virulencia observadas entre los subclones de *E. coli*-ST131, especialmente las relacionadas con el determinante del antígeno capsular, podrían ayudar a sospechar la presencia de los diferentes subclones, orientando su tratamiento empírico.

8. La clasificación en ExPEC y UPEC de *E. coli* es un buen marcador del alto contenido en genes de virulencia, pero no se corresponde con el origen esperado del aislado.
9. El modelo murino de sepsis utilizado en este trabajo no mostró una buena correlación entre el índice de virulencia y la virulencia experimental y no hubo diferencias significativas entre subclones que expliquen un mayor predominio de un subclón entre aislados invasivos en base a su contenido en factores de virulencia.
10. La presencia del clon de alto riesgo *E. coli*-BLEE-ST131 en el tracto intestinal de pacientes hospitalizados pone de relevancia la importancia de este nicho como reservorio y resalta la importancia de las estrategias de vigilancia de portadores de enterobacterias multirresistentes.
11. A diferencia de lo observado en los aislados invasivos, la estructura poblacional de los aislados de colonización no mostró diferencias de prevalencia entre los diferentes subclones de *E. coli*-ST131. No obstante, se observaron importantes variaciones geográficas que afectaron también a los distintos tipos de BLEE; mientras que en Madrid predominaron los aislados CTX-M-15-*H30*Rx, en Ginebra predominaron los aislados CTX-M-27-*H30* no-Rx.
12. CTX-M-27, enzima más prevalente hasta ahora en países asiáticos, fue la segunda BLEE más frecuente en nuestro estudio. El análisis por PFGE mostró que su emergencia en Europa podría estar ligada a la diseminación de una subpoblación de *H30* no-Rx.
13. Los aislados no invasivos *H30* no-Rx mostraron una menor variabilidad de perfiles de virulencia que los aislados invasivos del mismo subclón. Este hecho indicaría la emergencia de un linaje colonizador dentro de este subclón con perfiles de virulencia característicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Shulman ST, Friedmann HC, Sims RH. Theodor Escherich: The First Pediatric Infectious Diseases Physician? *Clin Infect Dis*. 2007 Oct 15;45(8):1025–9.
2. Johanson WG, Pierce AK, Sanford JP. Changing pharyngeal bacterial flora of hospitalized patients. Emergence of gram-negative bacilli. *N Engl J Med*. 1969 Nov 20;281(21):1137–40.
3. Raz R, Stamm WE. A controlled trial of intravaginal estriol in postmenopausal women with recurrent urinary tract infections. *N Engl J Med*. 1993;329(11):753–6.
4. Gupta K, Hillier SL, Hooton TM, Roberts PL, Stamm WE. Effects of contraceptive method on the vaginal microbial flora: a prospective evaluation. *J Infect Dis*. 2000;181(2):595–601.
5. Johnson JR, Russo T a. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol*. 2005 Oct;295(6–7):383–404.
6. Vila J, Sáez-López E, Johnson JR, Römling U, Dobrindt U, Cantón R, et al. *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. Gerdes K, editor. *FEMS Microbiol Rev*. 2016 Jul 1;40(4):437–63.
7. Chaudhuri RR, Henderson IR. The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. *Infect Genet Evol*. 2012 Mar;12(2):214–26.
8. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2(2):123–40.
9. Russo TA, Johnson JR. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis*. 2000 May;181(5):1753–4.
10. Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylogroups. *Environ Microbiol Rep*. 2013 Feb;5(1):58–65.
11. Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2010 Mar;8(3):207–17.

12. Johnson JR, Stell AL. Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise. *J Infect Dis.* 2000 Jan;181(1):261–72.
13. Picard B, Garcia JS, Gouriou S, Duriez P, Brahimi N, Bingen E, et al. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect Immun.* 1999 Feb;67(2):546–53.
14. Bailey JK, Pinyon JL, Anantham S, Hall RM. Distribution of human commensal *Escherichia coli* phylogenetic groups. *J Clin Microbiol.* 2010 Sep 1;48(9):3455–6.
15. Yamamoto S, Tsukamoto T, Terai A, Kurazono H, Takeda Y, Yoshida O. Genetic evidence supporting the fecal-perineal-urethral hypothesis in cystitis caused by *Escherichia coli*. *J Urol.* 1997 Mar;157(3):1127–9.
16. Johnson JR, Clermont O, Menard M, Kuskowski MA, Picard B, Denamur E. Experimental mouse lethality of *Escherichia coli* isolates, in relation to accessory traits, phylogenetic group, and ecological source. *J Infect Dis.* 2006 Oct 15;194(8):1141–50.
17. Johnson JR, Murray a. C, Gajewski A, Sullivan M, Snippes P, Kuskowski M a., et al. Isolation and Molecular Characterization of Nalidixic Acid-Resistant Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* from Retail Chicken Products. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 Jul 1;47(7):2161–8.
18. Banerjee R, Johnson JR. A New Clone Sweeps Clean: The Enigmatic Emergence of *Escherichia coli* ST131. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 May 27;(May):1–37.
19. Hacker J, Kaper JB. Pathogenicity Islands and the Evolution of Microbes. *Annu Rev Microbiol.* 2000 Oct;54(1):641–79.
20. Gal-Mor O, Finlay BB. Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. *Cell Microbiol.* 2006 Nov;8(11):1707–19.
21. Johnson JR, Russo T a. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* : “The other bad E coli .” *J Lab Clin Med.* 2002 Mar;139(3):155–62.
22. Ewers C, Li G, Wilking H, Kiessling S, Alt K, Antão E-M, et al. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? *Int J Med Microbiol.* 2007 Jun 11;297(3):163–76.

23. García-hernández AM, García-vázquez E, Hernández-torres A, Ruiz J, Yagüe G. Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. Rev Española Quimioter. 2011;24(2):57–66.
24. de Kraker MEA, Jarlier V, Monen JCM, Heuer OE, van de Sande N, Grundmann H. The changing epidemiology of bacteraemias in Europe: trends from the European Antimicrobial Resistance Surveillance System. Clin Microbiol Infect. 2013 Sep;19(9):860–8.
25. Nicolas-Chanoine M-HH, Bertrand X, Madec J-YY. *Escherichia coli* ST131, an Intriguing Clonal Group. Clin Microbiol Rev. 2014;27(3):543–74.
26. Spurbeck RR, Dinh PC, Walk ST, Stapleton AE, Hooton TM, Nolan LK, et al. *Escherichia coli* isolates that carry vat, fyuA, chuA, and yfcV efficiently colonize the urinary tract. Infect Immun. 2012 Dec;80(12):4115–22.
27. Pitout JDD. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: A Combination of Virulence with Antibiotic Resistance. Front Microbiol. 2012;3(JAN):9.
28. Foxman B. The epidemiology of urinary tract infection. Nat Rev Urol. 2010 Dec;7(12):653–60.
29. Alós JI. Epidemiology and etiology of urinary tract infections in the community. Antimicrobial susceptibility of the main pathogens and clinical significance of resistance. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2005 Dec;23 Suppl 4(Supl 4):3–8.
30. Subashchandrabose S, Mobley HLT. Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli*. Microbiol Spectr. 2015 Aug 6;3(4).
31. Spurbeck RR, Stapleton AE, Johnson JR, Walk ST, Hooton TM, Mobley HLT. Fimbrial Profiles Predict Virulence of Uropathogenic *Escherichia coli* Strains: Contribution of Ygi and Yad Fimbriae. Infect Immun. 2011 Dec 1;79(12):4753–63.
32. Johnson JR. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. Clin Microbiol Rev. 1991 Jan;4(1):80–128.
33. Saulino ET, Thanassi DG, Pinkner JS, Hultgren SJ. Ramifications of kinetic partitioning on usher-mediated pilus biogenesis. EMBO J. 1998 Apr 15;17(8):2177–85.

34. Antão E-M, Wieler LH, Ewers C. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Pathog.* 2009 Dec 10;1(1):22.
35. Stins MF, Prasadarao N V, Ibric L, Wass CA, Luckett P, Kim KS. Binding characteristics of S fimbriated *Escherichia coli* to isolated brain microvascular endothelial cells. *Am J Pathol.* 1994 Nov;145(5):1228–36.
36. Dozois CM, Clément S, Desautels C, Oswald E, Fairbrother JM. Expression of P, S, and F1C adhesins by cytotoxic necrotizing factor 1-producing *Escherichia coli* from septicemic and diarrheic pigs. *FEMS Microbiol Lett.* 1997 Jul 15;152(2):307–12.
37. Bauer RJ, Zhang L, Foxman B, Siitonen A, Jantunen ME, Saxen H, et al. Molecular Epidemiology of 3 Putative Virulence Genes for *Escherichia coli* Urinary Tract Infection— *usp*, *iha*, and *iroN* *E. coli*. *J Infect Dis.* 2002 May 15;185(10):1521–4.
38. Johnson JR, Russo TA, Tarr PI, Carlino U, Bilge SS, Vary JC, et al. Molecular epidemiological and phylogenetic associations of two novel putative virulence genes, *iha* and *iroN*(*E. coli*), among *Escherichia coli* isolates from patients with urosepsis. *Infect Immun.* 2000 May;68(5):3040–7.
39. Porcheron G, Garénaux A, Proulx J, Sabri M, Dozois CM. Iron, copper, zinc, and manganese transport and regulation in pathogenic Enterobacteria: correlations between strains, site of infection and the relative importance of the different metal transport systems for virulence. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013;3:90.
40. Schubert S, Rakin A, Karch H, Carniel E, Heesemann J. Prevalence of the “high-pathogenicity island” of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. *Infect Immun.* 1998 Feb;66(2):480–5.
41. Maroncle NM, Sivick KE, Brady R, Stokes F-E, Mobley HLT. Protease activity, secretion, cell entry, cytotoxicity, and cellular targets of secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 2006 Nov 1;74(11):6124–34.
42. Jann K, Jann B. Capsules of *Escherichia coli*, expression and biological significance. *Can J Microbiol.* 1992 Jul;38(7):705–10.
43. Whitfield C. Biosynthesis and Assembly of Capsular Polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu Rev Biochem.* 2006 Jun;75(1):39–68.

44. Kaczmarek A, Budzynska A, Gospodarek E. Prevalence of genes encoding virulence factors among *Escherichia coli* with K1 antigen and non-K1 *E. coli* strains. *J Med Microbiol*. 2012 Oct 1;61(Pt 10):1360–5.
45. Braun V, Pilsel H, Gross P. Colicins: structures, modes of action, transfer through membranes, and evolution. *Arch Microbiol*. 1994;161(3):199–206.
46. Šmajš D, Micenková L, Šmarda J, Vrba M, Ševčíková A, Vališová Z, et al. Bacteriocin synthesis in uropathogenic and commensal *Escherichia coli*: colicin E1 is a potential virulence factor. *BMC Microbiol*. 2010 Nov 15;10(1):288.
47. Waters VL, Crosa JH. Colicin V virulence plasmids. *Microbiol Rev*. 1991 Sep;55(3):437–50.
48. Fernandez-Beros ME, Kissel V, Lior H, Cabello FC. Virulence-related genes in ColV plasmids of *Escherichia coli* isolated from human blood and intestines. *J Clin Microbiol*. 1990 Apr;28(4):742–6.
49. Binns MM, Mayden J, Levine RP. Further characterization of complement resistance conferred on *Escherichia coli* by the plasmid genes traT of R100 and iss of ColV,I-K94. *Infect Immun*. 1982 Feb;35(2):654–9.
50. He XL, Wang Q, Peng L, Qu Y-R, Puthiyakunnon S, Liu X-L, et al. Role of uropathogenic *Escherichia coli* outer membrane protein T in pathogenesis of urinary tract infection. *Pathog Dis*. 2015 Apr 1;73(3).
51. Brannon JR, Thomassin J-L, Desloges I, Gruenheid S, Le Moual H. Role of uropathogenic *Escherichia coli* OmpT in the resistance against human cathelicidin LL-37. *FEMS Microbiol Lett*. 2013 Aug;345(1):64–71.
52. Zhao T, Fang X, Liu X, Peng L, Long M, Zhang W, et al. Construction and functional studies of uropathogenic *E. coli* strains with ompT gene knockout. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2012 Jun;32(7):956–9.
53. Hacker J, Bender L, Ott M, Wingender J, Lund B, Marre R, et al. Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur in vitro and in vivo in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates. *Microb Pathog*. 1990 Mar;8(3):213–25.
54. Kanamaru S, Kurazono H, Nakano M, Terai A, Ogawa O, Yamamoto S. Subtyping of

- uropathogenic *Escherichia coli* according to the pathogenicity island encoding uropathogenic-specific protein: comparison with phylogenetic groups. *Int J Urol*. 2006 Jun;13(6):754–60.
55. Lai YM, Zaw MT, Shamsudin SB, Lin Z. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method for differentiation of uropathogenic specific protein gene types. *J Microbiol Immunol Infect*. 2016 Aug;49(4):591–4.
56. Ostblom A, Adlerberth I, Wold AE, Nowrouzian FL. Pathogenicity Island Markers, Virulence Determinants *malX* and *usp*, and the Capacity of *Escherichia coli* To Persist in Infants' Commensal Microbiotas. *Appl Environ Microbiol*. 2011 Apr 1;77(7):2303–8.
57. Rodríguez-Baño J, Picón E, Gijón P, Hernández JR, Ruíz M, Peña C, et al. Community-onset bacteremia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: risk factors and prognosis. *Clin Infect Dis*. 2010 Jan 1;50(1):40–8.
58. Rodríguez-Baño J, Picón E, Gijón P, Hernández JR, Cisneros JM, Peña C, et al. Risk factors and prognosis of nosocomial bloodstream infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*. 2010 May;48(5):1726–31.
59. Peralta G, Sánchez MB, Garrido JC, De Benito I, Cano ME, Martínez-Martínez L, et al. Impact of antibiotic resistance and of adequate empirical antibiotic treatment in the prognosis of patients with *Escherichia coli* bacteraemia. *J Antimicrob Chemother*. 2007 Oct;60(4):855–63.
60. Schwaber MJ, Carmeli Y. Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother*. 2007 Nov;60(5):913–20.
61. Johnson JR, Johnston B, Clabots C, Kuskowski MA, Castanheira M. *Escherichia coli* sequence type ST131 as the major cause of serious multidrug-resistant *E. coli* infections in the United States. *Clin Infect Dis*. 2010 Aug 1;51(3):286–94.
62. Paño Pardo JR, Villar SS, Ramos Ramos JC, Pintado V. Infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: Risk factors, clinical features and prognosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014 Dec;32:41–8.
63. Peirano G, Bradford PA, Kazmierczak KM, Badal RE, Hackel M, Hoban DJ, et al. Global Incidence of Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* ST131. *Emerg Infect Dis*. 2014

- Nov;20(11):1928–31.
64. Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev.* 2009 Oct;22(4):664–89.
 65. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JDD. *Escherichia coli* ST131: The Quintessential Example of an International Multiresistant High-Risk Clone. In: *Advances in applied microbiology.* 2015. p. 109–54.
 66. Schito GC, Naber KG, Botto H, Palou J, Mazzei T, Gualco L, et al. The ARESC study: an international survey on the antimicrobial resistance of pathogens involved in uncomplicated urinary tract infections. *Int J Antimicrob Agents.* 2009 Nov;34(5):407–13.
 67. Cullen IM, Manecksha RP, McCullagh E, Ahmad S, O’Kelly F, Flynn RJ, et al. The changing pattern of antimicrobial resistance within 42033 *Escherichia coli* isolates from nosocomial, community and urology patient-specific urinary tract infections, Dublin, 1999-2009. *BJU Int.* 2012 Apr;109(8):1198–206.
 68. Giske CG, Sundsfjord AS, Kahlmeter G, Woodford N, Nordmann P, Paterson DL, et al. Redefining extended-spectrum beta-lactamases: balancing science and clinical need. *J Antimicrob Chemother.* 2008 Oct 18;63(1):1–4.
 69. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Mar 1;54(3):969–76.
 70. Cantón R, Coque TM. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol.* 2006 Oct;9(5):466–75.
 71. Lahlaoui H, Ben Haj Khalifa A, Ben Moussa M. Epidemiology of Enterobacteriaceae producing CTX-M type extended spectrum β -lactamase (ESBL). *Med Mal Infect.* 2014 Sep 15;44(9):400–4.
 72. Clermont O, Lavollay M, Vimont S, Deschamps C, Forestier C, Branger C, et al. The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup. *J Antimicrob Chemother.* 2008 May;61(5):1024–8.
 73. Nicolas-Chanoine M-H, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MP, Caniça MM, et al. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing

- CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother.* 2008 Mar;61(2):273–81.
74. Coque TM, Novais A, Carattoli A, Poirel L, Pitout J, Peixe L, et al. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis.* 2008 Feb;14(2):195–200.
75. Campos J, Ferech M, Lázaro E, de Abajo F, Oteo J, Stephens P, et al. Surveillance of outpatient antibiotic consumption in Spain according to sales data and reimbursement data. *J Antimicrob Chemother.* 2007 Sep 23;60(3):698–701.
76. Goossens H, Ferech M, Vander Stichele R, Elseviers M, ESAC Project Group. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *Lancet (London, England).* 2005 Feb;365(9459):579–87.
77. Ríos E, López MC, Rodríguez-Avial I, Pena I, Picazo JJ. Characterization of Inhibitor-Resistant TEM β -Lactamases and Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance in *Escherichia coli* Isolates. *Microb Drug Resist.* 2015 Oct 6;21(5):512–5.
78. Rodríguez-Baño J, Oteo J, Ortega A, Villar M, Conejo MC, Bou G, et al. Epidemiological and clinical complexity of amoxicillin-clavulanate-resistant *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 2013 Jul;51(7):2414–7.
79. Martín O, Valverde A, Morosini MI, Rodríguez-Domínguez M, Rodríguez-Baños M, Coque TM, et al. Population analysis and epidemiological features of inhibitor-resistant-TEM-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from both community and hospital settings in Madrid, Spain. *J Clin Microbiol.* 2010 Jul;48(7):2368–72.
80. Cantón R, Morosini MI, Martín O, de la Maza S, de la Pedrosa EGG. IRT and CMT β -lactamases and inhibitor resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2008 Jan;14:53–62.
81. Oteo J, Campos J, Lázaro E, Cuevas O, García-Cobos S, Pérez-Vázquez M, et al. Increased amoxicillin-clavulanic acid resistance in *Escherichia coli* blood isolates, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2008 Aug;14(8):1259–62.
82. Ortega A, Oteo J, Aranzamendi-Zaldumbide M, Bartolomé RM, Bou G, Cercenado E, et al. Spanish multicenter study of the epidemiology and mechanisms of amoxicillin-clavulanate resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Jul;56(7):3576–81.

83. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980 May 16;289(1036):321–31.
84. Albiger B, Glasner C, Struelens MJ, Grundmann H, Monnet DL, European Survey of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) working group. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015. *Eurosurveillance.* 2015 Nov 12;20(45):30062.
85. Livermore DM. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. *Korean J Intern Med.* 2012 Jun;27(2):128–42.
86. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clin Microbiol Infect.* 2014 Sep;20(9):821–30.
87. Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2012 May;18(5):413–31.
88. Nordmann P, Poirel L, Carrer A, Toleman MA, Walsh TR. How to detect NDM-1 producers. *J Clin Microbiol.* 2011 Feb;49(2):718–21.
89. Solé M, Pitart C, Roca I, Fàbrega A, Salvador P, Muñoz L, et al. First description of an *Escherichia coli* strain producing NDM-1 carbapenemase in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Sep;55(9):4402–4.
90. Naas T, Nordmann P. OXA-type beta-lactamases. *Curr Pharm Des.* 1999 Nov;5(11):865–79.
91. Oteo J, Ortega A, Bartolomé R, Bou G, Conejo C, Fernández-Martínez M, et al. Prospective multicenter study of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from 83 hospitals in Spain reveals high in vitro susceptibility to colistin and meropenem. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Jun;59(6):3406–12.
92. Gleckman R, Blagg N, Joubert DW. Trimethoprim: mechanisms of action, antimicrobial activity, bacterial resistance, pharmacokinetics, adverse reactions, and therapeutic indications. *Pharmacotherapy.* 1(1):14–20.
93. Kalkut G. Sulfonamides and trimethoprim. *Cancer Invest.* 1998;16(8):612–5.
94. Palou J, Pigrau C, Molina I, Ledesma JM, Angulo J, Grupo Colaborador Español del

- Estudio ARES. [Etiology and sensitivity of uropathogens identified in uncomplicated lower urinary tract infections in women (ARESC Study): implications on empiric therapy]. *Med Clin (Barc)*. 2011 Jan 15;136(1):1–7.
95. Talan DA, Krishnadasan A, Abrahamian FM, Stamm WE, Moran GJ, EMERGENCY ID NET Study Group. Prevalence and risk factor analysis of trimethoprim-sulfamethoxazole- and fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* infection among emergency department patients with pyelonephritis. *Clin Infect Dis*. 2008 Nov 1;47(9):1150–8.
96. Schito G. Why fosfomicin trometamol as first line therapy for uncomplicated UTI? *Int J Antimicrob Agents*. 2003 Oct;22(SUPPL. 2):79–83.
97. Neuner E a., Sekeres J, Hall GS, Van Duin D. Experience with fosfomicin for treatment of urinary tract infections due to multidrug-resistant organisms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(11):5744–8.
98. Gobernado M. [Fosfomicin]. *Rev Esp Quimioter*. 2003 Mar;16(1):15–40.
99. Falagas ME, Vouloumanou EK, Samonis G, Vardakas KZ. Fosfomicin. *Clin Microbiol Rev*. 2016 Apr 9;29(2):321–47.
100. Rodríguez-Baño J. Community Infections Caused by Extended-Spectrum beta-lactamase -producing *Escherichia coli*. *Arch Intern Med*. 2008;168(17):1897–902.
101. Sorlozano A, Jimenez-Pacheco A, de Dios Luna Del Castillo J, Sampedro A, Martinez-Brocal A, Miranda-Casas C, et al. Evolution of the resistance to antibiotics of bacteria involved in urinary tract infections: a 7-year surveillance study. *Am J Infect Control*. 2014 Oct;42(10):1033–8.
102. Oteo J, Bautista V, Lara N, Cuevas O, Arroyo M, Fernandez S, et al. Parallel increase in community use of fosfomicin and resistance to fosfomicin in extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*. 2010 Nov 1;65(11):2459–63.
103. Falagas ME, Rafailidis PI. Re-emergence of colistin in today's world of multidrug-resistant organisms: personal perspectives. *Expert Opin Investig Drugs*. 2008 Jul 12;17(7):973–81.
104. Olaitan AO, Morand S, Rolain J-M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and

- intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol.* 2014 Nov 26;5:643.
105. Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* 2016 Feb;16(2):161–8.
 106. Schwarz S, Johnson AP. Transferable resistance to colistin: a new but old threat. *J Antimicrob Chemother.* 2016 Aug;71(8):2066–70.
 107. Ortiz de la Tabla V, Ortega A, Buñuel F, Pérez-Vázquez M, Marcos B, Oteo J. Detection of the high-risk clone ST131 of *Escherichia coli* carrying the colistin resistance gene *mcr-1* and causing acute peritonitis. *Int J Antimicrob Agents.* 2017 Jan;49(1):115–6.
 108. Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler LH, et al. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol.* 2006 Jun;60(5):1136–51.
 109. Johnson JR, Nicolas-Chanoine M-H, DebRoy C, Castanheira M, Robicsek A, Hansen G, et al. Comparison of *Escherichia coli* ST131 pulsotypes, by epidemiologic traits, 1967-2009. *Emerg Infect Dis.* 2012 Apr;18(4):598–607.
 110. Peirano G, Van Der Bij AK, Freeman JL, Poirel L, Nordmann P, Costello M, et al. Characteristics of *Escherichia coli* Sequence Type 131 Isolates That Produce Extended-Spectrum β -Lactamases: Global Distribution of the H30-Rx Sublineage. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Jul;58(7):3762–7.
 111. Johnson JR, Tchesnokova V, Johnston B, Clabots C, Roberts PL, Billig M, et al. Abrupt emergence of a single dominant multidrug-resistant strain of *Escherichia coli*. *J Infect Dis.* 2013 Mar 15;207(6):919–28.
 112. Petty NK, Ben Zakour NL, Stanton-Cook M, Skipington E, Totsika M, Forde BM, et al. Global dissemination of a multidrug resistant *Escherichia coli* clone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Apr 15;111(15):5694–9.
 113. Price LB, Johnson JR, Aziz M, Clabots C, Johnston B, Tchesnokova V, et al. The epidemic of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 is driven by a single highly pathogenic subclone, H30-Rx. *MBio.* 2013 Jan;4(6):e00377-13.
 114. Stoesser N, Sheppard AE, Pankhurst L, De Maio N, Moore CE, Sebra R, et al. Evolutionary History of the Global Emergence of the *Escherichia coli* Epidemic Clone

- ST131. MBio. 2016 Jan;7(2).
115. Ben Zakour NL, Alsheikh-Hussain AS, Ashcroft MM, Khanh Nhu NT, Roberts LW, Stanton-Cook M, et al. Sequential acquisition of virulence and fluoroquinolone resistance has shaped the evolution of *Escherichia coli* ST131. MBio. 2016 Jan;7(May):1–12.
 116. Colpan A, Johnston B, Porter S, Clabots C, Anway R, Thao L, et al. *Escherichia coli* sequence type 131 (ST131) subclone H30 as an emergent multidrug-resistant pathogen among US veterans. Clin Infect Dis. 2013 Nov;57(9):1256–65.
 117. Olesen B, Hansen DS, Nilsson F, Frimodt-Møller J, Leihof RF, Struve C, et al. Prevalence and characteristics of the epidemic multiresistant *Escherichia coli* ST131 clonal group among extended-spectrum beta-lactamase-producing *E. coli* isolates in Copenhagen, Denmark. J Clin Microbiol. 2013 Jun;51(6):1779–85.
 118. Mora A, Dahbi G, López C, Mamani R, Marzoa J, Dion S, et al. Virulence patterns in a murine sepsis model of ST131 *Escherichia coli* clinical isolates belonging to serotypes O25b:H4 and O16:H5 are associated to specific virotypes. PLoS One. 2014 Jan;9(1):e87025.
 119. Blanco J, Mora A, Mamani R, López C, Blanco M, Dahbi G, et al. Four main virotypes among extended-spectrum- β -lactamase-producing isolates of *Escherichia coli* O25b:H4-B2-ST131: bacterial, epidemiological, and clinical characteristics. J Clin Microbiol. 2013 Oct;51(10):3358–67.
 120. Dahbi G, Mora A, Mamani R, López C, Alonso MP, Marzoa J, et al. Molecular epidemiology and virulence of *Escherichia coli* O16:H5-ST131: comparison with H30 and H30-Rx subclones of O25b:H4-ST131. Int J Med Microbiol. 2014 Nov;304(8):1247–57.
 121. Johnson JR, Thuras P, Johnston BD, Weissman SJ, Limaye AP, Riddell K, et al. The Pandemic H 30 Subclone of *Escherichia coli* Sequence Type 131 Is Associated With Persistent Infections and Adverse Outcomes Independent From Its Multidrug Resistance and Associations With Compromised Hosts. Clin Infect Dis. 2016 Jun 15;62(12):1529–36.
 122. Rodríguez-Baño J, Mingorance J, Fernández-Romero N, Serrano L, López-Cerero L, Pascual A. Outcome of bacteraemia due to extended-spectrum β -lactamase-producing

- Escherichia coli*: impact of microbiological determinants. J Infect. 2013 Jul;67(1):27–34.
123. Blanco J, Mora A, Mamani R, López C, Blanco M, Dahbi G, et al. National survey of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections reveals the spread of drug-resistant clonal groups O25b:H4-B2-ST131, O15:H1-D-ST393 and CGA-D-ST69 with high virulence gene content in Spain. J Antimicrob Chemother. 2011 Sep;66(9):2011–21.
124. Rodríguez-Baño J, Mingorance J, Fernández-Romero N, Serrano L, López-Cerero L, Pascual A. Virulence profiles of bacteremic extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*: association with epidemiological and clinical features. PLoS One. 2012 Jan;7(9):e44238.
125. Johnson JR, Porter SB, Zhanel G, Kuskowski M a, Denamur E. Virulence of *Escherichia coli* clinical isolates in a murine sepsis model in relation to sequence type ST131 status, fluoroquinolone resistance, and virulence genotype. Infect Immun. 2012 Apr;80(4):1554–62.
126. Ciesielczuk H, Betts J, Phee L, Doumith M, Hope R, Woodford N, et al. Comparative virulence of urinary and bloodstream isolates of extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* in a *Galleria mellonella* model. Virulence. 2015 Feb 17;6(2):145–51.
127. Alghoribi MF, Gibreel TM, Dodgson AR, Beatson S a, Upton M. *Galleria mellonella* Infection Model Demonstrates High Lethality of ST69 and ST127 Uropathogenic *E. coli*. PLoS One. 2014 Jan;9(7):e101547.
128. Johnson JR, Porter S, Johnston B, Kuskowski MA, Spurbeck RR, Mobley HLT, et al. Host Characteristics and Bacterial Traits Predict Experimental Virulence for *Escherichia coli* Bloodstream Isolates From Patients With Urosepsis. Open forum Infect Dis. 2015 Sep 8;2(3):ofv083.
129. Lavigne J-P, Vergunst AC, Goret L, Sotto A, Combescure C, Blanco J, et al. Virulence potential and genomic mapping of the worldwide clone *Escherichia coli* ST131. PLoS One. 2012 Jan;7(3):e34294.
130. Kudinha T, Johnson JR, Andrew SD, Kong F, Anderson P, Gilbert GL. *Escherichia coli* sequence type 131 as a prominent cause of antibiotic resistance among urinary *Escherichia coli* isolates from reproductive-age women. J Clin Microbiol. 2013 Oct;51(10):3270–6.

131. Kudinha T, Johnson JR, Andrew SD, Kong F, Anderson P, Gilbert GL. Distribution of phylogenetic groups, sequence type ST131, and virulence-associated traits among *Escherichia coli* isolates from men with pyelonephritis or cystitis and healthy controls. *Clin Microbiol Infect*. 2013 Apr;19(4):E173-80.
132. Adams-Sapper S, Diep BA, Perdreau-Remington F, Riley LW. Clonal composition and community clustering of drug-susceptible and -resistant *Escherichia coli* isolates from bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Jan 1;57(1):490–7.
133. Rodrigues C, Machado E, Fernandes S, Peixe L, Novais Â. An update on faecal carriage of ESBL-producing Enterobacteriaceae by Portuguese healthy humans: detection of the H30 subclone of B2-ST131 *Escherichia coli* producing CTX-M-27. *J Antimicrob Chemother*. 2016 Apr 7;71(4):1120–2.
134. Matsumura Y, Johnson JR, Yamamoto M, Nagao M, Tanaka M, Takakura S, et al. CTX-M-27- and CTX-M-14-producing, ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* of the H30 subclonal group within ST131 drive a Japanese regional ESBL epidemic. *J Antimicrob Chemother*. 2015 Jan;70(6):1639–49.
135. López-Cerero L, Navarro MD, Bellido M, Martín-Peña A, Viñas L, Cisneros JM, et al. *Escherichia coli* belonging to the worldwide emerging epidemic clonal group O25b/ST131: risk factors and clinical implications. *J Antimicrob Chemother*. 2014 Mar;69(3):809–14.
136. Müller A, Stephan R, Nüesch-Inderbinen M. Distribution of virulence factors in ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from the environment, livestock, food and humans. *Sci Total Environ*. 2016 Jan 15;541:667–72.
137. Owens RC, Johnson JR, Stogsdill P, Yarmus L, Lolans K, Quinn J. Community transmission in the United States of a CTX-M-15-producing sequence type ST131 *Escherichia coli* strain resulting in death. *J Clin Microbiol*. 2011 Sep;49(9):3406–8.
138. Johnson JR, Miller S, Johnston B, Clabots C, Debroy C. Sharing of *Escherichia coli* sequence type ST131 and other multidrug-resistant and Urovirulent *E. coli* strains among dogs and cats within a household. *J Clin Microbiol*. 2009 Nov;47(11):3721–5.
139. Birgy A, Mariani-Kurkdjian P, Bidet P, Doit C, Genel N, Courroux C, et al. Characterization of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli*

- strains involved in maternal-fetal colonization: prevalence of *E. coli* ST131. *J Clin Microbiol.* 2013 Jun;51(6):1727–32.
140. Blanc V, Leflon-Guibout V, Blanco J, Haenni M, Madec J-Y, Rafignon G, et al. Prevalence of day-care centre children (France) with faecal CTX-M-producing *Escherichia coli* comprising O25b:H4 and O16:H5 ST131 strains. *J Antimicrob Chemother.* 2014 May 1;69(5):1231–7.
141. Dahbi G, Mora A, López C, Alonso MP, Mamani R, Marzoa J, et al. Emergence of new variants of ST131 clonal group among extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases. *Int J Antimicrob Agents.* 2013 Oct;42(4):347–51.
142. Karas M, Bachmann D, Bahr U, Hillenkamp F. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Int J Mass Spectrom Ion Process.* 1987 Sep;78:53–68.
143. Monstein H-J, Ostholm-Balkhed A, Nilsson M V, Nilsson M, Dornbusch K, Nilsson LE. Multiplex PCR amplification assay for the detection of blaSHV, blaTEM and blaCTX-M genes in Enterobacteriaceae. *APMIS.* 2007 Dec;115(12):1400–8.
144. Weill F-X, Demartin M, Tandé D, Espié E, Rakotoarivony I, Grimont PAD. SHV-12-like extended-spectrum-beta-lactamase-producing strains of *Salmonella enterica* serotypes Babelsberg and Enteritidis isolated in France among infants adopted from Mali. *J Clin Microbiol.* 2004 Jun;42(6):2432–7.
145. Woodford N, Fagan EJ, Ellington MJ. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases. *J Antimicrob Chemother.* 2006 Jan;57(1):154–5.
146. Carattoli A, García-Fernández A, Varesi P, Fortini D, Gerardi S, Penni A, et al. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases isolated in Rome, Italy. *J Clin Microbiol.* 2008 Jan;46(1):103–8.
147. Mabilat C, Goussard S. PCR detection and identification of genes for extended-spectrum β -lactamases. In: Persing DH, Smith TF, Tenover F., White TJ, editors. *Diagnostic molecular microbiology Principles and applications.* ASM Press; 1995. p. 553–7.

148. Coque TM, Oliver A, Pérez-Díaz JC, Baquero F, Cantón R. Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum beta-lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 Feb;46(2):500–10.
149. Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis.* 2006;3:59–67.
150. Hunter SB, Vauterin P, Lambert-Fair MA, Van Duyn MS, Kubota K, Graves L, et al. Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard. *J Clin Microbiol.* 2005 Mar;43(3):1045–50.
151. Johnson JR, Menard M, Johnston B, Kuskowski M a, Nichol K, Zhanel GG. Epidemic clonal groups of *Escherichia coli* as a cause of antimicrobial-resistant urinary tract infections in Canada, 2002 to 2004. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Jul;53(7):2733–9.
152. Olesen B, Frimodt-Møller J, Leihof RF, Struve C, Johnston B, Hansen DS, et al. Temporal Trends in Antimicrobial Resistance and Virulence-Associated Traits within the *Escherichia coli* Sequence Type 131 Clonal Group and Its H30 and H30-Rx Subclones, 1968 to 2012. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Nov;58(11):6886–95.
153. Weissman SJ, Johnson JR, Tchesnokova V, Billig M, Dykhuizen D, Riddell K, et al. High-resolution two-locus clonal typing of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 2012 Mar;78(5):1353–60.
154. Johnson JR, Clermont O, Johnston B, Clabots C, Tchesnokova V, Sokurenko E, et al. Rapid and specific detection, molecular epidemiology, and experimental virulence of the O16 subgroup within *Escherichia coli* sequence type 131. *J Clin Microbiol.* 2014 May;52(5):1358–65.
155. Johnson JR, Kuskowski M a, Gajewski A, Sahm DF, Karlowsky J a. Virulence characteristics and phylogenetic background of multidrug-resistant and antimicrobial-susceptible clinical isolates of *Escherichia coli* from across the United States, 2000-2001. *J Infect Dis.* 2004 Nov 15;190(10):1739–44.

156. Johnson JR, O'Bryan TT. Detection of the *Escherichia coli* group 2 polysaccharide capsule synthesis Gene kpsM by a rapid and specific PCR-based assay. J Clin Microbiol. 2004 Apr;42(4):1773–6.
157. Horner C, Fawley W, Morris K, Parnell P, Denton M, Wilcox M. *Escherichia coli* bacteraemia: 2 years of prospective regional surveillance (2010-12). J Antimicrob Chemother. 2014 Jan;69(1):91–100.
158. Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Romero L, Muniain M a, de Cueto M, Ríos MJ, et al. Bacteremia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in the CTX-M era: a new clinical challenge. Clin Infect Dis. 2006 Dec 1;43(11):1407–14.
159. Feglo P, Adu-Sarkodie Y, Ayisi, Lord, Jain R, Spurbeck RR, Springman a C, et al. Emergence of a novel extended-spectrum- β -lactamase(ESBL)-producing, fluoroquinolone-resistant clone of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in Kumasi, Ghana. J Clin Microbiol. 2013 Feb;51(2):728–30.
160. McLellan LK, Hunstad DA. Urinary Tract Infection: Pathogenesis and Outlook. Trends Mol Med. 2016 Nov;22(11):946–57.
161. Izdebski R, Baraniak A, Fiett J, Adler A, Kazma M, Salomon J, et al. Clonal structure, extended-spectrum β -lactamases, and acquired AmpC-type cephalosporinases of *Escherichia coli* populations colonizing patients in rehabilitation centers in four countries. Antimicrob Agents Chemother. 2013 Jan 1;57(1):309–16.
162. Timofte D, Maciuca IE, Williams NJ, Wattret A, Schmidt V. Veterinary Hospital Dissemination of CTX-M-15 Extended-Spectrum Beta-Lactamase–Producing *Escherichia coli* ST410 in the United Kingdom. Microb Drug Resist. 2016 Oct;22(7):609–15.
163. Silva KC, Moreno M, Cabrera C, Spira B, Cerdeira L, Lincopan N, et al. First Characterization of CTX-M-15-Producing *Escherichia coli* Strains Belonging to Sequence Type (ST) 410, ST224, and ST1284 from Commercial Swine in South America. Antimicrob Agents Chemother. 2016 Apr;60(4):2505–8.
164. Cortés-Cortés G, Lozano-Zarain P, Torres C, Castañeda M, Sánchez GM, Alonso CA, et al. Detection and Molecular Characterization of *Escherichia coli* Strains Producers of Extended-Spectrum and CMY-2 Type Beta-Lactamases, Isolated from Turtles in Mexico. Vector-Borne Zoonotic Dis. 2016 Sep;16(9):595–603.

165. Oteo J, Diestra K, Juan C, Bautista V, Novais A, Pérez-Vázquez M, et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Spain belong to a large variety of multilocus sequence typing types, including ST10 complex/A, ST23 complex/A and ST131/B2. *Int J Antimicrob Agents*. 2009 Aug 8;34(2):173–6.
166. Asadi S, Kargar M, Solhjoo K, Najafi A, Ghorbani-Dalini S. The Association of Virulence Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli* With Antibiotic Resistance. *Jundishapur J Microbiol*. 2014 May;7(5):e9936.
167. Brolund a, Edquist PJ, Mäkitalo B, Olsson-Liljequist B, Söderblom T, Wisell KT, et al. Epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Sweden 2007-2011. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Jun;20(6):O344-52.
168. Micenková L, Sišková P, Bosák J, Jamborová I, Cernohorská L, Smajs D. Characterization of human uropathogenic ESBL-producing *Escherichia coli* in the Czech Republic: spread of CTX-M-27-producing strains in a university hospital. *Microb Drug Resist*. 2014 Dec;20(6):610–7.
169. Torres E, López-Cerero L, Rodríguez-Martínez JM, Pascual Á. Reduced Susceptibility to Cefepime in Clinical Isolates of Enterobacteriaceae Producing OXA-1 Beta-Lactamase. *Microb Drug Resist*. 2015 Aug 21;0(0):150821134352009.
170. Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Retamar P, Picón E, Pascual Á. β -Lactam/ β -lactam inhibitor combinations for the treatment of bacteremia due to extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*: a post hoc analysis of prospective cohorts. *Clin Infect Dis*. 2012 Jan 15;54(2):167–74.
171. Brisse S, Diancourt L, Laouénan C, Vigan M, Caro V, Arlet G, et al. Phylogenetic distribution of CTX-M- and non-extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates: group B2 isolates, except clone ST131, rarely produce CTX-M enzymes. *J Clin Microbiol*. 2012 Sep;50(9):2974–81.
172. Peirano G, Costello M, Pitout JDD. Molecular characteristics of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from the Chicago area: high prevalence of ST131 producing CTX-M-15 in community hospitals. *Int J Antimicrob Agents*. 2010 Jul;36(1):19–23.
173. Hernández JR, Martínez-Martínez L, Cantón R, Coque TM, Pascual A. Nationwide study

- of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 May;49(5):2122–5.
174. Valverde A, Cantón R, Garcillán-Barcia MP, Novais A, Galán JC, Alvarado A, et al. Spread of bla(CTX-M-14) is driven mainly by IncK plasmids disseminated among *Escherichia coli* phylogroups A, B1, and D in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Dec;53(12):5204–12.
175. Moreno E, Planells I, Prats G, Planes AM, Moreno G, Andreu A. Comparative study of *Escherichia coli* virulence determinants in strains causing urinary tract bacteremia versus strains causing pyelonephritis and other sources of bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005 Oct;53(2):93–9.
176. Coelho A, Mora A, Mamani R, Lopez C, Gonzalez-Lopez JJ, Larrosa MN, et al. Spread of *Escherichia coli* O25b:H4-B2-ST131 producing CTX-M-15 and SHV-12 with high virulence gene content in Barcelona (Spain). *J Antimicrob Chemother.* 2011 Mar 1;66(3):517–26.
177. Novais A, Pires J, Ferreira H, Costa L, Montenegro C, Vuotto C, et al. Characterization of globally spread *Escherichia coli* ST131 isolates (1991 to 2010). *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Jul;56(7):3973–6.
178. Peirano G, Pitout JDD. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M beta-lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. *Int J Antimicrob Agents.* 2010 Apr;35(4):316–21.
179. Banerjee R, Robicsek A, Kuskowski M a, Porter S, Johnston BD, Sokurenko E, et al. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* sequence type 131 and its H30 and H30-Rx subclones among extended-spectrum- β -lactamase-positive and -negative *E. coli* clinical isolates from the Chicago Region, 2007 to 2010. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Dec;57(12):6385–8.
180. López-Cerero L, Bellido M del M, Serrano L, Liró J, Cisneros JM, Rodríguez-Baño J, et al. *Escherichia coli* O25b:H4/ST131 are prevalent in Spain and are often not associated with ESBL or quinolone resistance. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013 Jun;31(6):385–8.
181. Rogers BA, Ingram PR, Runnegar N, Pitman MC, Freeman JT, Athan E, et al. Sequence type 131 fimH30 and fimH41 subclones amongst *Escherichia coli* isolates in Australia and New Zealand. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;45(4).

182. Alqasim A, Scheutz F, Zong Z, McNally A. Comparative genome analysis identifies few traits unique to the *Escherichia coli* ST131 H30Rx clade and extensive mosaicism at the capsule locus. *BMC Genomics*. 2014;15(1).
183. Andreu A. Pathogenesis of urinary tract infections. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2005 Dec;23 Suppl 4:15–21.
184. Birgy A, Levy C, Bidet P, Thollot F, Derkx V, Béchet S, et al. ESBL-producing *Escherichia coli* ST131 versus non-ST131: evolution and risk factors of carriage among French children in the community between 2010 and 2015. *J Antimicrob Chemother*. 2016 Oct 20;71(10):2949–56.
185. Han JH, Johnston B, Nachamkin I, Tolomeo P, Bilker WB, Mao X, et al. Clinical and Molecular Epidemiology of *Escherichia coli* Sequence Type 131 among Hospitalized Patients Colonized Intestinally with Fluoroquinolone-Resistant *E. coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Nov 1;58(11):7003–6.
186. Vasoo S, Madigan T, Cunningham SA, Mandrekar JN, Porter SB, Johnston B, et al. Prevalence of rectal colonization with multidrug-resistant Enterobacteriaceae among international patients hospitalized at Mayo Clinic, Rochester, Minnesota. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2014 Feb;35(2):182–6.
187. Nüesch-Inderbilen MT, Abgottspon H, Zurfluh K, Nüesch HJ, Stephan R, Hächler H. Cross-Sectional Study on Fecal Carriage of *Enterobacteriaceae* with Resistance to Extended-Spectrum Cephalosporins in Primary Care Patients. *Microb Drug Resist*. 2013 Oct;19(5):362–9.
188. Gurnee EA, Ndao IM, Johnson JR, Johnston BD, Gonzalez MD, Burnham C-AD, et al. Gut Colonization of Healthy Children and Their Mothers With Pathogenic Ciprofloxacin-Resistant *Escherichia coli*. *J Infect Dis*. 2015 Dec 15;212(12):1862–8.
189. Overdeest I, Haverkate M, Veenemans J, Hendriks Y, Verhulst C, Mulders A, et al. Prolonged colonisation with *Escherichia coli* O25:ST131 versus other extended-spectrum beta-lactamase-producing *E. coli* in a long-term care facility with high endemic level of rectal colonisation, the Netherlands, 2013 to 2014. *Euro Surveill*. 2016 Oct 20;21(42).
190. Arvand M, Moser V, Pfeifer Y. Prevalence of extended-spectrum- β -lactamase-producing

- Escherichia coli* and spread of the epidemic clonal lineage ST131 in nursing homes in Hesse, Germany. *J Antimicrob Chemother.* 2013 Nov 1;68(11):2686–8.
191. Hara T, Sato T, Horiyama T, Kanazawa S, Yamaguchi T, Maki H. Prevalence and molecular characterization of CTX-M extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from 2000 to 2010 in Japan. *Jpn J Antibiot.* 2015 Apr;68(2):75–84.
192. McGann P, Snesrud E, Ong AC, Appalla L, Koren M, Kwak YI, et al. War wound treatment complications due to transfer of an IncN plasmid harboring bla(OXA-181) from *Morganella morganii* to CTX-M-27-producing sequence type 131 *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Jan;59(6):3556–62.
193. Matsumura Y, Yamamoto M, Higuchi T, Komori T, Tsuboi F, Hayashi A, et al. Prevalence of plasmid-mediated AmpC β -lactamase-producing *Escherichia coli* and spread of the ST131 clone among extended-spectrum β -lactamase-producing *E. coli* in Japan. *Int J Antimicrob Agents.* 2012 Aug;40(2):158–62.
194. Nüesch-Inderbilen M, Zurfluh K, Peterhans S, Hächler H, Stephan R. Assessment of the Prevalence of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Ready-to-Eat Salads, Fresh-Cut Fruit, and Sprouts from the Swiss Market. *J Food Prot.* 2015 Jun;78(6):1178–81.
195. Platell JL, Johnson JR, Cobbold RN, Trott DJ. Multidrug-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* of sequence type ST131 in animals and foods. *Vet Microbiol.* 2011 Nov 21;153(1–2):99–108.
196. Le Gall T, Clermont O, Gouriou S, Picard B, Nassif X, Denamur E, et al. Extraintestinal virulence is a coincidental by-product of commensalism in B2 phylogenetic group *Escherichia coli* strains. *Mol Biol Evol.* 2007 Nov;24(11):2373–84.

ANEXOS

Artículos derivados de los resultados de esta tesis

1. **Artículo publicado:** Merino I, Shaw E, Horcajada JP, Cercenado E, Mirelis B, Pallarés MA, et al. CTX-M-15-H30Rx-ST131 subclone is one of the main causes of healthcare associated ESBL-producing *Escherichia coli* bacteraemia of urinary origin in Spain. J Antimicrob Chemother. 2016 Aug;71(8):2125–30.
2. **Manuscrito pendiente de publicación:** “Virulence genes and subclone status as markers of experimental virulence in a murine sepsis model among *Escherichia coli* sequence type 131 clinical isolates from Spain”

CTX-M-15-H30Rx-ST131 subclone is one of the main causes of healthcare-associated ESBL-producing *Escherichia coli* bacteraemia of urinary origin in Spain

Irene Merino^{1,2}, Evelyn Shaw^{2,3}, Juan Pablo Horcajada^{4,5}, Emilia Cercenado⁶, Beatriz Mirelis^{2,7}, M. Angeles Pallarés⁸, Juliá Gómez⁹, M. Xercavins¹⁰, Luis Martínez-Martínez^{2,11,12}, Marina De Cueto^{2,13}, Rafael Cantón^{1,2} and Patricia Ruiz-Garbajosa^{1,2*} on behalf of the ITUBRAS-GEIH-SEIMC Group†

¹Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal and Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain; ²Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; ³Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL, Barcelona, Spain; ⁴Departamento de Enfermedades Infecciosas, Hospital del Mar and Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM), Barcelona, Spain; ⁵CEXS-Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain; ⁶Servicio de Microbiología, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain; ⁷Servicio de Microbiología, Hospital Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain; ⁸Servicio de Microbiología, Complejo Hospitalario de Pontevedra, Pontevedra, Spain; ⁹Laboratori de Referència de Catalunya, Barcelona, Spain; ¹⁰Servicio de Microbiología, Catlab, Hospital Universitari Mútua de Terrassa, Terrassa, Spain; ¹¹Servicio de Microbiología, Hospital Marqués de Valdecilla-IDIVAL, Santander, Spain; ¹²Departamento de Biología Molecular, Universidad de Cantabria, Santander, Spain; ¹³Unidad Clínica Intercentros de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva, Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío, Sevilla, Spain

*Corresponding author. Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, 28034 Madrid, Spain. E-mail: prui zg@salud.madrid.org
†Other members of the ITUBRAS-GEIH-SEIMC Group are listed in the Acknowledgements section.

Received 19 November 2015; returned 1 December 2015; revised 10 March 2016; accepted 20 March 2016

Objectives: The objective of this study was to assess the prevalence and molecular epidemiology of ESBL-producing *Escherichia coli* causing healthcare-associated (HCA) and community-associated (CA) bacteraemia of urinary origin (BUO) in Spain.

Methods: An observational cohort study was conducted at eight hospitals from different Spanish geographical areas (2010–11). BUO episodes ($n=425$) were classified as HCA ($n=215$) and CA ($n=210$), and one blood isolate per episode was collected. Susceptibility testing was performed, ESBLs were screened by double-disc diffusion test and ESBL and OXA-1 genes were characterized (PCR and sequencing). Population structure (phylogenetic groups, XbaI-PFGE and MLST) and ST131 subtyping (PCR) were determined. Virulence genes were detected by PCR and virulence score, profiles and extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) status calculated.

Results: ESBL-producing *E. coli* prevalence was 9.2% (39/425). ESBL-producing *E. coli* episodes were significantly associated with HCA-BUO episodes [14% (30/215) versus 4.3% (9/210); $P=0.001$]. The highest non-susceptibility proportions corresponded to ciprofloxacin (97.4%), amoxicillin/clavulanate (74.4%), co-trimoxazole (69.2%) and tobramycin (61.5%). Of the 39 ESBL-producing *E. coli* isolates, 34 produced CTX-M enzymes (21 CTX-M-15, 11 CTX-M-14 and 2 CTX-M-1). Fifteen STs were identified, the B2-ST131 clone being the most prevalent (54%; 21/39). All ST131 isolates were ExPEC and had the highest virulence scores, but they showed less diversity in virulence profiles than other STs. The H30Rx subclone accounted for most ST131 isolates (20/21), co-produced CTX-M-15 (20/20) and OXA-1 (19/20) enzymes and was associated with HCA episodes (16/20).

Conclusions: The CTX-M-15-ST131-H30Rx subclone is a relevant MDR pathogen causing BUO, mainly HCA episodes. The dominance of this subclone with comparatively less diversity of virulence profiles reflects the spread of a successful and MDR ESBL ST131 lineage in Spain.

Introduction

Although ESBL-producing *Escherichia coli* isolates were first described in the hospital setting, several reports soon described the dissemination of these isolates in the community.¹ Changes

in ESBL epidemiology have coincided with the emergence of the ST131 clone, which is considered a high-risk *E. coli* clone and is mostly associated with urinary tract infection (UTI) and bacteraemia.² Analysis of the ST131 population structure has identified the H30 and H30Rx subclones, and H30Rx has been associated

**“Virulence genes and subclone status as markers of experimental virulence in
a murine sepsis model among *Escherichia coli* sequence type 131 clinical
isolates from Spain**

Irene Merino,^{1,2} Stephen B. Porter,³ Brian D. Johnston,⁴ Connie Clabots,³ Evelyn Shaw,^{2,5} Juan Pablo Horcajada,⁶ Rafael Cantón,^{1,2} Patricia Ruiz-Garbajosa,^{1,2} James R. Johnson,^{3,4}, and the ITUBRAS-GEIH group*.

1) Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal-Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain; 2) Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI); 3) Minneapolis Veterans Health Care System, Minneapolis, MN, USA; 4) University of Minnesota, MN, USA; 5) Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario de Bellvitge-IDIBELL, Barcelona, Spain; 6) Hospital del Mar-Medical Research Institute of Hospital del Mar (IMIM)-CEXS Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain.

Running head: Experimental virulence of *E. coli* ST131

Category: Original article

Length of abstract: 249 words. Length of paper: 2749 words.

Corresponding author: Patricia Ruiz-Garbajosa, Microbiology Department, Ramón y Cajal University Hospital. 28034-Madrid, Spain. E-mail: pruizg@salud.madrid.org.
Telephone: 0034913368832

*Members are listed in the Contributors section.

Abstract

Objective: To assess experimental virulence among sequence type 131 (ST131) *Escherichia coli* bloodstream isolates in relation to virulence genotype and subclone.

Methods: We analysed 48 Spanish ST131 bloodstream isolates (2010) by PCR for ST131 subclone status (*H30Rx*, *H30 non-Rx*, or non-*H30*), virulence genes (VGs), and O-type. Then we compared these traits with virulence in a murine sepsis model, as measured by illness severity score (ISS), rapid lethality (mean ISS ≥ 4), and > 50% lethality.

Results: Of the 48 study isolates, 65% were *H30Rx*, 21% *H30 non-Rx*, and 15% non-*H30*; 44% produced ESBLs, 98% were O25b, and 83% qualified as extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC). Of 50 VGs, *ibeA* was associated significantly with non-*H30* isolates, and *sat* and *malX* with *H30* isolates. Median VG scores differed by subclone, i.e., 12 (*H30Rx*), 10 (*H30 non-Rx*), and 10.5 (non-*H30*) ($p = 0.001$). Nearly 80% of isolates represented a described virotype. In mice, *H30Rx* and non-*H30* isolates were more virulent than *H30 non-Rx* isolates (according to ISS [$p = 0.03$], rapid lethality [$p = 0.03$], and > 50% lethality [$p = 0.01$]), as were ExPEC isolates compared with non-ExPEC isolates (median ISS, 4.3 vs. 2.7: $p = 0.03$). In contrast, individual VGs, VG scores, VG profiles, and virotypes were not associated with mouse virulence.

Conclusions: ST131 subclone and ExPEC status, but not individual VGs, VG scores or profiles, or virotypes, predicted mouse virulence. Given the lower virulence of non-*Rx H30* isolates, hypervirulence probably cannot explain the ST131-*H30* clade's epidemic emergence