



TESIS DOCTORAL

**Bacteriemias por *Escherichia coli*: análisis
clínico-epidemiológico, de factores de
patogenicidad y mecanismos de resistencia a
betalactámicos/inhibidores de betalactamasas**

Ángel Rodríguez Villodres

Sevilla 2019

Director 1: Dr. Younes Smani

Director 2: Dr. José Antonio Lepe Jiménez

Director 3: Dr. Jerónimo Pachón Díaz

Programa de Doctorado en Biología Molecular, Biomedicina e Investigación Clínica

Departamento de Medicina

Universidad de Sevilla



Departamento de Medicina

El Dr. Jerónimo Pachón Díaz, profesor emérito de Medicina de la Universidad de Sevilla, como Director y Tutor de la Tesis Doctoral, el Dr. Younes Smani, investigador del programa Miguel Servet del Instituto de Salud Carlos III, y el Dr. José Antonio Lepe Jiménez, Jefe de Sección del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen del Rocío, ambos miembros de la Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva del Hospital Universitario Virgen del Rocío y directores de la Tesis Doctoral,

CERTIFICAN:

Que la Tesis para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla que lleva por título **“Bacteriemias por *Escherichia coli*: análisis clínico-epidemiológico, de factores de patogenicidad y mecanismos de resistencia a betalactámicos/inhibidores de betalactamasas”** ha sido realizada por el Licenciado Don Ángel Rodríguez Villodres bajo nuestra supervisión, considerando que reúne los requisitos necesarios para su presentación.

Para que conste a los efectos oportunos, expiden la presente certificación en Sevilla, a 15 de noviembre de 2019.

Jerónimo Pachón Díaz

Director y Tutor

Younes Smani

Director

José Antonio Lepe Jiménez

Director

FINANCIACIÓN TESIS DOCTORAL

Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Instituto de Salud Carlos III. Proyecto Miguel Servet Tipo I CP15/00132 (2016-2019). “La sobreexpresión de la proteína de membrana externa A (OmpA) como factor de riesgo de mortalidad de la bacteriemia por *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*”.

Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades. Instituto de Salud Carlos III. Subprograma Río Hortega (CM18/00122) (2019-2020).

Junta de Andalucía. Fundación Pública Andaluza Para la Gestión de la Investigación en Salud de Sevilla (FISEVI). Programa de Fomento de Investigación en Residentes HUVR/IBiS (068/18-HUVR-1) (2018).

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA RELACIONADA CON LA TESIS DOCTORAL

Publicaciones

1. **Rodríguez-Villodres A**, Bonnin RA, Ortiz de la Rosa JM, Álvarez-Marín R, Naas T, Aznar J, Pachón J, Lepe JA, Smani Y. Phylogeny, resistome and virulome of *Escherichia coli* causing biliary tract infections. *Journal of Clinical Medicine*. Aceptado.
2. **Rodríguez-Villodres A**, Gil-Marqués ML, Álvarez-Marín R, Bonnin RA, Pachón-Ibáñez ME, Aguilar-Guisado M, Naas T, Aznar J, Pachón J, Lepe JA, Smani Y. Extended-spectrum resistance to β -lactams/ β -lactamase inhibitors (ESRI) evolved from low-level resistant *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2019; pi:dkz393. doi: 10.1093/jac/dkz393. [Epub ahead of print]
3. **Rodríguez-Villodres A**, Ortiz de la Rosa JM, Álvarez-Marín R, Pachón J, Aznar J, Lepe JA, Smani Y. Heteroresistance to Piperacillin-Tazobactam in Clinical Isolates of

Escherichia coli Sequence Type 131. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2018; 62: 1-3.

Comunicaciones a congresos

1. **Rodríguez-Villodres A**, Álvarez-Marín R, Miró-Canturri A, Roca C, Ayerbe-Algaba R, Pachón-Ibáñez ME, Aznar J, Pachón J, Lepe JA, Smani Y. Primera descripción de una población de *Escherichia coli* heterorresistente a piperacilina/tazobactam. XXI Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Málaga, España. 2017.

2. **Rodríguez-Villodres A**, Álvarez-Marín R, Roca C, Miró-Canturri A, Pachón-Ibáñez E, Aznar J, Pachón J, Lepe JA, Smani Y. Epidemiología y factores pronósticos de la bacteriemia or *Klebsiella pneumoniae*. XIX Congreso de la Sociedad Andaluza de Enfermedades Infecciosas (SAEI). Granada, España. 2017.

3. **Rodríguez-Villodres A**, Álvarez-Marín R, Pérez-Moreno MA, Roca C, Miró-Canturri A, Pachón-Ibáñez ME, Aznar J, Pachón J, Lepe JA, Smani S. Epidemiología clínica y factores pronósticos de la bacteriemia por *Klebsiella pneumoniae* vs. la bacteriemia por *Escherichia coli*. XXII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Bilbao, España. 2018.

4. **Rodríguez-Villodres A**, Ortiz de la Rosa JM, Álvarez-Marín R, Pachón-Ibáñez ME, Pachón J, Aznar J, Lepe JA, Smani Y. Efecto de la presión antibiótica con piperacilina/tazobactam sobre la resistencia a piperacilina/tazobactam en cepas clínicas de *Escherichia coli*. XXII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Bilbao, España. 2018.

5. **Rodríguez-Villodres A**, Gil-Marqués ML, Álvarez-Marín R, Bonnin R, Pachón-Ibáñez ME, Aguilar-Guisado M, NaasT, Aznar J, Pachón J, Lepe JA, Smani Y. Efecto *in vitro* e *in vivo* de la presión antibiótica con piperacilina/tazobactam en aislados clínicos de *Escherichia coli* causantes de bacteriemia. XX Congreso de la Sociedad Andaluza de Enfermedades Infecciosas (SAEI). Jerez de la Frontera, España. 2018.

6. **Rodríguez-Villodres A**, Álvarez-Marín R, Durán-Lobato M, Pachón-Ibáñez M, Aznar J, Pachón J, Lepe JA, Smani Y. Overexpression of outer membrane protein A by *Escherichia coli* as a risk factor for mortality in bloodstream infection. 29th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Ámsterdam, Holanda. 2019.

7. **Rodríguez-Villodres A**, Álvarez-Marín R, Pérez-Moreno MA, Miró-Canturri A, Durán-Lobato M, Pachón-Ibáñez ME, Aznar J, Pachón J, Lepe JA, Smani Y. Sobreexpresión de la proteína de membrana externa A (OmpA) como factor de riesgo para la mortalidad en la bacteriemia por *Escherichia coli*. XXI Congreso de la Sociedad Andaluza de Enfermedades Infecciosas (SAEI). Sevilla, España. 2019.

Otras publicaciones generadas durante el periodo de formación predoctoral

1. **Rodríguez-Villodres A**, Lepe JA, Blazquez J, Aznar J. Effect of subinhibitory concentration of ampicillin on *Listeria monocytogenes*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2019; pii: S0213-005X(19)30158-2. doi: 10.1016/j.eimc.2019.03.010. [Epub ahead of print].

2. Lepe JA, **Rodríguez-Villodres A**, Martín-Gutiérrez G, Luque R, Aznar J. *In vitro* study of synergy of ampicillin with ceftriaxone against *Listeria monocytogenes*. *Revista Española de Quimioterapia*. 2019. 32: 465-468.

3. Nordmann P, **Rodríguez-Villodres A**, Poirel L. A selective culture médium for screening linezolid-resistant gram-positive bacteria. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2019; 95: 1-4.

Patentes

1. Kit y método de detección rápida de bacterias resistentes a las combinaciones de antibiótico β -lactámico con inhibidores de β -lactamasa, y de la resistencia de espectro extendido a los β -lactámicos con inhibidores de β -lactamasas en aislados clínicos (Nº de solicitud P201930573). España. 2019.

INDICE DE CONTENIDOS

ABREVIACIONES	3
FIGURAS Y TABLAS	5
RESUMEN	6
I. INTRODUCCIÓN	9
1. Importancia del orden <i>Enterobacteriales</i> en la clínica humana	10
2. Epidemiología y clínica de las infecciones por <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i>	12
2.1 Situación epidemiológica de las infecciones por <i>E. coli</i> y <i>K. pneumoniae</i>	12
2.2 Características clínicas de las infecciones por <i>E. coli</i> y <i>K. pneumoniae</i>	13
2.3 Tratamiento de las infecciones por <i>E. coli</i> y <i>K. pneumoniae</i>	15
2.3.1 Cefalosporinas	16
2.3.2 Carbapenemas	18
2.3.3 Betalactámicos/inhibidores de betalactamasas	18
2.3.3.1 Ampicilina/sulbactam	19
2.3.3.2 Amoxicilina/ácido clavulánico	19
2.3.3.3 Piperacilina/tazobactam	20
2.3.3.4 Ceftazidima/avibactam	20
2.3.3.5 Ceftolozano/tazobactam	20
3. Factores de virulencia en <i>E. coli</i>	21
3.1 Adhesinas	21
3.2 Formación de <i>biofilm</i>	22
3.3 Sistemas de secreción	24
3.4 Toxinas	24
3.4.1 Endotoxina	25
3.4.2 Alfa-hemolisina	25
3.4.3 Factor citotóxico necrotizante 1	26
3.5 Sideróforos	26
3.6 Proteínas de membrana externa	26
4. Mecanismos de resistencia antimicrobiana en <i>E. coli</i>	28
4.1 Resistencia microbiana a los betalactámicos	29
4.1.1 Betalactamasas de espectro extendido	31
4.1.2 Carbapenemasas	32
4.2 Resistencia microbiana a los betalactámicos en combinación con inhibidores de betalactamasas	32

INDICE DE CONTENIDOS

II. FUNDAMENTOS	35
III. HIPÓTESIS	37
IV. OBJETIVOS	40
V. RESULTADOS	43
1. Capítulo I. Análisis de las características clínicas, pronósticas y microbiológicas de las bacteriemias por <i>E. coli</i> y <i>K. pneumoniae</i> y la infección intraabdominal por <i>E. coli</i>	44
1.1 Artículo 1. Epidemiology and risk factors for mortality in bloodstream infections by <i>Klebsiella pneumoniae</i> and <i>Escherichia coli</i>	45
1.2 Artículo 2. Epidemiology and risk factors for bacteremia and mortality in intraabdominal infections by <i>Escherichia coli</i>	66
1.3 Artículo 3. Phylogeny, resistome and virulome of <i>Escherichia coli</i> causing biliary tract infections	87
2. Capítulo II. La sobreexpresión de la proteína de membrana externa A (OmpA) como factor de riesgo para la mortalidad en la bacteriemia e infección intraabdominal por <i>E. coli</i>	101
2.1 Artículo 4. Overexpression of outer membrane protein A is a risk factor for mortality in <i>Escherichia coli</i> bloodstream infections	102
2.2. Datos adicionales no publicados	124
3. Capítulo III. Resistencia de espectro extendido a los betalactámicos en combinación con inhibidores de betalactamasas (ESRI) y desarrollo de un método de detección rápida de resistencia	129
3.1 Artículo 5. Extended-spectrum resistance to β -lactams/ β -lactamase inhibitors (ESRI) evolved from low-level resistant <i>Escherichia coli</i>	130
3.3 Artículo 6. Heteroresistance to piperacillin-tazobactam in clinical isolates of <i>Escherichia coli</i> sequence type 131	151
3.2 Artículo 7. Rapid detection of piperacillin/tazobactam resistance and extended spectrum resistance to β -lactams/ β -lactamase inhibitors (ESRI) in clinical isolates of <i>Escherichia coli</i>	155
VI. DISCUSIÓN GENERAL	184
VII. CONCLUSIONES	200
VIII. BIBLIOGRAFÍA	203

ABREVIACIONES

- BLEE:** Betalactamasas de espectro extendido
- BL/IBL:** Betalactámicos en combinación con inhibidores de betalactamasas
- CC:** Complejo clonal
- c-di-GMP:** Diguanilato cíclico
- CMI:** Concentración mínima inhibitoria
- CNI:** Concentración no inhibitoria
- CNF1:** Factor citotóxico necrotizante 1
- CTX-M:** Cefotaximasa
- CVC:** Catéter venoso central
- ECAD:** *E. coli* de adherencia difusa
- ECDC:** *European Centre for Disease Prevention and Control*
- ECEA:** *E. coli* enteroagregativa
- ECEH:** *E. coli* enterohemorrágica
- ECEI:** *E. coli* enteroinvasiva
- ECEP:** *E. coli* enteropatógena
- ECET:** *E. coli* enterotoxigénica
- EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético
- EPINE:** Estudio de la prevalencia de las infecciones nosocomiales en España
- ESRI:** Resistencia de espectro extendido a los betalactámicos en combinación con inhibidores de betalactamasas
- EUCAST:** *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
- ExPEC:** *E. coli* patógeno extraintestinal
- HlyA:** Alfa-hemolisina
- IL-1:** Interleucina-1
- ITU:** Infección del tracto urinario
- KPC:** *K. pneumoniae carbapenemase*
- LPS:** Lipopolisacárido
- MALDI-TOF:** *Matrix-Assisted laser desorption ionization-time of flight*
- MBL:** Metalobetalactamasa
- MERINO:** *Meropenem vs. Piperacillin-Tazobactam for Definitive Treatment of BSI's Due to Ceftriaxone Non-susceptible Escherichia coli and Klebsiella spp.*
- MLST:** *Multilocus sequence typing*
- OMP:** Proteína de membrana externa
- OmpA:** Proteína de membrana externa A

ABREVIACIONES

OXA: Oxacilinasas

PBP: Proteína de unión a penicilina

PBRT: *PCR-based replicon typing*

RSS: Resistencia a ampicilina/sulbactam y sensibilidad a amoxicilina/ácido clavulánico y piperacilina/tazobactam

RRS: Resistencia a ampicilina/sulbactam y amoxicilina/ácido clavulánico y sensibilidad a piperacilina/tazobactam

RRR: Resistencia a ampicilina/sulbactam, amoxicilina/ácido clavulánico y piperacilina/tazobactam

SHV: Betalactamasa tipo sulfhidrilo variable

SMART: *Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends*

SNC: Sistema nervioso central

ST: Secuenciotipo

TEM: Betalactamasa tipo Temoniera

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

UCI: Unidad de cuidados intensivos

FIGURAS Y TABLAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación filogenética por el método de máxima similitud para 49 géneros del orden *Enterobacterales* basado en 1548 familias de proteínas.

Figura 2. Estimación de las muertes atribuibles a diferentes causas en el año 2050.

Figura 3. Mecanismo de acción de los betalactámicos

Figura 4. Estructura de los principales inhibidores de betalactamasas utilizados en clínica.

Figura 5. Representación de algunos factores de virulencia en *E. coli*.

Figura 6. Representación de la formación de un *biofilm* bacteriano.

Figura 7. Estructura de la proteína de membrana externa A (OmpA).

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Concentración bacteriana en los diferentes tejidos y fluidos.

Tabla 2. Expresión de OmpA en los pacientes con infección intraabdominal bacteriémica y no bacteriémica.

RESUMEN

RESUMEN

Las infecciones por bacterias multirresistentes son un serio problema a nivel mundial. La aparición constante de mecanismos de resistencia a los antibióticos junto con el limitado desarrollo de nuevos compuestos con actividad antibacteriana en los últimos años plantea la necesidad de abordar este problema de forma urgente. Esta Tesis Doctoral se ha centrado en el estudio de las infecciones por *E. coli*, en especial la bacteriemia y la infección intraabdominal, tanto desde el punto de vista del paciente como del microorganismo.

Por un lado se analizaron las características clínicas y microbiológicas, así como factores de riesgo asociados con la mortalidad de los pacientes con bacteriemia por *E. coli* en comparación con pacientes con bacteriemia por *K. pneumoniae*. Este primer análisis mostró una serie de diferencias importantes entre uno y otro microorganismo. En la misma línea, se analizaron las características clínicas y microbiológicas de pacientes con infección intraabdominal por *E. coli* y su relación con la mortalidad, así como los factores de riesgo asociados al desarrollo de bacteriemia en este tipo de infección. Entre otros, la infección del tracto biliar parece jugar un papel importante, por lo que se decidió analizar la relación filogenética, el resistoma y el viruloma de un conjunto de aislados clínicos de *E. coli* causantes de infección biliar, con el objetivo de conocer si existen factores bacterianos que promuevan este tipo de infección. Aunque no existió relación filogenética entre los aislados, se encontraron numerosos factores de virulencia que podrían estar implicados en el desarrollo de infecciones del tracto biliar.

Por otro lado, el siguiente objetivo fue estudiar la expresión de un factor de virulencia concreto como es la proteína de membrana externa A (OmpA) en *E. coli*, y su asociación con la mortalidad de los pacientes con bacteriemia por *E. coli*. Se analizó una amplia cohorte de aislados clínicos procedentes de pacientes con bacteriemia, en los que se determinó la expresión de OmpA y se encontró que la sobreexpresión de esta proteína es un factor de riesgo independiente para la mortalidad de los pacientes con bacteriemia por *E. coli*. Estos resultados sugieren que OmpA tiene un papel importante en la patogénesis de este microorganismo.

Por último, y centrándonos en el tratamiento antibiótico de este tipo de infecciones, se estudió la existencia de un patrón de resistencia a los betalactámicos con inhibidores de betalactamasas (BL/IBL) en *E. coli*. Este patrón dio lugar a la descripción de un nuevo fenómeno denominado “resistencia de espectro extendido a los BL/IBL” o ESRI, el cual está favorecido por la presencia de concentraciones sub-óptimas de piperacilina/tazobactam, un antibiótico ampliamente utilizado para el tratamiento

RESUMEN

empírico de las infecciones graves por *E. coli*. Asimismo, y en relación con este objetivo, se llevó a cabo el diseño, desarrollo y validación de un sistema de detección rápida tanto de resistencia a piperacilina/tazobactam como de ESRI en *E. coli*. La descripción de este nuevo fenómeno de resistencia antibiótica, junto con la posibilidad de su detección anticipada, suponen una contribución innovadora a la par que prometedora en la lucha contra la resistencia a los antibióticos.

En conjunto, los datos derivados de esta Tesis Doctoral dan cuenta de la importancia del abordaje multifocal de este tipo de infecciones, las cuales suponen un problema de gran magnitud, con elevados costes tanto para el paciente como para el sistema sanitario.

I. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Importancia del orden *Enterobacterales* en la clínica humana

El orden *Enterobacterales*, dentro de la clase *Gammaproteobacteria*, es el grupo más grande y heterogéneo de bacilos gramnegativos con importancia clínica. Los miembros de este orden se encuentran colonizando multitud de nichos ecológicos como el suelo, el agua o viviendo en asociación con otros organismos como plantas o animales (1). Hasta el año 2016, se han descrito 60 géneros y más de 250 especies, proponiéndose una nueva clasificación que incluye siete grandes familias o clados: 1) familia *Enterobacteriaceae* (clado *Enterobacter-Escherichia*), 2) familia *Erwiniaceae* (clado *Erwinia-Pantoea*), 3) familia *Pectobacteriaceae* (clado *Pectobacterium-Dickeya*), 4) familia *Yersiniaceae* (clado *Yersinia-Serratia*), 5) familia *Hafniaceae* (clado *Hafnia-Edwardsiella*), 6) familia *Morganellaceae* (clado *Proteus-Xenorhabdus*), y 7) familia *Budviciaceae* (clado *Budvicia*) (Figura 1) (2). Dentro de estos clados, los más relevantes clínicamente son el 1, 4 y 6, los cuales incluyen varios géneros con importancia clínica para el ser humano como son *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Yersinia*, *Serratia*, *Proteus* y *Morganella* (2). Asimismo, dentro de estos géneros existen dos especies de especial relevancia para esta tesis doctoral como son *E. coli* y *K. pneumoniae*.

E. coli es un bacilo gramnegativo, que puede ser móvil o no, anaerobio facultativo, oxidasa negativo, con capacidad para fermentar la lactosa (3). Las otras especies que se encuentran dentro el género *Escherichia* actualmente, aunque con mucha menos relevancia clínica, son: *E. fergusonii* (4), *E. hermannii* (5), *E. marmotae* (6), *E. vulneris* (7) y *E. albertii* (8).

K. pneumoniae es un bacilo gramnegativo, no móvil, anaerobio facultativo, encapsulado, oxidasa negativo, con capacidad para fermentar la lactosa (9). Dentro de la gran variedad de especies incluidas en el género *Klebsiella*, las más relevantes clínicamente son *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* y *K. aerogenes* (anteriormente denominado *Enterobacter aerogenes*) (10,11).

INTRODUCCIÓN

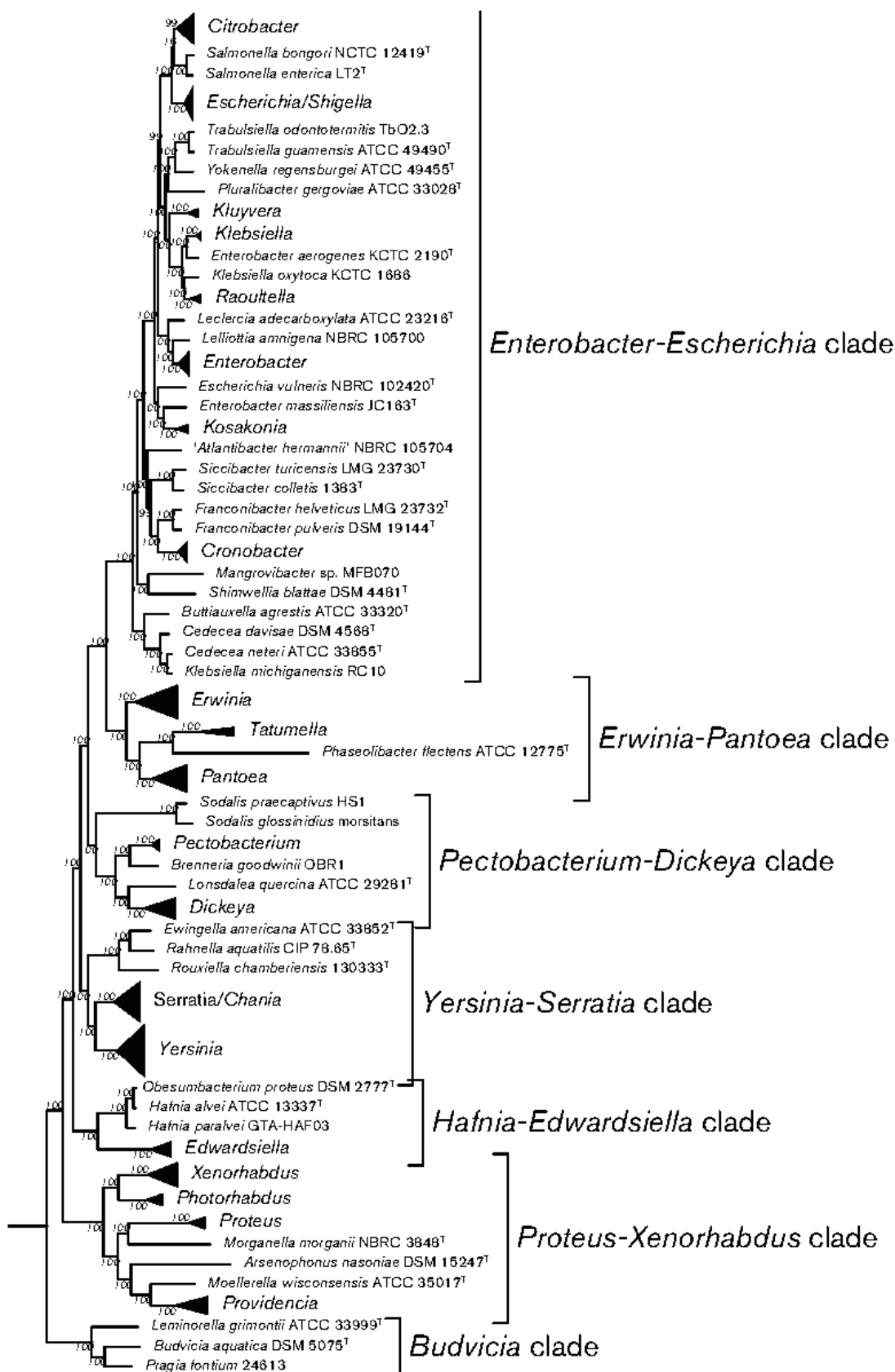


Figura 1. Representación filogenética por el método de máxima similitud para 49 géneros del orden *Enterobacteriales* basado en 1548 familias de proteínas (2).

INTRODUCCIÓN

2. Epidemiología y clínica de las infecciones por *E. coli* y *K. pneumoniae*

2.1 Situación epidemiológica de las infecciones por *E. coli* y *K. pneumoniae*

E. coli y *K. pneumoniae* se encuentran normalmente colonizando el intestino grueso de los seres humanos y otros mamíferos. En humanos, *E. coli* coloniza el tracto gastrointestinal de los niños pocas horas tras el nacimiento, pasando a ser el microorganismo anaerobio facultativo predominante en la microbiota colónica, donde mantiene una relación de mutualismo con su hospedador (1). *K. pneumoniae*, además de en el tracto gastrointestinal, se encuentra también en el ambiente, incluyendo el suelo y el agua, y en los dispositivos médicos, como los tubos de ventilación mecánica o los catéteres (12,13). La transmisión de estos microorganismos se produce típicamente a través de la ingestión de comida y agua contaminada, mediante el contacto persona-persona, contacto con animales, o contacto con ambientes o fómites contaminados con material fecal (3,14).

Aunque existen grupos patógenos específicos, la mayoría de las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* no causan enfermedad en personas sanas, existiendo como comensales en el intestino grueso o la orofaringe. Sin embargo, estas pueden comportarse como patógenos oportunistas cuando se dan ciertas condiciones, como la inmunodepresión del hospedador, la presencia de anomalías anatómicas o funcionales, o cuando el microorganismo se introduce en algún tejido tras un traumatismo o procedimiento quirúrgico (3,15).

Dependiendo del lugar en el que causan la infección, las cepas de *E. coli* pueden clasificarse en dos grandes grupos: *E. coli* intestinal o diarreogénica y *E. coli* extraintestinal (3). En el primer grupo se distinguen 6 patotipos: 1) *E. coli* enteropatógena (ECEP), 2) *E. coli* enterotoxigénica (ECET), 3) *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), 4) *E. coli* enteroagregativa (ECEA), 5) *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) y 6) *E. coli* de adherencia difusa (ECAD) (16). Todos estos patotipos están implicados en la producción de diarrea en el hospedador. Por otro lado, en el grupo de *E. coli* extraintestinal podemos encontrar todas aquellas cepas capaces de producir infección en otros sitios fuera del intestino, como infección del tracto urinario, bacteriemia e infecciones del tracto biliar, entre otras (17). Este grupo fue descrito en el año 2000 por Russo y Johnson (18) sugiriendo el término “*E. coli* patogénico extraintestinal o ExPEC” para todos aquellos aislados de *E. coli* no

INTRODUCCIÓN

comensales capaces de causar infecciones fuera del intestino, debido a la posesión de diferentes factores de virulencia (19).

En el caso de *K. pneumoniae*, este microorganismo se ha considerado causa de algunas infecciones graves como bacteriemia o neumonía, adquiriendo especial relevancia cuando afecta a individuos inmunocomprometidos, incluyendo aquellos que padecen diabetes o neoplasia (20–22). Sin embargo, la epidemiología de *K. pneumoniae* ha cambiado en los últimos años y actualmente es un microorganismo muy ligado a las infecciones en el ámbito hospitalario (15).

En cuanto a las relaciones filogenéticas, uno de los métodos más utilizados es la tipificación de secuencia multilocus, “*Multilocus sequence typing*”, en inglés, o MLST (23,24). Este método utiliza 7 genes constitutivos “*housekeeping genes*”, en inglés, de la bacteria, permitiendo separar a los aislados en grupos con idénticos perfiles alélicos (secuenciotipos, STs) o complejos clonales (CCs), los cuales se definen como un grupo de al menos tres STs que difieren de los otros en no más de 1 de los 7 alelos (25). La distribución filogenética de los aislados de *E. coli* a lo largo del mundo, aunque muy diversa, presenta cierta predominancia de varios STs como son el ST131, ST95, ST73 y ST69 (26–28). De especial relevancia es el ST131, un clon diseminado a nivel mundial asociado con multirresistencia a los antibióticos usado en clínica (29). En el caso de *K. pneumoniae*, también se han reportado varios STs predominantes a nivel mundial, como el ST258, ST15 y ST14, asociados también con multirresistencia a los antibióticos usado en clínica (15,30).

2.2 Características clínicas de las infecciones por *E. coli* y *K. pneumoniae*

El estudio de la prevalencia de las infecciones nosocomiales en España (EPINE) en el año 2018 mostró como *E. coli* y *K. pneumoniae* fueron el primer (19,1%) y cuarto (6,0%) patógeno, respectivamente, aislados más frecuentemente en infecciones en humanos (31). Esta situación es similar en toda Europa. El informe epidemiológico anual del *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) del año 2016 reportó que *E. coli* y *Klebsiella* spp. fueron el primer (14,7%) y cuarto (4,7%) microorganismo, respectivamente, más frecuentemente aislados en infecciones de sitio quirúrgico (32).

Entre las infecciones más frecuentemente producidas por *E. coli* se encuentran la infección del tracto urinario (ITU), la bacteriemia o la infección intraabdominal (17,33). De todas estas, la bacteriemia es una infección especialmente grave, que en caso de no

INTRODUCCIÓN

ser tratada adecuadamente puede evolucionar hasta un shock séptico y finalmente producir la muerte del paciente. Las tasas de incidencia de las bacteriemias por *E. coli* reportadas en países como Australia, Nueva Zelanda, Estados Unidos y Canadá se sitúan entre los 28 y los 52 casos por cada 100.000 habitantes (34–37), y las tasas de mortalidad entre el 12 y el 20% (38–40). En España, no existen datos específicos de la incidencia de la bacteriemia por *E. coli*, aunque globalmente se ha estimado una incidencia de bacteriemia comunitaria de 10 episodios por cada 1000 habitantes (41).

Por otro lado, la infección intraabdominal es una causa frecuente de morbi-mortalidad (33). Datos del estudio SMART (*Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends*), realizado en diferentes países como España, Turquía, Líbano y Jordania, muestran como *E. coli* representa entre el 40 y el 60% de los microorganismos que causan infección intraabdominal (42–44). Más concretamente, a nivel nacional, *E. coli* supone un 48,3% de los casos de infección intraabdominal (44). Además, la bacteriemia secundaria a una infección intraabdominal se asocia con un peor pronóstico que cuando cursa sin bacteriemia, especialmente cuando se desarrolla sepsis o shock séptico. En pacientes críticos, esta bacteriemia se produce en alrededor del 15% de los casos (45), pudiendo ser incluso mayor en pacientes sometidos a cirugía intraabdominal (26%) (46,47). Entre las infecciones intraabdominales, tienen especial relevancia aquellas del tracto biliar, normalmente asociadas con una elevada morbi-mortalidad (5-13%) (48,49), alcanzando hasta el 29% en casos de obstrucción maligna (50).

En el caso de *K. pneumoniae*, las infecciones en las que está implicada con mayor frecuencia son la bacteriemia, la neumonía, la ITU y los abscesos hepáticos (15). La tasa de incidencia de la bacteriemia por este microorganismo reportada en países como Estados Unidos y Canadá se sitúa entre los 7,2 y los 11,7 casos por cada 100.00 habitantes (21,51) y la mortalidad por la misma causa va del 27,4 al 37% (21,52–55). La neumonía por *K. pneumoniae* adquiere especial relevancia en el ámbito hospitalario, siendo el agente etiológico más frecuentemente aislado (9,8%) en pacientes con neumonía nosocomial tras *Staphylococcus aureus* (28,0%) y *Pseudomonas aeruginosa* (21,8%) (56). Además, desde los años 80 se ha reportado la presencia de una variante hipervirulenta en *K. pneumoniae* con capacidad para causar infecciones invasivas, especialmente abscesos hepáticos, tanto en individuos sanos como inmunocomprometidos (57–59).

2.3 Tratamiento de las infecciones por *E. coli* y *K. pneumoniae*

INTRODUCCIÓN

El tratamiento de las infecciones por *E. coli* y *K. pneumoniae* no es universal, sino que comprende un arsenal terapéutico de antibióticos que serán usados en uno u otro caso dependiendo del tipo y la gravedad de la infección, y del perfil de resistencia a los mismos que presenten estos microorganismos. Entre los antibióticos más utilizados están los betalactámicos (donde se incluyen penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenemas), betalactámicos en combinación con inhibidores de betalactamasas (BL/IBL), fluoroquinolonas, aminoglucósidos, cotrimoxazol o fosfomicina, entre otros (60). Sin embargo, el creciente aumento de cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* resistentes a uno o varios grupos de antibióticos ha limitado mucho las opciones de tratamiento (61). Tanto es así, que el Reino Unido ha planteado un escenario en el que el aumento de la resistencia a los antibióticos hará que, en 2050, las muertes por infecciones causadas por bacterias resistentes a los antibióticos pasen de 1 a 10 millones al año (62) (Figura 2).

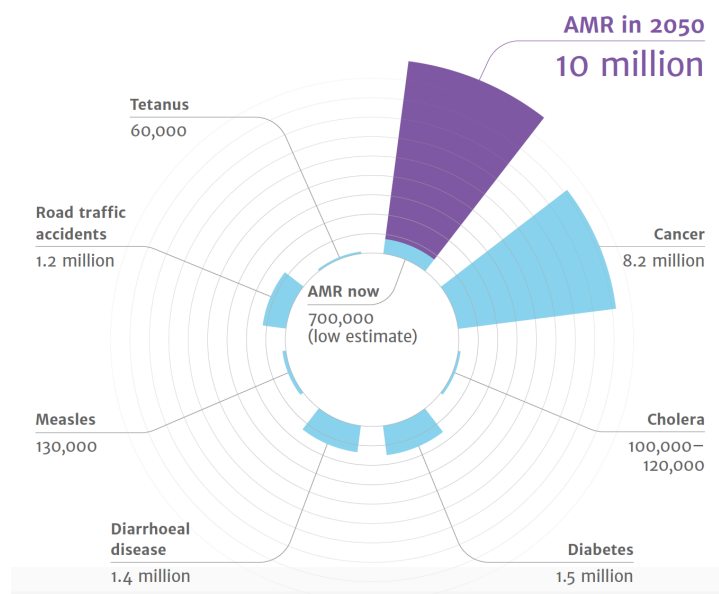


Figura 2. Estimación de las muertes atribuibles a diferentes causas en el año 2050 (62).

Este aumento en la resistencia antibiótica en *E. coli* y *K. pneumoniae* ha sido especialmente dramático en el caso de las quinolonas y los betalactámicos (60). La resistencia a este último grupo de antibióticos es, quizás, una de las más relevantes debido a la gran cantidad de antibióticos que lo componen. Esta resistencia viene dada principalmente por la presencia de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), betalactamasas de tipo AmpC y carbapenemasas (63,64). Algunos países europeos,

INTRODUCCIÓN

especialmente Grecia e Italia, han sufrido sobremanera este aumento de la resistencia a los betalactámicos, principalmente debido a la diseminación del CC 258 de *K. pneumoniae* portadora de una carbapenemasa de tipo KPC denominada así por *K. pneumoniae carbapenemase* (65). En Grecia, la proporción de bacteriemias por *K. pneumoniae* resistente a carbapenemas aumentó desde el 27,8% en 2005 hasta el 64,7% en 2017, mientras que en Italia, este aumento pasó del 1% en 2009 hasta el 29,7% en 2017 (66). En el resto de Europa, la situación se muestra cada vez más preocupante, con una tasa media de resistencia a carbapenemas en *K. pneumoniae* de 7,2% en 2017 y con un gradiente de resistencia de menos a más desde el norte y al sur de Europa (66).

2.3.1 Cefalosporinas

Las cefalosporinas son el grupo de betalactámicos más usado en todo el mundo debido a su amplio espectro de actividad, su buen perfil farmacocinético, su alta eficacia terapéutica y su buena tolerabilidad. Al igual que el resto de betalactámicos, las cefalosporinas interfieren en la síntesis de la pared bacteriana al unirse a unas enzimas conocidas como proteínas de unión a penicilina (PBPs), las cuales están implicadas en el proceso de formación de la pared celular bacteriana, lo que lleva finalmente a la lisis bacteriana (Figura 3) (67).

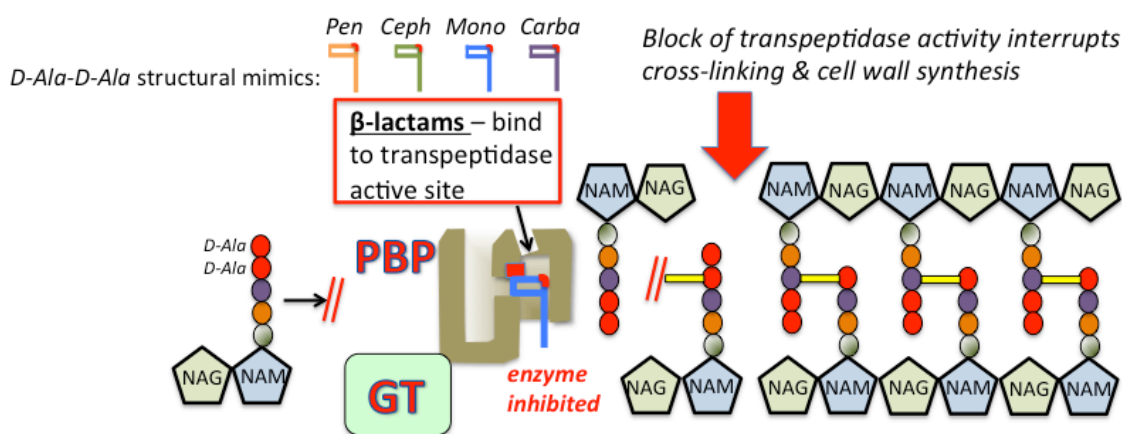


Figura 3. Mecanismo de acción de los betalactámicos. Los betalactámicos, como penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos o carbapenémicos, actúan inhibiendo las proteínas de unión a penicilina (PBPs), que son enzimas responsables de la transpeptidación de los residuos de ácido N-acetilmurámico (NAM), los cuales, junto con residuos de N-acetilglucosamina (NAG), son los que conforman la pared bacteriana. Pen, penicilinas; Ceph, cefalosporinas; Mono, monobactámicos; Carba, carbapenémicos; D-Ala, D-alanina; NAG, N-acetilglucosamina; NAM, ácido N-acetilmurámico; PBP, proteínas de unión a penicilina; GT, subunidad transglicosilasa. Tomado de Zango *et al.* MOJ Drug Des Develop Ther. 2019. 3: 52-58.

INTRODUCCIÓN

Las cefalosporinas se agrupan en 5 generaciones, de acuerdo a su espectro de actividad. Las de primera generación, que incluyen cefazolina, cefalotina o cefadroxiilo, entre otras, son activas contra cocos grampositivos, pero tienen una actividad limitada frente a bacilos gramnegativos (67). Las de segunda generación, que incluyen cefuroxima o cefaclor, entre otras, mantienen el espectro de actividad de las de primera generación, pero también son activas frente a ciertos bacilos gramnegativos como *Haemophilus influenzae* (67). Las de tercera generación como cefotaxima, ceftazidima o ceftriaxona, disminuyen su actividad frente a cocos grampositivos en comparación con las de primera o segunda generación, pero en cambio tienen una alta actividad frente a enterobacterias como *E. coli* y *K. pneumoniae* (67). En el caso de las cefalosporinas de cuarta generación, entre las que se incluye la cefepima, estas presentan un espectro de actividad más equilibrado frente a grampositivos y gramnegativos, en comparación con las de tercera generación (68). Las cefalosporinas de tercera y cuarta generación son antibióticos ampliamente utilizados para el tratamiento de las infecciones graves producidas por bacilos gramnegativos, como sepsis, infección intraabdominal o infección respiratoria (69). Por último están las cefalosporinas de quinta generación, entre las que se destaca el ceftolozano (70). Este último se comercializa en combinación con tazobactam y se ha propuesto como un tratamiento eficaz para las infecciones urinarias o intraabdominales producidas por enterobacterias productoras de BLEE, especialmente *E. coli*, o infecciones producidas por *P. aeruginosa* resistente a ceftazidima. Su uso no se recomienda en infecciones por enterobacterias productoras de carbapenemasas, *P. aeruginosa* productora de metalobetalactamasas (MBL) ni para las infecciones por *Acinetobacter baumannii* (69,70).

A pesar de ser uno de los grupos de betalactámicos más utilizados, la aparición de enterobacterias productoras de BLEE o de betalactamasas AmpC ha limitado el uso de las cefalosporinas, haciendo necesario el uso de otros antimicrobianos con diferente espectro de actividad, como son los carbapenemas o los BL/IBL (69).

2.3.2 Carbapenemas

INTRODUCCIÓN

Clásicamente los carbapenemas han sido uno de los grupos de betalactámicos con mayor espectro de actividad, tanto contra grampositivos como gramnegativos aerobios y anaerobios (71). Además, los carbapenemas son antibióticos particularmente estables contra una amplia variedad de betalactamasas, incluyendo las BLEE y las de tipo AmpC (72). Tal es su actividad que se han considerado durante mucho tiempo como “antibióticos de último recurso”, utilizado preferentemente cuando se sospecha una infección grave en el paciente por una bacteria multirresistente (71). Tres son los carbapenemas más relevantes en clínica: imipenem, meropenem y ertapenem. Imipenem fue el primero que se autorizó (1984), más de diez años después se autorizó el segundo, meropenem (1995), y en el año 2002 se autorizó el tercero, ertapenem (72). El espectro de actividad de estos tres compuestos va a variar en función del perfil de resistencia y del tipo de betalactamasa producida por el microorganismo (72).

Los carbapenemas, especialmente imipenem y meropenem, se consideran como el tratamiento de elección en las infecciones graves, independientemente del origen, por enterobacterias productoras de BLEE, entre las que se incluyen *E. coli* y *K. pneumoniae* (73–75). Sin embargo, la aparición y diseminación de las carbapenemasas a lo largo de todo el mundo está limitando el uso de esta familia de antibióticos (76) por lo que algunos autores han propuesto el uso de otros antibióticos como alternativa a los carbapenemas. Entre estos se encuentran las cefamicinas, la cefepima y los BL/IBL (77,78).

2.3.3 *Betalactámicos/inhibidores de betalactamasas*

Los BL/IBL surgieron ante la necesidad de desarrollar nuevos antibióticos por la aparición de las betalactamasas, las cuales limitaban el uso de los betalactámicos disponibles hasta el momento. Estos inhibidores (Figura 4) son compuestos capaces de unirse al centro activo de la betalactamasa, bloqueando su acción hidrolítica, y permitiendo que el betalactámico pueda unirse a las PBP y ejercer su acción antibacteriana (79). Varias combinaciones comprenden este grupo de antibióticos, entre las que destacan: Ampicilina/sulbactam, amoxicilina/ácido clavulánico, piperacilina/tazobactam, ceftazidima/avibactam, y ceftolozano/tazobactam.

INTRODUCCIÓN

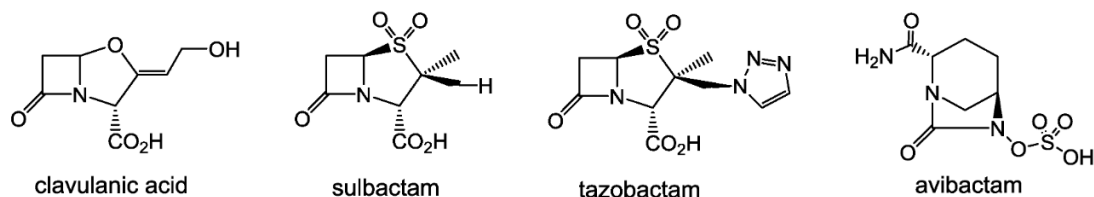


Figura 4. Estructura de los principales inhibidores de betalactamasas utilizados en clínica. Tomado de Konaklieva *et al.* Antibiotics. 2014. 3: 128-142.

2.3.3.1 Ampicilina/sulbactam

Sulbactam es un inhibidor de betalactamasas sintético que fue desarrollado por la industria farmacéutica en 1978 (80). Actúa frente a las betalactamasas de forma reversible, mediante la formación de un intermediario de tipo acil-enzima (81). Se comercializa en combinación con ampicilina, una penicilina, en una proporción 2:1 de ampicilina y sulbactam, respectivamente (79). Tiene actividad contra microorganismos anaerobios, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *H. influenzae*, *Moraxella catarrhalis* y *Proteus mirabilis* productores de ciertas betalactamasas (82–84). Esta actividad de amplio espectro lo convirtió, durante un tiempo, en un tratamiento eficaz contra infecciones polimicrobianas como infecciones abdominales o quirúrgicas, neumonías por aspiración, abscesos odontogénicos o infecciones del pie diabético. Sin embargo, su uso ha quedado limitado debido al aumento de cepas de *E. coli* resistentes a este antibiótico (85).

2.3.3.2 Amoxicilina/ácido clavulánico

El ácido clavulánico fue el primer inhibidor que se introdujo en la práctica clínica en 1970, aislado a partir de *Streptomyces clavuligerus* (86). Junto con amoxicilina, una penicilina, fue la primera combinación de BL/IBL que se incluyó en la práctica clínica (1981). Se comercializa en diferentes proporciones de amoxicilina y ácido clavulánico (87). Esta combinación permitía extender el espectro de la amoxicilina contra microorganismos productores de betalactamasas de tipo penicilinasas como *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *Bacteroides* spp., *Neisseria gonorrhoeae* y *P. mirabilis* (79). Actualmente se recomienda para el tratamiento empírico

INTRODUCCIÓN

de infecciones respiratorias, ITUs, infecciones de piel y partes blandas, así como infecciones intraabdominales (87,88).

2.3.3.3 Piperacilina/tazobactam

Tazobactam fue desarrollado en 1980 como un compuesto sintético por la industria farmacéutica (89). Se comercializa en una proporción 8:1 de piperacilina y tazobactam, respectivamente (79). La piperacilina por si sola es activa contra *P. aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* y ciertos anaerobios (90). La combinación con tazobactam permite disminuir la concentración mínima inhibitoria (CMI) de piperacilina en miembros del orden *Enterobacterales*, *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae* y *M. catarrhalis* productoras de ciertas betalactamasas (91). Actualmente este antimicrobiano se recomienda en el tratamiento empírico de infecciones graves como bacteriemias, infecciones intraabdominales, neumonías complicadas e ITUs complicadas (33,92–94).

2.3.3.4 Ceftazidima/avibactam

Ceftazidima/avibactam es un antibiótico de reciente comercialización que surge de la combinación entre una cefalosporina de tercera generación (ceftazidima) y un inhibidor de betalactamasas (avibactam). Esta combinación presenta actividad contra bacilos gramnegativos, incluyendo *Enterobacterales* y *P. aeruginosa*, productores de betalactamasas de clase A, C y algunas de clase D, de las que se hablará más adelante (69). Sin embargo, no presenta actividad contra las betalactamasas de clase B, también denominadas MBL. Por otro lado muestra una mínima actividad contra *Acinetobacter* spp., cocos grampositivos y microorganismos anaerobios (95,96). Se comercializa en proporción 4:1 de ceftazidima y avibactam, respectivamente (97) y ha demostrado una eficacia similar a los carbapenemas en el tratamiento empírico de infecciones intraabdominales (combinada con metronidazol) e ITUs complicadas (69).

2.3.3.5 Ceftolozano/tazobactam

Al igual que en el caso anterior, ceftolozano/tazobactam es una combinación reciente entre una oximino-cefalosporina (ceftolozano) y un inhibidor de betalactamasas

INTRODUCCIÓN

(tazobactam). Ceftolozano/tazobactam es activo contra microorganismos gramnegativos, incluyendo enterobacterias productoras de BLEE y *P. aeruginosa* resistentes a ceftazidima. Frente a *Acinetobacter* spp. muestra una actividad variable según el aislado clínico (69). Se comercializa en una proporción 2:1 de ceftolozano y tazobactam, respectivamente (70), y su uso está recomendado para el tratamiento de infecciones intraabdominales e ITUs complicadas (69,98).

A pesar de la existencia de tratamientos antibióticos eficaces, a veces se produce fracaso terapéutico en pacientes con infecciones por cepas de *E. coli* sensibles. Esto es debido, en parte, a la existencia de diversos factores de virulencia presentes en el microorganismo.

3. Factores de virulencia en *E. coli*

Uno de los principales motivos por los que *E. coli* puede pasar de ser un mero colonizador del intestino a producir infecciones graves es la presencia de factores de virulencia (60). Muchos de estos factores están codificados en plásmidos, por lo que son transmisibles (99), resultando en multitud de combinaciones posibles, lo que le permite a *E. coli* diversificar ampliamente el espectro de infecciones que puede producir (60). Existen diferentes factores de virulencia en *E. coli*, como se describe a continuación.

3.1 Adhesinas

El proceso de infección llevado a cabo por *E. coli* normalmente comienza con la unión de la bacteria a una célula del hospedador expresando una amplia variedad de adhesinas responsables de la unión a moléculas específicas de la membrana celular del hospedador (100) (Figura 5). La adhesión de *E. coli* a la célula del hospedador puede ser más que una simple unión hospedador-patógeno, ya que muchas de las moléculas usadas para el reconocimiento funcionan como señalizadores o como activadores del reclutamiento de la bacteria hacia el citosol (101). Las adhesinas pueden clasificarse como fimbriales o afimbriales según se encuentren localizadas o no en fimbrias, respectivamente (102). La unión a la célula del hospedador mediante este tipo de estructuras va a permitir a *E. coli* interactuar con la membrana celular del hospedador y asegurar una liberación óptima de sus toxinas en la vecindad de los receptores asociados a la membrana, produciendo eventos de señalización que afectarán a las funciones de transporte/secreción u

INTRODUCCIÓN

organización estructural de la célula hospedadora (103). Para otros patógenos, sin embargo, estos factores permiten la iniciación o compleción de señales que llevarán a lesionar la célula hospedadora.

Las principales familias de adhesinas en *E. coli* incluyen las adhesinas fimbriales dependientes de la vía chaperona/usher (104,105), las dependientes de la vía alternativa chaperona/usher (106), las adhesinas fimbriales agregadas finas dependientes de la nucleación extracelular (107), las adhesinas dependientes del sistema de secreción tipo I (108), las adhesinas de membrana externa dependientes del sistema de secreción de tipo III (109), los pili ensamblados de tipo IV (110) y las adhesinas no fimbriales triméricas dependientes del sistema de secreción de tipo V (111), y las proteínas de membrana externa (OMPs) (112).

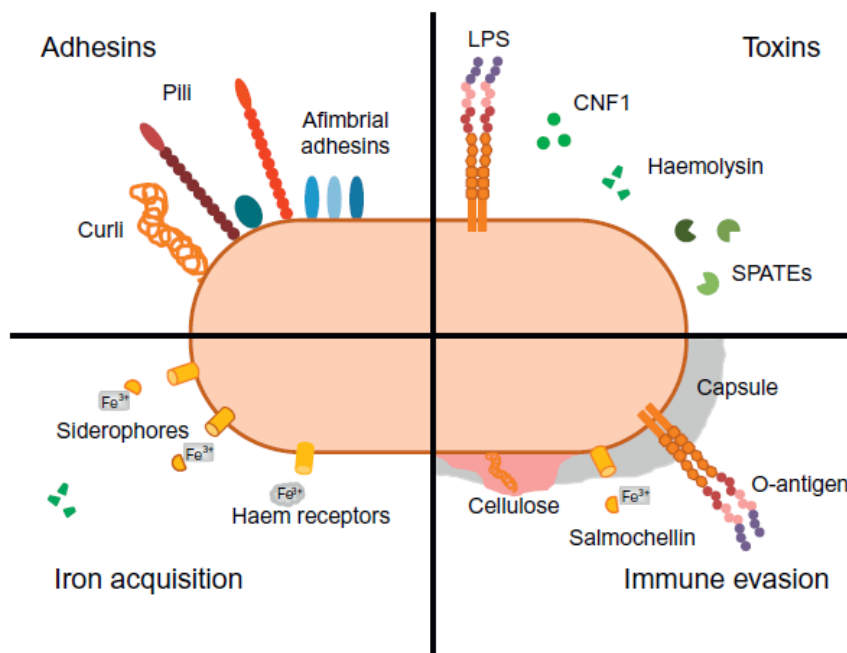


Figura 5. Representación de algunos factores de virulencia en *E. coli*. Tomado de Lüthje & Brauner. *Advances in Microbial Physiology*. 2014. 65: 337-372.

3.2 Formación de *biofilm*

La formación de *biofilm* es la capacidad de un microorganismo para auto-organizarse en una comunidad multicelular, que se encuentra embebida en una matriz de exopolisacáridos, proteínas y DNA extracelular (113). Esta matriz confiere protección a toda la comunidad bacteriana para sobrevivir en ambientes desfavorables y durante el

INTRODUCCIÓN

proceso infeccioso (114) (Figura 6). Además, el *biofilm* es una estructura compleja y dinámica ya que las células que lo conforman son dinámicas y heterogéneas (115). Esta capacidad permite a la bacteria colonizar tanto superficies bióticas como abióticas (116,117), siendo un factor de virulencia con importancia clínica, especialmente en las infecciones crónicas. Esto se debe tanto a la incapacidad del sistema inmune para erradicar a los microorganismos como al fracaso del tratamiento antibiótico al no poder penetrar en el interior del *biofilm* (60).

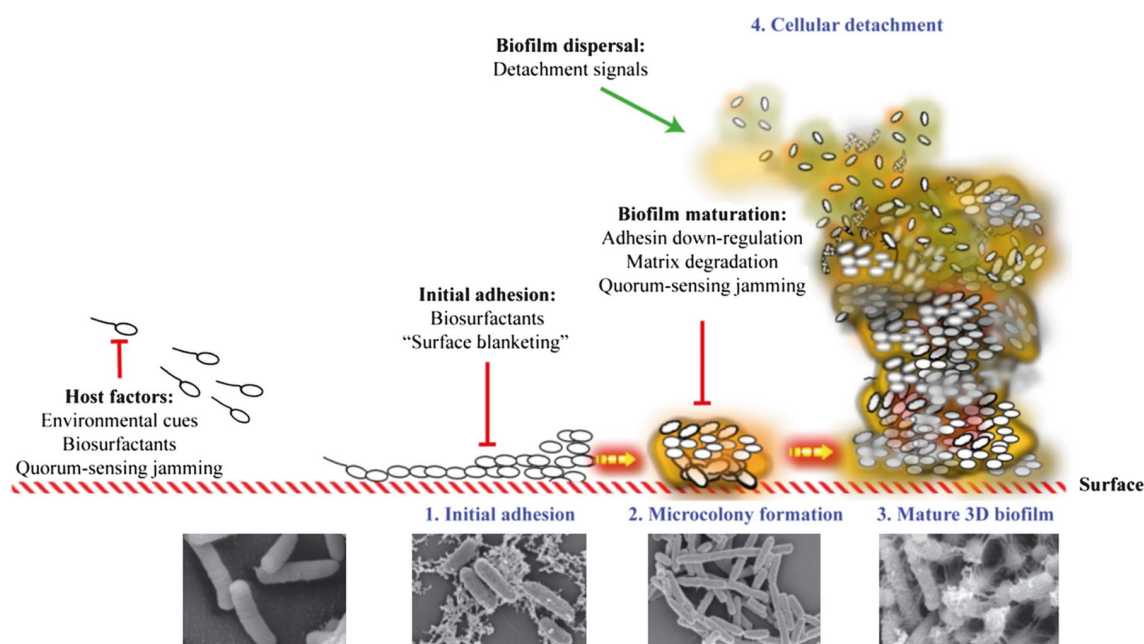


Figura 6. Representación de la formación de un *biofilm* bacteriano. La formación de biofilm comienza con bacterias de vida libre que se acercan a una superficie, se unen y se agregan. Posteriormente crecen y se dividen formando microcolonias que darán lugar a un biofilm maduro. Finalmente parte del biofilm se dispersa para liberar bacterias que colonizaran otras superficies Tomado de Rendueles *et al.* FEMS Microbiol Rev. 2012. 36: 972-989.

En *E. coli*, la formación de *biofilm* es un fenómeno que no está estudiado profundamente, considerando el extenso número de fimbrias que aún no se han caracterizado, el número de operones potencialmente implicados en la formación de exopolisacáridos (118), así como la información genética transferida horizontalmente conteniendo factores de adherencia y formación de *biofilm* (119,120).

Existe un tipo de *biofilm* en *E. coli*, conocido como rdar, que se puede identificar por la morfología característica que adquieren las colonias de *E. coli*. Este morfotipo se ha encontrado en cepas de *E. coli* tanto comensales como uropatógenas (121,122). El *biofilm*

INTRODUCCIÓN

de tipo rdar es un *biofilm* multicelular caracterizado por la expresión de componentes de la matriz extracelular como fibras de curli, unas proteínas amiloides, y de celulosa (121). La expresión de este morfotipo rdar es capaz de cambiar la interacción de *E. coli* con el hospedador, aunque a veces el papel de las fibras curli y la celulosa tienen efectos opuestos en la interacción patógeno-hospedador tanto en cultivos celulares como en modelos animales de ITU (122–125). No obstante, la expresión del morfotipo rdar está altamente regulada tanto *ex vivo* como *in vivo* en *E. coli*. Uno de los principales reguladores de la formación de *biofilm* de tipo rdar es el diguanilato cíclico (c-di-GMP), un mensajero secundario implicado en la regulación de la transición entre la vida sésil y móvil de los microorganismos (126–128).

Otra molécula que se ha relacionado con la formación de *biofilm* en *E. coli* es la proteína de regulación global CsrA, la cual funciona tanto como reprimiendo la formación del *biofilm* como activando la dispersión del *biofilm* bajo una variedad de condiciones de cultivo (129).

3.3 Sistemas de secreción

Los sistemas de secreción son utilizados por *E. coli* para el transporte de moléculas desde el interior hacia el exterior celular. Este proceso puede darse en uno o en dos pasos (130). En los procesos de un solo paso los sustratos se transportan directamente desde el citoplasma bacteriano al espacio extracelular o al interior de la célula diana, y están mediados por los sistemas de secreción de tipo I, III y VI (131). Por el contrario, los procesos en dos pasos los sustratos se translocan primero al espacio periplásmico para posteriormente transferirse a la membrana externa o secretarse al espacio extracelular. Este tipo de procesos los llevan a cabo los sistemas de secreción de tipo II y V. Por otro lado, los sistemas de secreción de tipo IV pueden utilizar tanto la vía de un paso como la de dos pasos (131).

3.4 Toxinas

Las toxinas facilitan a *E. coli* la diseminación en los tejidos y el acceso a nutrientes dentro de la célula hospedadora (Figura 5). Además, la actividad tóxica de estos compuestos resulta normalmente en una fuerte reacción inflamatoria, en respuesta a la necrosis o a la propia toxina (132).

INTRODUCCIÓN

3.4.1 Endotoxina

El lipopolisacárido (LPS) es el mayor componente de la membrana externa de *E. coli* como de otras bacterias gramnegativas. Es un componente altamente inmunogénico, y debido a que se encuentra unido a la bacteria y no se libera al exterior, se le conoce también como endotoxina (132). El LPS está compuesto por varias partes: i) el lípido A, localizado en la cara externa de la membrana externa, ii) el core de polisacáridos, y iii) repeticiones de las subunidades del antígeno O, las cuales se sitúan en la parte más exterior de la superficie de la bacteria y son las que concentran el mayor poder inmunógeno (133). La parte más conservada es el lípido A, mientras que el core y, especialmente, el antígeno O son los más variables en estructura y función (132). El papel del LPS en la virulencia de *E. coli* es bien conocido. Se sabe que activa la respuesta inmune del hospedador induciendo la producción de óxido nítrico y citoquinas como interleucina-1 (IL-1) o factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α) (134,135). Esto también se ha observado *in vivo*, donde cepas de *E. coli* mutantes en la vía de síntesis del LPS, tienen menor capacidad de activar la respuesta inflamatoria del hospedador (136).

3.4.2 Alfa-hemolisina

La alfa-hemolisina (HlyA) es una toxina formadora de poros que es secretada por *E. coli*. Esta toxina afecta a varios tipos celulares, incluyendo eritrocitos, células epiteliales y células del sistema inmune (137), especialmente neutrófilos (138). Además de la afectación hematológica, las cepas de *E. coli* que expresan HlyA inducen una exfoliación pronunciada durante la infección (139). Esta exfoliación del epitelio parece debida a que la HlyA estimula la actividad de serina proteasas y caspasas, las cuales median la degradación de la paxilina (importante para estabilizar los contactos célula-célula), induciendo la apoptosis celular (140). Esta exfoliación, además, facilita la entrada de la bacteria a través del tejido (140).

3.4.3 Factor citotóxico necrotizante 1

INTRODUCCIÓN

El factor citotóxico necrotizante 1 (CNF1) es una toxina producida por ciertas cepas patógenas de *E. coli* implicada en infecciones extraintestinales, especialmente ITUs (141). Esta toxina induce un número de cambios celulares basados en reordenamientos del citoesqueleto de actina, lo que permite la internalización de la bacteria en el interior del epitelio (142). Además, presenta una profunda actividad proinflamatoria, *in vitro*, en uroepitelio y en monocitos (142,143), aunque este efecto es menos evidente *in vivo* (144,145).

3.5 Sideróforos

El hierro es un elemento fundamental para el metabolismo bacteriano, pero la disponibilidad del mismo a veces está altamente restringida en el sitio de infección. Por eso es fundamental para la bacteria contar con sistemas que le permitan captar el hierro, permitiendo su propia supervivencia en ambientes desfavorables (146) (Figura 5). Los sideróforos son compuestos de bajo peso molecular con una gran afinidad por el hierro, y son factores esenciales en muchos bacilos gramnegativos. Funcionan como quelantes de hierro, los cuales posteriormente liberan el hierro en el interior de la bacteria (147).

En *E. coli* se han descrito varios sistemas de sideróforos, entre los que destacan la enterobactina y su receptor FebA, la salmochelina y IroN, la aerobactina y IutA y la yersiniabactina y FyuA (148). A pesar de las diferencias químicas que presentan entre ellos, cada sistema tiene una serie de pasos específicos requeridos para la captación del hierro que incluyen: i) síntesis del sideróforo, ii) exportación del sideróforo al exterior, iii) recepción del complejo hierro-sideróforo en la superficie de la membrana externa, iv) internalización del complejo, y v) liberación del hierro en el citoplasma (148).

3.6 Proteínas de membrana externa

Los bacilos gramnegativos presentan una doble membrana en su envuelta, la cual funciona como agente protector y permite el paso de nutrientes a través de ella. Al ser la primera línea de contacto entre la bacteria y su ambiente, esta funciona como una barrera selectiva que previene la entrada de numerosas moléculas tóxicas para la bacteria permitiendo, a su vez, la entrada de nutrientes requeridos para la supervivencia celular. La membrana externa está principalmente compuesta por proteínas, denominadas OMPs o porinas, las cuales tienen funciones esenciales para la célula, incluyendo la captación

INTRODUCCIÓN

de nutrientes, la adhesión y señalización celular, y la exportación de residuos (149). Además, en cepas patógenas de *E. coli*, muchas de estas OMPs sirven también como factores de virulencia para la captación de nutrientes y la evasión de los mecanismos de defensa del hospedador (150).

Dentro de las OMPs, OmpA se postula como un factor de virulencia importante en bacilos gramnegativos. La estructura de OmpA se caracteriza por un dominio N-terminal que forma un barril- β antiparalelo, formado por 8 láminas, el cual está embebido en la membrana externa. Estas 8 láminas están conectadas por 4 largos lazos en la superficie de la membrana externa y tres giros periplásmicos cortos (Figura 7). OmpA se encuentra anclada al peptidoglicano de forma no covalente y tiene actividad de porina (151). Esta OMP, que se encuentra ampliamente conservada entre las especies bacterianas, es la proteína más abundante en la superficie de la bacteria, la cual tiene multitud de funciones (151).

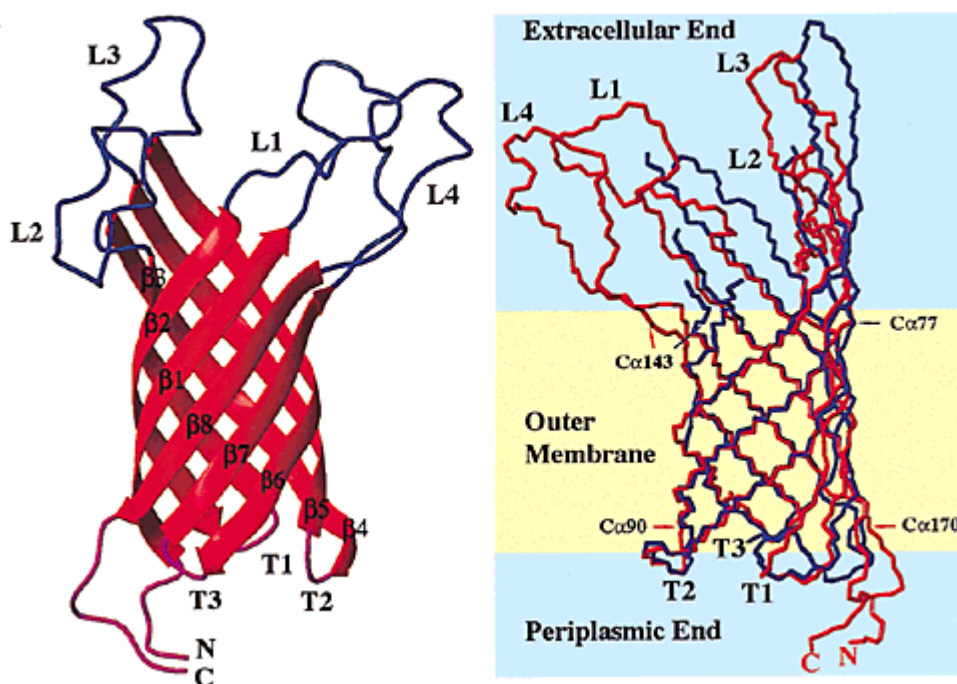


Figura 7. Estructura de la proteína de membrana externa A (OmpA). Tomado de Arora *et al.* Nat Struc Biol. 2001. 8: 334-338.

En *E. coli*, OmpA es una de las principales OMPs, estimándose aproximadamente unas 100.000 copias por célula (152). La importancia de OmpA en la virulencia de *E. coli* se ha demostrado en numerosos sistemas modelo. OmpA es un factor de virulencia en cepas

INTRODUCCIÓN

de *E. coli* productoras de meningitis, participando en la adhesión y la invasión del endotelio capilares del sistema nervioso central (SNC) y los astrocitos (153–155). Weiser y Gotschlich demostraron que un mutante, deficiente en la producción de OmpA, de una cepa de *E. coli* causante de meningitis fue menos virulento y más sensible a los efectos bactericidas mediados por el complemento, en un modelo de embrión de pollo y en un modelo neonatal de rata (156). OmpA también está implicada en la adhesión de ECEP a las células epiteliales de las superficies mucosas, los leucocitos y los macrófagos (157). Por otro lado, OmpA es crítica para promover la infección persistente en el epitelio urogenital. Nicholson *et al.* (158) demostraron que durante la infección del tracto urinario, la expresión de OmpA en bacterias *wild-type* aumentó de 20 a 30 veces tras la infección. Mutantes deficientes en la producción de OmpA tienen menos adherencia e invasividad en el epitelio vesical que las bacterias *wild-type* (158). En el caso de ECEH, OmpA demostró ser una molécula implicada en la adhesión de la bacteria a la célula epitelial (159,160). Además, se ha demostrado que OmpA estimula las células dendríticas para secretar citoquinas proinflamatorias IL-1, IL-10 e IL-12 de una forma dosis-dependiente y TLR4 de una forma dosis-independiente (159). Otras de las funciones de OmpA en *E. coli* son la supervivencia en el interior de macrófagos y monocitos (161,162) así como la formación de *biofilm* (163,164).

Otras OMPs implicadas en la virulencia de *E. coli* son OmpW, OmpX y OmpF. Las dos primeras (OmpW y OmpX) están relacionadas con la capacidad de evasión del sistema inmune en *E. coli*, especialmente en la evasión del complemento (165,166), mientras que OmpF se ha asociado con la adhesión, invasión y colonización de *E. coli* (167).

Además de la existencia de diversos factores de virulencia, *E. coli* está caracterizada también por la adquisición de diferentes mecanismos de resistencia antimicrobiana.

4. Mecanismos de resistencia antimicrobiana en *E. coli*

La resistencia antimicrobiana en *E. coli* es un grave problema a nivel mundial debido a diferentes factores. Por un lado *E. coli* representa uno de los mayores reservorios de genes de resistencia antimicrobiana, los cuales pueden donarse o recibirse mediante transferencia horizontal entre otras cepas de la misma especie o, incluso, a otras especies bacterianas. Por otro lado, se ha observado un aumento en el número de genes de resistencia en *E. coli* durante las últimas décadas (63). Aunque han surgido mecanismos

INTRODUCCIÓN

responsables de la resistencia a prácticamente todos los antibióticos usados para tratar las infecciones por *E. coli*, en esta tesis doctoral nos vamos a centrar en la resistencia de *E. coli* al grupo de los betalactámicos.

4.1 Resistencia microbiana a los betalactámicos

La resistencia de *E. coli* a los betalactámicos se produce fundamentalmente por la expresión de betalactamasas. Las betalactamasas son enzimas bacterianas que hidrolizan el anillo betalactámico, inactivando el antimicrobiano antes de que este alcance su diana PBP en la pared bacteriana (168). Los genes que codifican las betalactamasas pueden localizarse en el cromosoma bacteriano, en plásmidos, o en transposones, y es el ambiente genético el que va a determinar si la betalactamasa se produce de forma constitutiva o inducible (168). Las betalactamasas se pueden clasificar según su similitud en la secuencia aminoacídica (Clases A, B, C y D de Ambler) o según su perfil de sustrato e inhibidor (Grupos 1, 2, 3 y 4 de Bush-Jacoby-Medeiros) (169–172).

Las betalactamasas de clase A (grupo 2 de Bush) comprenden la clase más ampliamente distribuida y estudiada de todas las betalactamasas y que incluye varias serina-betalactamasas presentes en el centro activo de la betalactamasa. Esta serina es esencial para llevar a cabo su actividad hidrolítica. Entre las enzimas de la clase A más frecuentemente encontradas en *E. coli* están: i) las de tipo Temoniera (TEM), nombre de la primera paciente a la que se le detectó este tipo de enzima, son activas frente a penicilinas y cefalosporinas de primera generación, ii) las de tipo sulfhidrilo variable (SHV), una enzima con actividad similar a TEM, originalmente identificada en el cromosoma de *K. pneumoniae*, y posteriormente movilizada a plásmidos, y iii) las de tipo cefotaximasa (CTX-M), una enzima inherentemente activa contra cefotaxima, una cefalosporina de 3ª generación (173). Parte del éxito de estas enzimas ha sido su diseminación en plásmidos u otros elementos genéticos móviles a través de un rango de microorganismos gramnegativos, especialmente los *Enterobacterales*, y su capacidad para expandir su espectro de actividad hacia nuevos sustratos (173).

Las betalactamasas de clase B de Ambler (grupo 3 de Bush) incluye aquellas enzimas dependientes de zinc conocidas como MBL. Estas enzimas son miembros de una superfamilia de metalohidrolasas ampliamente distribuida (174,175). Presentan un amplio espectro de actividad, que comprende penicilinas, cefalosporinas y carbapenemas, aunque muestran poca o ninguna actividad frente a los monobactámicos (176,177). Estas

INTRODUCCIÓN

enzimas se inhiben por agentes quelantes como el ácido etilendiaminotetraacético denominado también EDTA, pero no por inhibidores de betalactamasas como el ácido clavulánico (168). Los genes *bla* que codifican para estas MBLs se encuentran en una gran variedad de elementos génicos (cromosoma, plásmidos, integrones, etc.) (178).

Las betalactamasas de clase C (grupo 1 de Bush) están ampliamente distribuidas en los cromosomas de muchas especies de bacilos gramnegativos como *Citrobacter freundii*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens* y *P. aeruginosa* (168). Estas serina-betalactamasas, conocidas como AmpC, no suelen expresarse en condiciones normales o lo hacen a muy bajo nivel. Sin embargo, bien debido a una mutación o a una inducción por betalactámicos, se puede producir la desrepresión de la expresión de los genes que codifican para estas enzimas, llevando a una hiperproducción de las mismas y al consecuente aumento de la CMI de ciertos betalactámicos, especialmente cefalosporinas de tercera generación, limitando las opciones de tratamiento (179,180). El gen *bla_{AmpC}* también se encuentra en el cromosoma de *E. coli*, pero expresándose de forma constitutiva, debido a la ausencia del gen *ampR*, un gen regulador de la expresión de AmpC. Por este motivo, y a diferencia de otras enterobacterias, en *E. coli* no se produce la activación del gen *bla_{AmpC}* en presencia de antibióticos inductores (181,182). Las betalactamasas AmpC son activas frente a penicilinas y cefalosporinas, pudiendo hidrolizar cefamicinas como cefoxitina y monobactámicos como el aztreonam. Los inhibidores de betalactamasas como el ácido clavulánico, el sulbactam o el tazobactam tienen poco efecto sobre este tipo de enzimas (183–185). También pueden encontrarse en plásmidos, incluso en *E. coli*, existiendo varias familias de enzimas: CMY, FOX, ACC, LAT, MIR, ACT, MOX y DHA (186).

Por último, las betalactamasas de clase D (grupo 2f de Bush) son serina-betalactamasas capaces de hidrolizar la oxacilina (de ahí su denominación oxacilinasas o betalactamasas de tipo OXA) (168), las cuales siempre se encuentran localizadas en plásmidos (187). Aunque las primeras enzimas tipo OXA que se identificaron tenían una actividad limitada a las penicilinas, actualmente se conocen una gran variedad de enzimas que también son activas contra las cefalosporinas y los carbapenemas (187,188). Este tipo de enzimas que hidrolizan carbapenemas son especialmente importantes en microorganismos como *A. baumannii* (189). En el orden *Enterobacterales*, la OXA-48 es una de las más importantes, debido a su capacidad de hidrolizar carbapenemas. Esta enzima fue descubierta inicialmente en *K. pneumoniae* (190), aunque actualmente se ha detectado en varias especies de enterobacterias, incluyendo *E. coli* (187). Recientemente también se

INTRODUCCIÓN

ha reportado como OXA-1 es un mecanismo importante en la resistencia a los BL/IBL en *E. coli* productora de BLEE (191).

4.1.1 *Betalactamasas de espectro extendido*

Poco después de la introducción de la ceftazidima y la cefotaxima en la práctica clínica apareció la resistencia a estos mismos antibióticos en *E. coli* (192). En 1989 se describió el concepto de “betalactamasas de espectro extendido” o BLEE, haciendo referencia a enzimas de tipo TEM o SHV que presentaban mutaciones que les conferían un espectro de actividad ampliado con respecto a las TEM o SHV clásicas (193). Posteriormente se han descrito otras enzimas responsables de este fenotipo de resistencia antimicrobiana como CTX-M, PER, VEB, GES y TLE (194–197). Las BLEE son enzimas que se caracterizan por presentar resistencia a las oximino-cefalosporinas (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefuroxima y cefepime) y a los monobactámicos (aztreonam) pero no afecta a las cefamicinas (cefotaxina) ni a los carbapenemas (imipenem, meropenem y ertapenem) (74). Además, estas enzimas se inhiben por inhibidores de betalactamasas como ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam (198). Durante la década de los años 90, *K. pneumoniae* BLEE portadora de TEM o SHV fue la que predominó y causó más brotes a nivel global, especialmente nosocomiales. Sin embargo, a partir del año 2000, *E. coli* BLEE portadora de CTX-M ha emergido como una causa importante de infecciones adquiridas en la comunidad, especialmente aquellas de origen urinario (199). Actualmente, CTX-M es la BLEE más ampliamente distribuida a nivel mundial en enterobacterias, especialmente en *E. coli* (198). A nivel europeo la resistencia a las cefalosporinas de tercera generación debido a la producción de BLEE en *E. coli* ha aumentado desde un 11,9% en el año 2012 hasta un 14,9% en el año 2017 mostrando un claro gradiente norte-sur, con el mayor porcentaje de resistencia en el sur de Europa.

4.1.2 *Carbapenemasas*

Las carbapenemasas son el grupo de betalactamasas con mayor espectro de hidrólisis, afectando a prácticamente todos los grupos de betalactámicos (200,201). Actualmente, las carbapenemasas se incluyen en las clases A, B y D de Ambler (202).

Las serina-carbapenemasas, que comprenden las clases A y D, se descubrieron en los años 80 (202). Existen varias familias principales de carbapenemasas de clase A, que

INTRODUCCIÓN

incluyen las enzimas tipo NMC/IMI, SME, GES y KPC. Estas enzimas hidrolizan carbapenemas y se inhiben parcialmente por el ácido clavulánico (203). Este tipo de enzimas son, quizás, las más importantes clínicamente y epidemiológicamente por su elevado potencial para diseminarse y su difícil tratamiento (204,205). Entre las principales carbapenememasas de clase D se encuentran las carbapenemasas de tipo OXA. La primera OXA con actividad carbapenemasa se aisló en *A. baumannii* en 1993 (206), y desde entonces se han descrito numerosas enzimas OXA capaces de hidrolizar carbapenemas, la mayoría de ellas en esta especie bacteriana, aunque también en *P. aeruginosa* y *Enterobacterales*, incluyendo *E. coli* (202).

El grupo de las MBLs incluye a las enzimas de la clase B de Ambler. Desde el punto de vista clínico, las familias más importantes son IMP, VIM y NDM (178,203). Estas enzimas confieren resistencia a todos los betalactámicos excepto los monobactámicos, y no se inhiben por ácido clavulánico (168).

4.2. Resistencia microbiana a los betalactámicos en combinación con inhibidores de betalactamasas

Los inhibidores de betalactamasas clásicos como sulbactam, ácido clavulánico y tazobactam se comercializan en combinación con penicilinas dando lugar a las combinaciones: ampicilina/sulbactam, amoxicilina/ácido clavulánico y piperacilina/tazobactam. Estos antibióticos son activos frente a betalactamasas de clase A como TEM-1, TEM-2, SHV-1 o CTX-M (207). Estas combinaciones surgieron como una estrategia para combatir la producción de betalactamasas por parte de las bacterias. No obstante, la primera descripción de resistencia a un BL/IBL (amoxicilina/ácido clavulánico) en *E. coli* fue en 1989, tan solo 8 años después de su comercialización (208). De estas tres combinaciones, piperacilina/tazobactam es uno de los más utilizados en la práctica clínica diaria debido a su mayor espectro de actividad, lo que lo convierte en un antibiótico muy utilizado para el tratamiento empírico de infecciones graves como bacteriemia e infecciones intraabdominales (33,92). Sin embargo, parece ser que el uso excesivo de BL/IBL está contribuyendo a la emergencia de mecanismos de resistencia que limitan su uso terapéutico (209,210). Datos extraídos del estudio SMART (*Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends*) en España muestra como se ha producido un aumento en las tasas de resistencia media en *E. coli* causante de infección intraabdominal, desde el 17,6% hasta el 18,5,1% para amoxicilina/ácido clavulánico y

INTRODUCCIÓN

desde el 7,7% hasta el 10% para piperacilina/tazobactam, durante los periodos 2002-2010 y 2016-2017, respectivamente (44,211). Por otro lado, un estudio llevado a cabo por Suseno *et al.* (212) entre 2006 y 2016 en los Estados Unidos también mostró que cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* aisladas de muestras clínicas aumentaron su resistencia a piperacilina/tazobactam desde aproximadamente un 0,5% hasta un 1,4%. De la misma forma, en Inglaterra, las tasas de resistencia a P/T han aumentado en las bacteriemias por *E. coli* desde un 8,5% hasta un 11,7% y en el caso de amoxicilina/ácido clavulánico desde el 31% al 42% desde 2011 hasta 2015 (69,213).

Diversos son los mecanismos de resistencia por los que *E. coli* presenta resistencia a los BL/IBL, entre los que se encuentran la hiperproducción de betalactamasas TEM-1 (214,215), la aparición de mutantes de TEM-1 conocidos como IRT, del inglés *inhibitor-resistant TEM* (207), la modificación de algunas OMPs en combinación con la presencia de betalactamasas (216), la producción de betalactamasas OXA-1 (191), la producción de betalactamasas SHV (217) o la hiperproducción de betalactamasas AmpC (218). De todos estos mecanismos, los más frecuentes son aquellos que se asocian con las betalactamasas de tipo TEM.

Aunque estos tres IBL pueden inhibir enzimas de tipo TEM, la resistencia a BL/IBL mediada por los mecanismos previamente expuestos suele afectar en mayor medida a ampicilina/sulbactam y amoxicilina/ácido clavulánico, permaneciendo piperacilina/tazobactam activo contra la mayoría de estas enzimas (207,219). Esto se puede explicar porque tazobactam presenta la mayor actividad inhibidora contra las betalactamasas de tipo TEM, seguido del ácido clavulánico y el sulbactam (79,209). En consecuencia, la resistencia a los BL/IBL en *E. coli* parece producirse a diferentes niveles, pudiendo considerarse de bajo nivel cuando solo afecta a ampicilina/sulbactam o amoxicilina/ácido clavulánico y de alto nivel cuando se extiende a piperacilina/tazobactam.

II. FUNDAMENTOS

FUNDAMENTOS

La emergencia de infecciones por enterobacterias multirresistentes plantea un serio problema a nivel mundial que necesita urgentemente de soluciones eficaces. Para abordarlo, se pueden seguir tres estrategias diferentes: i) mediante el conocimiento de las características epidemiológicas y clínicas de los pacientes que padecen la infección, ii) mediante el conocimiento de las características microbiológicas, en términos de virulencia y resistencia antimicrobiana, de los microorganismos que causan la infección, y iii) mediante el desarrollo de sistemas de detección rápida de resistencia antimicrobiana. *E. coli* y *K. pneumoniae* son dos de las principales enterobacterias causantes de bacteriemia. Dado que existen diferencias microbiológicas en términos de epidemiología, patogenicidad y factores de virulencia entre estas dos bacterias, es probable que también existan diferencias en cuanto a las características clínicas y los factores relacionados con la mortalidad de los pacientes con bacteriemia por uno u otro microorganismo. Por otro lado, *E. coli* es el principal microorganismo causante de infección intraabdominal, la cual está asociada con una elevada mortalidad, especialmente cuando cursa con bacteriemia. Sin embargo, apenas existen estudios sobre la incidencia y las características clínicas y microbiológicas en este tipo de pacientes.

Para poder producir una infección *E. coli* necesita de factores de virulencia. Uno de estos factores de virulencia que son importantes para el contacto patógeno-hospedador son las OMPs. En concreto, OmpA ha demostrado tener un papel importante en la virulencia de *E. coli*, tanto *in vitro* como en modelos animales. Además, la sobreexpresión de OmpA ha demostrado ser un factor de riesgo para el desarrollo de neumonía y bacteriemia, y mortalidad en *A. baumannii*. Sin embargo, no existen estudios que evalúen si la sobreexpresión de OmpA se asocia a una mayor mortalidad en la bacteriemia por *E. coli*. Otro aspecto importante a considerar es el tratamiento antimicrobiano. Piperacilina/tazobactam es un antimicrobiano ampliamente utilizado en el tratamiento empírico de las infecciones graves. Sin embargo, en los últimos años está aumentando la proporción de cepas de *E. coli* con resistencia a este antimicrobiano. Conocer los mecanismos por los que *E. coli* adquiere resistencia a piperacilina/tazobactam y, en consecuencia, desarrollar un sistema de detección rápida de resistencia al mismo sería fundamental para optimizar el abordaje terapéutico de los pacientes con infecciones graves por *E. coli*.

III. HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

Las hipótesis de esta tesis doctoral son las siguientes:

Capítulo I. Análisis de las características clínicas, pronósticas y microbiológicas de las bacteriemias por *E. coli* y *K. pneumoniae* y la infección intraabdominal por *E. coli*.

1. Existen diferencias en las características epidemiológicas y clínicas de la bacteriemia por *E. coli* y *K. pneumoniae*.
2. Existen diferencias en las características clínicas, pronósticas y epidemiológicas entre la infección intraabdominal por *E. coli* con y sin bacteriemia.
3. Los aislados clínicos de *E. coli* procedentes de foco biliar muestran diferencias con respecto a los aislados clínicos intraabdominales de foco no biliar.

Capítulo II. La sobreexpresión de la proteína de membrana externa A (OmpA) como factor de riesgo para la mortalidad en la bacteriemia e infección intraabdominal por *E. coli*.

1. La sobreexpresión de OmpA es un factor de riesgo para la mortalidad en la bacteriemia por *E. coli*.
2. La sobreexpresión de OmpA en *E. coli* facilita la diseminación desde el foco abdominal en modelos murinos.

La sobreexpresión de OmpA es un factor de riesgo para el desarrollo de bacteriemia a partir de foco intraabdominal por *E. coli*.

Capítulo III. Resistencia de espectro extendido a los betalactámicos en combinación con inhibidores de betalactamasas (ESRI) y desarrollo de un método de detección rápida de resistencia.

1. Los aislados clínicos de *E. coli* causantes de bacteriemia e infección intraabdominal que tienen bajo nivel de resistencia a los BL/IBL pueden adquirir resistencia a piperacilina/tazobactam si se exponen a concentraciones subinhibitorias del antimicrobiano.
2. La exposición a concentraciones crecientes de piperacilina/tazobactam produce la adquisición de resistencia de espectro extendido a los BL/IBL (ESRI).
3. La ESRI, incluida a piperacilina/tazobactam, es debida a la acción de las betalactamasas de tipo TEM .y afecta a la resistencia a cefalosporinas.

HIPÓTESIS

4. La presencia de betalactamasas en *E. coli* puede dar lugar a fenómenos de heterorresistencia a piperacilina/tazobactam
5. La ESRI, incluida a piperacilina/tazobactam, puede ser detectada mediante un sistema de detección rápida.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es realizar un análisis clínico-epidemiológico, de factores de virulencia y mecanismos de resistencia a los BL/IBL en aislados clínicos de *E. coli* causantes de bacteriemia e infección intraabdominal.

Objetivos del capítulo I. Análisis de las características clínicas, pronósticas y microbiológicas de las bacteriemias por *E. coli* y *K. pneumoniae* y la infección intraabdominal por *E. coli*.

1. Analizar las características clínicas y los factores pronósticos asociados con la mortalidad en las bacteriemias por *E. coli* y *K. pneumoniae*.
2. Comparar las características epidemiológicas y clínicas y los factores pronósticos asociados con la infección intraabdominal por *E. coli* bacteriémica y sin bacteriemia.
3. Estudiar la relación clonal, el resistoma y el viruloma de los aislados clínicos de *E. coli* procedentes de foco biliar *versus* los de foco intraabdominal no biliar.

Objetivos del capítulo II. La sobreexpresión de la proteína de membrana externa A (OmpA) como factor de riesgo para la mortalidad en la bacteriemia e infección intraabdominal por *E. coli*.

1. Estudiar la relación entre la expresión de OmpA y la mortalidad de los pacientes con bacteriemia por *E. coli*.
2. Estudiar el impacto de la sobreexpresión de OmpA en la patogenicidad de *E. coli* en un modelo experimental murino de sepsis peritoneal.
3. Comparar la expresión de OmpA en los pacientes con infección intraabdominal no bacteriémica y bacteriemia por *E. coli*.

Objetivos del capítulo III. Resistencia de espectro extendido a los betalactámicos en combinación con inhibidores de betalactamasas (ESRI) y desarrollo de un método de detección rápida de resistencia.

1. Estudiar el perfil de resistencia a BL/IBL de los aislados clínicos de *E. coli* procedentes de bacteriemia e infección intraabdominal.
2. Analizar la actividad de piperacilina/tazobactam sobre aislados clínicos de *E. coli* con bajo nivel de resistencia a BL/IB, tras su exposición a concentraciones crecientes de piperacilina/tazobactam.
3. Demostrar la adquisición de ESRI, incluida a piperacilina/tazobactam, en dichos aislados y su estabilidad.

OBJETIVOS

4. Analizar la relación entre el tratamiento con piperacilina/tazobactam y la recurrencia por adquisición de resistencia a piperacilina/tazobactam en *E. coli* en pacientes.
5. Estudiar el mecanismo subyacente a la ESRI y si la resistencia adquirida a piperacilina/tazobactam afecta a la actividad de las cefalosporinas.
6. Estudiar la presencia de heterorresistencia a piperacilina/tazobactam en *E. coli*.
7. Desarrollar un sistema de detección rápida de resistencia a BL/IBL.

V. RESULTADOS

CAPÍTULO I

Análisis de las características clínicas, pronósticas y microbiológicas de las bacteriemias por *E. coli* y *K. pneumoniae* y la infección intraabdominal por *E. coli*.

CAPÍTULO I. Artículo 1

Objetivo 1. Analizar las características clínicas y los factores pronósticos asociados con la mortalidad en las bacteriemias por *E. coli* y *K. pneumoniae*.

Artículo 1: Epidemiology and risk factors for mortality in bloodstream infections by *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*.

El objetivo de este trabajo fue analizar la epidemiología y los factores pronósticos para la mortalidad en las bacteriemias por *K. pneumoniae* y *E. coli* en la población general.

Para ello se llevó a cabo un estudio de cohortes observacional y prospectivo en el hospital Universitario Virgen del Rocío en el que se recogieron variables demográficas, clínicas y microbiológicas y se compararon entre ambos grupos de pacientes. Se llevó a cabo un análisis bivariado y un análisis multivariado para identificar factores de riesgo relacionados con la mortalidad. Además se realizó un análisis microbiológico en el que se determinó la actividad antimicrobiana de diferentes antibióticos.

Se incluyeron 106 pacientes con bacteriemia por *K. pneumoniae* y 247 con bacteriemia por *E. coli*. La bacteriemia por *K. pneumoniae* se asoció con la adquisición nosocomial, donde la bacteriemia fue mayormente de origen respiratorio o relacionada con el catéter. Estos pacientes necesitaron de más control del foco que los que tuvieron bacteriemia por *E. coli*, tenían mayor presencia de dispositivos externos y mayor exposición previa a los antibióticos. En contra, los pacientes con bacteriemia por *E. coli* tuvieron mayor adquisición comunitaria, donde el foco fue principalmente urinario y tuvieron mayor presencia de cáncer. El análisis multivariado identificó como factores de riesgo para la mortalidad en la bacteriemia por *K. pneumoniae* los índices de Charlson y Pitt, así como el foco gastrointestinal, mientras que para la bacteriemia por *E. coli* fueron también los índices de Charlson y Pitt, así como la presencia de catéter venoso central (CVC) permanente y sonda nasogástrica. El foco urinario de la bacteriemia, sin embargo, fue seleccionado como un factor protector. En cuanto al perfil de sensibilidad antibiótica, *K. pneumoniae* mostró más resistencia a cefalosporinas, amikacina y colistina, así como mayor producción de betalactamasas de espectro extendido.

En conclusión, existen diferencias clínicas, epidemiológicas y microbiológicas notables entre la bacteriemia por *K. pneumoniae* y la bacteriemia por *E. coli*.

El manuscrito resultante de este trabajo se enviará a la revista *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*.

CAPÍTULO I. Artículo 1

Title: Epidemiology and risk factors for mortality in bloodstream infections by *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*.

Abstract

The objective of this study was to analyse the epidemiology and prognostic factors for the mortality in bloodstream infections by *Klebsiella pneumoniae* (BSI_Kp) and *Escherichia coli* (BSI_Ec) in non-selected population. A prospective observational cohort study was conducted. Variables were collected and comparing between both groups. Bivariate and multivariate analyses were performed to identify risk factors for mortality, and antimicrobial activity was determined. One hundred and six BSI_Kp and 247 BSI_Ec were included. BSI_Kp was associated with nosocomial acquisition, lower respiratory tract and catheter infections, source management, presence of devices, and previous antibiotic treatment. BSI_Ec was associated with community acquisition, urinary tract origin and cancer. Multivariate analysis identified Charlson and Pitt scores, and gastrointestinal origin as independent factors related to mortality in BSI_Kp; and Charlson and Pitt scores, presence of permanent central venous catheter and nasogastric tube as independent factors related to mortality in BSI_Ec. Urinary tract origin of bacteremia was found as protective factor. *K. pneumoniae* showed more resistance to cephalosporins, amikacin and colistin, and more ESBL production. In conclusion, this is the first study about epidemiology and prognostic factors for mortality between BSI_Kp and BSI_Ec in non-selected population. Great differences were observed between BSI_Kp and BSI_Ec in terms of clinical and microbiological features and risk factors related to mortality among patients with BSI_KP and BSI_Ec.

CAPÍTULO I. Artículo 1

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, bloodstream infections, epidemiology, mortality.

CAPÍTULO I. Artículo 1

INTRODUCTION

Bloodstream infections (BSI) have increased in the last years causing high morbidity and mortality.^{1,2} Enterobacterials are the most common Gram-negative bacteria involved in BSI,³ with *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in the first and second more frequent positions, having incidence rates of 28-52 per 100,000⁴⁻⁷ and 7.2-11.7 per 100,000^{8,9}, respectively. Moreover, in spite of both microorganisms belonged to the Enterobacterials family differences between them exist in terms of pathogenicity, such as virulence factors or evasion of the immune response.^{10,11} Infections by *K. pneumoniae* have been associated with worse clinical outcome than *E. coli* and, recently, the emergence of hypervirulent *K. pneumoniae* strains have focused attention on this pathogen.^{10,12,13} Antimicrobial resistance is another main point to be considered between *K. pneumoniae* and *E. coli* causing BSI. In Europe, *K. pneumoniae* has been associated with higher antimicrobial resistance rates to third generation cephalosporins, quinolones, aminoglycosides and carbapenems than *E. coli*.¹⁴

The knowledge of the differences in terms of clinical characteristics and mortality-related factors between BSI by *K. pneumoniae* (BSI_Kp) and *E. coli* (BSI_Ec) would be important to improve the clinical management and outcomes of the patients with infections by both microorganisms. Most of the studies about BSI_Kp and BSI_Ec are focused in ESBL, carbapenem-resistant pathogens,^{12,13,15-17} or in specific populations groups (eg. onco-hematological or elderly patients).¹⁷⁻¹⁹ Of note, there are no reports comparing BSI_Kp and BSI_Ec in non-selected populations. To this end, studying differences in the epidemiology and prognostic factors related with the mortality in BSI caused by *E. coli* and *K. pneumoniae* in overall population will be necessary in order to improve the clinical management of patients with BSI_Kp and BSI_Ec. The aim of this study was to analyse the epidemiology, clinical features, antimicrobial susceptibility and

CAPÍTULO I. Artículo 1

resistance and the factors associated with the mortality of the non-selected population with BSI_Kp and BSI_Ec.

MATERIAL AND METHODS

Study design, patients and ethics

We conducted a prospective observational cohort study between February 2016 to March 2017, at the University Hospital Virgen del Rocío (Seville, Spain). All consecutive adult patients (≥ 18 years) with positive blood cultures by *K. pneumoniae* or *E. coli*, independently of the infection source, were included in the study. The onset of BSI was defined as the date of the blood cultures extraction. Only the first BSI episode was included in this study during the patient's admissions. The study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital Virgen del Rocío of Seville (approval no. 0023-N-16). Written informed consent was signed by all patients before inclusion in the study.

Variables and definitions

The following variables were collected from the patients: age and sex; comorbidities and severity of chronic underlying diseases (Charlson²⁰ and McCabe scores,²¹) presence of solid or hematological malignancies, immunosuppression, and neutropenia [< 500 neutrophils/ μl], acquisition type (defined as community-, health care- or hospital-acquired, source of BSI according with clinical and microbiological criteria, source control, sepsis or septic shock,²² Pitt score,²³ presence of devices (urinary catheter, transitory or permanent central venous catheter (CVC), nasogastric tube, and mechanical ventilation), antibiotic exposure in the two months prior the BSI and appropriate empirical therapy for the current episode. The patients were followed up until hospital discharge,

CAPÍTULO I. Artículo 1

death or 30 days, whichever occurred first. All clinical decisions were made by the physicians in charge of the patients.

Microbiological studies

K. pneumoniae and *E. coli* were identified using MALDI-TOF (Bruker Daltonik GmbH, Leipzig, Germany). The antimicrobial activity of the following antibiotics: amoxicillin-clavulanic acid, piperacillin/tazobactam, cefuroxime, ceftazidime, cefotaxime, cefepime, ertapenem, imipenem, meropenem, ciprofloxacin, levofloxacin, gentamicin, tobramycin, amikacin, co-trimoxazole and tigecycline against *K. pneumoniae* and *E. coli* isolates was measured by broth microdilution method using MicroScan Walk Away NM44 panels (Beckman Coulter, Inc., USA). Colistin activity was determined by standard broth microdilution as recommended by the European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST),²⁴ and PCR for *mcr-1* and *mcr-2* genes using specific primers (*mcr-1* Fw 5'-CGGTCAGTCCGTTTGTTC-3', *mcr-1* Rv 5'-CTTGGTCGGTCTGTAGGG-3', *mcr-2* Fw 5'-ATGACATCACATCACTCTTGG-3' , *mcr-2* Rv 5'-TTACTGGATAAATGCCGCGC-3'^{25,26} were performed in the colistin-resistant isolates. Interpretation criteria were performed following the EUCAST breakpoint tables.²⁷ ESBL production was confirmed using the broth microdilution synergy test according to the EUCAST standards.²⁸ MDR criteria was established as non-susceptible to ≥ 1 agent in ≥ 3 antimicrobial categories.²⁹ *E. coli* ATCC 25922 was used as control strain.

Statistical analysis

A descriptive analysis was performed for demographics and clinical variables, with median and range for the quantitative variables and frequency distribution for the qualitative variables. Fisher and χ^2 tests were used for categorical variables, and

CAPÍTULO I. Artículo 1

continuous variables were analyzed using Mann Whitney *U* test. Logistic regression analysis was performed to identify independent risk factors for death. Variables known to be associated with death for BSI_Kp and BSI_Ec, or with *P* values ≤ 0.1 in bivariate analysis, were included in the multivariate analysis. Furthermore, multivariate analysis of the variables associated with death was performed for BSI_Kp and BSI_Ec. Differences were considered significant at $P < 0.05$. All statistical analyses were performed using SPSS software, version 20.0 (SPSS).

RESULTS

Patients, clinical characteristics and risk factors

A total of 353 patients with BSI were included in the study, 106 (30.1%) by *K. pneumoniae* and 247 (69.9%) by *E. coli*. Demographics and clinical variables are summarized in Table 1. Several differences were found between both pathogens. BSI_Kp were more frequently hospital-acquired ($P < 0.001$), with source in lower respiratory tract ($P = 0.01$), catheter ($P < 0.001$), and presence of devices ($P = 0.002$) (especially transitory CVC ($P < 0.001$), nasogastric tube ($P < 0.001$) and mechanical ventilation ($P < 0.001$)), as well as previous antibiotic exposure ($P = 0.001$), and required more source control ($P = 0.033$). While, *E. coli* was more frequently associated with community acquired BSI ($P = 0.002$), cancer ($P = 0.048$), primary site of the BSI from urinary tract ($P = 0.025$). No differences in mortality were found between both pathogens (17.9% vs. 18.6%).

Factors related to mortality in BSI_Kp and BSI_Ec

The bivariate analysis showed that presence of systemic autoimmune diseases ($P = 0.008$), lung disease ($P = 0.031$) and hematological malignances ($P = 0.031$), and presence of sepsis ($P = 0.004$) were associated with mortality in BSI_Kp (Table 2). While presence of cancer ($P < 0.001$), diabetes mellitus ($P = 0.042$), dementia ($P = 0.034$), neutropenia ($P = 0.040$),

CAPÍTULO I. Artículo 1

health care-associated BSI ($P=0.035$), primary BSI ($P=0.007$), presence of septic shock ($P<0.001$), and presence of devices ($P=0.047$) especially permanent CVC ($P=0.006$) were associated with mortality in BSI_Ec (Table 3). Furthermore, in BSI_Kp and BSI_Ec, Charlson score ($P=0.016$ and $P<0.001$), McCabe score ultimately or rapidly fatal ($P<0.001$ and $P<0.001$), gastrointestinal origin of BSI ($P=0.008$ and $P=0.019$), Pitt score ($P<0.001$ and $P=0.001$) and presence of nasogastric tube ($P=0.003$ and $P<0.001$) were associated with mortality, respectively (Table 2 and Table 3).

It is noteworthy that factors associated with survival in BSI_Ec were found such as community-acquired BSI ($P=0.007$) and urinary tract origin of BSI ($P<0.001$) (Table 3). The multivariate analysis showed that Charlson score (odds ratio [OR], 1.39 [95% confidence interval (CI), 1.07-1.82; $P=0.014$]), gastrointestinal source of BSI (OR, 13.10 [1.52-112.71; $P=0.019$]) and Pitt score (OR, 1.65 [1.17-2.33; $P=0.004$]) were associated with mortality in BSI_Kp (Table 4). While Charlson score (OR, 1.44 [1.21-1.70; $P<0.001$]), Pitt score (OR, 1.62 [1.23-2.14; $P<0.001$]), presence of permanent CVC (OR, 5.37 [1.60-18.02; $P=0.006$]) and nasogastric tube (OR, 10.16 [2.26-45.51; $P=0.002$]) were associated with mortality in BSI_Ec (Table 5). Interestingly, the urinary tract source of BSI (OR, 0.24 [0.09-0.68; $P<0.007$]) was a protective factor for the mortality in BSI_Ec (Table 5).

Antimicrobial resistance

Differences between *K. pneumoniae* and *E. coli* in terms of antimicrobial resistance are summarized in Table 6. *K. pneumoniae* was more resistant to cefuroxime ($P=0.001$), cefotaxime ($P<0.001$), ceftazidime ($P<0.001$), cefepime ($P<0.001$), amikacin ($P=0.035$) and colistin ($P<0.001$) than *E. coli*. The production of ESBL also was higher in *K. pneumoniae* than *E. coli* ($P<0.001$), although no differences were observed in terms of

CAPÍTULO I. Artículo 1

MDR. All the isolates colistin-resistant were negative for the presence of *mcr-1* and *mcr-2* genes.

DISCUSSION

In the present study, we analyzed two cohorts of nonselected patients with BSI by *K. pneumoniae* and *E. coli*. Differences in the epidemiology, antimicrobial activity and factors related to mortality have been found. BSI_Kp is more related to the hospitalization while BSI_Ec to community acquisition. However, in hospitalized patients, BSI_Ec is more associated with mortality than BSI_Kp. Furthermore, *K. pneumoniae* showed higher antibiotic resistance profile than *E. coli*.

No difference in mortality was observed between BSI_Kp and BSI_Ec; neither the mortality related to ESBL-positive or ESBL-negative (Table 1). Similar data were reported by two other studies,^{12,30} although none of them were focused in nonselected population. In contrast, Leistner *et al.* found that ESBL-negative *K. pneumoniae* has presented higher mortality rates than ESBL-negative *E. coli*¹⁵. The difference in mortality observed in our study may be due to the study design, where mortality was measured differently and making the data not comparable between our study and the study of Leistner *et al.*¹⁵

Based on differences between demographic and clinical characteristic (Table 1), BSI_Ec was related with community acquisition as well as urinary tract as the primary site of BSI. On the other hand, BSI_Kp was related with nosocomial acquisition, patients with external devices, especially transitory CVC, nasogastric tube and mechanical ventilation. Hence, it's expected that the primary site of BSI was more frequently respiratory tract or catheter, and that patients infected by *K. pneumoniae* required more source management than those infected by *E. coli*. Furthermore, the fact that *K. pneumoniae* is considered an hospital-related pathogen may explain that BSI_Kp was associated with previous

CAPÍTULO I. Artículo 1

antibiotic exposure, since hospitalized patients receive antimicrobial therapy more frequently than community patients. It is noteworthy that *E. coli* was isolated with more frequency than *K. pneumoniae* in patients who had cancer ($P=0.048$), which has been also reported in two previous studies.^{19,31} This difference could be related with the number of patients included in our cohorts that have cancer and neutropenia. The presence of neutropenia in these patients could predispose them to primary bacteremia due to the translocation of *E. coli* into the bloodstream.³² However, more studies are necessary to elucidate this hypothesis.

Importantly, in multivariate analysis Charlson and Pitt scores and gastrointestinal origin were independent factors highly associated with mortality in BSI_KP (Table 4). In this way, the suspicion of gastrointestinal origin could have an important consideration as prognostic factor in patients with BSI_Kp. In BSI_Ec, however, Charlson and Pitt scores, and presence of permanent CVC and nasogastric tube were independent risk factors for mortality (Table 5). This main data indicate that nasogastric tube could be related to worse prognosis if bacteremia occurs in hospitalized patients infected by *E. coli*; although BSI_Kp is more associated with hospitalization than BSI_Ec. In contrast, urinary tract origin of the BSI was considered protective factors for the mortality in BSI_Ec, probably due to the good prognosis of BSI in these patients.

Finally, some differences in the antimicrobial resistant profile were observed between both pathogens (Table 6). *K. pneumoniae* present higher antimicrobial resistance and higher ESBL production than *E. coli*. However, MDR rate was similar in both pathogens without being associated with mortality (data not shown). These results are according to that reported by the SENTRY program, where colistin resistance is higher in *K. pneumoniae* than *E. coli*.³³ In contrast, previous observations showed that higher MDR strains rate was found in nonsurvivor patients with BSI (43.6% vs. 15.6%).¹³ Although the total percentage of MDR strains was similar in both studies (around 25%), this

CAPÍTULO I. Artículo 1

difference could be due to the additional inclusion of *Proteus mirabilis* in their analysis, and/or to definition of MDR. It is important to emphasize that higher percentage of *K. pneumoniae* resistant to colistin than *E. coli* has been observed in our study (16.6% vs. 0.5%). Previous independent work showed that colistin resistance prevalence is slightly higher in *E. coli* (0.5%) than *K. pneumoniae* (0.4%) in Spain.³⁴ These differences observed could be due to the different methods used to determine resistance to colistin (broth microdilution vs. gradient strips, respectively) that make both studies not comparable between them. It has been reported that MIC values to colistin in gradient strips can be underestimated,³⁵ so that EUCAST recommended the broth microdilution as the only valid method for the MIC determination to colistin.²⁴

This study has one main limitation. It was conducted in a single center. However, we collected data of patients hospitalized in the all departments which provide a general idea about the bacteremia that can be occurred in other hospitals. A multicenter study would be welcomed to confirm our hypothesis.

In conclusion, clear differences exist between BSI_Kp and BSI_Ec in terms of clinical characteristics, and mortality-related factors. To our knowledge, this is the first study in which BSI by *K. pneumoniae* and *E. coli* were analyzed independently in a nonselected population. A better understanding of these differences is important to improve clinical practice in BSI.

FUNDINGS

We thank Cristina Roca for help in samples recruitment. This study was supported by the Miguel Servet Tipo I Project grant, Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (CP15/00132) and by Plan Nacional de I+D+i 2013-2016 and Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa,

CAPÍTULO I. Artículo 1

Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD16/0016/0009) - cofinanced by European Development Regional Fund “A way to achieve Europe”, Operative program Intelligent Growth 2014-2020. Y.S. is supported by the Subprograma Miguel Servet Tipo I, Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Spain (CP15/01358). R.A.M. is supported by the Subprograma Juan Rodés, Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Spain (JR17/00025).

REFERENCES

1. Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis.* 2008;8(3):159-66.
2. Šuljagić V, Čobeljić M, Janković S, Mirović V, Marković-Denić L, Romić P, *et al.* Nosocomial bloodstream infections in ICU and non-ICU patients. *Am J Infect Control.* 2005;33(6):333-40.
3. Laupland KB, Church DL. Population-based epidemiology and microbiology of community- Onset Bloodstream Infections. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(4):647-64.
4. Williamson DA, Lim A, Wiles S, Roberts SA, Freeman JT. Population-based incidence and comparative demographics of community-associated and healthcare-associated *Escherichia coli* bloodstream infection in Auckland, New Zealand, 2005 - 2011. *BMC Infect Dis.* 2013;13(1):385.
5. Laupland KB, Gregson DB, Church DL, Ross T, Pitout JD. Incidence, risk factors and outcomes of *Escherichia coli* bloodstream infections in a large Canadian region. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(11):1041-7.

CAPÍTULO I. Artículo 1

6. Al-Hasan MN, Lahr BD, Eckel-Passow JE, Baddour LM. Antimicrobial resistance trends of *Escherichia coli* bloodstream isolates: A population-based study, 1998-2007. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64(1):169-74.
7. Kennedy KJ, Roberts JL, Collignon PJ. *Escherichia coli* bacteraemia in Canberra: Incidence and clinical features. *Med J Aust.* 2008;188(4):209-13.
8. Al-Hasan MN, Lahr BD, Eckel-Passow JE, Baddour LM. Epidemiology and outcome of *Klebsiella* species bloodstream infection: A population-based study. *Mayo Clin Proc.* 2010;85(2):139-44.
9. Meatherall BL, Gregson D, Ross T, Pitout JD, Laupland KB. Incidence, risk factors, and outcomes of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Am J Med.* 2009;122(9):866-73.
10. Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the offense with a strong defense. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2016;80(3):629-61.
11. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(4):822-80.
12. Sakellariou C, Gürntke S, Steinmetz I, Kohler C, Pfeifer Y, Gastmeier P, *et al.* Sepsis Caused by Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-positive *K. pneumoniae* and *E. coli* : comparison of severity of sepsis, delay of anti-infective therapy and ESBL genotype. *PLoS One.* 2016;11(7):e0158039.
13. Tumbarello M, Sanguinetti M, Montuori E, Trecarichi EM, Posteraro B, Fiori B, *et al.* Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by extended-spectrum- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: Importance of inadequate initial antimicrobial treatment. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(6):1987-94.

CAPÍTULO I. Artículo 1

14. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2016. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). 2017.
15. Leistner R, Gürntke S, Sakellariou C, Denkel LA, Bloch A, Gastmeier P, *et al.* Bloodstream infection due to extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) -positive *K. pneumoniae* and *E. coli*: an analysis of the disease burden in a large cohort. *Infection*. 2014;42(6):991-7.
16. Kang C, Kim S, Park WB, Lee KD, Kim HB, Kim EC, *et al.* Bloodstream infections due to Extended-Spectrum- β -Lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: Risk factors for mortality and treatment outcome, with special emphasis on antimicrobial therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(12):4574-81.
17. Trecarichi EM, Pagano L, Martino B, Candoni A, Di Blasi R, Nadali G, *et al.* Bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* in onco-hematological patients: clinical impact of carbapenem resistance in a multicentre prospective survey. *Am J Hematol*. 2016;91(11):1076-81.
18. Ku NS, Kim YC, Kim MH, Song JE, Oh DH, Ahn JY, *et al.* Risk factors for 28-day mortality in elderly patients with extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Arch Gerontol Geriatr*. 2014;58(1):105-9.
19. Wisplinghoff H, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Current trends in the epidemiology of nosocomial bloodstream infections in patients with hematological malignancies and solid neoplasms in hospitals in the United States. *Clin Infect Dis*. 2003;36(9):1103-10.
20. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: Development and validation. *J*

CAPÍTULO I. Artículo 1

- Chronic Dis.* 1987;40(5):373-83.
21. McCabe WR, Jackson GG. Gram-negative bacteraemia. *Arch Intern Med.* 1962;110:83-90.
 22. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, *et al.* The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA.* 2016;315(8):801-10.
 23. Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A, Mohapatra S, Casellas JM, Goossens H, *et al.* International prospective study of *klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of Extended-Spectrum β -Lactamase production in nosocomial infections. *Ann Intern Med.* 2004;140:26-32.
 24. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) As recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. EUCAST. 2016.
 25. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, 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;16:161-8.
 26. Liassine N, Assouvie L, Descombes MC, Tendon VD, Kieffer N, Poirel L, *et al.* Very low prevalence of MCR-1/MCR-2 plasmid-mediated colistin resistance in urinary tract Enterobacteriaceae in Switzerland. *Int J Infect Dis.* 2016;51:4-5.
 27. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. EUCAST. 2017.
 28. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistance of clinical and/or epidemiological importance. EUCAST. 2012.
 29. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, *et al.*

CAPÍTULO I. Artículo 1

- Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(3):268-81.
30. Cheng WL, Hsueh PR, Lee CC, Li CW, Li MJ, Chang CM, *et al.* Bacteremic pneumonia caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: Appropriateness of empirical treatment matters. *J Microbiol Immunol Infect.* 2016;49(2):208-15.
31. Krupova I, Kaiserova E, Foltinova A, Kovacicova G, Kiskova M, Krchnakova A, *et al.* Bacteremia and Fungemia in Pediatric Versus Adult Cancer Patients after Chemotherapy: Comparison of Etiology, Risk Factors and Outcome. *J Chemother.* 1998;10(3):236-42.
32. Gaytán-Martínez J, Mateos-García E, Sánchez-Cortés E, González-Llaven J, Casanova-Cardiel LJ, Fuentes-Allen JL. Microbiological Findings in Febrile Neutropenia. *Arch Med Res.* 2000;31:388-92.
33. Gales AC, Jones RN, Sader HS. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: Results from the SENTRY antimicrobial surveillance program (2006-09). *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(9):2070-4.
34. Prim N, Turbau M, Rivera A, Rodríguez-Navarro J, Coll P, Mirelis B. Prevalence of colistin resistance in clinical isolates of *Enterobacteriaceae*: A four-year cross-sectional study. *J Infect.* 2017;75(6):493-8.
35. Matuschek E, Åhman J, Webster C, Kahlmeter G. Antimicrobial susceptibility testing of colistin - evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter* spp. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24(8):865-70.

CAPÍTULO I. Artículo 1

Table 1. Demographics and clinical features of patients with bloodstream infections by *E. coli* and *K. pneumoniae*.

Factor	<i>K. pneumoniae</i> (n=106)	<i>E. coli</i> (n=247)	P-value
Age, median (range), y	63 (51-76)	68 (56-77)	0.189
Sex (male), No (%)	61 (57.5)	118 (47.8)	0.090
Charlson score, median (range)	2 (1-4)	2 (1-5)	0.582
Comorbid condition, No (%)			
McCabe score, ultimately or rapidly fatal	41 (38.7)	103 (41.7)	0.597
Cancer	26 (24.5)	87 (35.2)	0.048
Diabetes	30 (28.3)	62 (25.1)	0.530
Collagenosis	6 (5.6)	14 (5.6)	0.998
Dementia	2 (1.8)	8 (3.2)	0.729
Lung disease	12 (11.3)	26 (10.5)	0.825
Vascular disease	42 (39.6)	93 (37.6)	0.727
CKD	18 (16.9)	32 (12.9)	0.320
Liver disease	25 (10.1)	15 (14.1)	0.274
Hemmatological malignances	12 (11.3)	15 (6.0)	0.089
Immunosuppression	35 (33.0)	75 (30.3)	0.722
Neutropenia	11 (10.3)	19 (7.7)	0.407
Acquisition type			
Community-acquired	26 (24.5)	104 (42.1)	0.002
Health care-associated	27 (25.4)	80 (32.4)	0.195
Hospital-acquired	53 (50.0)	63 (25.5)	<0.001
Source of BSI, No (%)			
Urinary tract	39 (36.7)	123 (49.8)	0.025
Biliary tract	18 (16.9)	42 (17.0)	0.996
Catheter	16 (15.1)	8 (3.2)	<0.001
Respiratory tract	12 (11.3)	10 (4.0)	0.010
Gastrointestinal	6 (5.6)	17 (6.9)	0.670
Primary	11 (10.3)	33 (13.3)	0.437
Other	4 (3.7)	14 (5.6)	0.458
Source control, No (%)	37 (34.9)	59 (23.9)	0.033
Sepsis, No (%)	15 (14.1)	42 (17.0)	0.504
Septic shock, No (%)	27 (25.4)	49 (19.8)	0.238
Pitt score, median (range)	1 (0-3)	1 (0-2)	0.085
Presence of devices, No (%)	85 (80.1)	156 (63.1)	0.002
Urinary catheter	46 (43.3)	104 (42.1)	0.822
Transitory CVC	36 (33.9)	36 (14.5)	<0.001
Permanent CVC	10 (9.4)	25 (10.1)	0.843
Nasogastric tube	26 (24.5)	14 (5.6)	<0.001
Mechanical ventilation	20 (18.8)	13 (5.2)	<0.001
Previous antibiotic exposure, No (%)	68 (64.1)	111 (44.9)	0.001
Appropriate empirical therapy, No (%)	92 (86.7)	226 (91.5)	0.080
Crude Mortality, No (%)	19 (17.9)	46 (18.6)	0.877
related to ESBL-positive	4 (17.4)	4 (20.0)	1.0
related to ESBL-negative	15 (18.0)	42 (18.5)	0.931

CKD, chronic kidney disease, BSI, bloodstream infection; CVC, central venous catheter; ESBL, extended spectrum beta-lactamase.

CAPÍTULO I. Artículo 1

Table 2. Bivariate analysis of factors related to mortality in BSI by *K. pneumoniae*

Factor	Dead patients (n=19)	Survivor Patients (n=87)	P-value
Age, median (range), y	63 (52-76)	63 (51-76)	0.868
Sex (male), No (%)	12 (63.1)	49 (56.3)	0.586
Charlson score, median (range)	4 (3-5)	2 (1-3)	0.016
Immunosuppression	9 (47.3)	24 (27.5)	0.097
Neutropenia	4 (21.0)	7 (8.0)	0.105
Acquisition type			
Community acquired	3 (15.8)	23 (26.43)	0.335
Healthcare related	4 (21.0)	23 (26.4)	0.626
Nosocomial	12 (63.1)	41 (47.1)	0.210
Primary site of BSI, No (%)			
Urinary tract	4 (21.0)	35 (40.2)	0.125
Biliary tract	1 (5.2)	17 (19.5)	0.165
Catheter	2 (10.5)	14 (16.1)	0.540
Respiratory tract	4 (21.0)	8 (9.2)	0.150
Gastrointestinal	4 (21.0)	2 (2.3)	0.008
Unknown	3 (15.8)	8 (9.2)	0.399
Other	1 (5.2)	3 (3.4)	0.709
Source management, No (%)	4 (21.0)	33 (37.9)	0.170
Sepsis, No (%)	7 (36.8)	8 (9.1)	0.004
Septic shock, No (%)	6 (31.5)	21 (24.1)	0.502
Pitt score, median (range)	3 (2-5)	0 (0-2)	<0.001
Presence of devices, No (%)	18 (94.7)	67(77.0)	0.112
Urinary catheter	10 (52.6)	36 (41.3)	0.372
Transitory CVC	10 (52.6)	26 (71.2)	0.063
Permanent CVC	2 (10.5)	8 (9.1)	0.857
Nasogastric tube	10 (52.6)	16 (18.4)	0.003
Mechanical ventilation	5 (26.3)	15 (17.2)	0.364
Previous antibiotic exposure, No (%)	16 (84.2)	52 (59.7)	0.055
Appropriate empirical therapy, No (%)	17 (89.4)	75 (86.2)	0.787

BSI, bloodstream infection; CVC, central venous catheter.

CAPÍTULO I. Artículo 1

Table 3. Bivariate analysis of factors related to mortality in BSI by *E. coli*.

Factor	Dead patients (n=46)	Survivor Patients (n=201)	P-value
Age, median (range), y	68 (58 – 76)	68 (55 – 78)	0.404
Sex (male), No (%)	24 (52.1)	105 (52.2)	0.994
Charlson score, median (range)	5 (3-6.2)	2 (1-4)	<0.001
Immunosuppression	17 (36.9)	56 (27.86)	0.225
Neutropenia	7 (15.2)	12 (5.9)	0.040
Acquisition type			
Community acquired	11 (23.9)	93 (46.2)	0.007
Healthcare related	21 (45.6)	59 (29.3)	0.035
Nosocomial	14 (30.4)	49 (24.3)	0.396
Primary site of BSI, No (%)			
Urinary tract	9 (19.5)	114 (56.7)	<0.001
Biliary tract	9 (19.5)	33 (16.4)	0.609
Catheter	3 (6.5)	5 (2.4)	0.179
Respiratory tract	4 (8.7)	6 (2.9)	0.091
Gastrointestinal	7 (15.2)	10 (4.9)	0.019
Unknown	12 (26.1)	21 (10.4)	0.007
Other	2 (4.3)	12 (5.9)	0.669
Source management, No (%)	10 (21.7)	49 (24.3)	0.705
Sepsis, No (%)	7 (15.2)	35 (17.41)	0.721
Septic shock, No (%)	20 (43.5)	29 (14.4)	<0.001
Pitt score, median (range)	2 (0-3)	1 (0-2)	0.001
Presence of devices, No (%)	35 (76.1)	121 (60.2)	0.047
Urinary catheter	21 (45.6)	84 (41.8)	0.633
Transitory CVC	11 (23.9)	25 (12.43)	0.051
Permanent CVC	10 (21.7)	15 (7.4)	0.006
Nasogastric tube	9 (19.5)	5 (2.5)	<0.001
Mechanical ventilation	5 (10.8)	8 (3.9)	0.070
Previous antibiotic exposure, No (%)	21 (45.6)	90 (44.7)	0.914
Appropriate empirical therapy, No (%)	43 (93.4)	183 (91.0)	0.889

BSI, bloodstream infection; CVC, central venous catheter.

Table 4. Multivariate analysis of factors related to mortality in BSI by *K. pneumoniae*

Factor	Dead patients (n=19)	Survivor Patients (n=87)	P-value	OR (95% CI)
Charlson score, median (range)	4 (3-5)	2 (1-3)	0.014	1.39 (1.07–1.82)
Gastrointestinal origin of the BSI, No (%)	4 (21.0)	2 (2.3)	0.019	13.10 (1.52–112.71)
Pitt score, median (range)	3 (2-5)	0 (0-2)	0.004	1.65 (1.17–2.33)
Nasogastric tube, No (%)	10 (52.6)	16 (18.4)	0.368	1.90 (0.46–7.69)

BSI, bloodstream infection.

CAPÍTULO I. Artículo 1

Table 5. Multivariate analysis of factors related to mortality in BSI by *E. coli*.

Factor	Dead patients (n=46)	Survivor Patients (n=201)	P-value	OR (95% CI)
Charlson score, median (range)	5 (3-6.2)	2 (1-4)	<0.001	1.44 (1.21 – 1.70)
Neutropenia, No (%)	7 (15.2)	12 (5.9)	0.064	3.56 (0.93 – 13.63)
Community acquired BSI, No (%)	11 (23.9)	93 (46.2)	0.900	0.93 (0.33 – 2.59)
Urinary tract source of BSI, No (%)	9 (19.5)	114 (56.7)	0.007	0.24 (0.09 – 0.68)
Pitt score, median (range)	2 (0-3)	1 (0-2)	<0.001	1.62 (1.23 – 2.14)
Permanent CVC, No (%)	10 (21.7)	15 (7.4)	0.006	5.37 (1.60 – 18.02)
Nasogastric tube, No (%)	9 (19.5)	5 (2.5)	0.002	10.16 (2.26 – 45.51)

BSI, bloodstream infection; CVC, central venous catheter.

Table 6. Number of clinical isolates of *E. coli* and *K. pneumoniae* resistant to different antibiotics.

Factor	<i>K. pneumoniae</i> (n=106)	<i>E. coli</i> (n=247)	P-value
Antimicrobial agent, No. (%)			
Amoxicillin/clavulanic acid	19 (17.9)	51 (20.6)	0.331
Piperacillin/tazobactam	6 (5.7)	5 (2.0)	0.160
Cefuroxime	28 (26.4)	30 (12.1)	0.001
Cefotaxime	25 (23.6)	23 (9.3)	<0.001
Ceftazidime	24 (22.6)	21 (8.5)	<0.001
Cefepime	24 (22.6)	20 (8.1)	<0.001
Ertapenem	2 (1.9)	0 (0.0)	0.090
Imipenem	2 (1.9)	0 (0.0)	0.090
Meropenem	2 (1.9)	0 (0.0)	0.090
Ciprofloxacin	26 (24.5)	80 (32.4)	0.221
Levofloxacin	26 (24.5)	30 (32.4)	0.221
Gentamicin	18 (16.0)	24 (10.1)	0.070
Tobramycin	19 (17.0)	26 (10.9)	0.083
Amikacin	4 (3.8)	1 (0.4)	0.035
Cotrimoxazole	35 (33)	97 (39.3)	0.176
Tigecycline	0 (0)	0 (0)	1.0
Colistin	15/90 (16.6)	1/183 (0.5)	<0.001
ESBL, No. (%)	23 (21.7)	20 (8.1)	<0.001
MDR, No. (%)	24 (22.6)	59 (23.8)	0.800

ESBL, Extended Spectrum Betalactamase; MDR, Multidrug Resistant.

CAPÍTULO I. Artículo 2

Objetivo 2. Comparar las características epidemiológicas y clínicas y los factores pronósticos asociados con la infección intraabdominal por *E. coli* bacteriémica y sin bacteriemia.

Artículo 2: Epidemiology and risk factors for bacteremia and mortality in intraabdominal infections by *Escherichia coli*.

La infección intraabdominal es una causa frecuente de morbi-mortalidad y *E. coli* es uno de los principales microorganismos implicados. Sin embargo, a pesar de esto, apenas existen estudios sobre la epidemiología y los factores pronósticos para la mortalidad y el desarrollo de bacteriemia en este tipo de infecciones por *E. coli*. Es por ello decidimos analizar la epidemiología y los factores de riesgo tanto para la mortalidad como para el desarrollo de bacteriemia en las infecciones intraabdominales por *E. coli* en población general.

Se llevó a cabo un estudio de cohortes observacional y prospectivo en el hospital Universitario Virgen del Rocío en el que se recogieron datos demográficos, clínicos y microbiológicos de 154 pacientes con infección intraabdominal por *E. coli*. Se realizó un análisis bivariado y multivariado para identificar factores de riesgo relacionados con la mortalidad y con el desarrollo de bacteriemia en este tipo de infección.

En cuanto a los resultados referentes a la mortalidad, los pacientes fallecidos en comparación con los pacientes supervivientes tenían un mayor índice de Charlson, así como mayor frecuencia de índice de McCabe últimamente o rápidamente fatal, bacteriemia, shock séptico y presencia de dispositivos externos. El análisis multivariado seleccionó el shock séptico [*Odds ratio* (OR) 12,54 (3,17-49,60); $P < 0,001$] y la bacteriemia [OR 5,25 (1,25-21,96); $P = 0,023$] como factores de riesgo independientes para la mortalidad de los pacientes. Por otro lado, los pacientes en los que se produjo desarrollo de bacteriemia fueron de mayor edad, tuvieron un índice de Charlson mayor y un índice de McCabe últimamente o rápidamente fatal más frecuentemente. Además, tuvieron más frecuencia de shock séptico, presencia de dispositivos externos y mayor adquisición hospitalaria de la infección, así como mayor mortalidad. El análisis multivariado seleccionó como factores de riesgo independientes para el desarrollo de bacteriemia el índice de Charlson [OR 1,46 (1,10-1,94); $P = 0,009$], el foco biliar de la infección [OR 6,89 (1,28-37,07); $P = 0,024$] y la presencia de dispositivos externos [OR 16,12 (1,68-154,06); $P = 0,016$].

CAPÍTULO I. Artículo 2

Por lo tanto, se demuestra que existen grandes diferencias en cuanto a la epidemiología y los factores pronósticos para la mortalidad y el desarrollo de bacteriemia en la infección intraabdominal por *E. coli*.

El manuscrito resultante de este trabajo se enviará a la revista *Journal of Infection*

CAPÍTULO I. Artículo 2

Title: Epidemiology and risk factors for bacteremia and mortality in intraabdominal infections by *Escherichia coli*.

Abstract

Escherichia coli is one of the main microorganism involved in intraabdominal infections (IAI). However, despite the mortality and bacteremia development in IAI, there is few data on the epidemiology and prognostic factors for mortality and development of bacteremia in IAI by *E. coli*. In this study, we have determined the epidemiology and risk factors for mortality and bacteremia development in IAI by *E. coli* in non-selected patients. We analysed demographics, microbiological and clinical data from 154 patients with IAI by *E. coli* included in a prospective observational cohort study. Bivariate and multivariate analyses were performed to identify risk factors for mortality and bacteremia development. Dead patients have higher Charlson score, McCabe score ultimately or rapidly fatal, bacteremia, septic shock and presence of external devices. The multivariate analysis identified septic shock [OR 12.54 (3.17-49.60); $P<0.001$] and bacteremia [OR 5.25 (1.25-21.96); $P=0.023$] as independent risk factors for mortality. On the other hand, patients with bacteremia were older with higher Charlson and McCabe scores, sepsis, septic shock, more external devices and hospital acquisition, and higher mortality. The multivariate analysis identified Charlson score [OR 1.46 (1.10-1.94); $P=0.009$], biliary tract source [OR 6.89 (1.28-37.07); $P=0.024$] and presence of devices [OR 16.12 (1.68-154.06); $P=0.016$] as independent risk factors for bacteremia development. This study demonstrates the presence of great differences in terms of epidemiology and prognostic factors for mortality and bacteremia development in IAI by *E. coli*.

Keywords: *Escherichia coli*, intraabdominal infection, epidemiology, bacteremia, mortality.

INTRODUCTION

Escherichia coli is among the *Enterobacteriales* with high clinical interest. This pathogen may cause severe community and nosocomial infections including intraabdominal infections (IAI) [1]. Data from the SMART (Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends) surveillance study performed during several years in different countries showed that *E. coli* have represented 40-60% of the microorganism causing IAI [2–4].

Over the last decade, *E. coli* has become increasingly resistant to first and second-line antibiotics (i.e. β -lactams, fluoroquinolones and aminoglycosides) in Europe and in the rest of the world [5]. One of the most important problems with antimicrobial resistance in *E. coli* is the production of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) making difficult to have an appropriate therapy for the severe infections [6]. Resistance to the third-generation cephalosporin mainly due to ESBLs production continued to increase in Europe between 2012 and 2015 from 11.9% to 13.1%, respectively, and show a clear north to south gradient with the highest percentages of resistance reported from Southern Europe [7]. At intraabdominal level, the prevalence of *E. coli* producing ESBL varied from 9.9% to 49% according to the country (Spain, Turkey, Jordan and Lebanon) where it was isolated [2–4].

The management of patients with IAI is increasingly complicated due to the lack of optimal therapeutic options, which increases the risk of therapeutic failure and mortality, and produces a greater consumption of health resources. This complication is aggravated when these patients have secondary bacteremia, especially when they developed sepsis or septic shock [8]. Fifteen percent of secondary bacteremia to IAI has been reported in critically ill patients [8]. This percentage was increased to 26% when the patients undergo

CAPÍTULO I. Artículo 2

intraabdominal surgery [9,10]. However, there is a lack of data about the incidence of secondary bacteremia to IAI in non-selected patients.

Some risk factors associated with secondary bacteremia to IAI such as age, cancer, immunosuppression or SOFA score are studied in surgical or critically ill patients, but not in non-selected patients [8,9]. The knowledge of the differences between IAI with or without bacteremia, in terms of clinical characteristics and mortality-related factors is important to improve the clinical management and outcomes of the patients with IAI by *E. coli*. To this end, the aim of this study was to analyse the epidemiology, clinical features, antimicrobial susceptibility and factors associated with the mortality of the non-selected patients with IAI by *E. coli*.

MATERIAL AND METHODS

Study design, patients and ethics

A prospective observational cohort study from February 2016 to March 2017 was conducted at the University Hospital Virgen del Rocío (Seville, Spain). One hundred fifty four adult patients (≥ 18 years) with suspected IAI by *E. coli* isolated from intraabdominal samples or blood cultures were selected for the study. Only the first IAI episode was included in this study during the patient's admissions. The pathogenic role as colonization or infection was evaluated by a member of the Infectious Diseases Service and/or the Intensive Care Unit (ICU), according to defined criteria [1]. The study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital Virgen del Rocío of Seville (approval no. 0023-N-16). Written informed consent was signed by all patients before inclusion in the study.

CAPÍTULO I. Artículo 2

Variables

The following variables were collected from the patients: age and sex; comorbidities and severity of chronic underlying diseases (Charlson [11] and McCabe scores [12]) presence of solid or hematological malignances, immunosuppression, and neutropenia [<500 neutrophils/ μl]), acquisition type (defined as community-, health care- or hospital-acquired), source of IAI (defined as biliary, intestinal and peritonitis) according with clinical and microbiological criteria, source control, sepsis or septic shock [13], Pitt score [14], presence of devices (urinary catheter, transitory or permanent central venous catheter (CVC), nasogastric tube, and mechanical ventilation), antibiotic exposure in the two months prior the IAI, appropriate empirical therapy for the current episode, therapy for the current episode (at least an antimicrobial active against the isolate) de-escalation of the antimicrobial treatment and duration of the therapy. The patients were followed up until hospital discharge, death or 30 days, whichever occurred first. All clinical decisions were made by the physicians in charge of the patients.

Microbiological studies

E. coli isolates were identified using MALDI-TOF (Bruker Daltonik GmbH, Leipzig, Germany). The antimicrobial activity of the following antibiotics: ampicillin, amoxicillin-clavulanic acid, piperacillin/tazobactam, cefuroxime, ceftazidime, cefotaxime, cefepime, ertapenem, imipenem, meropenem, ciprofloxacin, levofloxacin, gentamicin, tobramycin, amikacin, co-trimoxazole and tigecycline against *E. coli* isolates was determined by broth microdilution method using MicroScan Walk Away NM44 panels (Beckman Coulter, Inc., USA). Colistin activity was determined by standard broth microdilution as recommended by the European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [15] and PCR for *mcr-1* and *mcr-2* genes using specific

CAPÍTULO I. Artículo 2

primers (mcr-1 Fw 5'-CGGTCAGTCCGTTTGTTC-3', mcr-1 Rv 5'-CTTGGTCGGTCTGTAGGG-3', mcr-2 Fw 5'-ATGACATCACATCACTCTTGG-3', mcr-2 Rv 5'-TTACTGGATAAATGCCGCGC-3'[16,17] were performed in the colistin-resistant isolates. Interpretation criteria were performed following the EUCAST breakpoint tables [18]. ESBL production was confirmed using the broth microdilution synergy test according to the EUCAST standards [19]. MDR criteria was established as non-susceptible to ≥ 1 agent in ≥ 3 antimicrobial categories [20]. *E. coli* ATCC 25922 was used as control strain.

Statistical analysis

A descriptive analysis was performed for demographics and clinical variables, with median and range for the quantitative variables and frequency distribution for the qualitative variables. Fisher and χ^2 tests were used for categorical variables, and continuous variables were analyzed using Mann Whitney *U* test. Logistic regression analysis was performed to identify independent risk factors for bacteremia and death. Variables known to be associated with bacteremia or mortality for IAI by *E. coli*, or with *P* values ≤ 0.1 in bivariate analysis were included in the multivariate analysis. Differences were considered significant at $P < 0.05$. All statistical analyses were performed using SPSS software, version 23.0 (SPSS).

RESULTS

Demographic, clinical characteristics and risk factors for mortality of IAI patients

A total of 154 patients with IAI by *E. coli* were included in the study which 16 (10.4%) of them died during the follow-up. Demographics and clinical features among dead and survivor IAI patients are summarized in table 1. Dead patients presented more

CAPÍTULO I. Artículo 2

comorbidities, with higher Charlson score ($P=0.018$) and more frequently McCabe score ultimately or rapidly fatal ($P<0.001$). Source of IAI was not associated with mortality of the patients. Dead patients had more severe infections, which are reflected in the higher bacteremia ($P<0.001$), the septic shock ($P<0.001$) and the presence of devices ($P=0.022$) such as transitory CVC ($P=0.008$) and mechanical ventilation ($P=0.001$).

On the other hand, the population were homogeneous according to in demographics features (age and sex), immunological state (immunosuppression or neutropenia), source of infection, previous antibiotic exposure and appropriate empirical therapy.

Demographic, clinical characteristics and risk factors for bacteremia of IAI patients

Seventeen (11%) of the 154 patients included in this study have developed bacteremia during the follow-up. Demographics and clinical characteristics are summarized in table 2. Bacteremic patients were older ($P=0.037$), presented more comorbidities, with higher Charlson score ($P<0.001$), more frequently McCabe score ultimately or rapidly fatal ($P=0.001$), and more presence of metastatic cancer ($P=0.039$) and chronic kidney disease ($P<0.001$). Development of the bacteremia in these patients was associated with hospital acquisition ($P=0.035$), and the bacteremic patients had more severe infections, which are reflected in the higher sepsis ($P=0.004$) and septic shock ($P<0.001$) frequencies and the presence of devices ($P=0.003$) such as urinary catheter ($P=0.013$) and transitory CVC ($P<0.001$). Moreover, forty-seven percent of the bacteremic patients died compared to 5.8% of the non-bacteremic patients ($P<0.001$).

On the other hand, the population were homogeneous according to in immunological state (neutropenia), source of infection, previous antibiotic exposure and appropriate empirical therapy.

CAPÍTULO I. Artículo 2

Antimicrobial resistance in *E. coli* causing IAI

No significant differences between bacteremic and non-bacteremic *E. coli* in terms of antimicrobial resistance were found (Table 3). Ampicillin showed the higher resistance rate both in bacteremic and non-bacteremic groups (76.4% vs 61.3%, respectively) followed by amoxicillin-clavulanic acid (17.6% vs 22.6%, respectively) and cotrimoxazole (29.4% vs 23.3%, respectively). The production of ESBL was detected only in 2.9% of the non-bacteremic isolates. However, the rate of MDR was lower in bacteremic isolates (17.6% vs. 25.5%, respectively; $P=0.762$). The only colistin-resistant isolate was negative for the presence of *mcr-1* and *mcr-2* genes.

Factors related to bacteremia and mortality IAI by *E. coli*.

The logistic regression analysis showed Charlson score (odds ratio [OR], 1.46 [95% confidence interval (CI), 1.10-1.94; $P=0.009$]), biliary tract source (OR, 6.89 [1.28-37.07; $P=0.024$]) and presence of external devices (OR, 16.12 [1.68-154.06; $P=0.016$]) were factors independently associated with bacteremia (Table 4). Regarding to independent factors associated with mortality, bacteremia (OR, 5.25 [1.25-21.96; $P=0.023$]) and septic shock (OR, 12.54 [3.17-49.60; $P<0.001$]) were selected as independent risk factors (Table 5).

DISCUSSION

In the present study, we analyzed a cohort of non-selected patients with IAI by *E. coli*. Differences in the epidemiology and factors related to development of secondary bacteremia to IAI and mortality have been found.

The overall mortality in our study was 10.4%. We showed that dead patients had more comorbidities than survivor patients, without being significantly different, except for

CAPÍTULO I. Artículo 2

Charlson score. More development of bacteremia, septic shock and presence of devices, especially transitory CVC and mechanical ventilation were observed in the dead patients than in the survivor patients. Nevertheless, no differences according to the previous antibiotic exposure and the appropriate empirical therapy were observed between both patient groups. To our knowledge, this is the first study that analyzed the clinical characteristics and risk factors for mortality and bacteremia in non-selected patients with IAI by *E. coli*. The multivariate analysis reported the presence of bacteremia and septic shock as independent risk factors for mortality in IAI by *E. coli*. Similar data were observed by Riché *et al.* in which demonstrated that septic shock together with biliary source are risk factors for mortality in patients with secondary generalized peritonitis [9]. In our study, however, biliary source was only a factor independently associated with bacteremia development in IAI patients.

In the current study, bacteremia occurred in old patients with comorbidities (charlson and McCabe scores, metastatic cancer and chronic kidney disease), and was accompanied by higher illness severity, as reflected in the higher frequency of sepsis and septic shock and the higher presence of external devices, such as urinary catheter and transitory CVC in the bacteremic patients. In contrast, immunosuppression was not different (12.5% vs 13.1%) between bacteremic and non-bacteremic patients. Previous independent work reported that cancer and immunosuppression were more presented in bacteremic than non-bacteremic patients who have developed postoperative IAI (55% vs 33%, and 59% vs 30%, respectively, $P < 0.001$) [8]. The discrepancy in the immunosuppression data could be explained by the fact that the patients developing postoperative IAI were admitted in ICU; meanwhile in our study we included non-selected patients. Moreover, we found an important difference in mortality between bacteremic and non-bacteremic patients (47% vs. 5.8%, $P < 0.001$). This result is consistent with two previous studies that

CAPÍTULO I. Artículo 2

reported higher mortality rates (41% to 62.5%) in bacteremic patients with IAIs [8,21]. Interestingly, we showed that the Charlson score, the presence of external devices and the biliary tract source were independently associated with bacteremia development in IAI patients. To our knowledge only one previous study has identified the risk factors for bacteremia in the IAI patients [8], and reported that immunosuppression or cancer, high SOFA score and *E. coli* in peritoneal samples were risk factors independently associated with bacteremia. However, they included surgical patients regardless of the isolated of the microorganism [8]. It is noteworthy that, according to our study data, the biliary tract infection and the presence of external devices could have an important consideration as prognostic factors for the development of bacteremia in patients with IAI by *E. coli*.

This study has one main limitation. It was conducted in a single center. However, we collected data of patients hospitalized in the all departments which provide a general analysis of *E. coli* causing IAI, similar to that can occurring in other hospitals. Notwithstanding, a multicenter study with larger sample would be welcomed to confirm our hypothesis.

In conclusion, this study demonstrates the presence of clear differences regarding the development of bacteremia and mortality among patients with IAI by *E. coli*. To our knowledge, this is the first study in which IAI by *E. coli* was analyzed independently in a non-selected population. A better understanding of these differences is important to improve clinical practice in these kinds of infections.

FUNDINGS

This work was supported by the Miguel Servet Tipo I Project grant, Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (CP15/00132), and by Plan Nacional

CAPÍTULO I. Artículo 2

de I+D+i 2013-2016 and Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (RD16/0016/0009), cofinanced by the European Development Regional Fund “A Way to Achieve Europe,” Operative Program Intelligent Growth 2014-2020. Y.S. is supported by the Subprograma Miguel Servet Tipo I, Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Spain [CP15/00132]. A.R.V. is supported by the Subprograma Río Hortega, Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Spain [CM18/00122]. R.A.M. is supported by the Subprograma Juan Rodés, Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Spain [JR17/00025].

REFERENCES

1. Solomkin, J.S.; Mazuski, J.E.; Bradley, J.S.; Rodvold, K.A.; Goldstein, E.J.; Baron, E.J.; O’Neill, P.J.; Chow, A.W.; Dellinger, E.P.; Eachempati, S.R.; Gorbach, S.; Hilfiker, M.; May, A.K.; Nathens, A.B.; Sawyer, R.G.; Bartlett, J.G. Diagnosis and management of complicated intra-abdominal infection in adults and children: guidelines by the Surgical Infection Society and the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* **2010**, *50*, 133-164.
2. Hayajneh, W.A.; Hajj, A.; Hulliel, F.; Sarkis, D.K.; Irani-Hakimeh, N.; Kazan, L.; Badal, R.E. Susceptibility trends and molecular characterization of Gram-negative bacilli associated with urinary tract and intra-abdominal infections in Jordan and Lebanon: SMART 2011-2013. *Int J Infect Dis* **2015**, *35*, 56-61.

CAPÍTULO I. Artículo 2

3. Koksall, I.; Yilmaz, G.; Unal, S.; Zarakolu, P.; Kortan, V.; Mulazimoglu, L.; Tabak, F.; Mete, B.; Oguz, V.A; Gulay, Z.; Alp, E.; Badal, R.; Lob, S. Epidemiology and susceptibility of pathogens from SMART 2011-12 Turkey: evaluation of hospital-acquired versus community-acquired urinary tract infections and ICU- versus non-ICU-associated intra-abdominal infections. *J Antimicrob Chemoter* **2017**, *72*, 1364-1372.
4. Cantón, R.; Loza, E.; Aznar, J.; Castillo, F.J.; Cercenado, E.; Fraile-Ribot, P.A.; González-Romo, F.; López-Hontangas, J.L.; Rodríguez-Lozano, J.; Suárez-Barrenechea, A.I.; Tubau, F.; Díaz-Regañón, J.; López-Mendoza, D.; SMART-Spain Working Group. Monitoring the antimicrobial susceptibility of Gram-negative organism involved in intraabdominal and urinary tract infections recovered during the SMART study (Spain, 2016 and 2017). *Rev Esp Quimioter* **2019**, *32*, 145-155.
5. Vila, J.; Sáez-López, E.; Johnson, J.R.; Römling, U.; Dobrindt, U.; Cantón, R.; Giske, C.G.; Naas, T.; Carattoli, A.; Martínez-Medina, M.; Bosch, J.; Retamar, P.; Rodríguez-Baño, J.; Baquero, F.; Soto, S.M. *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. *FEMS Microbiol Rev* **2016**, *40*, 437-463.
6. Peirano, G.; Pitout, J.D.D. Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: Update on Molecular Epidemiology and Treatment Options. *Drugs* **2019**, *79*, 1529-1541.
7. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2017.
8. Alqarni, A.; Kantor, E.; Grall, N.; Tanaka, S.; Zappella, N.; Godement, M.; Ribeiro-Parenti, L.; Tran-Dinh, A.; Montravers, P. Clinical characteristics and prognosis of

CAPÍTULO I. Artículo 2

- bacteraemia during postoperative intra-abdominal infections. *Crit Care* **2018**, *22*, 175.
9. Riché, F.C.; Dray, X.; Laisné, M.J.; Matéo, J.; Raskine, L.; Sanson-Le Pors, M.J.; Payen, D.; Valleur, P.; Cholley, B.P. Factors associated with septic shock and mortality in generalized peritonitis: Comparison between community-acquired and postoperative peritonitis. *Crit Care* **2009**, *13*, R99.
 10. Montravers, P.; Augustin, P.; Grall, N.; Desmard, M.; Allou, N.; Marmuse, J.P.; Guglielminotti, J. Characteristics and outcomes of anti-infective de-escalation during health care-associated intra-abdominal infections. *Crit Care* **2016**, *20*, 83.
 11. Charlson, M.E.; Pompei, P.; Ales, K.L.; MacKenzie, C.R. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis* **1987**, *40*, 373-383.
 12. McCabe, W.R.; Jackson, G.G. Gram-Negative Bacteremia. *Arch Intern Med* **1962**, *110*, 847-855.
 13. Singer, M.; Deutschman C.S.; Seymour, C.W.; Shankar-Hari, M.; Annane, D.; Bauer, M.; Bellomo, R.; Bernard, G.R.; Chiche, J.; Coopersmith, C.M.; Hotchkiss, R.S.; Levy, M.M.; Marshall, J.C.; Martin, G.S.; Opal, S.M.; Rubenfeld, G.D.; Van der Poll, T.; Vincent, J.L.; Angus, D.C. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA* **2016**, *315*, 801-810.
 14. Paterson, D.L.; Ko, W.C.; Von Gottberg, A.; Mohapatra, S.; Casellas, J.M.; Goossens, H.; Mulazimoglu, L.; Treholme, G.; Klugman, K.P.; Bonomo, R.A.; Rice, L.B.; Wagener, M.M.; McCormack, J.G.; Yu, V.L. International prospective study of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of extended-spectrum beta-lactamase production in nosocomial infections. *Ann Intern Med* **2004**, *140*, 26-32.

CAPÍTULO I. Artículo 2

15. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) As recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. EUCAST. **2016**.
16. Liu, Y.Y.; Wang, Y.; Walsh, T.R.; Yi, L.X.; Zhang, R.; Spencer, J.; Doi, Y.; Tian, G.; Dong, B.; Huang, X.; Yu, L.F.; Gu, D.; Ren, H.; Chen, X.; Lv, L; He, D.; Zhou, H.; Liang, Z.; Liu, J.H.; Shen, J. 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**, *16*, 161-168.
17. Liassine, N.; Assouvie, L.; Descombes, M.C.; Tendon, V.D.; Kieffer, N.; Poirel, L.; Nordmann, P. Very low prevalence of MCR-1/MCR-2 plasmid-mediated colistin resistance in urinary tract Enterobacteriaceae in Switzerland. *Int J Infect Dis* **2016**, *51*, 4-5.
18. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. EUCAST. **2018**.
19. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. EUCAST. **2017**.
20. Magiorakos, A.P.; Srinivasan, A.; Carey, R.B.; Carmeli, Y.; Falagas, M.E.; Giske, C.G.; Harbarth, S.; Hindler, J.F.; Kahlmeter, G.; Olsson-Liljequist, B.; Paterson, D.L.; Rice, L.B.; Stelling, J.; Struelens, M.J.; Vatopoulos, A.; Weber, J.T.; Monnet, D.L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* **2012**, *18*, 268-281.

CAPÍTULO I. Artículo 2

21. De Waele, J.J.; Hoste, E.A.; Blot, S.I. Blood stream infections of abdominal origin in the intensive care unit: characteristics and determinants of death. *Surg Infect*, **2008**, *9*, 171-177.

CAPÍTULO I. Artículo 2

Table 1. Bivariate analysis of factors related to mortality in patients with intraabdominal infection by *E. coli*.

Factor	Dead patients (n=16)	Survivor patients (n=138)	P-value
Age, median (range), y	72 (62.25-77)	64.5 (53-75)	0.219
Sex (male), No. (%)	10 (62.5)	87 (63.5)	0.966
Charlson score, median (range)	3 (2-4.75)	1 (0-3)	0.018
Comorbid condition, No. (%)			
McCabe score, ultimately or rapidly fatal	9 (56.2)	22 (16.1)	<0.001
Cancer	8 (50.0)	44 (32.1)	0.153
Metastatic cancer	3 (18.7)	10 (7.2)	0.138
Diabetes	2 (12.5)	21 (15.3)	1.000
Collagenosis	2 (12.5)	4 (2.9)	0.120
Dementia	0 (0.0)	1 (0.7)	1.000
Lung disease	2 (12.5)	13 (9.5)	0.658
Vascular disease	3 (18.7)	22 (16.1)	0.727
CKD	2 (12.5)	6 (4.3)	0.198
Liver disease	1 (6.2)	13 (9.5)	1.000
Hematological malignances	0 (0.0)	2 (1.4)	1.000
Immunosuppression	2 (12.5)	18 (13.1)	1.000
Neutropenia	0 (0.0)	0 (0.0)	1.000
Source of infection, No.(%)			
Biliary tract	7 (43.7)	46 (33.3)	0.406
Intestinal	2 (12.5)	35 (25.3)	0.254
Peritonitis	6 (37.5)	54 (39.1)	0.899
Other	1 (6.2)	3 (2.2)	0.358
Acquisition type, No. (%)			
Community acquired	6 (37.5)	75 (54.3)	0.201
Healthcare related	4 (25.0)	14 (10.1)	0.096
Hospital acquired	6 (37.5)	49 (35.5)	1.000
Bacteremia, No (%)	8 (50.0)	9 (6.6)	<0.001
Sepsis, No (%)	3 (18.7)	9 (6.5)	0.115
Septic shock, No (%)	12 (75.0)	17 (12.4)	<0.001
Previous intervention, No (%)	6 (37.5)	55 (40.1)	0.820
Presence of devices, No. (%)			
Urinary catheter	12 (75.0)	71 (51.8)	0.074
Transitory CVC	11 (68.7)	48 (35.0)	0.008
Permanent CVC	0 (0.0)	0 (0.0)	1.000
Nasogastric tube	4 (25.0)	35 (25.5)	1.000
Mechanical ventilation	8 (50.0)	17 (12.4)	0.001
Previous antibiotic exposure, No. (%)	12 (75.0)	88 (64.2)	0.392
Appropriate empirical therapy, No. (%)	16 (100.0)	122 (89.0)	0.362
Duration of therapy, d, median (range)	8.5 (3.25-19.5)	14 (8-21.75)	0.056

CKD, chronic kidney disease; CVC, central venous catheter.

CAPÍTULO I. Artículo 2

Table 2. Bivariate analysis of factors related to development of bacteremia in intraabdominal infections by *E. coli*.

Factor	Bacteremia (n=17)	Non-bacteremia (n=138)	P-value
Age, median (range), y	73 (66.5-75.0)	63 (53.0-75.0)	0.037
Sex (male), No. (%)	8 (47.0)	49 (35.7)	0.363
Charlson score, median (range)	4 (2.5-5.5)	1 (0.0-3.0)	<0.001
Comorbid condition, No. (%)			
McCabe score, ultimately or rapidly fatal	9 (52.9)	22 (16.0)	0.001
Cancer	5 (29.4)	34 (24.8)	0.768
Metastatic cancer	4 (23.5)	9 (6.56)	0.039
Diabetes	3 (17.6)	20 (14.7)	0.721
Collagenosis	2 (11.7)	4 (2.9)	0.132
Dementia	0 (0.0)	1 (1.4)	1.000
Lung disease	2 (11.7)	13 (9.5)	0.672
Vascular disease	3 (17.6)	22 (16.0)	0.727
CKD	5 (29.4)	3 (2.2)	<0.001
Liver disease	1 (5.8)	13 (9.5)	1.000
Hematological malignances	2 (11.7)	9 (6.5)	0.348
Immunosuppression	4 (23.5)	16 (11.6)	0.242
Neutropenia	0 (0.0)	0 (0.0)	1.000
Source of infection, No. (%)			
Biliary tract	9 (52.9)	44 (32.1)	0.088
Intestinal	1 (5.8)	36 (26.2)	0.063
Peritonitis	7 (41.1)	53 (38.7)	0.843
Other	0 (0.0)	4 (2.9)	1.000
Acquisition type, No. (%)			
Community acquired	4 (23.5)	77 (56.2)	0.011
Healthcare related	3 (17.6)	15 (10.9)	0.423
Hospital acquired	10 (58.8)	45 (32.8)	0.035
Sepsis, No. (%)	5 (29.4)	7 (5.1)	0.004
Septic shock, No. (%)	10 (58.8)	19 (13.8)	<0.001
Previous intervention, No. (%)	10 (58.8)	51 (37.2)	0.090
Presence of devices, No. (%)	16 (94.1)	78 (56.9)	0.003
Urinary catheter	14 (82.3)	69 (50.3)	0.013
Transitory CVC	14 (82.3)	45 (32.8)	<0.001
Permanent CVC	0 (0.0)	0 (0.0)	1.000
Nasogastric tube	5 (29.4)	34 (24.8)	0.768
Mechanical ventilation	5 (29.4)	20 (14.6)	0.157
Previous antibiotic exposure, No. (%)	13 (76.4)	87 (63.5)	0.291
Appropriate empirical therapy, No. (%)	15 (88.2)	124 (90.5)	1.000
Duration of therapy, d, median (range)	18 (5.0-31.5)	14 (8.0-20.0)	0.617
Death, No. (%)	8 (47.0)	8 (5.8)	<0.001

CKD, chronic kidney disease, CVC, central venous catheter

CAPÍTULO I. Artículo 2

Table 3. Antimicrobial susceptibility of *E. coli* isolated from patients with intraabdominal infection.

Variable	<i>Bacteremia</i> (n=17)	<i>Non-bacteremia</i> (n=137)	<i>P-value</i>
Antimicrobial agent, No. (%)			
Ampicillin	13 (76.4)	84 (61.3)	0.151
Amoxicillin/clavulanic acid	3 (17.6)	31 (22.6)	1.000
Piperacillin/tazobactam	4 (23.5)	18 (13.1)	0.259
Cefuroxime	0 (0.0)	11 (8.0)	0.609
Cefotaxime	0 (0.0)	5 (3.6)	1.000
Ceftazidime	0 (0.0)	5 (3.6)	1.000
Cefepime	0 (0.0)	3 (2.2)	1.000
Ertapenem	0 (0.0)	0 (0.0)	1.000
Imipenem	0 (0.0)	0 (0.0)	1.000
Meropenem	0 (0.0)	0 (0.0)	1.000
Ciprofloxacin	4 (23.5)	28 (20.4)	0.749
Levofloxacin	4 (23.5)	28 (20.4)	0.749
Gentamicin	2 (11.7)	9 (6.5)	0.335
Tobramycin	2 (11.7)	11 (8.0)	0.634
Amikacin	0 (0.0)	0 (0.0)	1.000
Cotrimoxazole	5 (29.4)	32 (23.3)	0.546
Tigecycline	0 (0.0)	0 (0.0)	1.000
Colistin	0 (0.0)	1 (0.7)	1.000
ESBL, No. (%)	0 (0.0)	4 (2.9)	1.000
MDR, No. (%)	3 (17.6)	35 (25.5)	0.762

ESBL, extended spectrum betalactamase; MDR, multidrug-resistant

CAPÍTULO I. Artículo 2

Table 4. Multivariate analysis of factors related to development of bacteremia in intraabdominal infections by *E. coli*.

Factor	Bacteremia (n=17)	Non-bacteremia (n=137)	P-value	OR (95% CI)
Age, median (range), y	73 (66.5-75.0)	63 (53.0-75.0)	0.395	1.02 (0.97-1.08)
Charlson score, median (range)	4 (2.5-5.5)	1 (0.0-3.0)	0.009	1.46 (1.10-1.94)
Biliary tract source, No (%)	9 (52.9)	44 (32.1)	0.024	6.89 (1.28-37.07)
Intestinal source, No (%)	1 (5.8)	36 (26.2)	0.485	0.40 (0.32-5.14)
Hospital acquired IAI, No (%)	10 (58.8)	45 (32.8)	0.242	2.82 (0.49-16.13)
Previous intervention, No (%)	10 (58.8)	51 (37.2)	0.887	0.879 (0.14-5.20)
Presence of devices, No (%)	16 (94.1)	78 (56.9)	0.016	16.12 (1.68-154.06)

Table 5. Multivariate analysis of factors related to mortality in intraabdominal infections by *E. coli*.

Factor	Dead patients (n=16)	Survivor Patients (n=138)	P-value	OR (95% CI)
Charlson score, median (range)	3 (2-4.75)	1 (0-3)	0.433	1.12 (0.83-1.51)
Bacteremia, No (%)	8 (50.0)	9 (6.6)	0.023	5.25 (1.25-21.96)
Septic shock, No (%)	12 (75.0)	17 (12.4)	<0.001	12.54 (3.17-49.60)
Presence of devices, No. (%)	14 (87.5)	80 (58.4)	0.75	1.34 (0.20-8.66)

CAPÍTULO I. Artículo 3

Objetivo 3. Estudiar la relación clonal, el resistoma y el viruloma de los aislados clínicos de *E. coli* procedentes de foco biliar versus los de foco intraabdominal no biliar.

Artículo 3: Phylogeny, resistome and virulome of *Escherichia coli* causing biliary tract infections.

Escherichia coli es uno de los principales microorganismos implicados en las infecciones de la vía biliar, las cuales cursan con una elevada morbi-mortalidad. Sin embargo, a pesar de su mal pronóstico, apenas existen estudios centrados en *E. coli* causantes de infección de la vía biliar. Por ello, decidimos caracterizar un grupo de 15 aislados clínicos de *E. coli* procedentes de 12 pacientes con sospecha de infección de la vía biliar. Se recogieron datos demográficos y clínicos de estos pacientes, se estudiaron además el resistoma, el viruloma y la relación filogenética de estos aislados mediante secuenciación genómica. Por otro lado, se analizó la capacidad de producir *biofilm* de estos aislados. En cuanto a los resultados, la edad mediana de los pacientes fue de 64 años, con una mediana del índice de Charlson de 1,5 y con una mayor adquisición comunitaria de la infección biliar. La distribución de los secuenciotipos (STs) encontrados fue muy variable entre los diferentes aislados clínicos de *E. coli* analizados, no encontrándose ningún ST predominante, aunque 3 de ellos pertenecieron a STs desconocidos (20%). En cuanto al resistoma, los mecanismos de resistencia más frecuentemente encontrados fueron la presencia del gen *bla*_{TEM-1} (asociado con la resistencia a betalactámicos), y mutaciones en los genes *gyrA*, *parC*, y *parE* (asociados con la resistencia a quinolonas). La resistencia fenotípica más frecuente se produjo frente a ampicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, cotrimoxazol y quinolonas. Por otro lado, se encontró una gran diversidad de factores de virulencia, siendo los más frecuentes *sfa* (93,3%), *fimH* (93,3%) y *gad* (86,6%), no habiendo ningún factor de virulencia común a todos los aislados analizados. Cabe destacar también que la producción de *biofilm* fue elevada en el 26,6% de los aislados. En conclusión, existen características diferenciales filogenéticas y microbiológicas en los aislados clínicos de *E. coli* causante de infección de la vía biliar.



Article

Phylogeny, Resistome, and Virulome of *Escherichia coli* Causing Biliary Tract Infections

Ángel Rodríguez-Villodres ^{1,2}, Rémy A. Bonnin ^{3,4}, José Manuel Ortiz de la Rosa ^{1,2}, Rocío Álvarez-Marín ^{1,2}, Thierry Naas ^{3,4,5}, Javier Aznar ^{1,2,6}, Jerónimo Pachón ^{2,7}, José Antonio Lepe ^{1,2} and Younes Smani ^{1,2,*}

¹ Clinical Unit of Infectious Diseases, Microbiology and Preventive Medicine, University Hospital Virgen del Rocío, 41013 Seville, Spain; anrovi1797@gmail.com (A.R.-V.); ortiz_dela_8@hotmail.com (J.M.O.d.l.R.); rocioalma@gmail.com (R.A.-M.); jaznar@us.es (J.A.); jalepe@cica.es (J.A.L.)

² Institute of Biomedicine of Seville (IBiS), University Hospital Virgen del Rocío; CSIC; University of Seville, 41013 Seville, Spain; jpachon@us.es

³ LabEx Lermite, EA7361, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91190, Saint-Aubin, France; remy.bonnin@u-psud.fr (R.A.B.); thierry.naas@aphp.fr (T.N.)

⁴ The Evolution and Ecology of Resistance to Antibiotics Unit, Institut Pasteur-APHP-Université Paris Sud, 91400, Orsay, France; remy.bonnin@u-psud.fr (R.A.B.); thierry.naas@aphp.fr (T.N.)

⁵ Bacteriology Hygiene unit, APHP, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, 94270, Paris, France; thierry.naas@aphp.fr (T.N.)

⁶ Department of Microbiology, University of Seville, 41009 Seville, Spain

⁷ Department of Medicine, University of Seville, 41009 Seville, Spain

* Correspondence: ysmani-ibis@us.es; Tel.: +34-955-923-100

Received: 4 November 2019; Accepted: 29 November 2019; Published: x

Abstract: *Escherichia coli* is the most frequent Gram-negative bacilli involved in intra-abdominal infections. However, despite high mortality rates associated with biliary tract infections due to *E. coli*, there is no study focusing on this pathogen. In this study, we have characterized a group of 15 *E. coli* isolates obtained from 12 patients with biliary tract infections. Demographic and clinical data of the patients were recovered. Phylogeny, resistome, and virulome analysis through whole genome sequencing and biofilm formation were investigated. Among the 15 *E. coli* isolates, no predominant sequence type (ST) was identified, although 3 of them belonged to unknown STs (20%). Resistance to ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, cotrimoxazole, and quinolones was more present in these isolates; whereas, third and fourth generation cephalosporins, carbapenems, amikacin, tigecycline, and colistin were highly active. Moreover, high diversity of virulence factors has been found, with *sfa*, *fimH*, and *gad* the most frequently detected genes. Interestingly, 26.6% of the *E. coli* isolates were high biofilm-producers. Altogether, our data characterized for the first time *E. coli* isolates associated with biliary tract infections in terms of genomic relationship, resistome, and virulome.

Keywords: *Escherichia coli*; biliary tract infection; virulome; resistome; biofilm

1. Introduction

Escherichia coli is a Gram-negative bacterium with high clinical relevance. This microorganism may cause severe community- and hospital-acquired infections including bacteraemia, urinary tract, respiratory, and intra-abdominal infections [1]. Among intra-abdominal infections, acute cholangitis, an infection of the biliary system, is usually associated with high morbidity and mortality (5–13%) [2,3], reaching up to 29% in cases of malignant obstruction [3]. In case of biliary

tract infection, *E. coli* was reported to be the most frequent pathogen isolated from bile samples (23%) [4].

E. coli sequence type 131 (ST131) identified by multilocus sequence typing (MLST) has been reported as the most prevalent clonal group worldwide, frequently associated with multidrug-resistance (MDR) and infections [5]. Other pandemic lineages such as ST69, ST95, and ST73 have been also associated with more virulent *E. coli* isolates [6,7]. Focusing at the abdominal level, the phylogenetic group B2 of *E. coli* non ST131 has been described in inflammatory bowel disease [8]. However, the epidemiology of *E. coli* causing biliary tract infection is poorly documented.

E. coli needs to move from the large intestine to the biliary tract to produce a biliary tract infection. This process depends on virulence factors that are usually located in pathogenicity islands and can be divided into five main groups: 1) adhesins, 2) toxins, 3) siderophores, 4) capsular, and 5) protectins and invasins [9]. Thus, some genes coding for virulence factors have been associated with urinary tract infections and bacteraemia such as *pap*, *fimH*, *sfa*, *iha*, *bfp* (adhesins), *hlyA*, *cnf1*, *sat* (toxins), *fyuA*, *iutA* (siderophores), *kpsMTII* (capsule) and *aer*, *traT*, *ompT*, *usp*, and *malX* (miscellaneous proteins) [10–14]. However, to our knowledge, only limited studies investigated the microbiological features of *E. coli* causing biliary tract infections [15,16], despite the fact that *E. coli* is the most frequent etiological agent [17]. Characterizing the virulence factors that facilitate the establishment of biliary tract infections in *E. coli* may be helpful in order to identify potential targets that could be locked as a therapeutic strategy. To this end, we examined the clonal relationship, the resistome, and virulome in 15 *E. coli* isolates responsible for biliary tract infections in Spain.

2. Materials and Methods

2.1. Bacterial Strains

Fifteen *E. coli* isolates obtained from bile and blood of 12 patients with biliary tract infection (BTI), and 21 isolates of 20 patients with non-BTI (bacteremia and non-biliary intraabdominal infections) hospitalized at the University Hospital Virgen del Rocío (Seville, Spain) were included in this study. The isolates were collected at the Clinical Microbiology Service from blood and/or bile samples of these patients and then, stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Luria Bertani (LB) broth supplemented with 30% glycerol. Identification of the isolates was performed using MALDI-TOF (Bruker Daltonik GmbH, Leipzig, Germany), as described previously [18] and whole genome sequencing (WGS) (HiSeq systems, Illumina, USA). *E. coli* ATCC 10536 strain was used as the positive control for biofilm formation. *E. coli* ATCC 25922 was used as the control strain for antibiotic susceptibility testing.

2.2. Demographics, Clinical Data, and Follow Up

The diagnosis of the biliary tract infection was made by members of the Infectious Disease Service and/or the Intensive Care Unit (ICU), according to the defined criteria [19]. The following variables were collected from the 12 BTI and 20 non-BTI patients: age and gender, Charlson score, an index that categorize comorbidity of patients based on the International Classification of Diseases diagnosis code [20] and McCabe score, a score that can obtain comparisons regarding the importance of host factors based on the severity of the underlying disease [21], the acquisition type of the BTI and non-BTI (community, healthcare-associated, or hospital), severity (sepsis or septic shock) [22], antibiotic exposure in the previous 2 months of hospitalization and duration of the antimicrobial treatment. The patients were followed until hospital discharge, death, or 30 days, which ever occurred first. The study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital Virgen del Rocío and University Hospital of Virgen Macarena of Seville (approval no. 0023-N-16, 01/10/2016). Written informed consent was signed by all patients before inclusion in the study.

2.3. Antimicrobial Resistant Profile

The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by broth microdilution method using MicroScan Walk Away NM44 panels (Beckman Coulter, Inc., USA) for the following antibiotics: ampicillin, amoxicillin-clavulanic acid, piperacillin-tazobactam, cefuroxime, cefotaxime, ceftazidime, cefepime, imipenem, meropenem, ciprofloxacin, levofloxacin, gentamicin, tobramycin, amikacin, cotrimoxazole, and tigecycline. Colistin was tested by standard broth microdilution as recommended by the European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [23] and the interpretation criteria was performed following the EUCAST breakpoints [24]. MDR criteria were established as non-susceptible to ≥ 1 agent in ≥ 3 antimicrobial categories [25]. *E. coli* ATCC 25922 was used as the control strain.

2.4. Whole Genome Sequencing

Genomic DNA was extracted using an UltraClean microbial DNA isolation kit (MO BIO Laboratories, Mo-Bio, Sait-Quentin en Yvelines, France) from overnight cultures in LB agar (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Genomic DNA quantification was performed using a Qubit fluorometer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and adjusted to 0.2 ng/ μ L. The DNA libraries were prepared using the NexteraXT v3 kit (Illumina, San Diego, CA, USA), according to the manufacturer's instructions, and then run on the HiSeq systems (Illumina, USA) to generate paired-end 150-bp reads. De novo assembly of Illumina reads was performed using CLC genomic workbench 10.1 according the manufacturer's recommendations (Qiagen, Courtaboeuf, France). The genome was annotated using the Rapid Annotations using Subsystems Technology (RAST) tool. The acquired antimicrobial resistance genes were identified by uploading assembled genomes to the Resfinder server v2.1 (<http://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder-2.1>) [26]. Virulence genes were searched using <https://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>.

2.5. Phylogenetic Analysis

Sequence alignment and phylogenetic trees were performed using the software MEGA7 and Evolview online tool [27,28]. Neighbor-joining trees were built from concatenated sequences of the 7 housekeeping genes (*adhk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *malh*, *purA*, and *recA*) used previously in MLST assay [29], and obtained for whole genome sequencing analysis. The evolutionary distances were computed using Kimura's two-parameter model with gamma-distributed rate variation of 0.8 [30]. A bootstrap consensus tree inferred from 1000 replicates was depicted to represent the evolutionary history of the taxa analyzed [31].

2.6. Biofilm Formation Assay

An abiotic solid surface biofilm formation assay was performed as described previously [32]. In brief, overnight cultures of the clinical *E. coli* isolates were diluted 1:100 in fresh LB broth in 96 well plates without shaking and incubated at 37 °C for 48 h. Biofilm was stained with crystal violet 0.4% (v/v) and quantified at 580 nm after solubilization with ethanol 95%. *E. coli* isolates were classified as biofilm-formers if they yielded optical density at 580 nm (OD_{580nm}) values that were at least twice those of the negative control. *E. coli* ATCC 10536 strain was used as positive control.

2.7. Statistical Analysis

A descriptive analysis was performed for demographics and clinical variables of the patients included in the study, with median and interquartile range for the quantitative variables and frequency distribution (%) for the qualitative variables. Fisher and χ^2 tests were used for categorical variables and continuous variables were analyzed using 2-sample t test or Mann Whitney U test. For biofilm formation assay, the group data are presented as mean \pm SEM. Differences were considered significant at $p < 0.05$. All statistical analyses were performed using SPSS software, version 23.0 (IBM Corporation, Somers, New York, USA).

CAPÍTULO I. Artículo 3

2.8. Nucleotide Sequence Accession Number

The WGS of the *E. coli* isolates generated in the study were deposited in GenBank under the BioProject accession number PRJNA557044.

3. Results

3.1. Bacterial Isolates

MALDI-TOF identified the 15 bacterial isolates from the 12 patients with bile infections, following the clinical criteria established by Solomkin et al. [19], as *E. coli*. Among them, 11 (73.3%) were isolated from bile samples and 4 (26.6%) from blood cultures. Three patients had two isolates each: 140-HE and 23-AE from blood and bile cultures, 43-HE and 4-AE from blood and bile cultures, and 60-AE and 61-AE from the bile culture, respectively.

3.2. Demographics and Clinical Data Analysis

Demographic and clinical features of the 12 and 20 patients with biliary tract infections (BTI) and non-BTI, respectively, included in this study are detailed in Table 1. To summarize, for both group of patients, the demographic (age and gender), comorbidities (Charlson and McCabe scores), sepsis or septic shock, and previous treatment and days of treatment were not significantly different. Regarding to the acquisition of the infection, significant difference was observed between both groups ($p = 0.035$). Importantly, there was no difference in mortality between both groups.

Table 1. Demographics and clinical data from patients with biliary tract infections (BTI) and non-BTI by *E. coli*.

Variable	BTI patients (n = 12)	non-BTI patients (n = 20)	P-value
Age, median (range)	64 (58–72.5)	64.5 (55.75–77.75)	0.893
Gender (female), n (%)	7 (58.3)	10 (50.0)	0.647
Charlson Score, median (range)	1.5 (0–3.75)	3 (0.25–6)	0.146
McCabe Score ultimately or rapidly fatal, n (%)	2 (16.6)	11 (55.0)	0.062
Acquisition, n (%)			
Community	9 (75.0)	6 (30.0)	
Healthcare	2 (16.6)	5 (25.0)	0.035
Nosocomial	1 (8.3)	9 (45.0)	
Sepsis or septic shock, n (%)	3 (25.0)	10 (50.0)	0.267
Previous antibiotic exposure, n (%)	7 (58.3)	13 (65.0)	0.724
Days of treatment, median (range)	12.5 (5–21)	10 (8–13)	0.329
Death, n (%)	3 (25.0)	3 (15.0)	0.647

BTI, biliary tract infection.

3.3. Antimicrobial Resistance Profile

Antimicrobial susceptibility testing results are shown in Table 2. Non-significant difference has been observed between BTI and non-BTI isolates. The most frequent resistance found in BTI isolates was by far Ampicillin (73.3%), followed by amoxicillin-clavulanic acid (26.6%), cotrimoxazole (26.6%), and fluoroquinolones (13.3%). The rest of the antibiotics (third and fourth generation cephalosporins, carbapenems, amikacin, tigecycline, and colistin) were highly active against these *E. coli* isolates. For the non-BTI isolates, the most frequent resistance was by far Ampicillin (90.4%), followed by fluoroquinolones (33.33%), amoxicillin-clavulanic acid (28.6%), cotrimoxazole (28.5%), and cefuroxime (14.3%). The rest of the antibiotics were highly active.

A MDR (resistance to beta-lactams including or not cephalosporins, beta-lactams/beta-lactamases inhibitors, fluoroquinolones, cotrimoxazole, and/or aminoglycoside) pattern was found in 2 and 5 BTI and non-BTI isolates (13.3% and 23.8%), respectively. Extended spectrum beta-lactamase (ESBL) was only detected in the 2 non-BTI isolates; whereas, carbapenemase production were not detected in any of the BTI and non-BTI isolates.

CAPÍTULO I. Artículo 3

Table 2. Antimicrobial resistance in *E. coli* isolates causing BTI and non-BTI.

	BTI <i>E. coli</i> (n = 15)	non-BTI <i>E. coli</i> (n = 21)	P-value
Ampicillin, n (%)	11 (73.3)	19 (90.4)	0.210
Amoxicillin-clavulanic acid, n (%)	4 (26.6)	6 (28.6)	1.000
Piperacillin-tazobactam, n (%)	2 (13.3)	1 (4.7)	0.559
Cefuroxime, n (%)	1 (6.6)	3 (14.3)	0.626
Cefotaxime, n (%)	0 (0.0)	2 (9.5)	0.500
Ceftazidime, n (%)	0 (0.0)	2 (9.5)	0.500
Cefepime, n (%)	0 (0.0)	2 (9.5)	0.500
Imipenem, n (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	1.000
Meropenem, n (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	1.000
Ciprofloxacin, n (%)	2 (13.3)	7 (33.3)	0.252
Levofloxacin, n (%)	2 (13.3)	7 (33.3)	0.252
Gentamicin, n (%)	1 (6.6)	2 (9.5)	1.000
Tobramycin, n (%)	1 (6.6)	2 (9.5)	1.000
Amikacin, n (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	1.000
Cotrimoxazole, n (%)	4 (26.6)	6 (28.5)	1.000
Tigecycline, n (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	1.000
Colistin, n (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	1.000
ESBL, n (%)	0 (0.0)	2 (9.5)	0.500
MDR, n (%)	2 (13.3)	5 (23.8)	0.674

BTI, biliary tract infection; ESBL, extended spectrum beta-lactamase; MDR, multidrug-resistant.

3.3. Genetic Characterization

3.3.1. Epidemiology

The WGS analysis of the *E. coli* isolates showed that 12 isolates belonged to 10 different STs and 3 isolates (3-AE, 47-HE, and 61-AE) belonged to novel STs (Table 3). Moreover, the isolate pairs recovered from the same patient 140-HE and 23-AE, and 43-HE and 4-AE belonged to ST131 and ST58, respectively. In contrast, the isolate pair 60-AE and 61-AE corresponded to two different STs, namely ST542 and an unknown ST, respectively.

Table 3. Typing of 15 *E. coli* isolates by multilocus sequence typing.

Strain	Source	<i>adk</i>	<i>fumC</i>	<i>gyrB</i>	<i>icd</i>	<i>mdh</i>	<i>purA</i>	<i>recA</i>	ST	ST complex
1-HE	Blood	6	346	12	1	20	13	7	2230	23
43-HE [^]	Blood	6	4	4	16	24	8	14	58	155
47-HE	Blood	6	95	15	18	9	8	6	Unknown	-
140-HE [']	Blood	53	40	47	13	36	28	29	131	131
23-AE [']	bile	53	40	47	13	36	28	29	131	131
3-AE	Bile	13	6	15	13	16	10	122	Unknown	-
4-AE [^]	Bile	6	4	4	16	24	8	14	58	155
8-AE	Bile	6	23	3	16	9	8	6	3640	-
16-AE	Bile	10	11	4	8	8	8	2	10	10
24-AE	Bile	13	13	9	13	16	10	9	12	12
60-AE ⁻	Bile	112	11	5	12	8	8	86	542	-
61-AE ⁻	Bile	112	40	4	12	8	8	86	Unknown	-
66-AE	Bile	21	35	27	6	5	5	4	69	69
81-AE	Bile	13	52	10	14	17	25	17	141	-
82-AE	Bile	6	4	14	16	24	8	14	155	155

[^] *E. coli* isolated from blood and bile samples of the same patient. ['] *E. coli* isolated from bile of the same patient. ST: sequence type.

The phylogenetic analysis of the concatenated sequences of the seven MLST housekeeping genes of each isolate showed a tree consisting of three clusters and one branch formed by only one isolate that belonged to ST69 (66-AE) and unrelated phylogenetically to the other isolates. The cluster 1 contained 5 isolates; two of them (140-HE and 23-AE) belonged to ST131 and 1 (3-AE) to an unknown ST related to ST12 complex. The cluster 2 contained 3 isolates; one of them (61-AE)

belonged to an unknown ST related to ST542. Finally, the cluster 3 had 6 isolates; one of them (47-HE) belonged to an unknown ST related to ST3640 (Figure 1).

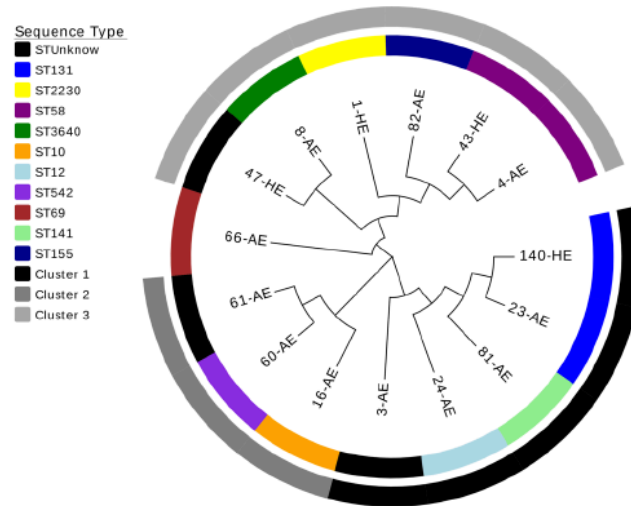


Figure 1. Phylogenetic tree using neighbor-joining method with 1000 bootstrap replicas of the 15 *E. coli* isolates from the patients with biliary tract infections.

3.3.2. Virulome

The WGS analysis has identified several genes coding for virulence factors in the *E. coli* isolates (Table 4). The most frequently detected genes were *sfa* (S fimbrial adhesin, 93.3%), *fimH* (type 1 Fimbriae, 93.3%), and *gad* (glutamate decarboxylase, 86.6%), followed by *lpfA* (long polar fimbria, 60.0%), *iss* (increased serum survival, 53.3%), *iroN* (enterobactin siderophore receptor protein, 53.3%), *iutA* (ferric aerobactin receptor, 53.3%), *mchF* (ABC transporter protein, 46.6%), *mchC* (microcin H47 maturation system, 20.0%), *senB* (enterotoxin, 20.0%), *mchB* (microcin H47, 13.3%), *astA* (heat-stable enterotoxin-1, 13.3%), *iha* (*irgA* homologue adhesion, 13.3%), *mcmA* (microcin M, 13.3%), *vat* (vacuolating autotransporter toxin, 13.3%), *papG* (P fimbrial adhesin, 13.3%), *tsh* (temperature-sensitive hemagglutinin, 6.6%), *air* (enteroaggregative immunoglobulin repeat protein, 6.6%), *eilA* (*Salmonella hila* homologue, 6.6%), *ireA* (siderophore receptor, 6.6%), *cnf1* (cytotoxic necrotizing factor-1, 6.6%), and *ipaH* (invasion plasmid antigen, 6.6%). Other relevant virulence factors in *E. coli* such as *hlyA* (hemolysin A), *stx-1* and *stx-2* (Shiga toxins-1 and -2), *cdtB* (cytotoxic necrotizing toxin), *eaeA* (intimin), and *bfp* (bundle-forming pilus) were not found in these isolates.

CAPÍTULO I. Artículo 3

Table 4. Virulence genes from *E. coli* causing biliary tract infection.

Strain	1-HE	43-H E*	47-H E	140-H E*	23- AE*	3-A E	4-A E*	8-A E	16- AE	24- AE	60- AE*	61-A E*	66- AE	81- AE	82- AE
Source	Blood	Blood	Blood	Blood	Bile	Bile	Bile	Bile	Bile	Bile	Bile	Bile	Bile	Bile	Bile
<i>iss</i>	+	+				+	+	+	+	+		+	+		+
<i>ipfA</i>	+	+	+			+	+	+				+	+		+
<i>mchC</i>						+				+					+
<i>mchB</i>						+									+
<i>mchF</i>	+	+				+				+			+	+	+
<i>iroN</i>	+	+				+				+		+	+	+	+
<i>tsh</i>	+														
<i>gad</i>	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+		+	+
<i>astA</i>			+									+	+		
<i>senB</i>									+	+		+			
<i>iha</i>										+		+			
<i>air</i>													+		
<i>ailA</i>													+		
<i>mcmA</i>										+					+
<i>vat</i>										+					+
<i>ireA</i>										+					
<i>papG</i>	+													+	
<i>sfa</i>	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
<i>fimH</i>	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+
<i>iutA</i>	+	+		+					+	+		+	+	+	+
<i>ipaH</i>													+		
<i>cnfI</i>										+					
<i>hlyA</i>															
<i>catB</i>															
<i>stx-1</i>															
<i>stx-2</i>															
<i>eaeA</i>															
<i>bfp</i>															
Total	10	8	5	4	3	8	3	3	6	14	3	10	12	9	8

iss: increased serum survival, *ipfA*: long polar fimbria, *mchC*: microcin HA7 maturation system, *mchB*: microcin HA7, *mchF*: ABC transporter protein, *iroN*: enterobactin siderophore receptor protein, *tsh*: temperature-sensitive hemagglutinin, *gad*: glutamate decarboxylase, *astA*: heat-stable enterotoxin-1, *senB*: enterotoxin, *iha*: irgA homologue adhesion, *air*: enteroaggregative immunoglobulin repeat protein, *ailA*: Salmonella hlyA homologue, *mcmA*: microcin M, *vat*: vacuolating autotransporter toxin, *ireA*: siderophore receptor, *papG*: P fimbrial adhesin, *Sfa*: S fimbrial adhesin, *fimH*: type 1 Fimbriae, *iutA*: ferric aerobactin receptor, *ipaH*: invasion plasmid antigen, *cnfI*: 4cytotoxic necrotizing factor-1, *hlyA*: hemolysin A, *catB*: cytolethal distending toxin, *stx-1* and *stx-2*: Shiga toxins-1 and -2, *eaeA*: intimin, and *bfp*: bundle-forming pilus. ^* *E. coli* isolated from blood and bile samples of the same patient. ~ *E. coli* isolated from bile of the same patient.

3.3.3. Resistome

The WGS revealed that the *bla*_{TEM-1a} and *bla*_{TEM-1b} genes, coding for the broad spectrum beta-lactamase TEM-1, were the most frequently detected enzyme (66.6%). Mutations in *gyrA*, *parC*, and *parE* genes, associated with fluoroquinolone resistance, were detected in 33%, 6.6%, and 20% of the isolates, respectively. Resistance to aminoglycosides (*aph*, 40%; *aadA*, 33.3%; and *strA*, 13.3%), sulphonomides (*sul*, 46.6%), trimethoprim (*dhfrA*, 33.3%), tetracycline (*tet*, 20.0%), azithromycin (*mph*, 13.3%), and chloramphenicol (*catA*, 13.3%) were also detected in these isolates (Table 5).

Table 5. Resistance genes from *E. coli* causing biliary tract infection.

Strain	Source	<i>strA</i>	<i>bla</i> _{TEM}	<i>catA</i>	<i>sul</i>	<i>tet</i>	<i>dfrA</i>	<i>aph</i>	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	<i>parE</i>	<i>aadA</i>	<i>mph</i>
1-HE	Blood	+	1a					+					
43-HE*	Blood		1b										
47-HE	Blood		1a					+					
140-HE*	Blood		1b				+				+(I529L)	+	+
23-AE*	Bile		1b				+				+(I529L)	+	+
3-AE	Bile	+	1b	+	+	+	+						
4-AE*	Bile								+(S83L)				
8-AE	Bile												
16-AE	Bile		1b		+			+					
24-AE	Bile												
60-AE	Bile		1b						+(S83L)				
61-AE	Bile				+		+	+	+(S83L)		+(I529L)	+	
66-AE	Bile		1b		+	+		+					
81-AE	Bile												
82-AE	Bile		1b	+	+	+	+	+	+(S83L) (D87N)	+(S80I)		+	

^* *E. coli* isolated from blood and bile samples of the same patient. ~ *E. coli* isolated from bile of the same patient.
1a and 1b: two different *bla*_{TEM} genes.

3.3.4. Biofilm Formation

The analysis of the biofilm formation in abiotic surface showed that 4 isolates (26.6%) were biofilm-producers with OD_{680nm} higher than 0.2. Two of them belonged to unknown ST (3-AE and 61-AE), one to ST2230 (1-HE), and one to ST542 (60-AE) (Figure 2).

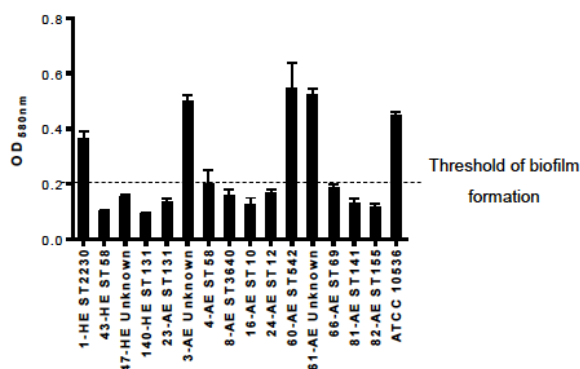


Figure 2. Biofilm formation by the 15 *E. coli* isolates isolated from patients with biliary tract infection. Unknown: unknown ST.

4. Discussion

This study shows, for the first time, the genomic relationship, resistome, and virulome of 15 *E. coli* isolates obtained from bile and blood cultures of 12 patients with biliary tract infection. Twenty percent of *E. coli* isolates belonged to unknown ST but with different allele combinations. This percentage is higher than those found in other areas of infections such as urinary tract infection (3.5%), bloodstream infection (10.5%), and left-sided inflammatory bowel disease (0%) [6,8,33]. Of note, twenty-one *E. coli* isolates recovered from different non-biliary sources in our hospital and over the same period of time were also characterized phylogenetically by MLST and none of them belonged to unknown STs (Table S1).

Although, ST131, ST95, ST73, and ST69 are clearly predominant STs in human *E. coli* infections such as urinary tract or bloodstream infections [7,34], in our study only 2 *E. coli* isolates (140-HE and 23-AE, from the same patient) belonged to ST131 and another one (66-AE), to ST-69. The rest of the isolates belonged to other STs, which suggests, even though the sample size of this study is small, that in *E. coli* biliary tract infections, there is not a predominant ST. It is noteworthy to mention that 140-HE and 23-AE isolates that belonged to ST131 had similar resistance profiles (resistance to ampicillin, amoxicillin-clavulanic acid, and cotrimoxazole) with exception for piperacillin-tazobactam. Indeed, the isolates 140-HE and 23-AE were categorized susceptible to piperacillin-tazobactam by MicroScan and resistant to piperacillin-tazobactam by broth microdilution method. This could be due to the presence of different heteroresistant populations that cannot be detected by the automated Microscan system [35].

Regarding the antimicrobial resistance profiles of the 15 *E. coli* isolates of this study, ampicillin showed the highest percentage of resistance (73.3%), followed by amoxicillin-clavulanic acid (26.6%), cotrimoxazole (26.6%), and fluoroquinolones (13.3%). These data are in agreement with those of WGS analysis (Table 5). Specifically, *bla*_{TEM} genes involved in ampicillin resistance have been found in 66.6% of the isolates, *dfrA* gene involved in trimethoprim resistance has been found in 33.3% of the isolates, whereas *gyrA* and *parE* were more prevalent (33% and 20%) than the observed fluoroquinolones resistance rate (13.3%). However, Razaghi et al. reported that 54%, 31.8%, 22.7%, and 0% of *E. coli* isolated from bile presented resistance to ciprofloxacin, meropenem, ceftazidime, and amoxicillin-clavulanic acid, respectively [15]. These differences are likely the result of differences in local epidemiology. In Spain, the analysis of a total of 1429 *E. coli* isolates causing intra-abdominal infections in a surveillance study called SMART (Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends) between 2016 and 2017 revealed that ciprofloxacin and amoxicillin-clavulanic acid presented resistance rates of 27.6% and 18.5%, respectively [36]. However, in Iran, the MDR pattern was detected in 95.5% of the *E. coli* recovered from bile, reporting different antimicrobial resistance rates in comparison with our results, mainly in the case of third generation cephalosporins (82% vs. 0%), carbapenems (~70% vs. 0%), gentamicin (36.4% vs. 6.6%), and ciprofloxacin (45.5% vs. 13.3%), respectively [37].

The WGS showed a high diversity in the virulome among the *E. coli* isolates analyzed in this study, similarly to Fernández-Romero et al. observations [38]. None of the virulence factors genes detected were present in all of the isolates, indicating the absence of a unique gene essential for the development of *E. coli*-borne biliary tract infections. However, three of the virulence factors were detected in around 90% of the isolates: *sfa* and *fimH* that are involved in the adhesion to the cells and facilitate the penetration of bacteria into the tissues [39], and *gad*, which expression is relevant for the maintenance of *E. coli* in acid environments such as the biliary tract [40]. These data suggest that adhesion ability and resistance to bile acids seem to be important to produce a biliary tract infection. Transcriptomic confirmatory analyses will help to determine the involvement of these genes in the infections development, especially in the patients with two isolates recovered from bile and blood, respectively, in which the expression of these genes may change during the course of the infection. Similar data have been reported by Wang et al. [16] who studied the role of virulence factors in the development of *E. coli* bacteraemia in patients with acute cholangitis. They detected the presence of *fimH* and *iutA* in 88% and 50% of the isolates, respectively; whereas, *sfa* was detected only in 8% of the isolates [16]. Another study reported that *bfp* and *astA* were the most frequent virulence factors in *E. coli* isolated from bile [15]; although they did not analyze the presence of *fimH*, *sfa*, or *gad* in their isolates. It is important to mention, that no transcriptomic analyses were performed in this study to confirm the degree of expression of these virulence genes, even though they might be or not be expressed.

Some genetic interconnections have been found between different isolates. It appears that the isolate 3-AE could be the ancestor of the cluster 1. Some virulence genes (*iss*, *ipfA*, *mchC*, and *mchB*) present in this isolate were lost when compared with the rest of the isolates of the cluster 1. In contrast, other virulence genes (*gad*, *mcmA*, *vat*, and *iutA*) were acquired in the rest of the isolates of the cluster 1. Similarly, we found that the isolate 60-AE acquired the genes *iss*, *ipfA*, *iroN*, *astA*, *senB*,

iha, and *iutA*, when compared with the isolate 61-AE recovered from the same patient. In the same line, the isolate 47-HE, closely related to the isolate 8-AE, acquired the genes *astA* and *fimH*, when compared with the isolate 8-AE.

Notably, we report, here, that the *E. coli* isolates do not only harbor virulence and resistance genes, but also 26.6% of them were high biofilm-formers. However, the relationship between biofilm formation and virulence or resistance pattern was not observed, and needs inclusion of more isolates in the future.

5. Conclusions

This study characterized, for the first time by WGS, the molecular epidemiological traits, virulome, and resistome of a collection of *E. coli* isolates from patients with biliary tract infections. Low proportion of *E. coli* ST131 was found and most *E. coli* isolates belonged to different STs. Antimicrobial susceptibility testing and WGS matched perfectly. Resistance to penicillins, cotrimoxazole, and fluoroquinolones were the most frequently encountered resistances. Furthermore, a high diversity of virulence factors was evidenced, with however, a predominance of genes involved in adhesion and resistance to biliary acids. A better knowledge of the microbiological features of *E. coli* causing biliary tract infection is important to improve the diagnosis and treatment of these patients.

Supplementary material: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Table S1: Typing of the 21 non-biliary *E. coli* isolates by MLST. The results of the typing of the 21 non-biliary *E. coli* isolates by MLST has been included in the supplementary material as Table S1.

Author Contributions: Y.S. conceived the study and designed the experiments, analyzed the results and wrote the manuscript. A.R.-V., J.M.O.d.l.R., R.A.-M., R.A.B., performed the experiments and analyzed the results. T.N., J.A., J.P., and J.A.L. reviewed the manuscript.

Funding: This work was supported by the Miguel Servet Tipo I Project grant, Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (CP15/00132), and by Plan Nacional de I+D+I 2013-2016 and Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (RD16/0016/0009), cofinanced by the European Development Regional Fund “A Way to Achieve Europe,” Operative Program Intelligent Growth 2014-2020. This study was supported by the Assistance Publique – Hôpitaux de Paris (AP-HP), the University Paris-Sud, the Laboratory of Excellence in Research on Medication and Innovative Therapeutics (LERMIT) supported by a grant from the French National Research Agency (ANR-10-LABX-33). Y.S. is supported by the Subprograma Miguel Servet Tipo I, Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Spain (CP15/00132). A.R.V. is supported by the Subprograma Río Hortega, Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Spain (CM18/00122). R.A.M. is supported by the Subprograma Juan Rodés, Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Spain (JR17/00025).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Rogers, B.A.; Sidjabat, H.E.; Paterson, D.L. *Escherichia coli* O25b-ST131: A pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J. Antimicrob. Chemother.* **2011**, *66*, 1–14.
2. Lai, E.C.S.; Mok, F.P.T.; Tan, E.S.Y.; Lo, C.; Fan, S.; You, K.; Wong, J. Endoscopic biliary drainage for severe acute cholangitis. *N. Engl. J. Med.* **1992**, *326*, 1582–1586.
3. Englesbe, M.J.; Dawes, L.G. Resistant pathogens in biliary obstruction: Importance of cultures to guide antibiotic therapy. *Hpb.* **2005**, *7*, 144–148.
4. Leung, J.W.; Liu, Y.L.; Lau, G.C.T.; Chan, R.C.Y.; Lai, A.C.W.; Ling, T.K.W.; Cheng, A.F. Bacteriologic analyses of bile and brown pigment stones in patients with acute cholangitis. *Gastrointest. Endosc.* **2001**, *54*, 340–345.
5. Nicolas-Chanoine, M.H.; Bertrand, X.; Madec, J.Y. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clin. Microbiol. Rev.* **2014**, *27*, 543–574.

6. Adams-Sapper, S.; Diep, B.A.; Perdreau-Remington, F.; Riley, L.W. Clonal composition and community clustering of drug-susceptible and -resistant *Escherichia coli* isolates from bloodstream infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 490–497.
7. Manges, A.R.; Harel, J.; Masson, L.; Edens, T.J.; Portt, A.; Reid-Smith, R.J.; Zhanel, G.G.; Kropinski, A.M.; Boerlin, P. Multilocus sequence typing and virulence gene profiles associated with *Escherichia coli* from human and animal sources. *Foodborne Pathog. Dis.* **2015**, *12*, 302–310.
8. Petersen, A.M.; Nielsen, E.M.; Littrup, E.; Brynskov, J.; Mirsepasi, H.; Krogfelt, K.A. A phylogenetic group of *Escherichia coli* associated with active left-sided Inflammatory Bowel Disease. *BMC Microbiol.* **2009**, *9*, 171.
9. Dale, A.P.; Woodford, N. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): Disease, carriage and clones. *J. Infect.* **2015**, *71*, 615–626.
10. Ron, E.Z. Distribution and evolution of virulence factors in septicemic *Escherichia coli*. *Int. J. Med. Microbiol.* **2010**, *300*, 367–370.
11. Hung, W.T.; Cheng, M.F.; Tseng, F.C.; Chen, Y.S.; Lee, S.S.J.; Chang, T.H.; Lin, H.H.; Hung, C.H.; Wang, J.L. Bloodstream infection with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: The role of virulence genes. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **2019**, doi:10.1016/j.jmii.2019.03.005.
12. Wang, M.C.; Tseng, C.C.; Wu, A.B.; Huang, J.J.; Sheu, B.S.; Wu, J.J. Different roles of host and bacterial factors in *Escherichia coli* extra-intestinal infections. *Clin. Microbiol. Infect.* **2009**, *15*, 372–379.
13. Tarchouna, M.; Ferjani, A.; Ben-Selma, W.; Boukadida, J. Distribution of uropathogenic virulence genes in *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection. *Int. J. Infect. Dis.* **2013**, *17*, e450–e453.
14. Ciesielczuk, H.; Betts, J.; Phee, L.; Doumith, M.; Hope, R.; Woodford, N.; Wareham, D.W. Comparative virulence of urinary and bloodstream isolates of extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* in a *Galleria mellonella* model. *Virulence* **2015**, *6*, 145–151.
15. Razaghi, M.; Tajeddin, E.; Ganji, L.; Alebouyeh, M.; Alizadeh, A.H.M.; Sadeghi, A.; Zali, M.R. Colonization, resistance to bile, and virulence properties of *Escherichia coli* strains: Unusual characteristics associated with biliary tract diseases. *Microb. Pathog.* **2017**, *111*, 262–268.
16. Wang, M.; Tseng, C.; Chen, C.; Wu, J.; Huang, J. The Role of bacterial virulence and host factors in patients with *Escherichia coli* bacteremia who have acute cholangitis or upper urinary tract infection. *Clin. Infect. Dis.* **2002**, *35*, 1161–1166.
17. Kochar, R.; Banerjee, S. Infections of the Biliary Tract. *Gastrointest. Endosc. Clin. N. Am.* **2013**, *23*, 199–218.
18. Cherkaoui, A.; Hibbs, J.; Emonet, S.; Tangomo, M.; Girard, M.; Francois, P.; Schrenzel, J. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *J. Clin. Microbiol.* **2010**, *48*, 1169–1175.
19. Solomkin, J.S.; Mazuski, J.E.; Bradley, J.S.; Rodvold, K.A.; Goldstein, E.J.; Baron, E.J.; O'Neill, P.J.; Chow, A.W.; Dellinger, E.P.; Eachempati, S.R.; et al. Diagnosis and management of complicated intra-abdominal infection in adults and children: Guidelines by the Surgical Infections Society and the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **2010**, *50*, 133–164.
20. Charlson, M.E.; Pompei, P.; Ales, K.L.; MacKenzie, C.R. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: Development and validation. *J. Chronic. Dis.* **1987**, *40*, 373–383.
21. McCabe, W.R.; Jackson, G.G. Gram-Negative bacteriemia. *Arch. Intern. Med.* **1962**, *110*, 847–855.
22. Singer, M.; Deutschman, C.S.; Seymour, C.W.; Shankar-Hari, M.; Annane, K.; Bauer, M.; Bellomo, R.; Bernard, G.R.; Chiche, J.; Coopersmith, C.M.; et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Jama* **2016**, *315*, 801–810.
23. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Recommendations for MIC Determination of Colistin (Polymyxin E) As Recommended by the Joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group*; European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing: Växjö, Sweden, 2016.
24. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters*; European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing: Växjö, Sweden, 2019.
25. Magiorakos, A.P.; Srinivasan, A.; Carey, R.B.; Carmeli, Y.; Falagas, M.E.; Giske, C.G.; Harbarth, S.; Hindler, J.F.; Kahlmeter, G.; Olsson-Liljequist, B.; et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* **2012**, *18*, 268–281.
26. Zankari, E.; Hasman, H.; Cosentino, S.; Vestergaard, M.; Rasmussen, S.; Lund, O.; Aarestrup, F.M.;

- Larsen, M.V. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* **2012**, *67*, 2640–2644.
27. Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* **2016**, *33*, 1870–1874.
 28. Zhang, H.; Gao, S.; Lercher, M.J.; Hu, S.; Chen, W. EvolView, an online tool for visualizing, annotating and managing phylogenetic trees. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, W569–W572.
 29. Rodríguez-Villodres, Á.; Gil-Marqués, M.L.; Álvarez-Marín, R.; Bonnin, R.A.; Pachón-Ibáñez, M.E.; Aguilar-Guisado, M.; Naas, T.; Aznar, J.; Pachón, J.; Lepe, J.A.; et al. Extended-spectrum resistance to β -lactams/ β -lactamase inhibitors (ESRI) evolved from low-level resistant *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2019**, doi:10.1093/jac/dkz393.
 30. Kimura, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **1980**, *16*, 111–120.
 31. Felsenstein, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **1985**, *39*, 783–791.
 32. Vila-Farrés, X.; Parra-Millán, R.; Sánchez-Encinales, V.; Varese, M.; Ayerbe-Algaba, R.; Bayó, N.; Guardiola, S.; Pachón-Ibáñez, M.E.; Kotev, M.; García, J.; et al. Combating virulence of Gram-negative bacilli by OmpA inhibition. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 14683.
 33. Hertz, F.B.; Nielsen, J.B.; Schønning, K.; Littauer, P.; Knudsen, J.D.; Løbner-Olesen, A.; Frimodt-Møller, N. Population structure of drug-susceptible, resistant and ESBL-producing *Escherichia coli* from community-acquired urinary tract infections. *BMC Microbiol.* **2016**, *16*, 63.
 34. Manges, A.R.; Geum, H.M.; Guo, A.; Edens, T.J.; Fibke, C.D.; Pitout, J.D.D. Global extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) lineages. *Clin. Microbiol. Rev.* **2019**, *32*, e00135–e00118.
 35. Rodríguez-Villodres, Á.; Ortiz de la Rosa, J.M.; Álvarez-Marín, R.; Pachón, J.; Aznar, J.; Lepe, J.A.; Smani, Y. Heteroresistance to piperacillin-tazobactam in clinical isolates of *Escherichia coli* sequence type 131. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **2017**, *62*, e01923–17.
 36. Cantón, R.; Loza, E.; Aznar, J.; Castillo, F.J.; Cercenado, E.; Fraile-Ribot, P.A.; González-Romo, F.; López-Hontangas, J.L.; Rodríguez-Lozano, J.; Suárez-Barrenechea, A.I.; et al. Monitoring the antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms involved in intraabdominal and urinary tract infections recovered during the SMART study (Spain, 2016 and 2017). *Rev. Esp. Quimioter.* **2019**, *32*, 145–155.
 37. Tajeddin, E.; Sherafat, S.J.; Majidi, M.R.; Alebouyeh, M.; Alizadeh, A.H.; Zali, M.R. Association of diverse bacterial communities in human bile samples with biliary tract disorders: A survey using culture and polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis methods. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2016**, *35*, 1331–1339.
 38. Fernández-Romero, N.; Romero-Gómez, M.P.; Mora-Rillo, M.; Rodríguez-Baño, J.; López-Cerero, L.; Pascual, A.; Mingorance, J. Uncoupling between core genome and virulome in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* **2015**, *61*, 647–652.
 39. Sarowska, J.; Futoma-Koloch, B.; Jama-Kmieciak, A.; Frej-Madrzak, M.; Ksiazczyk, M.; Bugla-Ploskonska, G.; Choroszy-Krol, I. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: Recent reports. *Gut Pathog.* **2019**, *11*, 10.
 40. Shin, S.; Castanie-Cornet, M.P.; Foster, J.W.; Crawford, J.A.; Brinkley, C.; Kaper, J.B. An activator of glutamate decarboxylase genes regulates the expression of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence genes through control of the plasmid-encoded regulator, Per. *Mol. Microb.* **2001**, *41*, 1133–1150.



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

CAPÍTULO I. Artículo 3: datos suplementarios

Supplementary data

Table S1. Typing of the 21 non-biliary *E. coli* isolates by multilocus sequence typing.

Isolate	Source (Focus)	<i>adk</i>	<i>fumC</i>	<i>gyrB</i>	<i>icd</i>	<i>mdh</i>	<i>purA</i>	<i>recA</i>	ST	ST Complex	Phylogroup
135-HE	Blood (UTI)	10	11	4	8	8	8	2	10	10	A
5-HE	Blood (UTI)	97	40	93	13	23	28	66	429	-	-
12-HE	Blood (UTI)	36	24	9	13	17	11	25	73	73	B2
38-HE	Blood (UTI)	40	13	9	13	16	10	9	493	12	-
2-HE	Blood (UTI)	37	38	19	37	17	11	26	95	95	B2
272-HE	Blood (IA)	13	38	84	13	17	64	34	569	-	-
29-HE	Blood (IA)	53	40	47	13	36	28	29	131	131	B2
15-HE	Blood (Unknown)	37	38	19	37	17	11	26	95	95	B2
23-HE	Blood (Unknown)	14	14	10	200	17	7	10	1193	-	-
31-HE	Blood (Unknown)	37	38	19	37	17	11	26	95	95	B2
7-HE	Blood (CNS)	53	40	47	13	36	28	29	131	131	B2
118-HE	Blood (Endocarditis)	53	40	47	13	36	28	29	131	131	B2
11-HE	Blood (Endovascular)	10	11	4	8	8	8	2	10	10	A
21-HE	Blood (Catheter)	13	43	9	37	17	37	25	567	-	-
3-HE	Blood (RTI)	53	40	47	13	36	28	29	131	131	B2
18-HE	Blood (endometritis)	92	4	87	96	70	58	2	648	648	-
33-HE	Blood (chorioamnionitis)	53	40	254	13	36	28	29	1982	131	-
74-HE	Blood (Surgical wound)	43	41	15	18	11	7	6	101	101	B1
47-AE	IA abscess	13	38	84	13	17	64	34	569	-	-
49-AE	Peritoneal fluid	21	35	27	6	5	5	4	69	69	D
54-AE	Peritoneal fluid	21	35	27	6	5	5	4	69	69	D

HE, Hemoculture *E. coli*, ST, sequence type, UTI, urinary tract infection; IA, intra-abdominal; CNS, central nervous system; RTI, respiratory tract infection.

CAPÍTULO II

La sobreexpresión de la proteína de membrana externa A (OmpA) como factor de riesgo para la mortalidad en la bacteriemia e infección intraabdominal por *E. coli*

CAPÍTULO II. Artículo 4

Objetivo 1. Estudiar la relación entre la expresión de OmpA y la mortalidad de los pacientes con bacteriemia por *E. coli*.

Artículo 4: Overexpression of outer membrane protein A is a risk factor for mortality in *Escherichia coli* bloodstream infections.

OmpA es un importante factor de virulencia en *E. coli*, sin embargo, su implicación clínica en infecciones producidas por este microorganismo es desconocida. Nuestro objetivo en este trabajo fue determinar si la expresión de OmpA es un factor de riesgo asociado con la mortalidad en la bacteriemia por *E. coli*.

Realizamos un estudio de cohortes prospectivo y observacional en el Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla en el que analizamos las características demográficas, clínicas y microbiológicas de 190 pacientes con bacteriemia por *E. coli*. La expresión de OmpA se determinó usando un ensayo basado en la emisión de fluorescencia debido a la introducción de un plásmido pUA66 el cual lleva una fusión transcripcional entre el gen de la proteína verde fluorescente (*gfp*) y el promotor del gen *ompA*. Por último, se realizó un análisis bivariado y multivariado.

En cuanto a las características demográficas, existió homogeneidad entre los pacientes fallecidos y supervivientes. Sin embargo, los pacientes fallecidos presentaron mayor número de comorbilidades, infecciones más severas, bacteriemia de foco no urinario y presencia de dispositivos externos de forma más frecuente. En cuanto a la expresión de OmpA, aquellos aislados procedentes de pacientes fallecidos sobreexpresaron OmpA en comparación con los pacientes superviviente ($36,8 \times 10^4$ vs. $28,3 \times 10^4$ u.a., $P=0,001$). El análisis multivariado seleccionó como factores relacionados de forma independiente con la mortalidad en la bacteriemia por *E. coli* la expresión de OmpA [OR 1,04 (1,00-1,07); $P=0,014$], el índice de Charlson [OR 1,33 (1,11-1,60); $P=0,002$], el índice de Pitt [OR 1,52 (1,14-2,01); $P=0,003$] y el foco no urinario de la bacteriemia [OR 5,11 (1,86-13,99); $P=0,001$]. Por tanto, todos estos datos indican que la sobreexpresión de OmpA es un factor de riesgo para la mortalidad en pacientes con bacteriemia por *E. coli*.

El manuscrito resultante de este trabajo se encuentra bajo revisión en la revista *Emerging Infectious Diseases*.

CAPÍTULO II. Artículo 4

Title. Overexpression of outer membrane protein A is a risk factor for mortality in *Escherichia coli* bloodstream infections.

Abstract

Outer membrane protein A (OmpA) is a virulence factor in *Escherichia coli*. However, OmpA clinical implication in infections by *E. coli* remains unknown. We aimed to determine whether OmpA overexpression is a risk factor associated with the mortality by bloodstream infections by *E. coli* (BSI-EC). We analysed demographics, microbiological and clinical data from 190 patients with BSI-EC included in a prospective observational cohort study. OmpA expression was determined using a fluorescence assay based on the introduction of pUA66 plasmid harbouring a transcriptional fusion of *gfp* and *ompA* promoter. Bivariate and logistic regression analyses were performed. Dead and survivors patients have homogenous demographics features. However, dead versus survivor patients presented more comorbidities, severe infections, BSI from non-urinary source and presence of external devices. Isolates from dead patients overexpressed OmpA than those from survivor patients (36.8×10^4 vs 28.3×10^4 a.u., $P=0.001$). Logistic regression analysis showed OmpA overexpression [OR 1.04 (1.00-1.07); $P=0.014$], Charlson score [OR 1.33 (1.11-1.60); $P=0.002$], Pitt score [OR 1.52 (1.14-2.01); $P=0.003$], the non-urinary tract infection sources of BSI [OR 5.11 (1.86-13.99); $P=0.001$] as independent risk factors for mortality by BSI-EC. These data indicate that OmpA overexpression is a risk factor for the mortality in patients with BSI-EC.

Keywords. *Escherichia coli*, bacteremia, OmpA, mortality, and risk factor.

INTRODUCTION

Escherichia coli is a gram-negative bacilli with high clinical relevance. It is one of the most important pathogens in humans involved in different community and nosocomial infections, including bloodstream infections (BSI) [1], with incidence rates of 30-52 per 100,000 population [2-3].

The success of *E. coli* as a community and nosocomial pathogen is attributed to its resistance to several antibiotic families. Over the last decade, *E. coli* in Europe and in the rest of the world has become increasingly resistant to first and second-line antibiotics. In 2017, the resistance of *E. coli* to third generation cephalosporins, fluoroquinolones and aminoglycosides in Europe has reached rates of 14.9%, 25.7% and 11.4%, respectively [4], and showed a clear North to South gradient with the highest percentages of resistance reported from Southern Europe [4].

Whole-genome sequencing studies involving *E. coli* have demonstrated not only a vast array of antibiotic drug resistance determinants but also many pathogenicity islands [5]. Studies of specific virulence mechanisms in hypervirulent clones have demonstrated the contribution of outer membrane protein A (OmpA), as well as pili, fimbriae, other outer membrane proteins (OMPs) and various secretion systems in the pathogenesis of *E. coli* *in vitro* and in animal experimental models [5-10].

OmpA is a multifunctional major OMP in *E. coli* highly conserved among gram-negative bacteria, with estimates of approximately 100,000 copies per cell [11]. OmpA is an anti-parallel β -barrel non-covalently anchored to peptidoglycan with porin activity [12]. In *E. coli*, the role of OmpA is very diverse, and this protein has a variety of interesting biological properties, both *in vitro* and *in vivo*. It has been suggested to have involvement in the adherence to host cells [8,13-15], intracellular survival within macrophages and monocytes [16,17], biofilm formation [18,19], and serum resistance [6]. In addition,

CAPÍTULO II. Artículo 4

OmpA stimulates murine dendritic cells to secrete the proinflammatory cytokines IL-1 and IL-12 in a dose-dependent and TLR4-independent manner [20].

It is known that bacteremia by *E. coli* has been associated with crude mortality rates from 9% to 18.2% [2,3,21]. Extrinsic and host risk factors associated with bacteremia by *E. coli* and associated with mortality are well established, including increasing age, non-urinary focus (especially respiratory or primary), ciprofloxacin resistance and hospital-acquired bacteremia [3,21]. Nevertheless, the clinical impact of bacterial pathogenic features, such as the production of OmpA needs to be explored.

In the present study, we aimed to determine whether OmpA overexpression would be considered a risk factor for the increased mortality rate in a cohort of patients with BSI by *E. coli*.

MATERIALS AND METHODS

Clinical cohort

Study design, patients and ethics

A prospective observational cohort study from February 2016 to March 2017, was conducted at the University Hospital Virgen del Rocío (Seville, Spain). Two hundred forty-seven adult patients (≥ 18 years) with *E. coli* isolated from blood cultures independently of the infection sources, were selected for the study. Of these, 190 patients were finally included in the study, in which the OmpA expression can be determined (Figure 1). The onset of BSI was defined as the date of the blood cultures extraction. Only the first BSI episode was included in this study during the patient's admissions. The study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital Virgen del Rocío of Seville (approval no. 0023-N-16). Written informed consent was signed by all patients before inclusion in the study.

CAPÍTULO II. Artículo 4

Variables

The following variables were collected from the patients: age and sex; comorbidities and severity of chronic underlying diseases (Charlson [22] and McCabe scores [23]) presence of solid or hematological malignances, immunosuppression and neutropenia [<500 neutrophils/ μL]), acquisition type (defined as community-, health care- or hospital-acquired, source of BSI according with clinical and microbiological criteria, source control, sepsis or septic shock [24], Pitt score [25], presence of devices (urinary catheter, transitory or permanent central venous catheter (CVC), nasogastric tube, and mechanical ventilation), antibiotic exposure in the two months prior the BSI, appropriate empirical therapy for the current episode (at less an antimicrobial active against the isolate). The patients were followed up until hospital discharge, death or 30 days, whichever occurred first, and classified in two groups according to the mortality. All clinical decisions were made by the physicians in charge of the patients.

Microbiological studies

The antimicrobial activity of the following antibiotics: amoxicillin-clavulanic acid, piperacillin/tazobactam, cefuroxime, ceftazidime, cefotaxime, cefepime, ertapenem, imipenem, meropenem, ciprofloxacin, levofloxacin, gentamicin, tobramycin, amikacin, co-trimoxazole and tigecycline against *E. coli* isolates was determined by broth microdilution method using MicroScan Walk Away NM44 panels (Beckman Coulter, Inc., USA). Colistin activity was determined by standard broth microdilution as recommended by the European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [26] and PCR for *mcr-1* and *mcr-2* genes using specific primers (*mcr-1* Fw 5'-CGGTCAGTCCGTTTGTTTC-3', *mcr-1* Rv 5'-CTTGGTCGGTCTGTAGGG-3', *mcr-2* Fw 5'-ATGACATCACATCACTCTTGG-3', *mcr-2* Rv 5'-

CAPÍTULO II. Artículo 4

TTACTGGATAAATGCCGCGC-3' [27,28] were performed in those colistin resistant isolates. Interpretation criteria were performed following the EUCAST breakpoint tables [29]. ESBL production was confirmed using the broth microdilution synergy test according to the EUCAST standards [30]. MDR criteria was established as non-susceptible to ≥ 1 agent in ≥ 3 antimicrobial categories [31]. *E. coli* ATCC 25922 was used as control strain.

Molecular Studies

OmpA expression assay

OmpA expression was determined through the bacterial fluorescence emission due to the introduction of pUA66 plasmid harbouring a transcriptional fusion of the *green fluorescent protein* gene (GFP) and the promoter of *ompA* gene. This system allows to measure the transcriptional activity of this promoter by means of GFP expression [32]. Briefly, plasmid was extracted from a parental K12 *E. coli* strain harbouring the construction GFP and *ompA* promoter and then was introduced by electroporation in 190 previously competent *E. coli* clinical isolates susceptible to kanamycin. Transformants resistant to kanamycin (30 mg/L) were selected. Then, overnight cultures were diluted at 1:1000 and 100 μ L of each diluted culture were incubated at 37 °C in microplates to determine the bacterial growth at optical density (OD) 600 nm, and to measure the fluorescence of GFP from 0 to 8h using the CLARIOstar plus system (BMG LABTECH, Germany). *OmpA* expression (a.u.) was determined by fluorescence data normalization according to the OD_{600nm}. The net increase of the *OmpA* expression was determined as the difference between the maximum normalized *OmpA* expression and the normalized *OmpA* expression at 3h, which is the time where bacterial growth is detected by OD. As

CAPÍTULO II. Artículo 4

control *E. coli* ATCC 25922 carrying the pUAA66 plasmid with and without the transcriptional fusion were used.

Analysis of outer membrane proteins (OMPs)

Three representative *E. coli* clinical isolates with early *ompA* expression (4h) and three representative *E. coli* clinical isolates with late *ompA* expression (7h), according to the fluorescence assay, were used. Bacterial cells were grown in LB at 37 °C for 4h and 7h, and lysed by sonication. OMPs were extracted with sodium lauroyl sarcosinate (Sigma, Spain) and recovered by ultracentrifugation as described previously [33]. The OMPs profiles were determined by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using 10% SDS gels and 6 µg protein of OMPs, followed by a Coomassie Brilliant Blue R-250 stain (BioRad, Spain). *E. coli* ATCC25922/pUA66 and *E. coli* ATCC25922 were used as control.

Statistical Analysis

A descriptive analysis was performed for demographics and clinical variables, with median and range for the quantitative variables and frequency distribution for the qualitative variables. Fisher and χ^2 tests were used for categorical variables and continuous variables were analyzed using 2-sample *t* test or Mann Whitney *U* test. Logistic regression analysis was performed to identify independent risk factors for mortality. Variables known to be associated with mortality or with *P*-values ≤ 0.1 were included in the multivariate analysis. Differences were considered significant at *P*<0.05. All statistical analyses were performed using SPSS software, version 23.0 (SPSS).

RESULTS

CAPÍTULO II. Artículo 4

Demographic and clinical characteristics of patients with BSI by *E. coli*

A total of 190 patients with BSI by *E. coli* were included in the study. Demographics and clinical characteristics are summarized in table 1. Differences were found between dead and survivor patients. Dead patients presented more comorbidities, with higher Charlson score ($P<0.001$) and more frequently McCabe score ultimately or rapidly fatal ($P<0.001$). Gastrointestinal ($P=0.013$) and primary ($P=0.011$) focus of BSI were also associated with mortality of the patients, while the urinary tract focus ($P<0.001$) and the community acquisition of the BSI ($P=0.013$) were associated with the survival of the patients. Dead patients had more severe infections, which are reflected in the higher Pitt score ($P=0.001$) and septic shock frequency ($P<0.001$) and the presence of devices such as transitory central venous catheter (CVC) ($P=0.006$), permanent CVC ($P=0.022$) and nasogastric tube ($P<0.001$).

On the other hand, the population were homogeneous according to in demographics features (age and sex), immunological state (immunosuppression or neutropenia), source control, previous antibiotic exposure and appropriate empirical therapy.

Antimicrobial resistance in *E. coli* causing BSI

Differences between dead and survivor patients with BSI by *E. coli* in terms of antimicrobial resistance were presented in table 2. *E. coli* isolated from dead patients was more resistant to amoxicillin/clavulanic acid ($P=0.019$), gentamicin ($P=0.015$) and tobramycin ($P=0.049$) than those isolated from survivor patients. The rate of MDR isolates was higher in dead than in survivor patients (26.3% vs. 15.8%, respectively; $P=0.130$). Regarding the production of ESBL, no difference has been observed between both patient groups. The only colistin-resistant isolate was negative for the presence of *mcr-1* and *mcr-2* genes.

***OmpA* expression in *E. coli* causing BSI**

In order to determine whether the mortality of patients is related to the overexpression of *ompA*, we compared the expression of OmpA in *E. coli* isolated from dead and survivor patients with BSI. Fluorescence analysis showed that *E. coli* isolates from dead patients overexpress OmpA compared with those from survivor patients (36.8 ± 13 vs. 28.3 ± 14.5 a.u.; $P=0.001$) (Table 1 and figure 2). To corroborate these data, SDS-PAGE analysis showed that three randomly selected isolates from survivor and dead patients each, overexpressed OmpA, being late expressed in isolates from dead patients (Figure 3).

OmpA association with mortality of patients with BSI by *E. coli*

The logistic regression analysis selected the OmpA expression as independent risk factor associated with mortality (odds ratio [OR], 1.04 [95% confidence interval (CI), 1.00-1.07; $P=0.014$]). Moreover, Charlson score (OR, 1.33 [1.11-1.60; $P=0.002$]), Pitt score (OR, 1.52 [1.14-2.01; $P=0.003$]) and non-urinary source, including biliary, catheter, respiratory, gastrointestinal, primary and others, (OR, 5.11 [1.86-13.99; $P=0.001$]) were factors independently associated with death of the patients with BSI by *E. coli* (Table 3).

DISCUSSION

E. coli is an important cause of severe infections in most countries, such as BSI and intraabdominal infections, and many outbreaks have been described in the literature [1-3, 5]. OmpA is considered a possible important virulence factor in *E. coli*. However, the level of OmpA expression by *E. coli* in epidemiological studies is unknown.

Demographics and clinical features of the 190 patients with BSI by *E. coli* were different between dead and survivor patients in terms of comorbidities (Charlson and McCabe

CAPÍTULO II. Artículo 4

scores), acquisition type and origin of the BSI, severity (Septic shock and Pitt score) and presence of devices. Similar differences in demographical and clinical features between dead and survivor patients with BSI by *E. coli* have also been reported in two other studies [3,21].

Charlson and Pitt scores, BSI non-urinary focus and *ompA* expression were independently associated with mortality. Importantly, BSI non-urinary focus, especially gastrointestinal and primary focus, were associated with higher mortality. In the same way, the analyses of thirty day all-cause mortality in a cohort of 28,616 patients with BSI by *E. coli* in England showed that patients with community-acquired BSI had lower mortality than those with health care-associated or hospital-acquired; and the respiratory and non-urinary as BSI primary sources were factors associated with an increase in mortality [21]. Previous independent work has analysed 2,368 BSI by *E. coli* during 7-year study in Canada. The non-urinary focus and presence of comorbidities were associated with the mortality, as well as the increasing age, ciprofloxacin resistance and nosocomial acquisition, which are not selected as risk factors for mortality in our study [3]. Therefore, in our study, the suspicion of non-urinary focus could have an important consideration as prognostic factor in patients with BSI by *E. coli*.

In the current study, the expression of *OmpA* was higher in isolates from dead patients than in those from survivor patients, being independently associated with the mortality. Previous reports suggested that *OmpA* of *E. coli* plays an important role in the death of animals in experimental models of infection [6,7,34]. For example, mutations in loops 1 and 2 of *OmpA* in *E. coli* showed substantially better survival than wild-type strain in new born mice meningitis caused by *E. coli* [7]. We know that *OmpA* overexpression in other gram-negative bacilli, such as *Acinetobacter baumannii*, is an associated factor for the development of pneumonia and bacteremia, and mortality [35]. Interestingly, we

CAPÍTULO II. Artículo 4

showed previously that the inhibition of OmpA by a cyclic hexapeptide reduces bacterial dissemination between organs, development of pneumonia and bacteremia and death in murine peritoneal sepsis model by *E. coli* [36]. Nicholson *et al.* have demonstrated that during urinary tract infection in mice, OmpA expression in wild-type *E. coli* was increased 20-30-fold [9]; suggesting that OmpA is fundamental for pathogenesis and virulence of *E. coli* and may play an important role in the persistence and dissemination of *E. coli* between organs and bloodstream.

Expression of OmpA has been studied in bacteremic isolates of *E. coli*. Overexpression of OmpA was suggested to contribute to the adherence of enterohemorrhagic *E. coli* to HeLa cells [37]. OmpA was required by *E. coli* to induce a high level of bacteremia [38]. We know that other OMPs are associated with bacteremia. For example, OmpT, an outer membrane protease that might contribute to virulence of *E. coli* by inactivating host defence proteins and cleaving host cell-surface peptides [39], was identified as the strongest virulence factor predictor of bacteremia in military veteran patients [40].

Our study has some limitations. The first is that it was conducted in a single center. Nevertheless, we collected data of patients hospitalized in the all the adult wards and intensive care units, which provide a general analysis of *E. coli* BSI, similar to that occurring in other hospitals. Moreover, in this study we identified well-known clinical risk factors associated to mortality, similar to those in other studies, reinforcing the clinical translation of the OmpA overexpression in dead patients. Notwithstanding, a multicenter study with larger sample would be welcomed to confirm our hypothesis and to obtain a cut-off of OmpA expression that can be used to predict the clinical outcome in BSI by *E. coli*. Moreover, in the future, it is would be necessary to analyze OmpA expression directly in clinical samples, such as blood, to avoid any experimental artifact that may be produced during bacterial growth *in vitro*.

CAPÍTULO II. Artículo 4

In summary, given our confirmation of our working hypothesis, we suggest that monitoring of OmpA expression could help in assessing new treatment regimens for *E. coli* infection, countering a poor prognosis or evolution of infection. The clinical implications of our findings suggest that the OmpA inhibition by specific drugs could be a new treatment approach for infections caused by gram-negative bacilli, especially *E. coli*.

FUNDINGS

This work was supported by the Miguel Servet Tipo I Project grant, Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (CP15/00132), and by Plan Nacional de I+D+i 2013-2016 and Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (RD16/0016/0009), cofinanced by the European Development Regional Fund “A Way to Achieve Europe,” Operative Program Intelligent Growth 2014-2020. Y.S. is supported by the Subprograma Miguel Servet Tipo I, Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Spain [CP15/00132]. A.R.V. is supported by the Subprograma Río Hortega, Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Spain [CM18/00122]. R.A.M. is supported by the Subprograma Juan Rodés, Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Spain [JR17/00025].

CAPÍTULO II. Artículo 4

REFERENCES

1. Vila J, Sáez-López E, Johnson JR *et al.* *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. *FEMS Microbiol Rev* **2016**; 40:437-63.
2. Williamson DA, Lim A, Wiles S, Roberts SA, Freeman JT. Population-based incidence and comparative demographics of community-associated and healthcare-associated *Escherichia coli* bloodstream infection in Auckland, New Zealand, 2005 - 2011. *BMC Infect Dis* **2013**; 13:385.
3. Laupland KB, Gregson DB, Church DL, Ross T, Pitout JD. Incidence, risk factors and outcomes of *Escherichia coli* bloodstream infections in a large Canadian region. *Clin Microbiol Infect* **2008**; 14:1041-7.
4. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2017. Stockholm. ECDC **2018**.
5. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev* **2004**; 2:123-40.
6. Weiser JN, Gotschlich EC. Outer membrane protein A (OmpA) contributes to serum resistance and pathogenicity of *Escherichia coli* K-1. *Infect Immun* **1991**; 59:2252-8.
7. Mittal R, Krishnan S, González-Gómez I, Prasadarao NV. Deciphering the Roles of Outer Membrane Protein A Extracellular Loops in the Pathogenesis of *Escherichia coli* K1 Meningitis. *J Biol Chem* **2011**;286:2183-93.
8. Nicholson TF, Watts KM, Hunstad DA. OmpA of uropathogenic *Escherichia coli* promotes postinvasion pathogenesis of cystitis. *Infect Immun* **2009**; 77:5245-51.

CAPÍTULO II. Artículo 4

9. Prasadarao NV, Wass CA, Weiser JN, Stins MF, Huang SH, Kim KS. Outer membrane protein A of *Escherichia coli* contributes to invasion of brain microvascular endothelial cells. *Infect Immun* **1996**; 64:146-53.
10. Teng CH, Xie Y, Shin S *et al.* Effects of *ompA* deletion on expression of type 1 fimbriae in *Escherichia coli* K1 strain RS218 and on the association of *E. coli* with human brain microvascular endothelial cells. *Infect Immun* **2006**; 74:5609-16.
11. Koebnik R, Locher KP, Van Gelder P. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol* **2000**; 37:239-53.
12. Smith SG, Mahon V, Lambert MA, Fagan RP. A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. *FEMS Microbiol Lett* **2007**; 273:1-11.
13. Meier C, Oelschlaeger TA, Merkert H, Korhonen TK, Hacker J. Ability of *Escherichia coli* isolates that cause meningitis in newborns to invade epithelial and endothelial cells. *Infect Immun* **1996**; 64:2391-9.
14. Wu HH, Yang YY, Hsieh WS, Lee CH, Leu SJ, Chen MR. OmpA is the critical component for *Escherichia coli* invasion-induced astrocyte activation. *J Neuropathol Exp Neurol* **2009**; 68:677-90.
15. Krishnan S, Prasadarao NV. Outer membrane protein A and OprF: Versatile roles in Gram-negative bacterial infections. *FEBS J* **2012**; 279:919-31.
16. Sukumaran SK, Shimada H, Prasadarao NV. Entry and intracellular replication of *Escherichia coli* K1 in macrophages require expression of outer membrane protein A. *Infect Immun* **2003**; 71:5951-61.
17. Selvaraj SK, Prasadarao NV. *Escherichia coli* K1 inhibits proinflammatory cytokine induction in monocytes by preventing NF-kappaB activation. *J Leukoc Biol* **2005**; 78:544-54.

CAPÍTULO II. Artículo 4

18. Orme R, Douglas CW, Rimmer S, Webb M. Proteomic analysis of *Escherichia coli* biofilms reveals the overexpression of the outer membrane protein OmpA. *Proteomics* **2006**; 6:4269-77.
19. Barrios AF, Zuo R, Ren D, Wood TK. Hha, YbaJ and OmpA regulate *Escherichia coli* K12 biofilm formation and conjugation plasmids abolish motility. *Biotechnol Bioeng* **2006**; 93:188-200.
20. Torres AG, Li Y, Tutt CB, Xin L, Eaves-Pyles T, Soong L. Outer membrane protein A of *Escherichia coli* O157:H7 stimulates dendritic cell activation. *Infect Immun* **2006**; 74:2676-85.
21. Abernethy JK, Johnson AP, Guy R, Hinton N, Sheridan EA, Hope RJ. Thirty day all-cause mortality in patients with *Escherichia coli* bacteremia in England. *Clin Microbiol Infect* **2015**; 21:251.e1-8.
22. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: Development and validation. *J Chronic Dis* **1987**; 40:373-83.
23. McCabe WR, Jackson GG. Gram-negative bacteraemia. *Arch Intern Med* **1962**; 110:847-55.
24. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW *et al.* The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA* **2016**; 315:801-10.
25. Paterson DL, Ko WC, Gottberg AV *et al.* International prospective study of *klebsiella pneumoniae* bacteremia : implications of Extended-Spectrum β -Lactamase production in nosocomial infections. *Ann Intern Med* **2004**; 140:26-32.
26. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) As recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. EUCAST. **2016**.

CAPÍTULO II. Artículo 4

27. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, *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**; 16:161-8.
28. Liassine N, Assouvie L, Descombes MC *et al.* Very low prevalence of MCR-1/MCR-2 plasmid-mediated colistin resistance in urinary tract *Enterobacteriaceae* in Switzerland. *Int J Infect Dis* **2016**; 51:4-5.
29. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. EUCAST. **2019**.
30. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistance of clinical and/or epidemiological importance. EUCAST. **2012**.
31. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* **2012**; 18:268-81.
32. Zaslaver A, Bren A, Ronen M *et al.* A comprehensive library of fluorescent transcriptional reporters for *Escherichia coli*. *Nat Methods* **2006**; 3:623-8.
33. Smani Y, Dominguez-Herrera J, Pachón J. Association of the outer membrane protein Omp33 with fitness and virulence of *Acinetobacter baumannii*. *J Infect Dis* **2013**; 208:1561-70.
34. Prasadarao NV, Wass CA, Kim KS. Endothelial cell B1cNAc beta 1-4GlcNAc epitopes for outer membrane protein A enhance traversal of *Escherichia coli* across the blood-brain barrier. *Infect Immun* **1996**; 64:154-60.
35. Sánchez-Encinales V, Álvarez-Marín R, Pachón-Ibáñez ME *et al.* Overproduction of Outer Membrane Protein A by *Acinetobacter baumannii* as a Risk Factor for

CAPÍTULO II. Artículo 4

- Nosocomial Pneumonia, Bacteremia, and Mortality Rate Increase. *J Infect Dis* **2017**; 215:966-74.
36. Vila-Farrés X, Parra-Millán R, Sánchez-Encinales V *et al.* Combating virulence of Gram-negative bacilli by OmpA inhibition. **2017**; 7:14683.
37. Torres AG, Kaper JB. Multiple elements controlling adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HeLa cells. *Infect Immun* **2003**; 71:4985-95.
38. Tseng YT, Wang SW, Kim KS, *et al.* NipI facilitates deposition of C4bp on *Escherichia coli* by blocking classical complement-mediated killing, which results in high-level bacteremia. *Infect Immun* **2012**; 80:3669-78.
39. Lundrigan MD, Webb RM. Prevalence of ompT among *Escherichia coli* of human origin. *FEMS Microbiol Lett* **1992**; 76:51-6.
40. Sannes MR, Kuskowski MA, Owens K, Gajewski A, Johnson JR. Virulence factor profiles and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from veterans with bacteremia and uninfected control subjects. *J Infect Dis* **2004**; 190:2121-8.

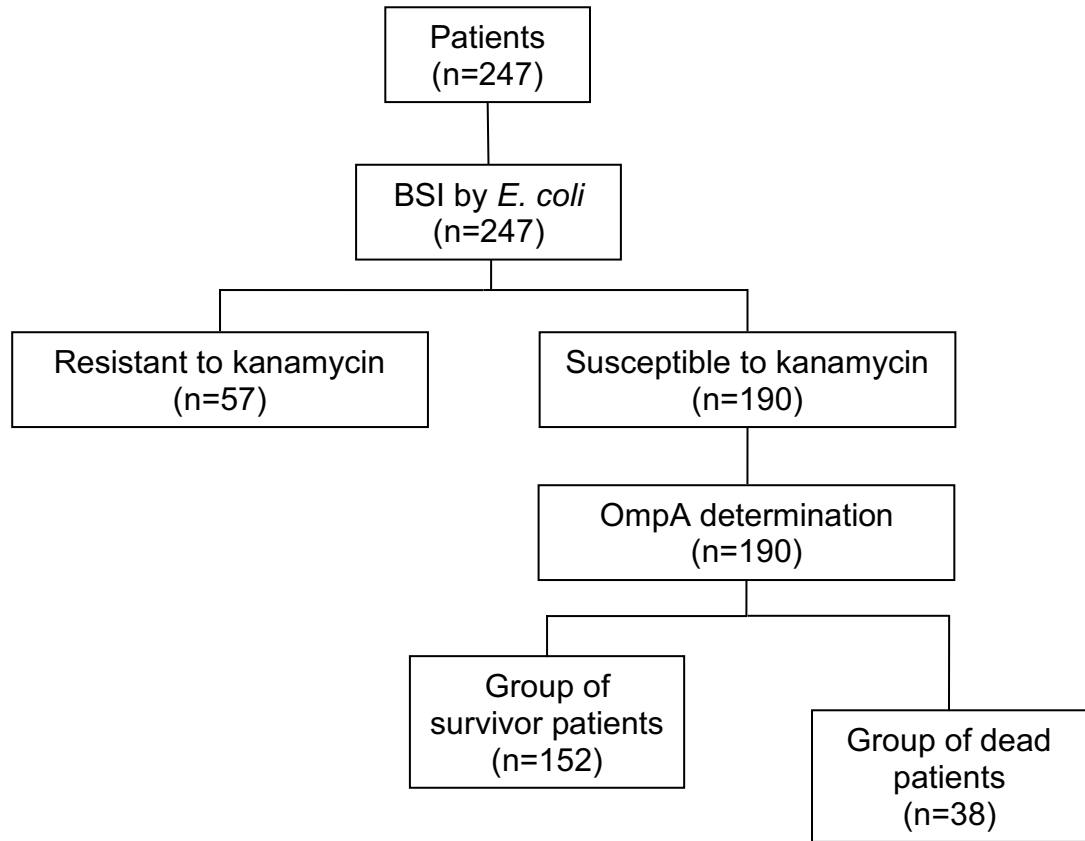


Figure 1. Selection procedure of patients with bloodstream infections by *Escherichia coli*. BSI: bloodstream infections.

CAPÍTULO II. Artículo 4

Table 1. Demographics and clinical features of patients with bloodstream infection by *Escherichia coli*.

Variables	Dead patients (n=38)	Survivor patients (n=152)	P-value
Age, median (range), y	69 (59.75-76.25)	67 (54-76)	0.223
Sex (male), No. (%)	17 (44.7)	67 (44.1)	0.942
Charlson score, median (range)	5 (2.75-6)	2 (1-4)	<0.001
Comorbid condition, No. (%)			
McCabe score, ultimately or rapidly fatal	30 (78.9)	47 (30.9)	<0.001
Immunosuppression	13 (34.2)	41 (26.9)	0.376
Neutropenia	5 (13.1)	9 (5.9)	0.127
Acquisition type			
Community-acquired	10 (26.3)	74 (48.6)	0.013
Health care-associated	16 (42.1)	43 (28.3)	0.100
Hospital-acquired	12 (31.6)	35 (23.0)	0.274
Primary site of BSI, No. (%)			
Urinary tract	8 (21.0)	87 (57.2)	<0.001
Biliary tract	7 (18.4)	22 (14.5)	0.545
Catheter	2 (5.2)	3 (1.9)	0.257
Respiratory tract	2 (5.2)	5 (3.3)	0.563
Gastrointestinal	7 (18.4)	9 (5.9)	0.013
Primary	10 (26.3)	16 (10.5)	0.011
Other	2 (5.2)	10 (6.5)	0.766
Source control, No. (%)	9 (23.7)	36 (23.7)	1.000
Sepsis, No. (%)	6 (15.8)	26 (17.1)	0.846
Septic shock, No. (%)	18 (47.3)	21 (13.8)	<0.001
Pitt score, median (range)	2 (0-3.5)	1 (0-2)	0.001
Presence of devices, No. (%)	29 (76.3)	92 (60.5)	0.070
Urinary catheter	20 (52.6)	66 (43.4)	0.308
Transitory CVC	11 (28.9)	17 (11.2)	0.006
Permanent CVC	7 (18.4)	10 (6.5)	0.022
Nasogastric tube	7 (18.4)	4 (2.6)	<0.001
Mechanical ventilation	5 (13.1)	8 (5.2)	0.085
Previous antibiotic exposure, No. (%)	15 (39.5)	64 (42.1)	0.768
Appropriate empirical therapy, No. (%)	35 (92.1)	138 (90.7)	0.806
<i>ompA</i> expression (x10 ⁴), a.u.	36.8 ± 13.2	28.3 ± 14.5	0.001

BSI: bloodstream infection; CVC: central venous catheter; a.u., arbitrary units

CAPÍTULO II. Artículo 4

Table 2. Resistance to antibiotics among *Escherichia coli* from dead and survivor patients with BSI.

Variable	Dead patients (n=38)	Survivor patients (n=152)	P-value
Antimicrobial agent, No. (%)			
Amoxicillin/clavulanic acid	12 (31.6%)	23 (15.1%)	0.019
Piperacillin/tazobactam	2 (5.2%)	3 (1.9%)	0.262
Cefuroxime	5 (13.1%)	17 (11.2%)	0.777
Cefotaxime	4 (10.5%)	14 (9.2%)	0.762
Ceftazidime	4 (10.5%)	13 (8.5%)	0.751
Cefepime	3 (7.9%)	12 (7.9%)	1.000
Ertapenem	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1.000
Imipenem	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1.000
Meropenem	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1.000
Ciprofloxacin	14 (36.8%)	37 (24.3%)	0.125
Levofloxacin	14 (36.8%)	37 (24.3%)	0.125
Gentamicin	5 (13.1%)	4 (2.6%)	0.015
Tobramycin	4 (10.5%)	4 (2.6%)	0.049
Amikacin	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1.000
Cotrimoxazole	15 (39.4%)	51 (33.5%)	0.493
Tigecycline	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1.000
Colistin	0 (0.0%)	1 (0.6%)	1.000
ESBL, No. (%)	3 (7.9%)	12 (7.9%)	1.000
MDR, No. (%)	10 (26.3%)	24 (15.8%)	0.130

ESBL: extended spectrum beta-lactamase; MDR: multidrug resistant.

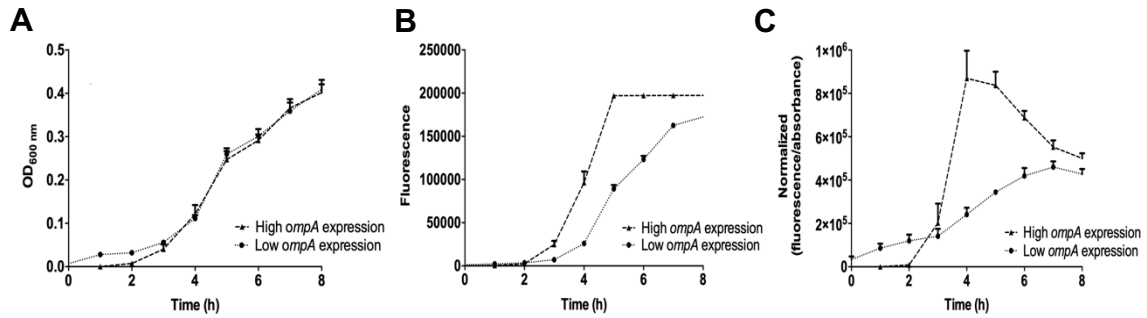


Figure 2. Determination of OmpA expression through the bacterial fluorescence emission assay in two representative isolates of *E. coli* with different *ompA* expression levels. (A) Absorbance of bacterial growth during 8h. (B) GFP fluorescence during 8h. (C) Normalized data (fluorescence/absorbance). OD: Optical density; OmpA: outer membrane protein A.

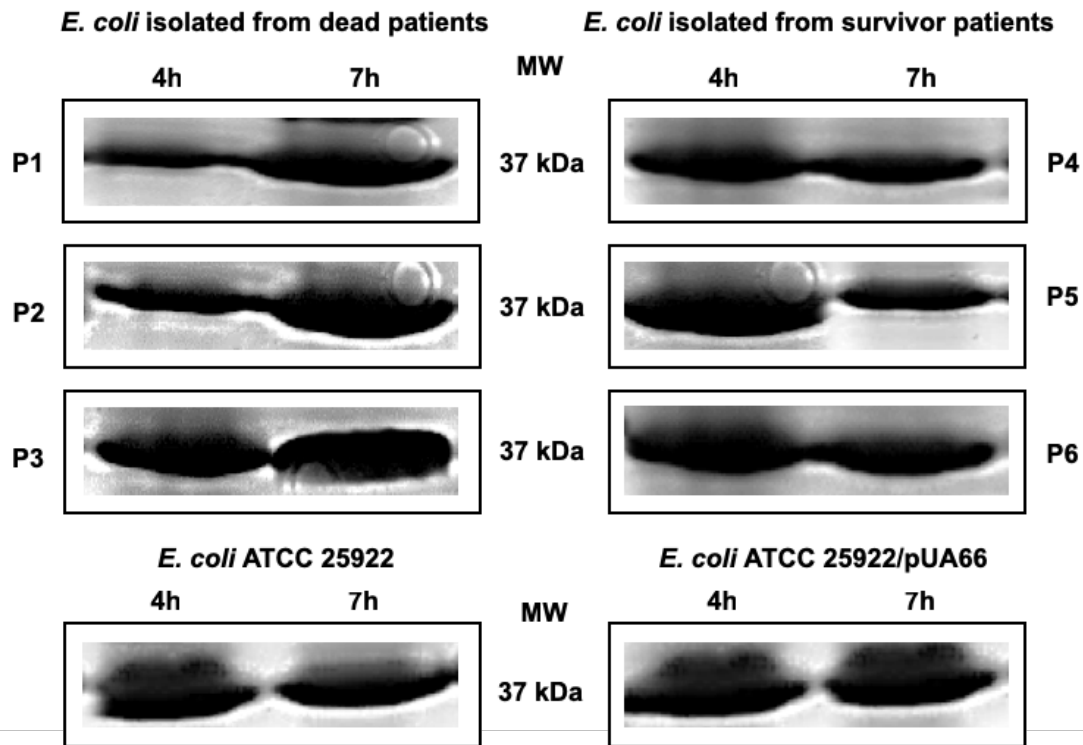


Figure 3. OmpA profile obtained by SDS-PAGE at 4h and 7h in six representative *E. coli* isolates from dead and survivor patients. ATCC 25922 and ATCC 25922/pUA66 were used as negative control strains. P: patient.

CAPÍTULO II. Artículo 4

Table 3. Multivariate analysis of factors related to mortality in bloodstream infection by *E. coli*.

Factor	Dead patients (n=38)	Survivor Patients (n=152)	P-value	OR (95% CI)
<i>ompA</i> expression ($\times 10^4$), a.u.	36.8 \pm 13.2	28.3 \pm 14.5	0.014	1.04 (1.00–1.07)
Charlson score, median (range)	5 (2.75-6)	2 (1-4)	0.002	1.33 (1.11–1.60)
Community-acquired BSI, No (%)	10 (26.3)	74 (48.6)	0.681	0.81 (0.30–2.19)
Non-urinary source, No (%)	30 (78.9)	65 (42.7)	0.001	5.11 (1.86–13.99)
Pitt score, median (range)	2 (0-3.5)	1 (0-2)	0.003	1.52 (1.14–2.01)
Presence of devices, No. (%)	29 (76.3)	92 (60.5)	0.787	1.15 (0.40–3.26)
AMC resistance, No. (%)	12 (31.6%)	23 (15.1%)	0.211	2.02 (0.67–6.12)
GEN resistance, No. (%)	5 (13.1%)	4 (2.6%)	0.190	8.17 (0.35–188.95)
TOB resistance, No. (%)	4 (10.5%)	4 (2.6%)	0.480	0.28 (0.01–9.38)

OR, odds ratio; CI, confidence interval; BSI, bloodstream infection; AMC: amoxicillin/clavulanic acid; GEN: gentamicin; TOB: tobramycin.

CAPÍTULO II. Datos adicionales

Datos adicionales no publicados

Objetivo 2. Estudiar el impacto de la sobreexpresión de OmpA en la patogenicidad de *E. coli* en un modelo experimental murino de sepsis peritoneal.

Estudio del papel de OmpA en el desarrollo de bacteriemia en modelos experimentales murinos

1. Fundamento

Los resultados obtenidos en el artículo 4, capítulo II, de esta Tesis Doctoral demostraron como la sobreexpresión de OmpA es un factor de riesgo para la mortalidad de los pacientes con bacteriemia por *E. coli*, lo que nos permitió plantear la hipótesis de si la diferente expresión de OmpA se traduciría en diferencias en cuanto a la virulencia de *E. coli* en un modelo experimental murino.

2. Metodología

2.1 Aislados clínicos bacterianos

Para el estudio realizado en el modelo experimental murino se utilizaron dos parejas de aislados clínicos de *E. coli* procedentes de dos pacientes con bacteriemia secundaria a una infección intraabdominal. Estos aislados presentaban diferente expresión de OmpA a las 4 h de crecimiento, punto en el que el crecimiento bacteriano es óptimo, lo que permite ver diferencias en la expresión de OmpA con mayor claridad. En la primera pareja, pertenecientes ambos al ST2230, el aislado de *E. coli* obtenido a partir de la muestra de sangre (C1-1) tenía mayor expresión de OmpA a las 4 h que el procedente de la muestra de abdomen (C2-1) ($80,7 \times 10^4$ vs. $51,9 \times 10^4$ u.a. respectivamente). La segunda pareja de aislados, pertenecientes al ST12, se seleccionó de forma contraria, el aislado obtenido a partir de la muestra de sangre (C1-83) tenía menos expresión de OmpA que el aislado en la muestra de abdomen (C2-12) a las 4 h ($32,5 \times 10^4$ vs. $55,9 \times 10^4$ u.a., respectivamente).

CAPÍTULO II. Datos adicionales

2.2 Modelo experimental murino

Se utilizó un modelo experimental murino de sepsis peritoneal mediante el uso de ratones hembra inmunocompetentes (C57BL/6). Primeramente, se inocularon grupos de 6 ratones intraperitonealmente con dosis decrecientes en Log_{10} de cada aislado de *E. coli* utilizado (comenzando en todos los casos con 9 Log_{10} UFC/mL, lo cual es potencialmente letal) y observándolos durante los siguientes 7 días. Se calcularon los siguientes parámetros: mortalidad (%), dosis mínima letal (DML, inóculo que produce el 100% de mortalidad), dosis letal 50 (DL_{50} , inóculo que produce el 50% de mortalidad) y DL_0 (inóculo que produce el 0% de mortalidad). Posteriormente, se inocularon ratones intraperitonealmente con la DML de las cepas de *E. coli* utilizadas en el estudio y, tras 6 h, se sacrificaron con una sobredosis de tiopental. Los ratones se abrieron asépticamente, y los órganos se procesaron mediante homogeneizado y cultivo bacteriano cuantitativo según el protocolo previamente publicado por nuestro grupo de investigación (220). Finalmente se determinó la concentración bacteriana en sangre, líquido peritoneal, bazo, hígado, pulmón y riñón.

2.3 Análisis estadístico

Los datos de las concentraciones bacterianas en el análisis del modelo experimental murino se representaron como media \pm desviaciones estándar de la media. La DL_{50} se determinó utilizando el método Probit. Las diferencias observadas en las concentraciones bacterianas de los distintos órganos se analizaron mediante el test U de Mann Whitney. Las diferencias se consideraron significativas con un valor $P < 0,05$. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS (IBM Corporation, Somers, New York, USA), versión 23.0.

3. Resultados

En primer lugar, las dosis letales calculadas para los diferentes aislados de *E. coli* utilizados en el modelo experimental murino fueron las siguientes. Para el aislado C1-1, las DML, DL_{50} y DL_0 fueron 7,63, 6,53 y 5,81 Log_{10} UFC/mL, respectivamente. Para el aislado C2-1, las DML, DL_{50} y DL_0 fueron 6,78, 6,15 y 4,38 Log_{10} UFC/mL, respectivamente. En el caso del aislado C1-83, las DML, DL_{50} y DL_0 fueron 8,17, 7,85 y

CAPÍTULO II. Datos adicionales

7,54 Log₁₀ UFC/mL, respectivamente. Por último, para el aislado C2-12, las DML, DL₅₀ y DL₀ fueron 7,95, 7,64 y 7,35 Log₁₀ UFC/mL, respectivamente.

En cuanto a la concentración bacteriana obtenida en los diferentes tejidos y fluidos, si observamos la primera pareja de aislados (C1-1 y C2-1), en los que había mayor expresión de OmpA en el aislado procedente de sangre (C1-1) que en aquel procedente de abdomen (C2-1), se encontraron diferencias en la concentración bacteriana alcanzadas tanto en sangre ($P=0,015$) como en hígado ($P=0,009$) (Tabla 1). En el resto de órganos no se observaron recuentos significativamente diferentes entre ambos aislados. Por otro lado, la concentración bacteriana obtenida en la pareja de aislados C1-83 y C2-12 también es superior en sangre en el aislado con mayor expresión de OmpA (C2-12), aunque las diferencias observadas no llegan a ser estadísticamente significativas (Tabla 1).

Tabla 1. Concentración bacteriana en los diferentes tejidos y fluidos.

Aislado	N	Inóculo (Log UFC/mL)	Concentración bacteriana (Log UFC/g)				Concentración bacteriana (Log UFC/mL)	
			Bazo	Pulmón	Hígado	Riñón	Sangre	Líquido peritoneal
C1-1	6	7,41	7,47 ± 0,32	6,41 ± 0,25	6,88 ± 0,26	6,49 ± 0,22	7,15 ± 0,30	5,95 ± 0,36
C2-1	6	7,70	7,11 ± 0,15	6,04 ± 0,09	6,27 ± 0,14	6,11 ± 0,12	6,59 ± 0,07	5,71 ± 0,30
Valor <i>P</i>			0,132	0,065	0,009	0,065	0,015	0,240
C1-83	5	8,0	7,98 ± 0,24	6,61 ± 0,22	7,93 ± 0,13	7,33 ± 0,23	6,21 ± 0,38	7,67 ± 0,16
C2-12	5	8,3	8,28 ± 0,16	6,38 ± 0,46	8,03 ± 0,25	7,50 ± 0,35	6,80 ± 0,16	7,84 ± 0,16
Valor <i>P</i>			0,151	0,690	0,690	0,421	0,056	0,222

UFC, unidad formadora de colonias.

CAPÍTULO II. Datos adicionales

Objetivo 3. Comparar la expresión de OmpA en los pacientes con infección intraabdominal no bacteriémica y bacteriemia por *E. coli*.

Estudio del papel de OmpA en el desarrollo de bacteriemia en pacientes con infección intraabdominal por *E. coli*.

1. Fundamento

Los resultados obtenidos en el objetivo 2 nos permitieron plantear otra hipótesis sobre si la sobreexpresión de OmpA sería un factor de riesgo para el desarrollo de bacteriemia en pacientes con infección intraabdominal por *E. coli*.

2. Metodología

2.1 Aislados clínicos bacterianos

Se utilizaron 130 aislados clínicos de *E. coli* procedentes de pacientes cuyas características clínicas se han descrito previamente en el artículo 2, capítulo I, de esta Tesis Doctoral. Estos aislados se clasificaron en dos grupos de acuerdo al desarrollo o no de bacteriemia a partir de foco intraabdominal.

2.2 Determinación de la expresión OmpA

La expresión de OmpA se determinó mediante la emisión de fluorescencia debido a la introducción de un plásmido pUAA66 que portaba una fusión transcripcional entre el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) y el promotor del gen *ompA*. Para ello, la metodología seguida ha sido similar a la descrita previamente en el artículo 4, capítulo II, de esta Tesis Doctoral.

2.3 Análisis estadístico

Las diferencias en la expresión de OmpA entre los aislados de grupos de pacientes con infección intraabdominal bacteriémica o no bacteriémica se analizaron mediante el test U de Mann Whitney. Las diferencias se consideraron significativas con un valor $P < 0,05$. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS (IBM Corporation, Somers, New York, USA), versión 23.0.

CAPÍTULO II. Datos adicionales

3. Resultados

El análisis de la cohorte de pacientes con infección intraabdominal incluyó 16 aislados clínicos de *E. coli* dentro del grupo de pacientes con infección intraabdominal y bacteriemia y 114 aislados dentro de los pacientes con infección intraabdominal sin bacteriemia. El análisis de la expresión de OmpA no mostró diferencias significativas en ambos grupos ($40,7 \times 10^4 \pm 15,8$ vs. $41,0 \times 10^4 \pm 14,3$ u.a.; $P=0,832$) (Tabla 2).

Tabla 2. Expresión de OmpA en los pacientes con infección intraabdominal bacteriémica y no bacteriémica.

Variable	Pacientes con bacteriemia (n=16)	Pacientes sin bacteriemia (n=114)	Valor P
Expresión de OmpA ($\times 10^4$), u.a.	$40,7 \pm 15,8$	$41,0 \pm 14,3$	0,832

CAPÍTULO III

**Resistencia de espectro extendido a los betalactámicos
en combinación con inhibidores de betalactamasas
(ESRI) y desarrollo de un método de detección rápida
de resistencia**

Capítulo III. Artículo 5

Objetivo 1. Estudiar el perfil de resistencia a BL/IBL de los aislados clínicos de *E. coli* procedentes de bacteriemia e infección intraabdominal.

Objetivo 2. Analizar la actividad de piperacilina/tazobactam sobre aislados clínicos de *E. coli* con bajo nivel de resistencia a BL/IB, tras su exposición a concentraciones crecientes de piperacilina/tazobactam.

Objetivo 3. Demostrar la adquisición de ESRI, incluida a piperacilina/tazobactam, en dichos aislados y su estabilidad.

Objetivo 4. Analizar la relación entre el tratamiento con piperacilina/tazobactam y la recurrencia por adquisición de resistencia a piperacilina/tazobactam en *E. coli* en pacientes.

Objetivo 5. Estudiar el mecanismo subyacente a la ESRI y si la resistencia adquirida a piperacilina/tazobactam afecta a la actividad de las cefalosporinas.

Artículo 5. Extended-spectrum resistance to β -lactams/ β -lactamase inhibitors (ESRI) evolved from low-level resistant *Escherichia coli*.

Los betalactámicos en combinación con inhibidores de betalactamasas (BL/IBL) como ampicilina/sulbactam, amoxicilina/ácido clavulánico y piperacilina/tazobactam se diseñaron para combatir la producción de betalactamasas por parte de las bacterias. *E. coli* se destaca por un patrón de resistencia a los BL/IBL caracterizado por tres fenotipos: 1) resistencia a ampicilina/sulbactam y sensibilidad a amoxicilina/ácido clavulánico y piperacilina/tazobactam (RSS); ii) resistencia a ampicilina/sulbactam y amoxicilina/ácido clavulánico, y sensibilidad a piperacilina/tazobactam (RRS); y iii) resistencia a ampicilina/sulbactam, amoxicilina/ácido clavulánico y piperacilina tazobactam (RRR). Estos perfiles de resistencia a los BL/IBL se adquieren consecutivamente, lo que indica la existencia de un riesgo potencial de desarrollo de resistencia a piperacilina/tazobactam en aquellos aislados sensibles, pero con bajo nivel de resistencia a los BL/IBL (RSS o RRS). Sin embargo, el mecanismo por el que se produce este proceso no está claro.

En este artículo se utilizaron 23 aislados clínicos de *E. coli* procedentes de pacientes con bacteriemia e infección intraabdominal. Se determinó la CMI a piperacilina/tazobactam y se expusieron a presión antibiótica con concentraciones crecientes de piperacilina/tazobactam, desde una sub-CMI (0,5xCMI) hasta 256 mg/L (o la concentración a la que se produjera la muerte bacteriana). Posteriormente se determinó nuevamente la CMI a piperacilina/tazobactam y se determinó la estabilidad de la

Capítulo III. Artículo 5

adquisición de la resistencia mediante pases diarios en un medio sin antibiótico durante 15 días. Se analizaron, además, 2 aislados de *E. coli* procedentes de hemocultivos de un paciente con absceso perianal y bacteriemia persistente, tratado con piperacilina/tazobactam durante 8 días. En todos los aislados se determinó la presencia del gen *bla*_{TEM} y la actividad betalactamasa en las diferentes condiciones. Para descifrar el mecanismo de adquisición de resistencia a piperacilina/tazobactam, se realizó una secuenciación genómica de 2 aislados de *E. coli* representativos (portadores de los genes *bla*_{TEM-1} y *bla*_{TEM-30}) antes y después de la presión con piperacilina/tazobactam.

En cuanto a los resultados, 17 de los 23 aislados (74%) crecieron a concentraciones de piperacilina/tazobactam varias veces superior a su CMI. Esta exposición previa conllevó un aumento en la CMI a piperacilina/tazobactam ≥ 8 veces, en comparación con el aislado original, lo que demuestra que existe una adquisición de resistencia a piperacilina/tazobactam a expensas de una mayor expresión del gen *bla*_{TEM} y, por consiguiente, una mayor actividad betalactamasa. En estos 17 aislados se detectó la presencia del gen *bla*_{TEM}, mientras que en los 6 aislados restantes (*bla*_{TEM} negativos) no consiguieron crecer tras la presión antibiótica con piperacilina/tazobactam. Este aumento en la CMI no se redujo tras 15 días sin exposición a piperacilina/tazobactam. En los aislados de *E. coli* obtenidos del caso clínico descrito, la CMI de piperacilina/tazobactam fue de 8 mg/L para el aislado bacteriémico obtenido al inicio del cuadro clínico, y de 256 mg/L para el aislado recuperado tras 8 días de tratamiento con piperacilina/tazobactam. En el aislado resistente también se produjo una mayor expresión del gen *bla*_{TEM-1} a expensas de una mayor actividad betalactamasa. Por su parte la secuenciación genómica mostró que tras la exposición a piperacilina/tazobactam se producen varias duplicaciones en el gen *bla*_{TEM} en las dos cepas representativas (8 y 60 copias en *bla*_{TEM-30} y *bla*_{TEM-1}, respectivamente).

Por tanto, en este estudio se demuestra la exposición a piperacilina/tazobactam induce la resistencia de espectro extendido a BL/IBL (ESRI) en aislados de *E. coli* portadoras del gen *bla*_{TEM} tanto *in vitro* como *in vivo*. Esta ESRI se produce por un aumento en el número de copias del gen *bla*_{TEM}, lo que conlleva un aumento en la actividad betalactamasa y el consiguiente aumento de la CMI de piperacilina/tazobactam.

Referencia

Rodríguez-Villodres A, Gil-Marqués ML, Álvarez-Marín R, Bonnin R.A., Pachón-Ibáñez ME, Aguilar-Guisado MA, Naas T, Aznar J, Pachón J, Lepe JA, Smani Y. Extended-spectrum resistance to β -lactams/ β -lactamase inhibitors (ESRI) evolved from low-level resistant *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2019. pi:dkz393. doi: 10.1093/jac/dkz393. [Epub ahead of print].

CAPÍTULO III. Artículo 6

Objetivo 6. Estudiar la presencia de heterorresistencia a piperacilina/tazobactam en *E. coli*.

Artículo 6. Heteroresistance to piperacillin-tazobactam in clinical isolates of *Escherichia coli* sequence type 131.

La heterorresistencia a los antibióticos ha adquirido importancia en los últimos años debido a su posible relevancia clínica. Aunque se ha detectado casos de heterorresistencia en antibióticos como colistina o meropenem, en el caso de piperacilina/tazobactam solo se ha reportado heterorresistencia en *P. aeruginosa*. En este trabajo se describe y caracteriza por primera vez la heterorresistencia a piperacilina/tazobactam en *E. coli*. Para ello se utilizaron dos aislados clínicos de *E. coli* (C2-23 y C1-140) obtenidos a partir de muestra de bilis y sangre de un mismo paciente, respectivamente. Se determinó la CMI por microdilución, tanto por el método estándar como a través del sistema semiautomático MicroScan, y por tiras de gradiente de difusión de antibiótico. La relación clonal de los aislados se estudió mediante MLST y la detección del gen de resistencia *bla*_{TEM} mediante PCR. Para evaluar el comportamiento de los aislados frente a diferentes concentraciones de piperacilina/tazobactam se realizó un análisis del perfil poblacional (PAP) con inóculos de 0,5 y 2 en la escala de McFarland. Este PAP se realizó con el objetivo de poder calcular un valor más preciso de la CMI, el valor de la concentración no inhibitoria (CNI), y así calcular el cociente entre ambas (CMI/CNI), el cual nos permitió medir el nivel de heterorresistencia de la población. En cuanto a los resultados, la CMI de piperacilina/tazobactam determinada por el método estándar en el aislados C2-23 fue de 64 mg/L y la del aislado C1-140 fue de 32 mg/L, mientras que por MicroScan fue de 64 mg/L y 8 mg/L, respectivamente. El MLST demostró que ambos aislados pertenecían al clon ST131, y que ambos portaban el gen *bla*_{TEM}. El PAP mostró una respuesta heterogénea cuando ambos aislados de *E. coli* crecieron a diferentes concentraciones de piperacilina/tazobactam, con un cociente CMI/CNI ≥ 8 , lo que permitió clasificar a los aislados como heterorresistentes a piperacilina/tazobactam. Como conclusión, en este estudio se describe por primera vez la hererorresistencia a piperacilina/tazobactam en *E. coli*.

Referencia

Rodríguez-Villodres A, Ortiz de la Rosa JM, Álvarez-Marín R, Pachón J, Aznar J, Lepe JA, Smani Y. Heteroresistance to Piperacillin-Tazobactam in Clinical Isolates of *Escherichia coli* Sequence Type 131. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2018; 62: 1-3.

CAPÍTULO III. Artículo 7

Objetivo 7. Desarrollar un sistema de detección rápida de resistencia a BL/IBL.

Artículo 7: Rapid detection of piperacillin/tazobactam resistance and extended spectrum resistance to β -lactams/ β -lactamase inhibitors (ESRI) in clinical isolates of *Escherichia coli*

Los BL/IBL, en especial piperacilina/tazobactam, son un grupo de antibióticos usados ampliamente en el tratamiento empírico de las infecciones graves. Sin embargo, su uso excesivo ha contribuido a la aparición de aislados de *E. coli* resistentes. Esto, junto con la demostración previa a lo largo de esta Tesis Doctoral, de que piperacilina/tazobactam contribuye al desarrollo de la ESRI en aislados de *E. coli* sensibles a piperacilina/tazobactam pero con bajo nivel de resistencia a los BL/IBL (RSS o RRS) plantea la necesidad de disponer de sistemas de detección rápida de esta resistencia. Para ello, en este trabajo se ha desarrollado un método colorimétrico basado en la hidrólisis del anillo betalactámico por parte de las betalactamasas (test ESRI). Se usaron 114 aislados clínicos de *E. coli* obtenidos a partir de hemocultivos y muestras intraabdominales, y caracterizados según su perfil de sensibilidad a los BL/IBL. En todos ellos se estudió la presencia de las tres betalactamasas más frecuentes implicadas en la resistencia a los BL/IBL (*bla*_{TEM}, *bla*_{OXA-1} and *bla*_{SHV}) mediante PCR. Los resultados mostraron que el test ESRI fue capaz de detectar, mediante diferentes tiempos de positividad, todos los aislados resistentes a piperacilina/tazobactam y todos aquellos aislados sensibles a piperacilina/tazobactam pero con capacidad de desarrollar una ESRI, mientras que todos los aislados sensibles a los BL/IBL y/o que no fueron capaces de desarrollar una ESRI fueron negativos para el test. En cuanto a las betalactamasas, *bla*_{TEM} fue la que se detectó con más frecuencia seguida de *bla*_{SHV} y *bla*_{OXA-1}.

Estos resultados demuestran la eficacia del test ESRI, cuyo potencial clínico parece prometedor, el cual podría llevar a reducir el uso inapropiado de tratamientos antibióticos, mejorando así el manejo clínico del paciente.

El manuscrito resultante de este trabajo se enviará a la revista *Journal of Clinical Microbiology*.

CAPÍTULO III. Artículo 7

Title: Rapid detection of piperacillin/tazobactam resistance and extended spectrum resistance to β -lactams/ β -lactamase inhibitors (ESRI) in clinical isolates of *Escherichia coli*

Abstract

Piperacillin/tazobactam is a β -lactam/ β -lactamase inhibitor (BL/BLI) recommended for the empirical treatment of severe infections. The excessive and indiscriminate use of piperacillin/tazobactam has promoted the emergence of piperacillin/tazobactam resistant *Escherichia coli* isolates. Recently, we demonstrated that piperacillin/tazobactam may contribute to the development of extended spectrum resistance to BL/BLI (ESRI) in piperacillin/tazobactam susceptible *E. coli* isolates but with low-level resistance to BL/BLI (resistance to amoxicillin/clavulanic acid and/or ampicillin/sulbactam). This raises the need for development of rapid detection systems. Therefore, the objective of this study is to design and validate a method able to detect resistance to piperacillin/tazobactam and ESRI in *E. coli*.

A colorimetric assay based on the β -lactam ring hidrolisis by β -lactamases was designed (ESRI test). A total of 114 *E. coli* isolates from bloodstream and intra-abdominal sources, characterized according to their susceptibility profiles to BL/BLI, were used. Detection of the three more frequent β -lactamases involved in BL/BLI resistance (*bla*_{TEM}, *bla*_{OXA-1} and *bla*_{SHV}) was performed by PCR.

The ESRI test was able to detect all the piperacillin/tazobactam intermediate/resistant isolates, and all the piperacillin/tazobactam susceptible isolates but with capability for ESRI development. Their mediane time-to-result was 5 and 30 min, respectively. All the isolates without resistance to BL/BLI were negative for the ESRI test. *bla*_{TEM} was the most frequent β -lactamase gene detected, follow by *bla*_{SHV} and *bla*_{OXA-1}.

CAPÍTULO III. Artículo 7

These results demonstrate the efficacy of the ESRI test, showing a great clinical potential which would lead to a reduction of health costs, ineffective treatments and inappropriate use of BL/BLI.

Keywords: β -lactams with β -lactamase inhibitors, *Escherichia coli*, piperacillin/tazobactam, resistance detection, ESRI method.

INTRODUCTION

Excessive and indiscriminate use of antibiotics has accelerated the emergence and spread of antimicrobial resistance, and increased the inefficacy of available antimicrobial treatments. Within the wide range of bacterial species able to produce infection in humans, the order *Enterobacterales* holds a prominent place; being *Escherichia coli* the species with higher clinical relevance (1). Among the set of antimicrobials used for the treatment of infections by *E. coli*, we found the group of β -lactams combined with β -lactamase inhibitors (BL/BLI), such as ampicillin/sulbactam, amoxicillin/clavulanic acid and piperacillin/tazobactam. This last is efficacious against *E. coli* and other Gram-negative bacteria producing β -lactamases (mainly TEM enzymes) (2). Piperacillin/tazobactam is used specially in severe infections and healthcare-associated infections (3,4). However, the abusive use of this antibiotic is led to the appearance of resistant strains (5,6).

In Spain, data extracted from the SMART (Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends) between 2002-2010 and 2016-2017 revealed an increase in the rate of piperacillin/tazobactam resistance in intra-abdominal *E. coli* isolates, from 7.7% to 10.0% (7,8). Similarly, in England, the same increase, from 8.5% to 11.7%, was observed between 2011-2015 in bacteremic *E. coli* isolates (9).

Presence of TEM, inhibitor-resistant TEM (IRT), OXA-1, SHV and AmpC β -lactamases are common causes of the *E. coli* resistance to BL/BLI (10-14). Of these, TEM-1 hyperproduction and IRT are the most frequent mechanisms involved in the resistance to BL/BLI, especially to ampicillin/sulbactam and amoxicillin/clavulanic acid, and in some cases to piperacillin/tazobactam (15,16).

In *E. coli*, the pattern of BL/BLI resistance is a gradual and unidirectional process that extends from ampicillin/sulbactam to piperacillin/tazobactam through

CAPÍTULO III. Artículo 7

amoxicillin/clavulanic acid (17). Thus, one isolate may be resistant to ampicillin/sulbactam but susceptible to amoxicillin/clavulanic acid and piperacillin/tazobactam (RSS phenotype), resistant to ampicillin/sulbactam and amoxicillin/clavulanic acid but susceptible to piperacillin/tazobactam (RRS phenotype), or resistant to the three combinations (RRR phenotype) (17). Recently, we demonstrated, both *in vitro* and in patients with intraabdominal infections, that *E. coli* isolates with RSS or RRS phenotype, classified as low level of resistance to BL/BLI, and carrying *bla*_{TEM} gene, are able to acquire stable resistance to piperacillin/tazobactam and to the others two combinations if they are exposed to piperacillin/tazobactam sub-MIC; indicating that an extended spectrum resistance to BL/BLI (ESRI) from ampicillin/sulbactam (RSS) to piperacillin/tazobactam (RRR) can be developed (17).

Early detection of both resistance to piperacillin/tazobactam and ability to develop ESRI in *E. coli* isolates with low-level resistance to BL/BLI (RSS or RRS) is essential to establish adequate initial and early antibiotic treatment of severe infections, moment in which the P/T treatment has special relevance. In clinical practice, when *E. coli* is isolated in a clinical sample, the Microbiology Service reports only the susceptibility or resistance to the different BL/BLI, among other antimicrobials, but not the potential development of resistance to those agents. Therefore, there is no system that allows us to detect this possible ESRI when *E. coli* isolates present low-level resistance to BL/BLI (RSS or RRS). In this study, we develop a rapid detection system to detect resistance to piperacillin/tazobactam and potential development of ESRI in clinical isolates of *E. coli*.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial isolates

CAPÍTULO III. Artículo 7

One hundred and fourteen *E. coli* clinical isolates were obtained from bloodstream and intra-abdominal samples of patients with suspected bacteremia or intra-abdominal infections at the University Hospital Virgen del Rocío, Seville (Spain). *E. coli* ATCC 25922 strain was a control in all the experiments. The study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital Virgen del Rocío of Seville (approval no. 0023-N-16).

Antimicrobial susceptibility testing

The ampicillin/sulbactam, amoxicillin/clavulanic and piperacillin/tazobactam antimicrobial susceptibility profiles were initially tested by broth microdilution using the MicroScan Walk Away NM44 panels (Beckman Coulter, Inc., USA). Isolates selection was made taking into account their BL/BLI susceptibility profiles (SSS, RSS, RRS, RRR). MICs of piperacillin/tazobactam were subsequently confirmed using the standard broth microdilution method (18,19). MICs were determined on original isolates and isolates subjected to piperacillin/tazobactam pressure.

Antimicrobial selection pressure

Antimicrobial selection pressure was performed as described previously (17). Overnight bacterial cultures grown in 10 mL of Mueller-Hinton Broth (MHB) at 37°C were adjusted to 0.5 of the McFarland standard (10^8 CFU/mL) and diluted to a final inoculum level of 10^5 CFU/mL. The diluted inocula were incubated with sub-inhibitory concentrations of piperacillin/tazobactam (8:1 ratio) corresponding to 1-fold dilutions below the MICs at 37°C for 24 h. Positive bacterial growth was re-adjusted to 10^5 CFU/mL and incubated with a 2-fold increased concentration of piperacillin/tazobactam. These steps were repeated until a P/T concentration of 256/32 mg/L or up to a piperacillin/tazobactam

CAPÍTULO III. Artículo 7

concentration that did not allow bacterial growth was reached. At the end of the process, MICs were determined for all the pressed isolates.

Detection and sequencing of *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA-1} and *bla*_{SHV} genes

The *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA-1} and *bla*_{SHV} genes were analysed in all studied isolates by PCR using the following primers: *bla*_{TEM} (Forward: 5'-ATGAGTATTCAACATTTCCG, Reverse: 5'-CTGACAGTTACCAATGCTTA) (17), *bla*_{OXA-1} (Forward: 5'-GGATAAAACCCCCAAAGGAA-3', Reverse: 5'-TGCACCAGTTTTTTTCCCATAACA-3') (20), and *bla*_{SHV} (Forward: 5'-GGGTTATTCTTATTTGTCGC, Reverse: 5'-TTAGCGTTGCCAGTGCTC) (21). All positive PCR products were screened by Sanger sequencing using an ABI3500 Genetic 121 Analyzer (Applied Biosystems, Foster, VA, United States) and analyzed using SnapGene® Viewer 2.7.2 software and BLAST Internet services (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

ESRI test

The ESRI test is based on the colorimetric and pH-based detection of the hydrolysis of the β -lactam ring produced by the enzyme β -lactamase. The clinical isolates were inoculated in different blood culture vials (BACTEC™ Standard/10Aerobic/F and BACTEC™ Lytic/10Anerobic/F, Becton Dickinson, United States) at a concentration of 10^6 and 10^2 UFC/mL, and incubated at 37°C with agitation at 180 rpm during 6-8 and 24 h in order to test the method efficacy in the interval time in which a patient blood culture with *E. coli* bacteraemia is usually positive. After this time, 1.5 mL of bacterial suspension growth in the blood culture were taken, transferred to an Eppendorf tube and centrifuged at 9,600 g for 2 min at room temperature (Thermo Fisher Scientific, USA).

CAPÍTULO III. Artículo 7

Subsequently, the pellet was resuspended with 1 mL of NaCl (0.9%), and centrifuged at 9.600 g for 2 min at room temperature. Then, the pellet was resuspended in 100 µL of B-PER II lysis buffer (Bacterial Protein Extraction Reagent, Thermo Fisher Scientific, USA) and incubated at 37°C for 30 min. Afterwards, the sample was centrifuged again at 9.600 g for 2 min at room temperature. Subsequently, 30 µL of the supernatant was added to a 195 µL solution consisting of 190 µL of ampicillin (3 mg/mL) (Sigma, Spain) + sulbactam (4 µg/mL) (Sigma, Spain) + 5 µL of 0.5% v/v phenol red (Sigma, Spain) on a flat-bottom microplate. Finally, the plate was incubated at 37°C for 120 min, with reading every minute during the first 10 min, and each 10 min the rest of the time until 120 min (Figure 1). In order to interpret the results, those samples with the slightest change of color respect to the negative control were considered as positive results.

ESRI test validation

Statistical parameters of sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) were used to determine the validity of the detection method developed and fine-tuned in this work. To calculate these parameters, we included the data of the isolates susceptible to piperacillin/tazobactam.

Statistical analysis

A descriptive analysis was performed for time of positivity of the ESRI test, with median and interquartile range (IQR). Times of positivity of the ESRI test were analyzed using Mann Whitney *U* test. Differences were considered significant at $P < 0.05$. All statistical analyses were performed using SPSS software, version 23.0 (SPSS).

RESULTS

CAPÍTULO III. Artículo 7

Antimicrobial susceptibility in clinical isolates of *E. coli*

Susceptibility profiles to ampicillin/sulbactam, amoxicillin/clavulanic and piperacillin/tazobactam obtained through MicroScan were previously analyzed, and allowed the selection of 114 *E. coli* clinical isolates with different profiles (SSS, RSS, RRS, RRR) to develop and validate the ESRI test (Tables 1-3). On the other hand, the piperacillin/tazobactam MICs by broth microdilution classified 67 (58.7%) of the 114 *E. coli* isolates as susceptible, 6 (5.2%) of them as intermediate and 41 (35.9%) of them as resistant to piperacillin/tazobactam, according to breakpoint established by CLSI (19). The use of MicroScan and standard broth microdilution method showed the same susceptibility profile of piperacillin/tazobactam to the majority of clinical isolates. However, some exceptions were observed: C1-8 (RRR) and C1-102 (RRR) isolates presented MIC values of 4 mg/L, classified as susceptible (Table 2), and C1-136 (RRS), C1-166 (RSS), and C1-189 (RSS) isolates showed MIC values of >512, >512 and 128 mg/L, respectively, and were classified as resistant (Table 3).

Detection of ESRI

Sixty seven isolates classified as susceptible to piperacillin/tazobactam were exposed to piperacillin/tazobactam pressure in order to show the ability of ESRI development. Of these, twenty-two (32.8%) did not develop ESRI (Table 1), maintaining their piperacillin/tazobactam MICs or increasing slightly but without become resistant. Of the remaining isolates, forty-five (67.2%) were able to developed ESRI, increasing their MICs to piperacillin/tazobactam at least 8-fold (Table 2).

Detection and sequencing of β -lactamases

CAPÍTULO III. Artículo 7

None of the *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA-1} and *bla*_{SHV} were detected in the 22 isolates susceptible to piperacillin/tazobactam and without ability to develop ESRI (Table 1). However, in the 45 isolates susceptible to piperacillin/tazobactam, and with ability to develop ESRI, *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA-1} and *bla*_{SHV} were detected in 38 (84.4%), 1 (2.2%) and 6 (13.3%) of them, respectively. Simultaneous detection of *bla*_{TEM} and *bla*_{SHV} were found in 4 isolates (8.8%). However, there were 2 *E. coli* isolates (4.4%) in which *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA-1}, and *bla*_{SHV} were not detected. Regarding to the type of *bla*_{TEM} detected, thirty-four isolates expressed TEM-1, and the other four isolates expressed TEM-30, TEM-35, TEM-40 and TEM-135, respectively (Table 2).

In the case of the 47 isolates intermediate or resistant to piperacillin/tazobactam, *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA-1} and *bla*_{SHV} were detected in 34 (72.3%), 7 (14.9%) and 5 (10.6%) of them, respectively. Detection of *bla*_{TEM} together with *bla*_{SHV} was found in 3 isolates, and with *bla*_{OXA-1} in 2 other isolates. There were 6 isolates (12.7%) in which *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA-1}, and *bla*_{SHV} were not detected. All the *bla*_{TEM} detected expressed TEM-1, except for the isolates C2-117 and C2-136 that expressed TEM-12 and TEM-84 (Table 3).

ESRI test validation

All the isolates susceptible to piperacillin/tazobactam and without ability to develop ESRI were negative for the ESRI test (Table 1). Regarding the isolates susceptible to piperacillin/tazobactam and potentially ESRI developer's, forty-three isolates (95.5%) were positive for the ESRI test at 6-8 h of bacterial growth. The 2 isolates negative for ESRI test became positive at 24 h of the bacterial growth (Table 2). Similarly, the isolates intermediate/resistant to piperacillin/tazobactam were 100% positive for the ESRI test both at 6-8 and 24 h of bacterial growth (Table 3).

CAPÍTULO III. Artículo 7

Statistically, significant differences between both groups (ESRI developer's isolates and piperacillin/tazobactam intermediate/resistant isolates) were found in the time of positivity of the ESRI test. In the first group, the median time and IQR were 30 min (25-40 min) at 6-8 h and 30 min (25-60 min) at 24 h. However, in the second group the median time and IQR were 5 min (3-10 min) at 6-8 h ($P<0.001$) and 3 min (2-10 min) at 24 h ($P<0.001$) (Figure 2). Sensitivity, specificity, PPV and NPV were 100% both at 6-8 h and 24 h in the detection of isolates intermediate or resistant to P/T (Table 4). However, in the group of ESRI developer's, sensitivity and NPV decreased until 96% and 93%, respectively, at 6-8 h (Table 5).

DISCUSSION

In the present study, we designed a rapid detection system, called ESRI test, for piperacillin/tazobactam resistance detection or ability to develop ESRI in *E. coli*. We characterized a collection of 114 clinical isolates of *E. coli* that were used to validate the ESRI test.

We should mention that, although the test is designed to detect piperacillin/tazobactam resistance and the possible development of ESRI, ampicillin/sulbactam was used in the test instead of piperacillin/tazobactam. This is due to two reasons: i) piperacillin/tazobactam resistance mediated by β -lactamases also leads to ampicillin/sulbactam resistance, and ii) ESRI development always starts with ampicillin/sulbactam resistance, allowing to detect ampicillin/sulbactam hydrolysis, even if the isolate is susceptible to piperacillin/tazobactam, and avoiding false negatives.

Discordant results in piperacillin/tazobactam MICs between MicroScan and standard broth microdilution have been observed for 5 (4.3%) of the total *E. coli* isolates studied.

CAPÍTULO III. Artículo 7

Two replicate were performed and showed the same results. This difference could be due to technical problems associated with the development of the MicroScan method.

This study showed that *bla*_{TEM} was the most frequently β -lactamase gene detected both in piperacillin/tazobactam resistant and ESRI developer's *E. coli* isolates. In contrast, *bla*_{OXA-1} was the less frequent β -lactamase gene detected in the ESRI developer's group (2.2%) group; with a clear difference between piperacillin/tazobactam resistant isolates (14.9%). Similar data were observed in another study in which OXA-1 was strongly associated with resistance to piperacillin/tazobactam in *E. coli* (13). Moreover, in some isolates, any of the studied β -lactamases were not detected, indicating probably the involvement of other β -lactamases such as AmpC (22).

It is noteworthy that ESRI test is very sensitive and specific, and with higher PPV and PPN, being able to detect all the piperacillin/tazobactam resistant, and practically all the ESRI-developers *E. coli* isolates analysed in this study. Only two ESRI developer's isolates were not detected by ESRI test at 6-8 h. One possible explanation is that the growth rate of both isolates was lower than the rest of the isolates. Another possibility is that both isolates did not produce enough quantity of β -lactamase to be detected by the test at 6-8 h of the bacterial growth. More studies are needed to confirm this hypothesis.

Other similar tests have been developed and/or commercialized for the detection of extended spectrum β -lactamases (ESBL) or carbapenemases, such as ESBL NDP test (23), Rapidec[®] Carba NP test (24), Nitro-Carba test (25), MALDI-ToF MS (26), among others. The main difference with these kinds of tests is that ESRI test has been designed to detect not only piperacillin/tazobactam resistant isolates, but also ESRI developer's isolates, which are firstly susceptible to piperacillin/tazobactam.

The ESRI test combines many advantages in relation to conventional clinical methods. It is fast, simple and cheap. We have demonstrated that ESRI test allows to differentiate

CAPÍTULO III. Artículo 7

with a high probability between isolates resistant to piperacillin-tazobactam (≤ 10 min of detection time) and ESRI developer's (> 10 -120 min of detection time). These early detection times are an advantage when compared with the 24 h needed by the conventional methods (Figure 3).

As limitations, ESRI test has been designed only for *E. coli* isolates growing in hemoculture bottles, unlike the mentioned tests that have also been tested with other genera of the *Enterobacteriales* and from agar plates. However, it should be noted that *E. coli* is the main Gram-negative bacteria isolated from blood, peritoneal fluid and bile samples (1), which are usually being processed in hemoculture bottles in Clinical Microbiology laboratories. Future analyses of the ability of ESRI test to detect resistance to piperacillin/tazobactam in other bacterial genera, and from different clinical samples are welcomed.

In conclusion, the ESRI test is a powerful weapon to fight against the antimicrobial resistance. This system may be an innovative contribution to the microbiological diagnosis, allowing to obtain information on the possible development of resistance to BL/BLI in less than 24 hours and a better clinical prognosis both in terms of survival and in the absence of recurrence by resistant microorganisms, and to achieve an economic impact associated with the improvement of the quality of healthcare.

FUNDINGS

This work was supported by the Miguel Servet Tipo I Project grant, Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (CP15/00132), and by Plan Nacional de I+D+i 2013-2016 and Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Ciencia, Innovación y

CAPÍTULO III. Artículo 7

Universidades, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (RD16/0016/0009), cofinanced by the European Development Regional Fund “A Way to Achieve Europe,” Operative Program Intelligent Growth 2014-2020. Y.S. is supported by the Subprograma Miguel Servet Tipo I, Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Spain [CP15/00132]. A.R.V. is supported by the Subprograma Río Hortega, Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Spain [CM18/00122].

REFERENCES

1. Vila J, Sáez-López E, Johnson JR, Römling U, Dobrindt U, Cantón R, Giske CG, Naas T, Carattoli A, Martínez-Medina M, Bosch J, Retamar P, Rodríguez-Baño J, Baquero F, Soto SM. 2016. *Escherichia coli*: An old friend with new tidings. *FEMS Microbiol Rev* 40:437-463.
2. Bush K, Bradford PA. 2016. β -Lactams and β -lactamase inhibitors: an overview. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6:a025247.
3. Solomkin JS, Mazuski JE, Bradley JS, Rodvold KA, Goldstein EJ, Baron EJ, O’Neill PJ, Chow AW, Dellinger EP, Eachempati SR, Gorbach S, Hilfiker M, May AK, Nathens AB, Sawyer RG, Bartlett JG. 2010. Diagnosis and management of complicated intra-abdominal infection in adults and children: Guidelines by the Surgical Infection Society and the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 50:133-164.
4. Vazquez-Guillamet MC, Vazquez R, Micek ST, Kollef MH. 2017. Predicting resistance to piperacillin-tazobactam, cefepime and meropenem in septic patients

CAPÍTULO III. Artículo 7

- with bloodstream infection due to gram-negative bacteria. Clin Infect Dis 65:1607-1614.
5. Zhou XY, Bordon F, Sirot D, Kitzis MD, Gutmann L. 1994. Emergence of clinical isolates of *Escherichia coli* producing TEM-1 derivatives or an OXA-1 beta-lactamase conferring resistance to beta-lactamase inhibitors. Antimicrob Agents Chemother 38:1085-1089.
 6. Suseno M, Das S, Semel J, Thomson R. 2018. Emerging piperacillin/tazobactam resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella* sp. Open Forum Infect Dis 5:S719.
 7. Cantón R, Loza E, Aznar J, Calvo J, Cercenado E, Cisterna R, González F, López JL, Rubio C, Suárez AI, Tubau F, Weber I, Yuste P, Cavanillas R, grupo de trabajo SMART-España. 2011. Sensibilidad de microorganismos gramnegativos de infecciones intraabdominales y evolución de los aislados con β -lactamasas de espectro extendido en el estudio SMART en España (2002-2010). Rev Esp Quimioter 24:223-232.
 8. Cantón R, Loza E, Aznar J, Castillo FJ, Cercenado E, Fraile-Ribot PA, González-Romo F, López-Hontagas JL, Rodríguez-Lozano J, Suárez-Barrenechea AI, Tubau F, Díaz-Regañón J, López-Mendoza D, SMART-Spain Working Group. 2019. Monitoring the Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms involved in intraabdominal and urinary tract infections recovered during the SMART study (Spain, 2016 and 2017). Rev Esp Quimioter 32:145-155.
 9. Public Health England. 2018. English Surveillance Programme for Antimicrobial Utilisation and Resistance (ESPAUR). Report 2018.
 10. Drawz SM, Bonomo RA. 2010. Three decades of β -lactamase inhibitors. Clin Microbiol Rev 23:160-201.

CAPÍTULO III. Artículo 7

11. Wu PJ, Shannon K, Phillips I. 1994. Effect of hyperproduction of TEM-1 betalactamase on *in vitro* susceptibility of *Escherichia coli* to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 38:494-498.
12. Martín O, Valverde A, Morosini MI, Rodríguez-Domínguez M, Rodríguez-Baños M, Coque TM, Cantón R, del Campo R. 2010. 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* 48:2368-2372.
13. Livermore DM, Day M, Cleary P, Hopkins KL, Toleman MA, Wareham DW, Wiuff C, Doumith M, Woodford N. 2019. OXA-1 β -lactamase and non-susceptibility to penicillin/ β -lactamase inhibitor combinations among ESBL-producing *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 74:326-333.
14. Jacoby GA. 2009. AmpC β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 22:161-182.
15. Chaibi EB, Sirot D, Paul G, Labia R. 1999. Inhibitor-resistant TEM β -lactamases: phenotypic, genetic and biochemical characteristics. *J Antimicrob Chemother* 43:447-458.
16. Babic M, Hujer AM, Bonomo RA. 2006. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resist Updat* 9:142-156.
17. Rodríguez-Villodres A, Gil-Marqués ML, Álvarez-Marín R, Bonnin RA, Pachón-Ibáñez ME, Aguilar-Guisado M, Naas T, Aznar J, Pachón J, Lepe JA, Smani Y. 2019. Extended-spectrum resistance to β -lactams/ β -lactamase inhibitors (ESRI) evolved from low-level resistant *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*. In press. Doi: 10.1093/jac/dkz393.

CAPÍTULO III. Artículo 7

18. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard-tenth edition. CLSI document M07-A10.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2019. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI M100.
20. Karisik E, Ellington MJ, Pike R, Warren RE, Livermore DM, Woodford N. 2006. Molecular characterization of plasmid encoding CTX-M-15 β -lactamases from *Escherichia coli* strains in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother* 58:665-668.
21. Díaz MA, Hernández-Bello JR, Rodríguez-Baño J, Martínez-Martínez L, Calvo J, Blanco J, Pascual A. Diversity of *Escherichia coli* Strains Producing Extended-Spectrum β -Lactamases in Spain: Second Nationwide Study. *J Clin Microbiol* 48:2840-2845.
22. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. 2002. Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 46:1-11.
23. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. 2012. Rapid Detection of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 50:3016-3022.
24. Dortet L, Agathine A, Naas T, Cuzon G, Poirel L, Nordmann P. 2015. Evaluation of the RAPIDEC® CARBA NP, the Rapid CARB Screen® and the Carba NP test for biochemical detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* 70:3014-3022.
25. Teethaisong Y, Nakouti I, Evans K, Eumkeb G, Hobbs G. 2019. Nitro-Carba test, a novel and simple chromogenic phenotypic method for rapid screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Glob Antimicrob Resist* 18:22-25.

CAPÍTULO III. Artículo 7

26. Choquet M, Guiheneuf R, Castelain S, Cattoir V, Auzou M, Pluquet E, Decroix V. 2018. Comparison of MALDI-ToF MS with the Rapidec Carba NP test for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 37:149-155.

CAPÍTULO III. Artículo 7

Table 1. Clinical isolates of *Escherichia coli* non ESRI developer's and with negative results for the ESRI test detection (N=22).

Isolate	Origin	BL/BLI resistance profile*	P/T MIC (mg/L)	Resistance mechanism	Test (6-8 h)	Time (min)	Test (24 h)	Time (min)	Pressure	New P/T MIC (mg/L)
C1-74	Blood	RRS	16	NEG	-	>120	-	>120	-	32
C1-83	Blood	RRS	8	NEG	-	>120	-	>120	-	8
C1-90	Blood	SSS	2	NEG	-	>120	-	>120	-	2
C1-95	Blood	SSS	2	NEG	-	>120	-	>120	-	8
C1-97	Blood	SSS	4	NEG	-	>120	-	>120	-	16
C1-100	Blood	SSS	2-4	NEG	-	>120	-	>120	-	4
C1-110	Blood	SSS	4	NEG	-	>120	-	>120	-	4
C1-111	Blood	SSS	2-4	NEG	-	>120	-	>120	-	16
C1-128	Blood	SSS	2	NEG	-	>120	-	>120	-	8
C1-138	Blood	RSS	4	NEG	-	>120	-	>120	-	4
C1-144	Blood	SSS	4	NEG	-	>120	-	>120	-	4
C1-146	Blood	SSS	2-4	NEG	-	>120	-	>120	-	4
C1-152	Blood	SSS	4	NEG	-	>120	-	>120	-	4
C1-155	Blood	SSS	4	NEG	-	>120	-	>120	-	4
C1-157	Blood	SSS	2	NEG	-	>120	-	>120	-	2
C1-168	Blood	SSS	4	NEG	-	>120	-	>120	-	4
C1-169	Blood	SSS	2	NEG	-	>120	-	>120	-	2

CAPÍTULO III. Artículo 7

C1-172	Blood	SSS	2	NEG	-	>120	-	>120	-	2
C1-177	Blood	SSS	4	NEG	-	>120	-	>120	-	4
C2-4	Bile	SSS	2	NEG	-	>120	-	>120	-	2
C2-8	Bile	SSS	8	NEG	-	>120	-	>120	-	8
C2-12	Bile	RRS	4	NEG	-	>120	-	>120	-	4

* SSS: susceptible to ampicillin/sulbactam, amoxicillin/clavulanic acid and piperacillin/tazobactam; RSS: resistant to ampicillin/sulbactam and susceptible to amoxicillin/clavulanic acid and piperacillin/tazobactam; RRS: resistant to ampicillin/sulbactam, amoxicillin/clavulanic acid and susceptible to piperacillin/tazobactam.

-: negative result (detection test or pressure); NEG: negative result in relation to studied resistance mechanisms (TEM type, OXA-1 type, SHV type); MIC: minimum inhibitory concentration; P/T: piperacillin/tazobactam.

CAPÍTULO III. Artículo 7

Table 2. Clinical isolates of *Escherichia coli* ESRI developer's and with positive results for the ESRI test detection (N=45).

Isolate	Origin	BL/BLI resistance profile*	P/T MIC (mg/L)	Resistance mechanism	Test (6-8 h)	Time (min)	Test (24 h)	Time (min)	Pressure	New P/T MIC (mg/L)
C1-8	Blood	RRR	4	NEG	+	25	+	60	+	256
C1-31	Blood	RRS	8	TEM-40	+	25	+	60	+	64
C1-38	Blood	RRS	16	TEM-35	+	1	+	1	+	256
C1-48	Blood	RRS	4	TEM-1	+	20	+	30	+	128
C1-65	Blood	RRS	8	TEM-1	+	60	+	60	+	512
C1-72	Blood	RRS	16	TEM-1	+	30	+	60	+	512
C1-81	Blood	RRS	16	TEM-30	+	2	+	1	+	512
C1-91	Blood	RSS	1	NEG	+	40	+	20	+	256
C1-93	Blood	RSS	2	SHV	+	20	+	10	+	512
C1-99	Blood	RSS	8	TEM-1	+	40	+	30	+	>512
C1-102	Blood	RRR	4	TEM-1	+	1	+	2	+	32
C1-103	Blood	RSS	8	TEM-1	+	40	+	100	+	512
C1-106	Blood	RSS	8	TEM-1	+	40	+	25	+	512
C1-108	Blood	RSS	2	TEM-1	+	40	+	30	+	512
C1-118	Blood	RRS	16	OXA-1	+	30	+	10	+	256
C1-120	Blood	RSS	8	TEM-1	+	40	+	20	+	>512
C1-121	Blood	RSS	8	TEM-1/SHV	+	30	+	30	+	256

CAPÍTULO III. Artículo 7

C1-126	Blood	RSS	8	TEM-1	+	30	+	30	+	512
C1-129	Blood	RSS	16	TEM-1	+	40	+	25	+	256
C1-130	Blood	RSS	8	TEM-1	+	40	+	25	+	256
C1-137	Blood	RSS	8	TEM-1	+	40	+	25	+	>512
C1-139	Blood	RSS	8	TEM-1	+	30	+	120	+	>512
C1-141	Blood	RSS	4	TEM-1/SHV	+	30	+	10	+	>512
C1-142	Blood	RRS	4	TEM-135/SHV	+	10	+	10	+	512
C1-143	Blood	RSS	8	TEM-1	+	30	+	60	+	>512
C1-153	Blood	RSS	8	TEM-1/SHV	+	50	+	90	+	>512
C1-159	Blood	RSS	2	TEM-1	+	100	+	30	+	512
C1-160	Blood	RSS	4	TEM-1	+	50	+	60	+	512
C1-161	Blood	RSS	16	TEM-1	+	100	+	60	+	>512
C1-162	Blood	RSS	4	NEG	+	30	+	30	+	512
C1-164	Blood	RSS	8	TEM-1	+	30	+	30	+	512
C1-170	Blood	RSS	4	TEM-1	+	30	+	60	+	>512
C1-171	Blood	RSS	8	NEG	-	>120	+	40	+	512
C1-174	Blood	SSS	2	TEM-1	+	120	+	120	+	>512
C1-175	Blood	RSS	16	TEM-1	+	30	+	60	+	512
C1-183	Blood	RSS	8	TEM-1	+	30	+	40	+	512
C1-187	Blood	RSS	2	TEM-1	+	100	+	40	+	>256

CAPÍTULO III. Artículo 7

C1-190	Blood	RSS	16	SHV	-	>120	+	120	+	512
C1-191	Blood	RSS	8	TEM-1	+	60	+	100	+	256
C1-306	Blood	RSS	16	TEM-1	+	30	+	30	+	128
C2-14	Bile	RRS	8	TEM-1	+	10	+	10	+	512
C2-47	Intra-abdominal abscesses	RSS	8	TEM-1	+	20	+	30	+	512
C2-49	Peritoneal fluid	RSS	8	TEM-1	+	15	+	30	+	512
C2-54	Intra-abdominal abscesses	RRS	8	TEM-1	+	15	+	30	+	256
PT3	Blood	RSS	8	TEM-1	+	30	+	50	+	256 (PT4)

* RSS: resistant to ampicillin/sulbactam and susceptible to amoxicillin/clavulanic acid and piperacillin/tazobactam; RRS: resistant to ampicillin/sulbactam, amoxicillin/clavulanic acid and susceptible to piperacillin/tazobactam; RRR: resistant to ampicillin/sulbactam, amoxicillin/clavulanic acid and piperacillin/tazobactam.

-: negative result (detection test or pressure); +: positive result (detection test or pressure); NEG: negative result in relation to studied resistance mechanisms (TEM type, OXA-1 type, SHV type); MIC: minimum inhibitory concentration; P/T: piperacillin/tazobactam.

CAPÍTULO III. Artículo 7

Table 3. Clinical isolates of *Escherichia coli* intermediate and resistant to piperacillin/tazobactam and positive for the ESRI test detection (N=47).

Isolate	Origin	BL/BLI resistance profile*	P/T MIC (mg/L)	Resistance mechanism	Test (6-8 h)	Time (min)	Test (24 h)	Time (min)
C1-23	Blood	RRR	>256	TEM-1	+	2	+	10
C1-82	Blood	RRS	32	TEM-1	+	10	+	10
C1-94	Blood	RRS	32	TEM-1	+	15	+	10
C1-109	Blood	RRR	>256	SHV	+	2	+	2
C1-116	Blood	RRR	256	TEM-1	+	5	+	4
C1-136	Blood	RRS	>512	TEM-1/SHV	+	20	+	25
C1-166	Blood	RSS	>512	TEM-1	+	100	+	30
C1-189	Blood	RSS	128	TEM-1	+	10	+	10
C1-239	Blood	RRR	>256	TEM-1	+	2	+	2
C1-436	Blood	RRR	>256	TEM-1	+	3	+	3
C2-23	Bile	RRR	>256	TEM-1	+	10	+	10
C2-45	Peritoneal fluid	RRR	256	TEM-1	+	10	+	60
C2-48	Intra-abdominal abscesses	RRR	>256	TEM-1	+	2	+	10
C2-57	Bile	RRR	>256	NEG	+	2	+	10

CAPÍTULO III. Artículo 7

C2-72	Intra-abdominal abscesses	RRR	>256	TEM-1	+	20	+	4
C2-74	Peritoneal fluid	RRR	256	TEM-1	+	5	+	3
C2-82	Hepatic abscesses	RRR	>256	TEM-1/SHV	+	3	+	3
C2-90	Peritoneal fluid	RRR	256	TEM-1	+	4	+	2
C2-95	Peritoneal fluid	RRR	64	TEM-1	+	15	+	15
C2-103	Peritoneal fluid	RRR	256	TEM-1	+	2	+	3
C2-106	Peritoneal fluid	RRR	128	OXA-1	+	30	+	25
C2-113	Intra-abdominal abscesses	RRR	256	TEM-1/SHV	+	2	+	3
C2-116	Intra-abdominal abscesses	RRR	256	TEM-1	+	2	+	3
C2-117	Peritoneal fluid	RRR	128	TEM-12	+	5	+	3
C2-136	Peritoneal fluid	RRR	128	TEM-84	+	5	+	1
C2-146	Peritoneal fluid	RRR	>256	TEM-1	+	1	+	1
C2-147	Intra-abdominal abscesses	RRR	>256	TEM-1	+	3	+	1
PT4	Blood	RRR	256	TEM-1	+	10	+	15
PTR1	Blood	RRR	64	OXA-1	+	10	+	5
PTR2	Blood	RRR	256	TEM-1	+	10	+	1
PTR3	Blood	RRR	256	NEG	+	10	+	1

CAPÍTULO III. Artículo 7

PTR4	Blood	RRR	>256	NEG	+	3	+	1
PTR5	Blood	RRR	>256	TEM-1	+	3	+	1
PTR7	Blood	RRR	256	NEG	+	15	+	1
PTR8	Blood	RRR	128	OXA-1	+	30	+	2
PTR9	Blood	RRR	128	TEM-1/OXA-1	+	3	+	5
PTR10	Blood	RRR	>256	SHV	+	1	+	1
PTR11	Blood	RRR	128	TEM-1	+	3	+	1
PTR12	Blood	RRR	256	NEG	+	3	+	1
PTR13	Blood	RRR	256	TEM-1	+	3	+	10
PTR14	Blood	RRR	32	NEG	+	50	+	40
PTR15	Blood	RRR	128	OXA-1	+	10	+	10
PTR16	Blood	RRR	128	TEM-1	+	15	+	15
PTR17	Blood	RRR	>256	TEM-1/OXA-1	+	10	+	3
PTR18	Blood	RRR	128	TEM-1	+	10	+	10
PTR19	Blood	RRR	64	OXA-1	+	10	+	10
PTR20	Blood	RRR	>256	TEM-1	+	10	+	3

* RSS: resistant to resistant to ampicillin/sulbactam and susceptible to amoxicillin/clavulanic acid and piperacillin/tazobactam; RRS: resistant to ampicillin/sulbactam, amoxicillin/clavulanic acid and susceptible to piperacillin/tazobactam; RRR: resistant to ampicillin/sulbactam, amoxicillin/clavulanic acid and piperacillin/tazobactam.

+: positive result of detection test; NEG: negative result in relation to studied resistance mechanisms (TEM type, OXA-1 type, SHV type); MIC: minimum inhibitory concentration; P/T: piperacillin/tazobactam.

CAPÍTULO III. Artículo 6

Table 4. Validation of the ESRI test in the detection of piperacillin/tazobactam resistant isolates (N=47)

Test	Sensitivity	Especificity	PPV	NPV
6-8 h	100%	100%	100%	100%
24 h	100%	100%	100%	100%

PPV: positive predictive value

NPV: negative predictive value

Table 5. Validation of the ESRI test in the detection of ESRI developer's isolates (N=45)

Test	Sensitivity	Especificity	PPV	NPV
6-8 h	96%	100%	100%	93%
24 h	100%	100%	100%	100%

PPV: positive predictive value

NPV: negative predictive value

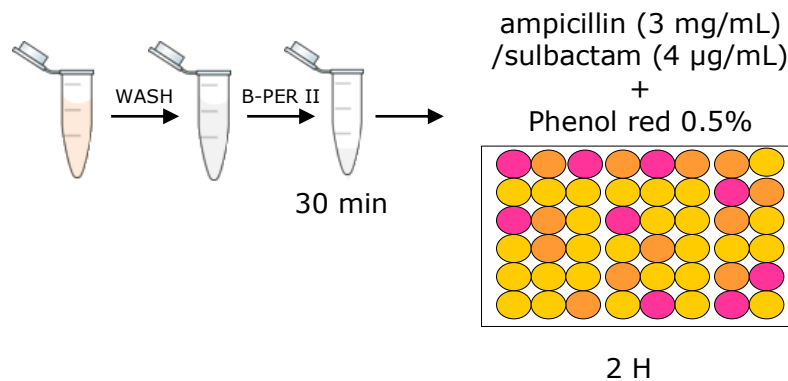


Figure 1. Design and protocol of the ESRI test.

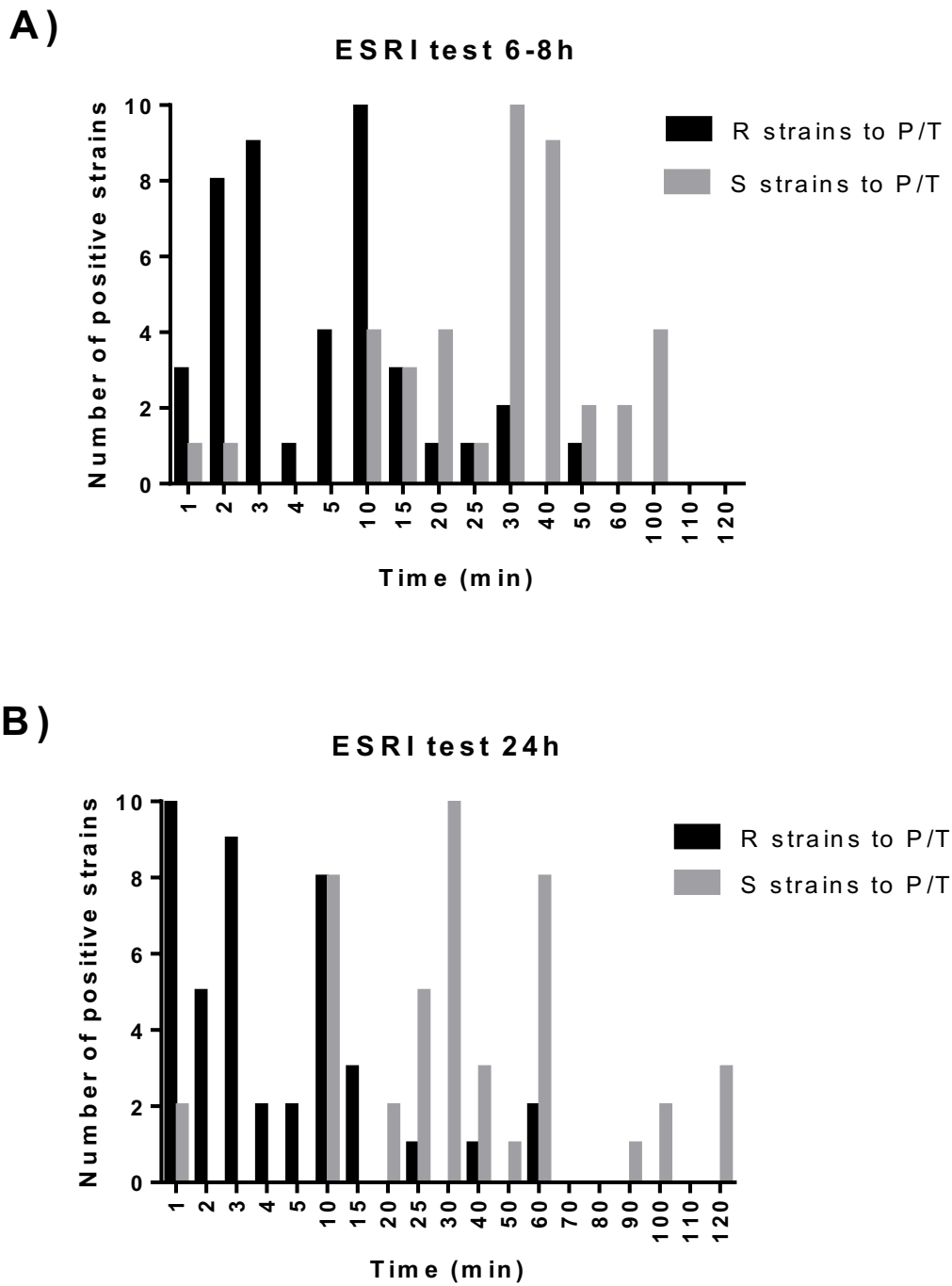


Figure 2. Time of ESRI test positivity in piperacillin/tazobactam resistant and ESRI developer's *E. coli* isolates. S: susceptible, R: resistant, P/T: piperacillin/tazobactam.

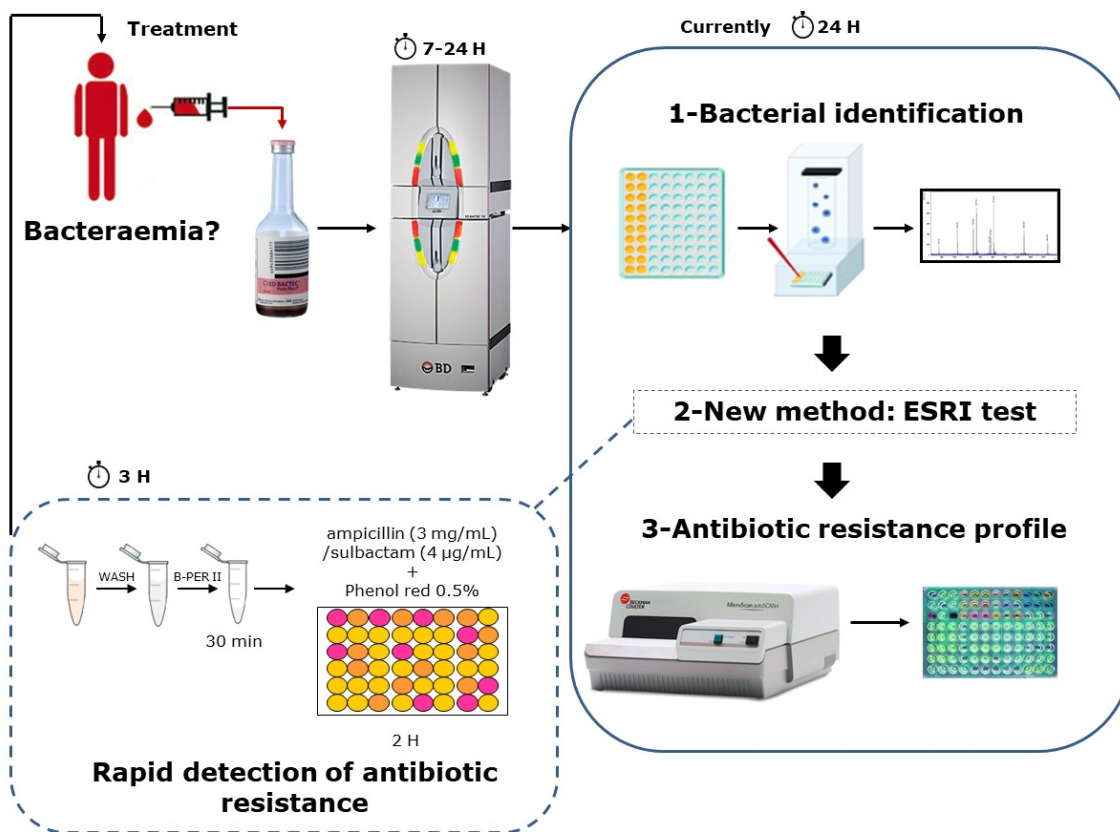


Figure 3. New detection method and its possible application in the clinical practice.

VI. DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

La bacteriemia y la infección intraabdominal por *E. coli* son un grave problema a nivel mundial debido a su gravedad y su mal pronóstico si no reciben un tratamiento adecuado, especialmente en las primeras horas de la infección. Entender el papel que juegan tanto el hospedador como el patógeno en este tipo de infecciones resulta crucial a la hora de realizar un diagnóstico y un tratamiento óptimos, lo que redundará en un mejor manejo clínico del paciente y, por lo tanto, un mejor pronóstico clínico.

Es por ello que el trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral está basado en tres pilares fundamentales: i) el estudio de las características clínico-epidemiológicas de los pacientes que padecen la infección, ii) el estudio del papel de los factores de virulencia bacterianos en el pronóstico clínico de la infección y iii) el estudio de los mecanismos de resistencia a los antibióticos ampliamente utilizados para tratar este tipo de infecciones, así como el desarrollo de un sistema que permita detectar esta resistencia rápidamente.

Capítulo I: Análisis de las características clínicas, pronósticas y microbiológicas de las bacteriemias por *E. coli* y *K. pneumoniae* y la infección intraabdominal por *E. coli*.

Tras el análisis comparativo realizado entre los pacientes con bacteriemia por *E. coli* y los pacientes con bacteriemia por *K. pneumoniae* encontramos diferencias tanto en las características clínicas como en los factores de riesgo asociados con la mortalidad de los mismos entre uno y otro microorganismo.

Sin embargo, la mortalidad cruda a los 30 días no mostró diferencias entre los pacientes con bacteriemia por *E. coli* y los pacientes con bacteriemia por *K. pneumoniae* (18,6 vs. 17,9%, respectivamente, $P=0,877$), incluso cuando comparamos entre productores de BLEE (20,0% vs. 17,4%, $P=1,000$) y no productores de BLEE (18,5% vs. 18,0%, $P=0,931$) (Tabla 1, artículo 1, capítulo I). Existen otros estudios en los que se analiza la mortalidad en la bacteriemia por *E. coli* y *K. pneumoniae*, aunque ninguno de ellos se ha realizado en población general. En el primero de ellos, Cheng *et al.* (221), analizando pacientes con bacteriemia secundaria a neumonía producida por *E. coli* o *K. pneumoniae* BLEE, encontraron una mortalidad cruda a los 30 días del 43,2% en la neumonía bacteriémica producida por *E. coli*, y del 39,2% en la producida por *K. pneumoniae* ($P=0,69$). Otros autores, como Sakellariou *et al.* (222), en un estudio comparativo entre bacteriemia por *E. coli* o *K. pneumoniae* productoras de BLEE, reportan una mortalidad del 27,1% en el caso de la bacteriemia por *E. coli* y del 23,8% en el caso de la bacteriemia

DISCUSIÓN GENERAL

por *K. pneumoniae* ($P=0,724$) (222). Por otro lado, Leistner *et al.* (223) encontraron mayor mortalidad en aquellos pacientes con bacteriemia por *K. pneumoniae* que en aquellos con bacteriemia por *E. coli* (25,0% vs. 18,5%, respectivamente; $P=0,006$), y además, sorprendentemente, mayor mortalidad entre los pacientes con bacteriemia por *K. pneumoniae* no productora de BLEE frente a la bacteriemia por *E. coli* no productora de BLEE (25,2% vs. 17,6%, respectivamente; $P=0,005$). Estas diferencias en la mortalidad en comparación con nuestro estudio pueden deberse al propio diseño del estudio, donde la mortalidad medida fue únicamente intrahospitalaria en lugar de la mortalidad cruda a los 30 días, haciendo que los datos no sean comparables entre sí.

Una primera diferencia importante en las características clínico-epidemiológicas encontradas entre ambos patógenos es que la bacteriemia por *E. coli* parece más relacionada con el ámbito comunitario, mientras que la bacteriemia por *K. pneumoniae* con el hospitalario. Esto se deduce de la mayor frecuencia de adquisición nosocomial de la bacteriemia por *K. pneumoniae*, así como mayor presencia de dispositivos externos en los pacientes, especialmente CVC transitorio, sonda nasogástrica y ventilación mecánica (Tabla 1, artículo 1, capítulo I). De esta forma, es lógico pensar que el principal foco de la bacteriemia por *K. pneumoniae* fuera el respiratorio o el catéter, y que los pacientes con bacteriemia por este microorganismo precisaran de más control de foco que los pacientes con bacteriemia por *E. coli*, donde el foco mayoritario de la bacteriemia fue el urinario. Además, esta distribución diferencial de los patógenos explicaría por qué los pacientes con bacteriemia por *K. pneumoniae* tuvieron una mayor exposición previa a los antibióticos, ya que que los pacientes hospitalizados reciben tratamiento antibiótico más frecuentemente que los pacientes comunitarios (Tabla 1, artículo 1, capítulo I).

Un aspecto a destacar en cuanto a las comorbilidades es que *E. coli* se aisló con más frecuencia que *K. pneumoniae* en hemocultivos de pacientes que tuvieron cáncer ($P=0,048$), algo que ya ha sido reportado en estudios previos (224,225). Esta diferencia se podría deber a que el número de pacientes con inmunosupresión relacionada con el cáncer fuera mayor en el caso de bacteriemia por *E. coli* que en la bacteriemia por *K. pneumoniae*, pudiendo esta favorecer la translocación de *E. coli* en el torrente sanguíneo desde otros focos (226). Sin embargo, son necesarios más estudios para confirmar esta hipótesis.

El análisis multivariado mostró como factores de riesgo independientes asociados con la mortalidad en la bacteriemia por *E. coli* los índices de Charlson (OR, 1,44 [1,21-1,70; $P<0,001$]) y Pitt (OR, 1,62 [1,23-2,14; $P<0,001$]), la presencia de CVC permanente (OR,

DISCUSIÓN GENERAL

5,37 [1,60-18,02; $P=0,006$]) y sonda nasogástrica (OR, 10,16 [2,26-45,51; $P=0,002$]) (Tabla 5, artículo 1, capítulo I). Esto parece indicar que, aunque la bacteriemia por *E. coli* se relaciona menos con el ambiente hospitalario, cuando esta ocurre en pacientes hospitalizados con dispositivos externos es más grave que la bacteriemia por *K. pneumoniae*. Por otro lado, el foco urinario se consideró un factor protector para la mortalidad en la bacteriemia por *E. coli* (OR, 0,24 [0,09-0,68; $P=0,007$]), probablemente debido al buen pronóstico clínico que presentan estos pacientes.

En el caso de la bacteriemia por *K. pneumoniae* el análisis multivariado seleccionó los índices de Charlson (OR, 1,39 [1,07-1,82; $P=0,014$]) y Pitt (OR, 1,65 [1,17-2,33; $P=0,004$]), así como el foco gastrointestinal (OR, 13,10 [1,52-112,71; $P=0,019$]) como factores de riesgo independiente para la mortalidad (Tabla 4, artículo 1, capítulo I). En este sentido, la sospecha de foco gastrointestinal puede tener una consideración importante como factor pronóstico en los pacientes con bacteriemia por *K. pneumoniae*. Por último, también observamos diferencias en el perfil de resistencia antibiótica entre *E. coli* y *K. pneumoniae* (Tabla 6, artículo 1, capítulo I). La última presentó mayor resistencia a cefalosporinas de segunda (cefuroxima), tercera (cefotaxima y ceftazidima) y cuarta (cefepime) generación, así como amikacina y colistina. También la producción de BLEE fue mayor en *K. pneumoniae* que en *E. coli*. Sin embargo, la prevalencia de aislados multirresistentes fue similar en ambos patógenos. La mayor producción de BLEE concuerda con la mayor resistencia a cefalosporinas observada a favor de *K. pneumoniae*. En el caso de la colistina, es importante resaltar la diferencia notable observada entre *K. pneumoniae* (16,6%) y *E. coli* (0,5%). Nuestros datos van en consonancia con lo reportado por el programa de vigilancia antimicrobiana SENTRY, donde la resistencia a colistina es mayor en *K. pneumoniae* que en *E. coli* (1,5% vs. 0,2%, respectivamente) (227). Sin embargo, otro estudio mostró que la prevalencia de la resistencia a colistina es ligeramente superior en *E. coli* (0,5%) que en *K. pneumoniae* (0,4%) en España (228). Estas diferencias se pueden deber a los diferentes métodos utilizados para determinar la resistencia a colistina, microdilución en caldo en nuestro caso y tiras de gradiente de concentración en el estudio llevado a cabo por Prim *et al.* (228). Esto hace que los resultados no puedan ser comparables, ya que se ha reportado que los valores de CMI a colistina obtenidos mediante tiras de gradiente de concentración pueden estar subestimados (229). En cuanto a la mayor prevalencia de aislados multirresistentes, un estudio previo llevado a cabo por Tumbarello *et al.* (230) mostró una mayor proporción de cepas multirresistentes en pacientes fallecidos con bacteriemia (43,6% vs. 15,6%) y,

DISCUSIÓN GENERAL

aunque el porcentaje de multirresistencia fue similar al de nuestro estudio (alrededor del 25%), estas diferencias observadas pudieran ser debidas a la inclusión de *P. mirabilis* que hacen estos autores, o a la propia definición de multirresistencia utilizada.

Por otro lado, cuando nos centramos en aquellos pacientes con infección intraabdominal por *E. coli*, también encontramos diferencias en la epidemiología y factores pronósticos relacionados con la mortalidad y el desarrollo de bacteriemia secundaria a infección intraabdominal.

En este caso la mortalidad global de los pacientes con infección intraabdominal fue del 10,4%, más baja que la producida en la bacteriemia por *E. coli* de cualquier foco (18,6%), como se ha reportado previamente en esta Tesis Doctoral. Los pacientes que fallecieron presentaron más comorbilidades, reflejándose en un mayor índice de Charlson y mayor frecuencia de índice de McCabe últimamente o rápidamente fatal que aquellos pacientes que sobrevivieron. También tuvieron un mayor desarrollo de bacteriemia, shock séptico y presencia de dispositivos externos, especialmente CVC transitorio y ventilación mecánica (Tabla 1, artículo 2, capítulo I). En este sentido, el análisis multivariado seleccionó la presencia de bacteriemia (OR, 5,25 [1,25-21,96; $P=0,023$]) y shock séptico (OR, 12,54 [3,17-49,60; $P<0,001$]) como factores de riesgo independientes para la mortalidad en la infección intraabdominal por *E. coli* (Tabla 5, artículo 2, capítulo I). Un estudio llevado a cabo por Riché *et al.* (46), en el que analizaron pacientes quirúrgicos ingresados en la unidad de cuidados intensivos (UCI), mostró como la mortalidad fue mayor en aquellos pacientes con shock séptico frente a los que no desarrollaban shock séptico (35% vs. 8%, respectivamente) (OR, 4.11 [1,78-9,48; $P<0,001$]). Además, en el subgrupo de pacientes que presentaron shock séptico, el origen biliar de la peritonitis fue un factor de riesgo para la mortalidad (OR, 3,50 [1,09-11,70; $P=0,03$]).

Un aspecto que llama especialmente la atención es que el tratamiento empírico fue apropiado en el 100% de los pacientes que fallecieron (Tabla 1, artículo 2, capítulo I), lo que plantea que la muerte de estos pacientes pudo deberse bien a factores no relacionados con el propio tratamiento antibiótico o a problemas subyacentes a las propias características farmacocinéticas/farmacodinámicas de los antibióticos utilizados en este tipo de infecciones. Sería interesante realizar estudios futuros que aclaren esta cuestión.

Debido a que la presencia de bacteriemia fue un factor de riesgo asociado con la mortalidad, decidimos comparar las características clínicas de aquellos pacientes donde se desarrolló bacteriemia a partir de foco intraabdominal frente a aquellos con infección

DISCUSIÓN GENERAL

intraabdominal sin bacteriemia (Tabla 2, artículo 2, capítulo I). Los resultados mostraron que con bacteriemia fueron mayores y tuvieron más comorbilidades, reflejándose en un mayor índice de Charlson y mayor frecuencia de un índice de McCabe últimamente o rápidamente fatal. Entre las comorbilidades destacan la presencia de cáncer metastásico y de enfermedad renal crónica. Un estudio previo (45) ha reportado como el cáncer y la inmunosupresión fueron más frecuentes en aquellos pacientes que desarrollaron bacteriemia frente a los que no la desarrollaron cuando se producía una infección intraabdominal postquirúrgica. Con estos resultados podríamos pensar que la inmunosupresión asociada al cáncer podría favorecer la translocación bacteriana desde el abdomen hacia la sangre, como hemos discutido previamente en este capítulo. Sin embargo, no encontramos una mayor frecuencia de inmunosupresión entre los pacientes bacteriémicos frente a los no bacteriémicos. No obstante consideramos de gran interés realizar estudios posteriores que permitan confirmar esta hipótesis. Las diferencias encontradas entre ambos estudios pueden deberse a los diferentes tipos de pacientes incluidos. Mientras que en nuestro estudio hemos incluido todo tipo de pacientes con infección intraabdominal, en el estudio llevado a cabo por Alqarni *et al.* (45), solo incluyeron pacientes de UCI. Por otro lado, y como es lógico, aquellos pacientes que desarrollaron bacteriemia tuvieron una mayor gravedad de los síntomas, presentando sepsis y shock séptico con mayor frecuencia. Además, también hubo una mayor proporción de pacientes con dispositivos externos, como sonda urinaria y CVC transitorio. Cuando comparamos la mortalidad entre pacientes bacteriémicos y no bacteriémicos, encontramos una diferencia importante en la misma (47% vs. 5,8%, respectivamente, $P < 0,001$). Elevadas tasas de mortalidad también se han reportado en dos estudio previos (41%-62,5%) entre pacientes bacteriémicos con infección intraabdominal (45,231).

En cuanto a los factores de riesgo que se asocian independientemente con el desarrollo de la bacteriemia, el análisis multivariado seleccionó el índice de Charlson (OR, 1,46 [1,10-1,94; $P = 0,009$]), la presencia de dispositivos externos (OR, 16,12 [1,68-154,06; $P = 0,016$]) y el foco biliar de la infección intraabdominal (OR, 6,89 [1,28-37,07; $P = 0,024$]) (Tabla 4, artículo 2, capítulo I). Solo un estudio previo ha reportado factores de riesgo relacionados con el desarrollo de la bacteriemia en pacientes con infección intraabdominal, reportando la presencia de cáncer o inmunosupresión (OR, 2,59 [1,46-4,59; $P < 0,001$]), un índice SOFA elevado (OR, 1,19 [1,02-1,39; $P = 0,002$]) y la presencia de *E. coli* en las muestras peritoneales (OR, 2,10 [1,19-3,73; $P = 0,011$]) (45). Sin

DISCUSIÓN GENERAL

embargo, estos autores incluyen solo pacientes quirúrgicos independientemente del tipo de microorganismo que cause la infección intraabdominal, lo que explicaría las diferencias con nuestro estudio. Hasta donde sabemos, el estudio realizado en esta Tesis Doctoral es el primero que se realiza incluyendo pacientes no seleccionados con infección intraabdominal por *E. coli*, proporcionando una visión más global de las características clínicas y los factores de riesgo en este tipo de infección.

Atendiendo a los resultados obtenidos en el análisis multivariado, parece que la infección biliar es un factor de riesgo para el desarrollo de bacteriemia en pacientes con infección intraabdominal, por lo que consideramos interesante estudiar si existen factores bacterianos específicos que pudieran favorecer este tipo de infección.

Para ello realizamos un análisis clínico, epidemiológico y microbiológico de una cohorte de 15 aislados clínicos de *E. coli* procedentes de 12 pacientes con sospecha de infección biliar. Encontramos que un 20% de los aislados pertenecían a STs desconocidos (Figura 1, Tabla 3, artículo 3, capítulo I), aunque con una combinación de alelos diferente entre ellos. Este porcentaje es más alto que el encontrado en otro tipo de infecciones como ITU (3,5%), bacteriemias (10,5%) y enfermedad inflamatoria intestinal (0%) (28,232,233). Comparando nuestra cohorte con otra cohorte de cepas de *E. coli* no productoras de infección biliar recogidas en el mismo tiempo encontramos como, en este último caso, ninguna de las cepas analizadas pertenecían a STs desconocidos (Tabla S1, artículo 3, capítulo I). Con respecto a otros STs más prevalentes en humanos como son el ST131, ST95, ST73 o ST69, no encontramos en nuestra cohorte un predominio claro de ninguno de ellos. Solo hubo 2 aislados (140-HE y 23-AE), procedentes del mismo paciente, que pertenecían al ST131 y uno de ellos (66-AE) al ST-69. Con todo esto, podemos sospechar que las infecciones biliares por *E. coli* no están asociadas con un clon determinado.

El estudio del perfil de resistencia fenotípico (Tabla 2, artículo 3, capítulo I) y del resistoma (Tabla 5, artículo 3, capítulo I) mostró como las mayores tasas de resistencia en estos aislados se produjeron frente a ampicilina (73,3%), amoxicilina/ácido clavulánico (26,6%), cotrimoxazol (26,6%) y fluoroquinolonas (13,3%). Un estudio llevado a cabo por Razaghi *et al.* (234) en Irán, reportó como las quinolonas se encontraban en el primer lugar en cuanto a resistencia (54%), mientras que ninguno de los aislados fue resistente a amoxicilina/ácido clavulánico. En otro estudio Iraní, Tajeddin *et al.* (235), reportaron la presencia de multiresistencia en el 95,5% de los aislados de *E. coli* causantes de infección biliar, donde la resistencia a cefalosporinas de tercera

DISCUSIÓN GENERAL

generación se situó en un 82%, a carbapenemas en aproximadamente un 70%, a gentamicina en un 36,4% y ciprofloxacino en un 45,5%. Sin embargo, en el estudio SMART llevado a cabo en España entre los años 2016 y 2017 y en el que se analizaron 1429 aislados clínicos de *E. coli* causantes de infección intraabdominal las mayores tasas de resistencia se reportaron para ciprofloxacino (27,6%) y amoxicilina clavulánico (18,5%) (44). Por tanto, podríamos concluir que la tasa de resistencia a los antibióticos es muy variable y probablemente obedezca a la propia epidemiología local más que a factores relacionados con la infección en sí misma.

Con respecto al análisis del viruloma (Tabla 4, artículo 3, capítulo I), cabe destacar dos aspectos. Por un lado, ningún factor de virulencia fue común a todos los aislados, lo que indica que no hay ningún factor de virulencia concreto en *E. coli* que sea imprescindible para causar infección biliar. Por otro lado, se encontró una amplia variedad de factores de virulencia entre los aislados analizados, de los que destacan 3 de ellos por su elevada frecuencia. Dos de estos factores (*sfa* y *fimH*), están implicados en la adhesión celular, lo que facilita la entrada de la bacteria en los tejidos (236). El otro, *gad*, es un factor relevante para el mantenimiento celular en ambientes ácidos como el tracto biliar (237). Dos estudios previos han buscado factores de virulencia relacionados con la infección biliar. En el primero de ellos Wang *et al.* (238), analizando pacientes con colangitis aguda que habían desarrollado bacteriemia por *E. coli*, encontraron que el 88% de las cepas eran portadoras del gen *fimH*, el 50% del gen *iutA*, mientras que solo el 8% portaban el gen *sfa*. En otro estudio, llevado a cabo por Razaghi *et al.* (234), encontraron que *bfp* y *astA* fueron los factores de virulencia más frecuentes en *E. coli* aisladas en muestras biliares, aunque bien es cierto que no analizaron la presencia de factores de virulencia como *fimH*, *sfa* o *gad*.

Por tanto, y como resumen de la discusión del capítulo I, podemos concluir que, pese a no observarse diferencias en la mortalidad cruda entre la bacteriemia por *E. coli* y la bacteriemia por *K. pneumoniae*, sí que existen diferencias tanto en las características clínicas y microbiológicas, como en los factores relacionados con la mortalidad de los pacientes con este tipo de infecciones. En cuanto a la infección intraabdominal por *E. coli*, la presencia de bacteriemia y shock séptico son factores de riesgo asociados a la mortalidad, mientras que el desarrollo de bacteriemia a partir de foco intraabdominal se produce mayoritariamente en pacientes con comorbilidades, que presentan dispositivos externos y con infección del tracto biliar. Centrándonos en esta última, parece ser que en

DISCUSIÓN GENERAL

E. coli no está asociada a un clon determinado y necesita de factores de virulencia relacionados con la adhesión y la supervivencia en presencia de ácidos biliares para producirse. El conocimiento que extrae de todos estos estudios puede servir para entender mejor procesos infecciosos graves como la bacteriemia y la infección intraabdominal, así como para mejorar el manejo clínico de estos pacientes.

Capítulo II: La sobreexpresión de la proteína de membrana externa A (OmpA) como factor de riesgo para la mortalidad en la bacteriemia e infección intraabdominal por *E. coli*.

Continuando con el estudio de los factores de virulencia, en este segundo capítulo hemos analizado el papel de OmpA en la virulencia de *E. coli*. El análisis de una cohorte de 190 pacientes con bacteriemia por *E. coli* ha mostrado que la expresión de OmpA fue mayor en aquellos aislados procedentes de pacientes fallecidos, siendo, además, un factor de riesgo para la mortalidad (Tabla 3, artículo 4, capítulo II). Algunos estudios han sugerido que OmpA juega un importante papel en la muerte de animales cuando se utilizan modelos experimentales de infección por *E. coli* (156,239,240). Por ejemplo, las mutaciones en el los *loops* 1 y 2 de la OmpA en *E. coli* mostró una mayor supervivencia que cuando se utilizó la cepa salvaje en ratones recién nacidos con meningitis por *E. coli* (239). Por otro lado, estudios previos realizados en nuestro grupo han demostrado como la sobreexpresión de OmpA en *A. baumannii* fue un factor de riesgo asociado con el desarrollo de neumonía y bacteriemia, así como con la mortalidad (241). Además, también se ha demostrado como la inhibición de OmpA mediante el uso de un hexapéptido cíclico fue capaz de reducir la diseminación bacteriana entre los órganos, el desarrollo de neumonía y bacteriemia, así como la mortalidad en un modelo experimental murino de sepsis peritoneal por *E. coli* (242).

En otro estudio, como el llevado a cabo por Nicholson *et al.* (154), han demostrado que durante la infección del tracto urinario en ratones, la expresión de OmpA en cepas de *E. coli wild-type* aumenta de 20 a 30 veces. Además, la expresión de OmpA también se ha estudiado en aislados bacteriémicos de *E. coli*, siendo requerida para inducir un alto nivel de bacteriemia (243). Esto sugiere que la OmpA es fundamental para la patogénesis de *E. coli*, pudiendo jugar un papel importante en la persistencia y diseminación de la bacteria hacia la sangre. En este sentido, decidimos evaluar el papel de OmpA en un

DISCUSIÓN GENERAL

modelo experimental murino utilizando aislados clínicos con diferente expresión de OmpA. Los resultados obtenidos muestran como aquellos 2 aislados con mayor expresión de OmpA presentaron una mayor concentración bacteriana en sangre, y en hígado (solo uno de ellos) (Tabla 1, datos adicionales, capítulo II). Por tanto, estos resultados apoyan la hipótesis de que OmpA juega un papel importante en la translocación bacteriana de *E. coli* desde el abdomen hacia la sangre (160).

De acuerdo a los resultados obtenidos en el modelo animal, decidimos estudiar si existía una expresión diferencial de OmpA en los aislados procedentes de una cohorte de 130 pacientes con infección intraabdominal, comparando entre aquellos pacientes bacteriémicos y no bacteriémicos. Los resultados obtenidos no permitieron asociar el desarrollo de bacteriemia con una mayor expresión de OmpA en *E. coli*. Esto podría explicarse por varias razones. Por un lado, el pequeño número de pacientes con bacteriemia secundaria a infección intraabdominal incluidos en el estudio (n=16). Por otro, que los pacientes incluidos en el análisis presenten algunas características clínicas (comorbilidades, tratamiento, etc.) que faciliten el desarrollo de bacteriemia, pudiendo enmascarar el efecto de la expresión de OmpA. Finalmente, pueden existir otros factores de virulencia que también estén relacionados con el desarrollo de bacteriemia como la OmpT, una proteasa que puede contribuir a la virulencia de *E. coli* mediante la inactivación de proteínas implicadas en la defensa del hospedador (244). Esta OMP fue identificada como un factor de virulencia importante predictor de bacteriemia en pacientes veteranos militares (245).

En resumen, la sobreexpresión de OmpA ha demostrado ser un factor de riesgo para la mortalidad en pacientes con bacteriemia por *E. coli*. Sin embargo, y aunque se ha visto que esta sobreexpresión de OmpA favorece la diseminación sanguínea de *E. coli* en un modelo experimental murino, no se ha podido demostrar su papel en el desarrollo de la bacteriemia en pacientes con infección intraabdominal.

Capítulo III: Resistencia de espectro extendido a los betalactámicos en combinación con inhibidores de betalactamasas (ESRI) y desarrollo de un método de detección rápida de resistencia.

DISCUSIÓN GENERAL

El hecho de que existan varios patrones de resistencia a los BL/IBL en *E. coli* (RSS, RRS o RRR) (Figura 1a, artículo 5, capítulo III), nos indujo a pensar que la resistencia a los BL/IBL es un proceso que se produce de forma gradual y unidireccional en *E. coli*, y que piperacilina/tazobactam podría tener un papel clave en esta resistencia de espectro extendido a los BL/IBL, o ESRI, por sus siglas en inglés. Este proceso se confirmó tras la exposición a concentraciones crecientes de piperacilina/tazobactam en aquellos aislados sensibles al mismo, pero con bajo nivel de resistencia a los BL/IBL (RSS o RRS) (Tabla S1, artículo 5, capítulo III). Cabe destacar, que el aumento de la CMI a piperacilina/tazobactam se produjo en paralelo a la concentración creciente de antibiótico utilizada, lo que sugiere la existencia de una relación dosis-respuesta entre la concentración de piperacilina/tazobactam. Por otro lado, la detección de betalactamasas de tipo TEM en los 17 aislados que adquirieron resistencia a piperacilina/tazobactam, y la ausencia en aquellos que no pudieron adquirir resistencia (Tabla S1, artículo 5, capítulo III), nos puso en la pista para sospechar que este tipo de betalactamasas tendrían un papel relevante en este fenómeno. Esto se demostró posteriormente mediante la clonación de diferentes genes bla_{TEM} en una cepa de *E. coli* ATCC 25922 (bla_{TEM} negativa), las cuales aumentaron su actividad betalactamasa (Figura 2a, artículo 5, capítulo III), así como su CMI a piperacilina/tazobactam tras la exposición a ella misma (Tabla S3, artículo 5, capítulo III). Todos estos datos sugieren que la evolución desde una resistencia de bajo nivel a los BL/IBL (RSS) hasta una resistencia de alto nivel (RRR) (ESRI) es un proceso ligado a las betalactamasas de tipo TEM, y que piperacilina/tazobactam es el inductor de este proceso.

Para entender mejor el mecanismo subyacente a este incremento de la CMI a piperacilina/tazobactam, se realizó la secuenciación genómica de dos parejas de aislados clínicos, C1-81 y C2-54, los cuales portaban los genes bla_{TEM-30} y bla_{TEM-1} , respectivamente. Se secuenció tanto el aislado original como el expuesto a piperacilina/tazobactam. Los resultados mostraron dos mecanismos diferentes de adquisición de resistencia. Mientras que en el aislado C1-81 (TEM-30) se produjo una duplicación génica basada en secuencias de inserción de tipo IS26, en el aislado C2-54 (TEM-1) la resistencia se debió a una transposición del gen bla_{TEM} en un plásmido de tipo colE multicopia (Figura 3, artículo 5, capítulo III). Esto va en línea con lo observado previamente por Schechter *et al.* (246), donde la presencia del gen bla_{TEM-1} en una región genómica de 10kb y repetida en tándem se asoció con la resistencia a piperacilina/tazobactam. La existencia de estos dos mecanismos podría deberse a que las

DISCUSIÓN GENERAL

cepas sean portadoras de diferentes tipos de plásmidos, lo que se confirmó posteriormente mediante un análisis del tipo de replicón por PCR, o PBRT (*PCR-based replicon typing*). De estos resultados se deduce que la ESRI se debe a una hiperproducción de betalactamasas de tipo TEM en *E. coli*, la cual está favorecida por la exposición a piperacilina/tazobactam.

Para confirmar esta hipótesis *in vivo*, se utilizaron dos parejas de aislados clínicos de *E. coli* procedentes de dos pacientes. La primera de ellas (C2-49 y C2-54), pertenecientes ambos al ST69, fueron obtenidas a partir de un absceso intraabdominal antes y tras 10 días de tratamiento antibiótico con piperacilina/tazobactam, sin evolución clínica favorable. La otra pareja de aislados (PT3 y PT4), pertenecientes ambas al ST88, se obtuvieron a partir de hemocultivos de un paciente con un absceso perianal y bacteriemia persistente, antes y tras 8 días de tratamiento con piperacilina/tazobactam, sin evolución clínica favorable. La adquisición de resistencia a los BL/IBL, parcial en el caso de la cepa C2-54 (RSS → RRS) y completa en el caso del aislado PT4 (RSS → RRR), sugiere que el tratamiento con piperacilina/tazobactam, especialmente en zonas donde las concentraciones pueden no ser óptimas, puede favorecer el desarrollo de una ESRI.

Los resultados obtenidos en este estudio son relevantes desde el punto de vista clínico, ya que el tratamiento de una infección grave con concentraciones sub-óptimas de piperacilina/tazobactam podría favorecer la aparición de aislados de *E. coli* que desarrollen una ESRI, dando lugar a fracasos terapéuticos. En este sentido, dos estudios clínicos van en línea con nuestra observación. Retamar *et al.* (247) analizaron el impacto de la CMI de piperacilina/tazobactam sobre el pronóstico clínico de pacientes con bacteriemia por *E. coli* productora de BLEE. Encontraron que aquellos aislados con CMIs de piperacilina/tazobactam intermedias (4-8 mg/L) y elevadas (≥ 16 mg/L), que no procedían de foco urinario, se asociaron con mayor mortalidad que aquellos con CMIs bajas (≤ 2 mg/L) (41,1% vs. 0,0%). Recientemente, los resultados del estudio MERINO (*Meropenem vs. Piperacillin-Tazobactam for Definitive Treatment of BSI's Due to Ceftriaxone Non-susceptible Escherichia Coli and Klebsiella spp.*), un ensayo clínico internacional y multicéntrico que compararon el tratamiento con piperacilina/tazobactam o meropenem para la bacteriemia por *E. coli* o *Klebsiella spp.* resistentes a cefalosporinas de tercera generación, mostraron una mortalidad a los 30 días del 12,3% en el brazo de la piperacilina/tazobactam frente a un 3,7% en el brazo del meropenem (248). Los

DISCUSIÓN GENERAL

resultados obtenidos en este ensayo clínico han generado cierto debate sobre sus puntos fuertes y débiles (249).

Debido a que la ESRI es un fenómeno que se produce por una hiperproducción de betalactamasas, nos preguntamos si además de afectar a la combinación BL/IBL, podría afectar a la sensibilidad de otro tipo de BL como las cefalosporinas de 1ª (cefazolina), 2ª (cefuroxima) y 3ª (cefotaxima) generación, o la combinación cefalosporina/IBL (ceftolozano/tazobactam), ya que comparten el mismo inhibidor de betalactamasas que la piperacilina/tazobactam. Nuestros resultados mostraron como, efectivamente, de las tres parejas de aislados estudiadas (C2-49/C2-54, PT3/PT4 y C1-142/C1-142P), se produjo un aumento de la CMI de las cefalosporinas, incluyendo ceftolozano/tazobactam, en dos de ellas (PT4 y C1-142P) (Tabla 1, artículo 5, capítulo III). Además, el aumento de la CMI fue más acusado en las cefalosporinas de primera generación que en las de tercera generación. Llama la atención especialmente el aislado C1-142P, portador de una betalactamasa TEM-135, el cual aumentó su CMI a ceftolozano/tazobactam con respecto al aislado original 8 veces (de 0,19 mg/L a 1,5 mg/L), desarrollando resistencia a este antibiótico según los puntos de corte establecidos por EUCAST (250). En línea con estos resultados, Sun *et al.* (251) observaron una pérdida de actividad en siete cefalosporinas diferentes (incluyendo desde la 1ª a la 4ª generación) en *S. typhimurium* portadora del gen *bla*_{TEM-1} tras la exposición progresiva a cefalotina y cefaclor, cefalosporinas de 1ª y 2ª generación, respectivamente. Los resultados discutidos en este apartado demuestran como la ESRI no solo afecta a la combinación BL/IBL sino también puede afectar a la actividad de las cefalosporinas, solas o en combinación con tazobactam. No obstante, se necesitan estudios adicionales para determinar el impacto real de la piperacilina/tazobactam en la adquisición de resistencia a las cefalosporinas.

Por otro lado, se estudió la presencia de heterorresistencia a piperacilina/tazobactam en dos aislados clínicos de *E. coli*. Las diferencias encontradas en la CMI a piperacilina/tazobactam entre ambos aislados probablemente se deban a la diferente proporción de subpoblaciones resistentes en cada uno de ellos, siendo mayor en el aislado procedente de bilis (C2-23) y menor en el de sangre (C1-140). Los valores resultantes del cociente CMI/CNI demostraron como en ambos aislados este valor fue >8 cuando se utilizó un inóculo elevado (2 McFarland), mostrando una heterorresistencia clara al antibiótico. Sin embargo, cuando se utilizó un inóculo equivalente a 0,5 en la escala de McFarland, en el aislado C1-140 este cociente CMI/CNI fue de 7.90 (heterorresistencia

DISCUSIÓN GENERAL

intermedia) (Figura 2, artículo 6, capítulo III). Esta diferencia puede deberse a la existencia de una mayor proporción de la subpoblación resistente a piperacilina/tazobactam cuando se utilizó un inóculo alto en comparación con el inóculo estándar. Estos resultados subrayan la posibilidad de fracasos terapéuticos debidos a la presencia de cepas heterorresistentes que no sean detectadas por los sistemas automáticos utilizados en la rutina diaria de los laboratorios de microbiología clínica.

Desde el punto de vista clínico, sería de gran interés disponer de herramientas que nos permitan detectar de forma rápida este tipo de resistencia a los BL/IBL, permitiendo establecer un tratamiento antibiótico adecuado en infecciones graves, especialmente en las primeras horas. Sin embargo, hasta este momento no existen sistemas que nos permitan detectar de forma rápida y conjunta tanto la resistencia a piperacilina/tazobactam como el desarrollo de una ESRI en *E. coli*, microorganismo principalmente implicado en infecciones graves como bacteriemias e infecciones intraabdominales. Es por ello que en esta Tesis Doctoral hemos diseñado y validado un sistema de detección rápida, llamado test ESRI, tanto para resistencia a piperacilina/tazobactam como para desarrollo de ESRI en *E. coli*.

Cabe mencionar que, aunque el test ESRI ha sido diseñado para detectar resistencia a piperacilina/tazobactam y el posible desarrollo de una ESRI, se usó ampicilina/sulbactam como antibiótico en lugar de piperacilina/tazobactam (Figura 1, artículo 7, capítulo III). Esto se debe a dos razones principales: i) la resistencia a piperacilina/tazobactam mediada por betalactamasas también conlleva una resistencia a ampicilina/sulbactam, como hemos demostrado previamente en esta Tesis Doctoral y ii) el desarrollo de una ESRI siempre comienza con resistencia a ampicilina/sulbactam, lo que permite detectar la hidrólisis de ampicilina/sulbactam incluso si el aislado es sensible a piperacilina/tazobactam, evitando resultados falsos negativos.

En cuanto al mecanismo de resistencia de estos aislados, este estudio mostró como *bla*_{TEM} fue la betalactamasa detectada con mayor frecuencia tanto en aquellos aislados de *E. coli* resistentes a piperacilina/tazobactam como en los desarrolladores de ESRI. En contra, *bla*_{OXA-1} fue la betalactamasa detectada con menos frecuencia en el grupo de los desarrolladores de ESRI (2,2%), no así en los resistentes a piperacilina/tazobactam, donde se situó en segundo lugar (14,9%) (Tabla 2, Tabla 3, artículo 7, capítulo III). Esto último ha sido reportado previamente en otro estudio llevado a cabo por Livermore *et al.* (191) en el que OXA-1 se asoció estrechamente con la resistencia a piperacilina/tazobactam en

DISCUSIÓN GENERAL

E. coli. En el caso de *bla_{SHV}*, esta se detectó entre un 10 y un 15% en ambos grupos. Cabe destacar que en algunos aislados en los que el test resultó positivo, no se detectó la presencia de ninguna de las betalactamasas estudiadas, lo que sugiere la presencia de otras betalactamasas, como las de tipo AmpC (218).

En cuanto a la validación del test ESRI, los resultados demuestran que es muy sensible y específico, con un alto valor predictivo positivo y negativo, pudiendo detectar todos aquellos aislados resistentes a piperacilina/tazobactam, así como prácticamente todos los que han desarrollado una ESRI (Tabla 4, Tabla 5, artículo 7, capítulo III). Solo hubo dos aislados que no se detectaron cuando el test se realizó tras 6-8h de crecimiento en el frasco de hemocultivo (C1-171 y C1-190) (Tabla 2, artículo 7, capítulo III). Una posible explicación es que la tasa de crecimiento de ambos aislados fuera más baja que el resto de aislados. También podría ocurrir que los aislados no produjeran suficiente cantidad de betalactamasa a las 6-8h de crecimiento. Se necesitan más estudios para confirmar estas hipótesis.

Además del test ESRI, se han desarrollado y/o comercializado otros test de detección rápida de BLEE o carbapenemasas, como el ESBL NDP test (252), Rapidec[®] Carba NP test (253), Nitro-Carba test (254) o el MALDI-TOF MS (255), entre otros. La principal diferencia entre este tipo de métodos y el test ESRI es que este último no solo permite detectar la resistencia a piperacilina/tazobactam, sino también aquellos aislados sensibles a piperacilina/tazobactam pero con capacidad de desarrollar una ESRI.

El test ESRI combina muchas ventajas en relación con los métodos convencionales utilizados en los laboratorios de Microbiología Clínica (Figura 3, artículo 7, capítulo III). Es simple, rápido, barato y, además, permite diferenciar aquellos aislados resistentes a piperacilina/tazobactam (tiempo de detección ≤ 10 min) de aquellos con capacidad de desarrollar ESRI (tiempo de detección > 10 min - 120 min) ($P < 0,001$) (Figura 2, artículo 7, capítulo III). La posibilidad de tener un resultado en solo un par de horas, en comparación a las 24 h que se necesitan utilizando los métodos convencionales, suponen una gran ventaja.

Como todo test diagnóstico, el test ESRI presenta algunas limitaciones. Se ha validado solo en aislados clínicos de *E. coli* que crecen a partir de botellas de hemocultivo, lo que podría limitar su aplicabilidad. Sin embargo, *E. coli* es el principal microorganismo gramnegativo aislado en muestras de sangre, líquido peritoneal y bilis (60), las cuales se procesan normalmente en botellas de hemocultivo en los laboratorios de Microbiología Clínica.

DISCUSIÓN GENERAL

Como conclusión de la discusión de este capítulo, la resistencia a los BL/IBL inducida por piperacilina/tazobactam y dependiente de betalactamasas de tipo TEM parece seguir un camino unidireccional e irreversible, que ha dado lugar a un nuevo concepto de resistencia antimicrobiana llamado ESRI (Figura 4, artículo 5, capítulo III). Este nuevo concepto es muy importante para comprender los mecanismos implicados en la adquisición de resistencia a piperacilina/tazobactam, uno de los antibióticos más utilizados en todo el mundo en el tratamiento empírico de infecciones graves. Por otro lado, el desarrollo del test ESRI puede ser una herramienta muy potente para luchar contra la resistencia a los antibióticos. Este sistema puede suponer una contribución innovadora al diagnóstico microbiológico, permitiendo obtener información sobre el posible desarrollo de resistencias a los BL/IBL en menos de 24 h, lo que mejoraría el pronóstico clínico tanto en supervivencia como en ausencia de recurrencia por microorganismos resistentes, así como un impacto económico positivo en el sistema sanitario.

VII. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Capítulo I

1. La bacteriemia por *E. coli* es mayormente de adquisición comunitaria, de foco urinario y se asocia con cáncer, mientras que la bacteriemia por *K. pneumoniae* es mayormente de adquisición nosocomial y de foco respiratorio o asociada a catéter, y se asocia con más control del foco.
2. La presencia de bacteriemia y shock séptico son factores de riesgo para la mortalidad en los pacientes con infección intraabdominal por *E. coli*.
3. Un mayor índice de Charlson, la presencia de dispositivos externos y el origen biliar de la infección intraabdominal son factores de riesgo para el desarrollo de bacteriemia en los pacientes con infección intraabdominal por *E. coli*.
4. La infección biliar por *E. coli* parece depender de factores de virulencia relacionados con la adhesión y la supervivencia en medio ácido.

Capítulo II

5. La sobreexpresión de OmpA es un factor de riesgo asociado con la mortalidad en los pacientes con bacteriemia por *E. coli*.
6. No existen diferencias en la expresión de OmpA entre los aislados de *E. coli* de pacientes con infección intraabdominal bacteriémica y no bacteriémica.
7. Los aislados de *E. coli* que sobreexpresan OmpA presentan mayor carga bacteriana en sangre en el modelo murino de sepsis peritoneal.

Capítulo III

8. Existe un patrón de resistencia a los BL/IBL en *E. coli* que es gradual y unidireccional, desde ampicilina/sulbactam hasta piperacilina/tazobactam, pasando por amoxicilina/clavulánico, denominado “resistencia de espectro extendido a los BL/IBL” o “ESRI”.
9. La evolución hacia una ESRI es un proceso ligado a un aumento en la expresión de betalactamasas, principalmente de tipo TEM, teniendo piperacilina/tazobactam un papel inductor en este proceso.
10. La ESRI puede afectar no solo a los BL/IBL sino a otro tipo de BL como las cefalosporinas.

CONCLUSIONES

11. El tratamiento con piperacilina/tazobactam podría dar lugar a fracasos terapéuticos por la aparición de aislados de *E. coli* que hayan desarrollado una ESRI.
12. *E. coli* ST131 productor de *bla*_{TEM} presenta heteroresistencia a piperacilina/tazobactam.
13. El test ESRI es un sistema de detección rápida tanto de resistencia a piperacilina/tazobactam como de posible desarrollo de ESRI en *E. coli*, el cual ha demostrado tener una elevada sensibilidad y especificidad así como valores predictivos positivo y negativo.
14. El test ESRI podría ser muy útil en el diagnóstico microbiológico de las infecciones graves por *E. coli*, para incidir directamente en las decisiones terapéuticas y, por tanto, en el pronóstico clínico del paciente.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Brenner D., Farmer J., Family I. *Enterobacteriaceae*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Springer (Ed). New York, USA, 587-607. 2005.
2. Adeolu M., Alnajar S., Naushad S., Gupta RS. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2016;66:5575–99.
3. Strockbine N., Bopp C., Fields P., Kaper J., Nataro J. *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. In: Manual of Clinical Microbiology. ASM Press (Ed). USA, 685-712. 2015.
4. Farmer JJ., Fanning G.R., Davis B.R., O'Hara C.M., Riddle C., Hickman-Brenner FW., Asbury M.A., Lowery V.A., Brenner D.J. *Escherichia fergusonii* and *Enterobacter taylorae*, two new species of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 1985;21:77–81.
5. Brenner D.J., Davis B.R., Steigerwalt A.G., Riddle C.F., McWhorter A.C., Allen S.D., Farmer J.J., Saitoh Y., Fanning G.R. Atypical biogroups of *Escherichia coli* found in clinical specimens and description of *Escherichia hermannii* sp. nov. *J Clin Microbiol*. 1982;15:703–13.
6. Liu S., Jin D., Lan R., Wang Y., Meng Q., Dai H., Lu S., Hu S., Xu J. *Escherichia marmotae* sp. nov., isolated from faeces of *Marmota himalayana*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2015;65:2130–4.
7. Brenner D.J., McWhorter A.C., Knutson J.K., Steigerwalt A.G. *Escherichia vulneris*: a new species of *Enterobacteriaceae* associated with human wounds. *J Clin Microbiol*. 1982;15:1133–40.
8. Huys G., Cnockaert M., Janda J., Swings J. *Escherichia albertii* sp. nov., a diarrhoeagenic species isolated from stool specimens of Bangladeshi children. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003;53:807–10.
9. Trevisan V. Sul micrococco della rabbia e sulla possibilita di riconoscere durante il periode d'incubazione, dall'essame del sangue della persona moricata, se ha contratta l'infezione rabbica. *Rend Ist Lombardo*. 1887;20:88–105.
10. Podschun R., Ullmann U. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11:589–603.

BIBLIOGRAFÍA

11. Tindall B.J., Sutton G., Garrity G.M. *Enterobacter aerogenes* Hormaeche and Edwards 1960 (Approved Lists 1980) and *Klebsiella mobilis* Bascomb *et al.* 1971 (Approved Lists 1980) share the same nomenclatural type (ATCC 13048) on the Approved Lists and are homotypic synonyms, with consequences for the name *Klebsiella mobilis* Bascomb *et al.* 1971 (Approved Lists 1980). *Int J Syst Evol Microbiol.* 2017;67:502–4.
12. Bagley ST. Habitat association of *Klebsiella* species. *Infect Control IC.* 1985;6:52–8.
13. Rock C., Thom K.A., Masnick M, Johnson JK, Harris AD, Morgan DJ. Frequency of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing and non-KPC-producing *Klebsiella* species contamination of healthcare workers and the environment. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2014;35:426–9.
14. Forsythe S., Abbott S., Pitout J. *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Cronobacter*, *Serratia*, *Plesiomonas*, and other *Enterobacteriaceae*. In: *Manual of Clinical Microbiology.* ASM Press (Ed). USA, 714-737. 2015.
15. Paczosa M.K., Mecsas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the offense with a strong defense. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR.* 2016;80:629–61.
16. Nataro J.P., Kaper J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11:142–201.
17. Manges A.R., Geum H.M., Guo A., Edens T.J., Fibke C.D., Pitout J.D.D. Global extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) lineages. *Clin Microbiol Rev.* 2019;32:e00135-18.
18. Russo T.A., Johnson J.R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis.* 2000;181:1753–4.
19. Dale A.P., Woodford N. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): Disease, carriage and clones. *J Infect.* 2015;71:615–26.
20. Tsay R.W., Siu L.K., Fung C.P., Chang F.Y. Characteristics of bacteremia between community-acquired and nosocomial *Klebsiella pneumoniae* infection: risk factor for mortality and the impact of capsular serotypes as a herald for community-acquired infection. *Arch Intern Med.* 2002;162:1021–7.
21. Meatherall B.L., Gregson D., Ross T., Pitout J.D.D., Laupland K.B. Incidence, risk factors, and outcomes of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Am J Med.* 2009;122:866–73.

BIBLIOGRAFÍA

22. Korvick J.A., Hackett A.K., Yu V.L., Muder R.R. *Klebsiella pneumoniae* in the modern era: clinicroadiographic correlations. *South Med J.* 1991;84:200–4.
23. Wirth T., Falush D., Lan R., Colles F., Mensa P., Wieler L.H., Karch H., Reeves P.R., Maiden M.C., Ochman H., Achtman M. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol.* 2006;60:1136–51.
24. Diancourt L., Passet V., Verhoef J., Grimont P.A.D., Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol.* 2005;43:4178–82.
25. Salvador E., Wagenlehner F., Köhler C.D., Mellmann A., Hacker J., Svanborg C., Dobrindt U. Comparison of asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* isolates from healthy individuals versus those from hospital patients shows that long-term bladder colonization selects for attenuated virulence phenotypes. *Infect Immun.* 2012;80:668–78.
26. Banerjee R., Johnston B., Lohse C., Chattopadhyay S., Tchesnokova V., Sokurenko E.V., Johnson J.R. The clonal distribution and diversity of extraintestinal *Escherichia coli* isolates vary according to patient characteristics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57:5912–7.
27. Jauregui F., Landraud L., Passet V., Diancourt L., Frapy E., Guigon G., Carbonnelle E., Lortholary O., Clermont O., Denamur D., Picard B., Nassif X., Brisse S. Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics.* 2008;9:560.
28. Adams-Sapper S., Diep B.A., Perdreau-Remington F., Riley L.W. Clonal composition and community clustering of drug-susceptible and -resistant *Escherichia coli* isolates from bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57:490–7.
29. Nicolas-Chanoine M.H., Bertrand X., Madec J.Y. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27:543–74.
30. Wyres K.L., Holt K.E. *Klebsiella pneumoniae* population genomics and antimicrobial-resistant clones. *Trends Microbiol.* 2016;24:944–56.
31. Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene. Estudio EPINE-EPPS 2018. Informe global de España. 2018.
32. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report for 2016. Healthcare-associated infections: surgical site infections. 2018.

BIBLIOGRAFÍA

33. Solomkin J.S., Mazuski J.E., Bradkey J.S., Rodvold K.A., Goldstein E.J.C., Baron E.J., O'Neill P.J., Chow A.W., Dellinger E.P., Eachempati S.R., Gorbach S., Hilfiker M., May A.K., Nathens A.B., Sawyer R.G., Bartlett J.G. Diagnosis and management of complicated intra-abdominal infection in adults and children: guidelines by the Surgical Infection Society and the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2010;50:133–64.
34. Williamson D.A., Lim A., Wiles S., Roberts S.A., Freeman J.T. Population-based incidence and comparative demographics of community-associated and healthcare-associated *Escherichia coli* bloodstream infection in Auckland, New Zealand, 2005-2011. *BMC Infect Dis*. 2013;13:385.
35. Laupland K.B., Gregson D.B., Church D.L., Ross T., Pitout J.D.D. Incidence, risk factors and outcomes of *Escherichia coli* bloodstream infections in a large Canadian region. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14:1041–7.
36. Al-Hasan M.N., Lahr B.D., Eckel-Passow J.E., Baddour L.M. Antimicrobial resistance trends of *Escherichia coli* bloodstream isolates: a population-based study, 1998-2007. *J Antimicrob Chemother*. 2009;64:169–74.
37. Kennedy K.J., Roberts J.L., Collignon P.J. *Escherichia coli* bacteraemia in Canberra: incidence and clinical features. *Med J Aust*. 2008;188:209–13.
38. Morales-Barroso I., López-Cerero L., Molina J., Bellido M., Navarro M.D., Serrano L., González-Galán V., Praena J., Pascual A., Rodríguez-Baño J. Bacteraemia due to non-ESBL-producing *Escherichia coli* O25b:H4 sequence type 131: insights into risk factors, clinical features and outcomes. *Int J Antimicrob Agents*. 2017;49:498–502.
39. Abernethy J.K., Johnson A.P., Guy R., Hinton N., Sheridan E.A., Hope R.J. Thirty day all-cause mortality in patients with *Escherichia coli* bacteraemia in England. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21:251.e1-8.
40. Courpon-Claudinon A., Lefort A., Panhard X., Clermont O., Dornic Q., Fantin B., Mentré F., Wolff M., Denamur E., Branger C., COLIBAFI Group. Bacteraemia caused by third-generation cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in France: prevalence, molecular epidemiology and clinical features. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17:557–65.
41. Cisneros-Herreros J.M., Cobo-Reinoso J., Pujol-Rojo M., Rodríguez-Baño J., Salavert-Lletí M. Guía para el diagnóstico y tratamiento del paciente con bacteriemia. Guías de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y

BIBLIOGRAFÍA

- Microbiología Clínica (SEIMC). *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. 2007;25:111–30.
42. Hayajneh W.A., Hajj A., Hulliel F., Sarkis D.K., Irani-Hakimeh N., Kazan L., Badal R.E. Susceptibility trends and molecular characterization of gram-negative bacilli associated with urinary tract and intra-abdominal infections in Jordan and Lebanon: SMART 2011-2013. *Int J Infect Dis*. 2015;35:56–61.
43. Koksall I., Yilmaz G., Unal S., Zarakolu P., Korten V., Mulazimoglu L., Tabak F., Mete B., Oguz V.A, Gulay Z., Alp E., Badal R., Lob S. Epidemiology and susceptibility of pathogens from SMART 2011-12 Turkey: evaluation of hospital-acquired versus community-acquired urinary tract infections and ICU- versus non-ICU-associated intra-abdominal infections. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72:1364–72.
44. Cantón R., Loza E., Aznar J., Castillo F.J., Cercenado E., Fraile-Ribot P.A., González-Romo F., López-Hontangas J.L., Rodríguez-Lozano J., Suárez-Barrenchea A.I., Tubau F., Díaz-Regañón J., López-Mendoza D., SMART-Spain Working Group. Monitoring the antimicrobial susceptibility of gram-negative organisms involved in intraabdominal and urinary tract infections recovered during the SMART study (Spain, 2016 and 2017). *Rev Esp Quimioter*. 2019;32:145–55.
45. Alqarni A., Kantor E., Grall N., Tanaka S., Zappella N., Godement M., Ribeiro-Parenti L., Tran-Dinh A., Montravers P. Clinical characteristics and prognosis of bacteraemia during postoperative intra-abdominal infections. *Crit Care*. 2018;22:175.
46. Riché F.C., Dray X., Laisné M.J., Matéo J., Raskine L., Sanson-Le Pors M.J., Payen D., Valleur P., Cholley B.P. Factors associated with septic shock and mortality in generalized peritonitis: comparison between community-acquired and postoperative peritonitis. *Crit Care*. 2009;13:R99.
47. Montravers P., Augustin P., Grall N., Desmard M., Allou N., Marmuse J.P., Guglielminotti J. Characteristics and outcomes of anti-infective de-escalation during health care-associated intra-abdominal infections. *Crit Care*. 2016;20:83.
48. Lai E.C., Mok F.P., Tan E.S., Lo C.M., Fan S.T., You K.T., Wong J. Endoscopic biliary drainage for severe acute cholangitis. *N Engl J Med*. 1992;326:1582–6.
49. Englesbe M.J., Dawes L.G. Resistant pathogens in biliary obstruction: importance of cultures to guide antibiotic therapy. *HPB*. 2005;7:144–8.

BIBLIOGRAFÍA

50. Leung J.W., Liu Y., Lau G.C., Chan R.C., Lai A.C., Ling T.K., Cheng A.F. Bacteriologic analyses of bile and brown pigment stones in patients with acute cholangitis. *Gastrointest Endosc.* 2001;54:340–5.
51. Al-Hasan M.N., Lahr B.D., Eckel-Passow J.E., Baddour L.M. Epidemiology and outcome of *Klebsiella* species bloodstream infection: a population-based study. *Mayo Clin Proc.* 2010;85:139–44.
52. Chetcuti Z.S., Azzopardi N., Sant J. Mortality risk score for *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia. *Eur J Intern Med.* 2014;25(6):571–6.
53. Marra A.R., Wey S.B., Castelo A., Gales A.C., Cal R.G., Filho J.R., Edmond M.B., Pereira C.A. Nosocomial bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae*: impact of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) production on clinical outcome in a hospital with high ESBL prevalence. *BMC Infect Dis.* 2006;6:24.
54. Mosqueda-Gómez J.L., Montaña-Loza A., Rolón A.L., Cervantes C., Bobadilla-del-Valle J.M., Silva-Sánchez J., Garza-Ramos U., Villasís-Keever A., Galindo-Fraga A., Palacios G.M., Ponce-de-León A., Sifuentes-Osornio J. Molecular epidemiology and risk factors of bloodstream infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* A case-control study. *Int J Infect Dis.* 2008;12:653–9.
55. Peña C., Pujol M., Ardanuy C., Ricart A., Pallarés R., Liñares J., Ariza J., Gudiol F. An outbreak of hospital-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia, including strains producing extended-spectrum beta-lactamase. *J Hosp Infect.* 2001;47:53–9.
56. Jones R.N. Microbial aetiologies of hospital-acquired bacterial pneumonia and ventilator-associated bacterial pneumonia. *Clin Infect Dis.* 2010;51:S81-87.
57. Cheng D.L., Liu Y.C., Yen M.Y., Liu C.Y., Wang R.. Septic metastatic lesions of pyogenic liver abscess. Their association with *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in diabetic patients. *Arch Intern Med.* 1991;151:1557–9.
58. Liu Y.C., Cheng D.L., Lin C.L. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess associated with septic endophthalmitis. *Arch Intern Med.* 1986;146:1913–6.
59. Shon A.S., Bajwa R.P.S., Russo T.A. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. *Virulence.* 2013 Feb;4:107–18.
60. Vila J., Sáez-López E., Johnson J.R., Römling U., Dobrindt U., Cantón R., Giske C.G., Naas T., Carattoli A., Martínez-Medina M., Bosch J., Retamar P., Rodríguez-Baño J., Baquero F., Soto S.M. *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. *FEMS Microbiol Rev.* 2016;40:437–63.

BIBLIOGRAFÍA

61. Magiorakos A.P., Srinivasan A., Carey R.B., Carmeli Y., Falagas M.E., Giske C.G., Harbarth S., Hindler J.F., Kahlmeter G., Olsson-Liljequist B., Paterson D.L., Rice L.B., Stelling J., Struelens M.J., Vatopoulos A., Weber J.T., Monnet D.L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:268–81.
62. O’Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. Review on Antimicrobial Resistance. 2016.
63. Poirel L., Madec J.Y., Lupo A., Schink A.K., Kieffer N., Nordmann P., Schwarz S. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr.* 2018;6:1-27.
64. Navon-Venezia S., Kondratyeva K., Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2017;41:252–75.
65. Giani T., Pini B., Arena F., Conte V., Bracco S., Migliavacca R., AMCLI-CRE Survey Participants, Pantosti A., Pagani L., Luzzaro F., Rossolini G.M. Epidemic diffusion of KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy: results of the first countrywide survey, 15 May to 30 June 2011. *Euro Surveill.* 2013;18:pi20489.
66. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Surveillance of antimicrobial resistance in Europe. 2017.
67. Kalman D., Barriere S.L.. Review of the pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use of cephalosporins. *Tex Heart Inst J.* 1990;17:203–15.
68. Wilson W.R. The role of fourth-generation cephalosporins in the treatment of serious infectious diseases in hospitalized patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1998;31:473–7.
69. Hawkey P.M., Warren R.E., Livermore D.M., McNulty C.A.M., Enoch D.A., Otter J.A., Wilson A.P. Treatment of infections caused by multidrug-resistant gram-negative bacteria: report of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy/Healthcare Infection Society/British Infection Association Joint Working Party. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73:2–78.
70. Cluck D., Lewis P., Stayer B., Spivey J., Moorman J. Ceftolozane-tazobactam: a new-generation cephalosporin. *Am J Health-Syst Pharm.* 2015;72:2135–46.
71. Papp-Wallace K.M., Endimiani A., Taracila M.A., Bonomo R.A. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:4943–60.

BIBLIOGRAFÍA

72. Shah P.M. Parenteral carbapenems. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14:175–80.
73. Paterson D.L., Bonomo R.A. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18:657–86.
74. Pitout J.D., Laupland K.B. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis.* 2008;8:159–66.
75. Hawkey P.M., Livermore D.M. Carbapenem antibiotics for serious infections. *BMJ.* 2012;344:3236.
76. Nordmann P. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: overview of a major public health challenge. *Med Mal Infect.* 2014;44:51–6.
77. Sfeir M.M., Askin G., Christos P. Beta-lactam/beta-lactamase inhibitors versus carbapenem for bloodstream infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: systematic review and meta-analysis. *Int J Antimicrob Agents.* 2018;52:554–70.
78. Tamma P.D., Rodriguez-Baño J. The use of noncarbapenem β -Lactams for the treatment of extended-spectrum β -Lactamase infections. *Clin Infect Dis.* 2017;64:972–80.
79. Drawz S.M., Bonomo R.A. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23:160–201.
80. English A.R., Retsema J.A., Girard A.E., Lynch J.E., Barth W.E. CP-45,899, a beta-lactamase inhibitor that extends the antibacterial spectrum of beta-lactams: initial bacteriological characterization. *Antimicrob Agents Chemother.* 1978;14:414–9.
81. Campoli-Richards D.M., Brogden R.N. Sulbactam/ampicillin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties, and therapeutic use. *Drugs.* 1987;33:577–609.
82. Bush L.M., Johnson C.C. Ureidopenicillins and beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations. *Infect Dis Clin North Am.* 2000;14:409–33.
83. Retsema J.A., English A.R., Girard A., Lynch J.E., Anderson M., Brennan L., Cimochofski C., Faiella J., Norcia W., Sawyer P. Sulbactam/ampicillin: in vitro spectrum, potency, and activity in models of acute infection. *Rev Infect Dis.* 1986;8:528-34.
84. Wexler H.M., Harris B., Carter W.T., Finegold S.M. *In vitro* efficacy of sulbactam combined with ampicillin against anaerobic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985;27:876–8.

BIBLIOGRAFÍA

85. Adnan S., Paterson D.L., Lipman J., Roberts J.A. Ampicillin/sulbactam: its potential use in treating infections in critically ill patients. *Int J Antimicrob Agents*. 2013;42:384–9.
86. Reading C., Cole M. Clavulanic acid: a beta-lactamase-inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1977;11:852–7.
87. White A.R., Kaye C., Poupard J., Pypstra R., Woodnutt G., Wynne B. Augmentin (amoxicillin/clavulanate) in the treatment of community-acquired respiratory tract infection: a review of the continuing development of an innovative antimicrobial agent. *J Antimicrob Chemother*. 2004;53:3-20.
88. Ball P. The clinical development and launch of amoxicillin/clavulanate for the treatment of a range of community-acquired infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2007;30:113–7.
89. Fisher J., Belasco J.G., Charnas R.L., Khosla S., Knowles J.R. Beta-lactamase inactivation by mechanism-based reagents. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1980;289:309–19.
90. Livermore D.M. Beta-lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. *J Antimicrob Chemother*. 1998;41:25–41.
91. Jones R.N., Pfaller M.A., Fuchs P.C., Aldridge K., Allen S.D., Gerlach E.H. Piperacillin/tazobactam (YTR 830) combination. Comparative antimicrobial activity against 5889 recent aerobic clinical isolates and 60 *Bacteroides fragilis* group strains. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1989;12:489–94.
92. Vazquez-Guillamet M.C., Vazquez R., Micek S.T., Kollef M.H. Predicting resistance to piperacillin-tazobactam, cefepime and meropenem in septic patients with bloodstream infection due to gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis*. 2017;65:1607–14.
93. Perry C.M., Markham A. Piperacillin/Tazobactam: an updated review of its use in the treatment of bacterial infections. *Drugs*. 1999;57:805–43.
94. Gin A., Dilay L., Karlowsky J.A., Walkty A., Rubinstein E., Zhanel G.G. Piperacillin-tazobactam: a beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combination. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2007;5:365–83.
95. Sader H.S., Castanheira M., Flamm R.K., Farrell D.J., Jones R.N. Antimicrobial activity of ceftazidime-avibactam against gram-negative organisms collected from U.S. medical centers in 2012. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58:1684–92.

BIBLIOGRAFÍA

96. Citron D.M., Tyrrell K.L., Merriam V., Goldstein E.J.C. *In vitro* activity of ceftazidime-NXL104 against 396 strains of beta-lactamase-producing anaerobes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:3616–20.
97. Docquier J.D., Mangani S. An update on β -lactamase inhibitor discovery and development. *Drug Resist Updat.* 2018;36:13–29.
98. Scott L.J. Ceftolozane/Tazobactam: A review in complicated intra-abdominal and urinary tract infections. *Drugs.* 2016;76:231–42.
99. Hacker J., Carniel E. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Rep.* 2001;2:376–81.
100. Kline K.A., Fälker S., Dahlberg S., Normark S., Henriques-Normark B. Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell Host Microbe.* 2009;5:580–92.
101. Hayward R.D., Leong J.M., Koronakis V., Campellone K.G. Exploiting pathogenic *Escherichia coli* to model transmembrane receptor signalling. *Nat Rev Microbiol.* 2006;4:358–70.
102. Bouguénéec C.L. Adhesins and invasins of pathogenic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol.* 2005;295:471–8.
103. Servin AL. Pathogenesis of human diffusely adhering *Escherichia coli* expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): current insights and future challenges. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27:823–69.
104. Waksman G., Hultgren S.J. Structural biology of the chaperone-usheer pathway of pilus biogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7:765–74.
105. Zav'yalov V., Zavialov A., Zav'yalova G., Korpela T. Adhesive organelles of gram-negative pathogens assembled with the classical chaperone/usheer machinery: structure and function from a clinical standpoint. *FEMS Microbiol Rev.* 2010 May;34:317–78.
106. Soto G.E., Hultgren S.J. Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *J Bacteriol.* 1999;181:1059–71.
107. Fronzes R., Remaut H., Waksman G. Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in gram-negative bacteria. *EMBO J.* 2008;27:2271–80.
108. Holland I.B., Schmitt L., Young J. Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway. *Mol Membr Biol.* 2005;22:29–39.

BIBLIOGRAFÍA

109. Lai Y., Rosenshine I., Leong J.M., Frankel G. Intimate host attachment: enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol.* 2013;15:1796–808.
110. Voth D.E., Broederdorf L.J., Graham J.G. Bacterial type IV secretion systems: versatile virulence machines. *Future Microbiol.* 2012;7:241–57.
111. Henderson I.R., Navarro-Garcia F., Desvaux M., Fernandez R.C., Ala'Aldeen D. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004;68:692–744.
112. Monteiro-Neto V., Bando S.Y., Moreira-Filho C.A., Girón J.A. Characterization of an outer membrane protein associated with haemagglutination and adhesive properties of enteroaggregative *Escherichia coli* O111:H12. *Cell Microbiol.* 2003;5:533–47.
113. Flemming H.C., Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8:623–33.
114. Fux C.A., Costerton J.W., Stewart P.S., Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.* 2005;13:34–40.
115. Franklin M.J., Chang C., Akiyama T., Bothner B. New technologies for studying biofilms. *Microbiol Spectr.* 2015;3(4).
116. Lee H.W., Koh Y.M., Kim J., Lee J.C., Lee Y.C., Seol S.Y., Cho D.T., Kim J. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14:49–54.
117. Villegas M.V., Hartstein A.I. *Acinetobacter* outbreaks, 1977-2000. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2003;24:284–95.
118. Korea C.G., Badouraly R., Prevost M.C., Ghigo J.M., Beloin C. *Escherichia coli* K-12 possesses multiple cryptic but functional chaperone-usher fimbriae with distinct surface specificities. *Environ Microbiol.* 2010;12:1957–77.
119. Ghigo J.M. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature.* 2001;412:442–5.
120. Ong C.L.Y., Beatson S.A., McEwan A.G., Schembri M.A. Conjugative plasmid transfer and adhesion dynamics in an *Escherichia coli* biofilm. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75:6783–91.

BIBLIOGRAFÍA

121. Bokranz W., Wang X., Tschäpe H., Römling U. Expression of cellulose and curli fimbriae by *Escherichia coli* isolated from the gastrointestinal tract. *J Med Microbiol.* 2005;54:1171–82.
122. Kai-Larsen Y., Lüthje P., Chromek M., Peters V., Wang X., Holm A., Kádas L., Hedlund K.O., Johansson J., Chapman M.R., Jacobson S.H., Römling U., Agerberth B., Brauner A. Uropathogenic *Escherichia coli* modulates immune responses and its curli fimbriae interact with the antimicrobial peptide LL-37. *PLoS Pathog.* 2010;6:e1001010.
123. Wang X., Rochon M., Lamprokostopoulou A., Lünsdorf H., Nimtz M., Römling U. Impact of biofilm matrix components on interaction of commensal *Escherichia coli* with the gastrointestinal cell line HT-29. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63:2352–63.
124. Monteiro D.R., Gorup L.F., Takamiya A.S., Ruvollo-Filho A.C., de Camargo E.R., Barbosa D.B. The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. *Int J Antimicrob Agents.* 2009;34:103–10.
125. Lamprokostopoulou A., Monteiro C., Rhen M., Römling U. Cyclic di-GMP signalling controls virulence properties of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium at the mucosal lining. *Environ Microbiol.* 2010;12:40–53.
126. Paul R., Weiser S., Amiot N.C., Chan C., Schirmer T., Giese B., Jenal U. Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel diguanylate cyclase output domain. *Genes Dev.* 2004;18:715–27.
127. Simm R., Morr M., Kader A., Nimtz M., Römling U. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol Microbiol.* 2004;53:1123–34.
128. Tischler A.D., Camilli A. Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Mol Microbiol.* 2004;53:857–69.
129. Jackson D.W., Suzuki K., Oakford L., Simecka J.W., Hart M.E., Romeo T. Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2002;184:290–301.
130. Navarro-Garcia F., Ruiz-Perez F., Larzabal M., Cataldi A. Secretion systems of pathogenic *Escherichia coli*. In: *Escherichia coli* in the Americas. Springer (Ed), Switzerland, 221–49. 2016.

BIBLIOGRAFÍA

131. Costa T.R., Felisberto-Rodrigues C., Meir A., Prevost M.S., Redzej A., Trokter M., Waksman G. Secretion systems in gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nat Rev Microbiol.* 2015;13:343–59.
132. Lüthje P., Brauner A. Virulence factors of uropathogenic *E. coli* and their interaction with the host. *Adv Microb Physiol.* 2014;65: 337–72.
133. Wang X., Quinn P.J. Lipopolysaccharide: biosynthetic pathway and structure modification. *Prog Lipid Res.* 2010;49:97–107.
134. Bien J., Sokolova O., Bozko P. Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. *Int J Nephrol.* 2012;2012:681473.
135. Emody L., Kerényi M., Nagy G. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents.* 2003;22:29–33.
136. Somerville J.E., Cassiano L., Darveau R.P. *Escherichia coli msbB* gene as a virulence factor and a therapeutic target. *Infect Immun.* 1999;67:6583–90.
137. Island M.D., Cui X., Foxman B., Marrs C.F., Stamm W.E., Stapleton A.E., Warren J.W. Cytotoxicity of hemolytic, cytotoxic necrotizing factor 1-positive and -negative *Escherichia coli* to human T24 bladder cells. *Infect Immun.* 1998;66:3384–9.
138. Bhakdi S., Greulich S., Muhly M., Eberspächer B., Becker H., Thiele A., Hugo F. Potent leukocidal action of *Escherichia coli* hemolysin mediated by permeabilization of target cell membranes. *J Exp Med.* 1989;169:737–54.
139. Smith Y.C., Rasmussen S.B., Grande K.K., Conran R.M., O'Brien A.D. Hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli* evokes extensive shedding of the uroepithelium and hemorrhage in bladder tissue within the first 24 hours after intraurethral inoculation of mice. *Infect Immun.* 2008;76:2978–90.
140. Dhakal B.K., Mulvey M.A. The UPEC pore-forming toxin α -hemolysin triggers proteolysis of host proteins to disrupt cell adhesion, inflammatory, and survival pathways. *Cell Host Microbe.* 2012;11:58–69.
141. Boquet P. The cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1) from *Escherichia coli*. *Toxicon.* 2001;39:1673–80.
142. Hertting O, Chromek M, Slamová Z, Kádas L, Söderkvist M, Vainumäe I, Tallvik T, Jacobson S.H., Brauner A. Cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1) induces an inflammatory response in the urinary tract in vitro but not in vivo. *Toxicon.* 2008 Jun 15;51(8):1544–7.

BIBLIOGRAFÍA

143. Falzano L., Quaranta M.G., Travaglione S., Filippini P., Fabbri A., Viora M., Donelli G, Fiorentini C. Cytotoxic necrotizing factor 1 enhances reactive oxygen species-dependent transcription and secretion of proinflammatory cytokines in human uroepithelial cells. *Infect Immun.* 2003;71:4178–81.
144. Garcia T.A., Ventura C.L., Smith M.A., Merrell D.S., O'Brien A.D. Cytotoxic necrotizing factor 1 and hemolysin from uropathogenic *Escherichia coli* elicit different host responses in the murine bladder. *Infect Immun.* 2013;81:99–109.
145. Rippere-Lampe K.E., O'Brien A.D., Conran R., Lockman H.A. Mutation of the gene encoding cytotoxic necrotizing factor type 1 (*cnf1*) attenuates the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 2001;69:3954–64.
146. Ferreira D., Seca A.M.L., Pinto D.C.G.A., Silva A.M.S. Targeting human pathogenic bacteria by siderophores: a proteomics review. *J Proteomics.* 2016;145:153–66.
147. Holden V.I., Bachman M.A. Diverging roles of bacterial siderophores during infection. *Met Integr Biometal Sci.* 2015;7:986–95.
148. Garénaux A., Caza M., Dozois C.M. The ins and outs of siderophore mediated iron uptake by extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Vet Microbiol.* 2011;153:89–98.
149. Fairman J.W., Noinaj N., Buchanan S.K. The structural biology of β -barrel membrane proteins: a summary of recent reports. *Curr Opin Struct Biol.* 2011;21:523–31.
150. Rollauer S.E., Soorshjani M.A., Noinaj N., Buchanan S.K. Outer membrane protein biogenesis in gram-negative bacteria. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2015;370: pii20150023.
151. Smith S.G, Mahon V., Lambert M.A., Fagan R.P. A molecular swiss army knife: OmpA structure, function and expression. *FEMS Microbiol Lett.* 2007;273:1–11.
152. Koebnik R., Locher K.P., Van Gelder P. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol.* 2000 ;37:239–53.
153. Meier C., Oelschlaeger T.A., Merkert H., Korhonen T.K., Hacker J. Ability of *Escherichia coli* isolates that cause meningitis in newborns to invade epithelial and endothelial cells. *Infect Immun.* 1996;64:2391–9.
154. Prasadarao N.V., Wass C.A., Weiser J.N., Stins M.F., Huang S.H., Kim K.S. Outer membrane protein A of *Escherichia coli* contributes to invasion of brain microvascular endothelial cells. *Infect Immun.* 1996;64:146–53.

BIBLIOGRAFÍA

155. Wu H.H., Yang Y.Y., Hsieh W.S., Lee C.H., Leu S.J., Chen M.R. OmpA is the critical component for *Escherichia coli* invasion-induced astrocyte activation. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2009;68:677–90.
156. Weiser J.N., Gotschlich E.C. Outer membrane protein A (OmpA) contributes to serum resistance and pathogenicity of *Escherichia coli* K-1. *Infect Immun.* 1991;59:2252–8.
157. Krishnan S., Prasadarao N.V. Outer membrane protein A and OprF: versatile roles in gram-negative bacterial infections. *FEBS J.* 2012;279:919–31
158. Nicholson T.F., Watts K.M., Hunstad D.A. OmpA of uropathogenic *Escherichia coli* promotes postinvasion pathogenesis of cystitis. *Infect Immun.* 2009;77:5245–51.
159. Torres A.G., Li Y., Tutt C.B., Xin L., Eaves-Pyles T., Soong L. Outer membrane protein A of *Escherichia coli* O157:H7 stimulates dendritic cell activation. *Infect Immun.* 2006;74:2676–85.
160. Torres A.G., Kaper J.B. Multiple elements controlling adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HeLa cells. *Infect Immun.* 2003;71:4985–95.
161. Sukumaran S.K., Shimada H., Prasadarao N.V. Entry and intracellular replication of *Escherichia coli* K1 in macrophages require expression of outer membrane protein A. *Infect Immun.* 2003;71:5951–61.
162. Selvaraj S.K., Prasadarao N.V. *Escherichia coli* K1 inhibits proinflammatory cytokine induction in monocytes by preventing NF-kappaB activation. *J Leukoc Biol.* 2005;78:544–54.
163. Orme R., Douglas C.W., Rimmer S., Webb M. Proteomic analysis of *Escherichia coli* biofilms reveals the overexpression of the outer membrane protein OmpA. *Proteomics.* 2006;6:4269–77.
164. Barrios A.F., Zuo R., Ren D., Wood T.K. Hha, YbaJ, and OmpA regulate *Escherichia coli* K12 biofilm formation and conjugation plasmids abolish motility. *Biotechnol Bioeng.* 2006;93:188–200.
165. Li W., Wen L., Li C., Chen R., Ye Z., Zhao J., Pan J. Contribution of the outer membrane protein OmpW in *Escherichia coli* to complement resistance from binding to factor H. *Microb Pathog.* 2016;98:57–62.

BIBLIOGRAFÍA

166. Vogt J., Schulz G.E. The structure of the outer membrane protein OmpX from *Escherichia coli* reveals possible mechanisms of virulence. *Structure*. 1999;7:1301–9.
167. Hejair H.M.A., Zhu Y., Ma J., Zhang Y., Pan Z., Zhang W., Yao H. Functional role of ompF and ompC porins in pathogenesis of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Microb Pathog*. 2017 ;107:29–37.
168. Babic M., Hujer A.M., Bonomo R.A. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resist Updat*. 2006;9:142–56.
169. Ambler R.P. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1980;289:321–31.
170. Bush K., Jacoby G.A., Medeiros A.A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39:1211–33.
171. Jaurin B., Grundström T. *ampC* cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of beta-lactamases of the penicillinase type. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78:4897–901.
172. Ouellette M., Bissonnette L., Roy P.H. Precise insertion of antibiotic resistance determinants into Tn21-like transposons: nucleotide sequence of the OXA-1 beta-lactamase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84:7378–82.
173. Tooke C.L., Hinchliffe P., Bragginton E.C., Colenso C.K., Hirvonen V.H.A., Takebayashi Y., Spencer J. β -Lactamases and β -Lactamase inhibitors in the 21st century. *J Mol Biol*. 2019;431:3472–500.
174. Bebrone C. Metallo-beta-lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochem Pharmacol*. 2007;74:1686–701.
175. Baier F., Tokuriki N. Connectivity between catalytic landscapes of the metallo- β -lactamase superfamily. *J Mol Biol*. 2014;426:2442–56.
176. Lohans C.T., Brem J., Schofield C.J. New Delhi metallo- β -lactamase 1 catalyzes avibactam and aztreonam hydrolysis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61:pii01224-17.
177. Poeylout-Palena A.A., Tomatis P.E., Karsisiotis A.I., Damblon C., Mata E.G., Vila A.J. A minimalistic approach to identify substrate binding features in B1 Metallo-beta-lactamases. *Bioorg Med Chem Lett*. 2007;17:5171–4.

BIBLIOGRAFÍA

178. Walsh T.R., Toleman M.A., Poirel L., Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev.* 2005;18:306–25.
179. Juan C., Torrens G., González-Nicolau M., Oliver A. Diversity and regulation of intrinsic β -lactamases from non-fermenting and other gram-negative opportunistic pathogens. *FEMS Microbiol Rev.* 2017;41:781–815.
180. Fisher J.F., Mobashery S. The sentinel role of peptidoglycan recycling in the β -lactam resistance of the gram-negative *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorganic Chem.* 2014;56:41–8.
181. Jaurin B., Grundström T., Normark S. Sequence elements determining *ampC* promoter strength in *E. coli*. *EMBO J.* 1982;1:875–81.
182. Olsson O., Bergström S., Lindberg F.P., Normark S. *ampC* beta-lactamase hyperproduction in *Escherichia coli*: natural ampicillin resistance generated by horizontal chromosomal DNA transfer from *Shigella*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983;80:7556–60.
183. Bush K., Macalintal C., Rasmussen B.A., Lee V.J., Yang Y. Kinetic interactions of tazobactam with beta-lactamases from all major structural classes. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;37:851–8.
184. Kazmierczak A., Cordin X., Duez J.M., Siebor E., Pechinot A., Sirot J. Differences between clavulanic acid and sulbactam in induction and inhibition of cephalosporinases in enterobacteria. *J Int Med Res.* 1990;18:67-77.
185. Monnaie D., Frere J.M. Interaction of clavulanate with class C beta-lactamases. *FEBS Lett.* 1993;334:269–71.
186. Jacoby G.A. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22:161–82.
187. Evans B.A., Amyes S.G. OXA β -lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27:241–63.
188. Leonard D.A., Bonomo R.A., Powers R.A. Class D β -lactamases: a reappraisal after five decades. *Acc Chem Res.* 2013;46:2407–15.
189. Poirel L., Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12:826–36.
190. Poirel L., Héritier C., Tolün V., Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:15–22.
191. Livermore D.M., Day M., Cleary P., Hopkins K.L., Toleman M.A., Wareham D.W., Wiuff C., Doumith M., Woodford N. OXA-1 β -lactamase and non-

BIBLIOGRAFÍA

- susceptibility to penicillin/ β -lactamase inhibitor combinations among ESBL-producing *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74:326–33.
192. Knothe H., Shah P., Krcmery V., Antal M., Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, ceftazidime, ceftazidime-avibactam and ceftazidime-avibactam in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection.* 1983;11:315–7.
193. Philippon A., Labia R., Jacoby G. Extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989;33:1131–6.
194. Livermore D.M. Defining an extended-spectrum beta-lactamase. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14:3–10.
195. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:1–14.
196. Vahaboglu H., Oztürk R., Aygün G., Coşkuncan F., Yaman A., Kaygusuz A., Leblebicioglu H., Balik I., Aydin K., Otkun M. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41:2265–9.
197. Girlich D., Naas T., Leelaporn A., Poirel L., Fennewald M., Nordmann P. Nosocomial spread of the integron-located veb-1-like cassette encoding an extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Thailand. *Clin Infect Dis.* 2002;34:603–11.
198. Peirano G., Pitout J.D.D. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: update on molecular epidemiology and treatment options. *Drugs.* 2019; 79:1529-41.
199. Pitout J.D., Nordmann P., Laupland K.B., Poirel L. Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56:52–9.
200. Livermore D.M., Woodford N. The beta-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol.* 2006;14:413–20.
201. Nordmann P., Poirel L. Emerging carbapenemases in gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect.* 2002;8:321–31.
202. Queenan A.M., Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20:440–58.
203. Nordmann P., Naas T., Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis.* 2011;17:1791–8.

BIBLIOGRAFÍA

204. Bratu S., Landman D., Haag R., Recco R., Eramo A., Alam M., Quale J. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. *Arch Intern Med.* 2005;165:1430–5.
205. Bratu S., Mooty M., Nichani S., Landman D., Gullans C., Pettinato B., Karumudi U., Tolaney P., Quale J. Emergence of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: epidemiology and recommendations for detection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:3018–20.
206. Paton R, Miles RS, Hood J, Amyes SG, Miles RS, Amyes SG. ARI 1: beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents.* 1993;2:81–7.
207. Cantón R., Morosini M.I., Martín O., de la Maza OM, de la Pedrosa EG. IRT and CMT beta-lactamases and inhibitor resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14:53–62.
208. Martinez J.L., Vicente M.F., Delgado-Iribarren A., Perez-Diaz J.C., Baquero F. Small plasmids are involved in amoxicillin-clavulanate resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989;33:595.
209. Chaïbi E.B., Sirot D., Paul G., Labia R. Inhibitor-resistant TEM beta-lactamases: phenotypic, genetic and biochemical characteristics. *J Antimicrob Chemother.* 1999;43:447–58.
210. Zhou X.Y., Bordon F., Sirot D., Kitzis M.D., Gutmann L. Emergence of clinical isolates of *Escherichia coli* producing TEM-1 derivatives or an OXA-1 beta-lactamase conferring resistance to beta-lactamase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38:1085–9.
211. Cantón R., Loza E., Aznar J., Calvo J., Cercenado E., Cisterna R., González-Romo F, López-Hontangas J.L, Suárez-Barrenechea A.I., Tubau F., Molloy B., López-Mendoza D., SMART-Spain Working Group. Antimicrobial susceptibility of gram-negative organisms from intraabdominal infections and evolution of isolates with extended spectrum β -lactamases in the SMART study in Spain (2002-2010). *Rev Esp Quimioter.* 2011;24:223–32.
212. Suseno M., Das S., Semel J., Thomson R. Emerging piperacillin/tazobactam resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella* sp. *Open Forum Infect Dis.* 2018;5:719.
213. Public Health England. English surveillance programme for antimicrobial utilisation and resistance (ESPAUR). Report 2018. 2018.

BIBLIOGRAFÍA

214. Wu P.J., Shannon K., Phillips I. Effect of hyperproduction of TEM-1 beta-lactamase on in vitro susceptibility of *Escherichia coli* to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38:494–8.
215. Wu P.J., Shannon K., Phillips I. Mechanisms of hyperproduction of TEM-1 beta-lactamase by clinical isolates of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 1995;36:927–39.
216. Reguera J.A., Baquero F., Pérez-Díaz J.C., Martínez J.L. Factors determining resistance to beta-lactam combined with beta-lactamase inhibitors in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 1991;27:569–75.
217. Helfand M.S., Bethel C.R., Hujer A.M., Hujer K.M., Anderson V.E., Bonomo R.A. Understanding resistance to beta-lactams and beta-lactamase inhibitors in the SHV beta-lactamase: lessons from the mutagenesis of SER-130. *J Biol Chem.* 2003;278:52724–9.
218. Philippon A., Arlet G., Jacoby G.A. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:1–11.
219. Waltner-Toews R.I., Paterson D.L., Qureshi Z.A., Sidjabat H.E., Adams-Haduch J.M, Shutt K.A., Jones M., Tian G.B., Pasculle A.W., Doi Y. Clinical characteristics of bloodstream infections due to ampicillin-sulbactam-resistant, non-extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and the role of TEM-1 hyperproduction. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:495–501.
220. Parra-Millán R., Jiménez-Mejías M.E., Sánchez-Encinales V., Ayerbe-Algaba R., Gutiérrez-Valencia A., Pachón-Ibáñez M.E., Díaz C., Pérez Del Palacio J., López-Cortés L.F., Pachón J., Smani Y. Efficacy of lysophosphatidylcholine in combination with antimicrobial agents against *Acinetobacter baumannii* in experimental murine peritoneal sepsis and pneumonia models. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60:4464–70.
221. Cheng W.L., Hsueh P.R., Lee C.C., Li C.W., Li M.J., Chang C.M., Lee N.Y., Ko W.C. Bacteremic pneumonia caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: appropriateness of empirical treatment matters. *J Microbiol Immunol Infect.* 2016;49:208–15.
222. Sakellariou C., Gürntke S., Steinmetz I., Kohler C., Pfeifer Y., Gastmeier P., Schwab F., Kola A., Deja M., Leistner R. Sepsis caused by extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-positive *K. pneumoniae* and *E. coli*: comparison of severity of

BIBLIOGRAFÍA

- sepsis, delay of anti-infective therapy and ESBL Genotype. *PloS One*. 2016;11:e0158039.
223. Leistner R., Gürntke S., Sakellariou C., Denkel L.A., Bloch A., Gastmeier P., Schwab F. Bloodstream infection due to extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-positive *K. pneumoniae* and *E. coli*: an analysis of the disease burden in a large cohort. *Infection*. 2014;42:991–7.
224. Wisplinghoff H., Seifert H., Wenzel R.P., Edmond M.B. Current trends in the epidemiology of nosocomial bloodstream infections in patients with hematological malignancies and solid neoplasms in hospitals in the United States. *Clin Infect Dis*. 2003;36:1103–10.
225. Krupova I., Kaiserova E., Foltinova A., Kovacicova G., Kiskova M., Krchnakova A., *et al.* Bacteremia and fungemia in pediatric versus adult cancer patients after chemotherapy: comparison of etiology, risk factors and outcome. *J Chemother*. 1998;10:236–42.
226. Gaytán-Martínez J., Mateos-García E., Sánchez-Cortés E., González-Llaven J., Casanova-Cardiel L.J., Fuentes-Allen J.L. Microbiological findings in febrile neutropenia. *Arch Med Res*. 2000;31:388–92.
227. Gales A.C., Jones R.N., Sader H.S. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of gram-negative pathogens: results from the SENTRY antimicrobial surveillance program (2006-09). *J Antimicrob Chemother*. 2011;66:2070–4.
228. Prim N., Turbau M., Rivera A., Rodríguez-Navarro J., Coll P., Mirelis B. Prevalence of colistin resistance in clinical isolates of *Enterobacteriaceae*: a four-year cross-sectional study. *J Infect*. 2017;75:493–8.
229. Matuschek E., Åhman J., Webster C., Kahlmeter G. Antimicrobial susceptibility testing of colistin - evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter* spp. *Clin Microbiol Infect*. 2018;24:865–70.
230. Tumbarello M., Sanguinetti M., Montuori E., Trecarichi E.M., Posteraro B., Fiori B., Citton R., D’Inzeo T., Fadda G., Cauda R., Spanu T. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: importance of inadequate initial antimicrobial treatment. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:1987–94.

BIBLIOGRAFÍA

231. De Waele J.J., Hoste E.A., Blot S.I. Blood stream infections of abdominal origin in the intensive care unit: characteristics and determinants of death. *Surg Infect.* 2008;9:171–7.
232. Petersen A.M., Nielsen E.M., Litrup E., Brynskov J., Mirsepasi H., Krogfelt K.A. A phylogenetic group of *Escherichia coli* associated with active left-sided inflammatory bowel disease. *BMC Microbiol.* 2009;9:171.
233. Hertz F.B., Nielsen J.B., Schønning K., Littauer P., Knudsen J.D., Løbner-Olesen A., Frimodt-Møller N. Population structure of drug-susceptible,-resistant and ESBL-producing *Escherichia coli* from community-acquired urinary tract. *BMC Microbiol.* 2016;16:63.
234. Razaghi M., Tajeddin E., Ganji L., Alebouyeh M., Alizadeh A.H., Sadeghi A., Zali M.R. Colonization, resistance to bile, and virulence properties of *Escherichia coli* strains: Unusual characteristics associated with biliary tract diseases. *Microb Pathog.* 2017;111:262–8.
235. Tajeddin E., Sherafat S.J., Majidi M.R., Alebouyeh M., Alizadeh A.H., Zali M.R. Association of diverse bacterial communities in human bile samples with biliary tract disorders: a survey using culture and polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis methods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2016;35:1331–9.
236. Sarowska J., Futoma-Koloch B., Jama-Kmiecik A., Frej-Madrzak M., Ksiazczyk M., Bugla-Ploskonska G., Choroszy-Krol I. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. *Gut Pathog.* 2019;11:10.
237. Shin S., Castanie-Cornet M.P., Foster J.W., Crawford J.A., Brinkley C., Kaper J.B. An activator of glutamate decarboxylase genes regulates the expression of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence genes through control of the plasmid-encoded regulator, Per. *Mol Microbiol.* 2001;41:1133–50.
238. Wang M.C., Tseng C.C., Chen C.Y., Wu J.J., Huang J.J. The role of bacterial virulence and host factors in patients with *Escherichia coli* bacteremia who have acute cholangitis or upper urinary tract infection. *Clin Infect Dis.* 2002;35:1161–6.
239. Mittal R., Krishnan S., Gonzalez-Gomez I., Prasadarao N.V. Deciphering the roles of outer membrane protein A extracellular loops in the pathogenesis of *Escherichia coli* K1 meningitis. *J Biol Chem.* 2011;286:2183–93.

BIBLIOGRAFÍA

240. Prasadarao N.V., Wass C.A., Kim K.S. Endothelial cell GlcNAc beta 1-4GlcNAc epitopes for outer membrane protein A enhance traversal of *Escherichia coli* across the blood-brain barrier. *Infect Immun.* 1996;64:154–60.
241. Sánchez-Encinales V., Álvarez-Marín R., Pachón-Ibáñez M.E., Fernández-Cuenca F., Pascual A., Garnacho-Montero J., Martínez-Martínez L., Vila J., Tomás M.M., Cisneros J.M., Bou G., Rodríguez-Baño J., Pachón J., Smani Y. Overproduction of outer membrane protein A by *Acinetobacter baumannii* as a risk factor for nosocomial pneumonia, bacteremia, and mortality rate increase. *J Infect Dis.* 2017;215:966–74.
242. Vila-Farrés X., Parra-Millán R., Sánchez-Encinales V., Varese M., Ayerbe-Algaba R., Bayó N., Guardiola S, Pachón-Ibáñez M.E., Kotev M., García J., Teixidó M., Vila J., Pachón J., Giralt E., Smani Y. Combating virulence of gram-negative bacilli by OmpA inhibition. *Sci Rep.* 2017;7:14683.
243. Tseng Y., Wang S.W., Kim K.S., Wang Y.H., Yao Y., Chen C.C., Chiang C.W., Hsieh P.C., Teng C.H. NlpI facilitates deposition of C4bp on *Escherichia coli* by blocking classical complement-mediated killing, which results in high-level bacteremia. *Infect Immun.* 2012;80:3669–78.
244. Lundrigan M.D., Webb R.M. Prevalence of ompT among *Escherichia coli* isolates of human origin. *FEMS Microbiol Lett.* 1992;76:51–6.
245. Sannes M.R., Kuskowski M.A., Owens K., Gajewski A., Johnson J.R. Virulence factor profiles and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from veterans with bacteremia and uninfected control subjects. *J Infect Dis.* 2004;190:2121–8.
246. Schechter L.M., Creely D.P., Garner C.D., Shortridge D., Nguyen H., Chen L., Hanson B.M., Sodergren E., Weinstock G.M., Dunner W.M., van Belkum A., Leopold S.R. Extensive gene amplification as a mechanism for piperacillin-tazobactam resistance in *Escherichia coli*. *mBio.* 2018;9:pii:e00583-18.
247. Retamar P., López-Cerero L., Muniain M.A., Pascual Á., Rodríguez-Baño J., ESBL-REIPI/GEIH Group. Impact of the MIC of piperacillin-tazobactam on the outcome of patients with bacteremia due to extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57:3402–4.
248. Harris P.N., Tambyah P.A., Lye D.C., Mo Y, Lee T.H., Yilmaz M, Alenazi T.H., Arabi Y., Falcone M., Bassetti M., Righi E., Rogers B.A., Kanj S., Bhally H., Iredell J., Mendelson M., Boyles T.H., Looke D., Miyakis S., Walls G., Al Khamis M.,

BIBLIOGRAFÍA

- Zikri A., Crowe A., Ingram P., Daneman N., Griffin P., Athan E., Lorenc P., Baker P., Roberts L., Beatson S.A., Peleg A.Y., Harris-Brown T., Paterson D.L., MERINO Trial Investigators and the Australasian Society for Infectious Disease Clinical Research Network (ASID-CRN). Effect of piperacillin-tazobactam vs meropenem on 30-day mortality for patients with *E coli* or *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection and ceftriaxone resistance: A randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2018;320:984–94.
249. Grant J., Afra K. Point–counterpoint: The MERINO trial and what it should imply for future treatment of ESBL bacteremia. *Off J Assoc Med Microbiol Infect Dis Can*. 2019;4:125–35.
250. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. 2019.
251. Sun S., Berg O.G., Roth J.R., Andersson D.I. Contribution of gene amplification to evolution of increased antibiotic resistance in *Salmonella typhimurium*. *Genetics*. 2009;182:1183–95.
252. Nordmann P., Dortet L., Poirel L. Rapid detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol*. 2012;50:3016–22.
253. Dortet L., Agathine A., Naas T., Cuzon G., Poirel L., Nordmann P. Evaluation of the RAPIDEC® CARBA NP, the Rapid CARB Screen® and the Carba NP test for biochemical detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70:3014–22.
254. Teethaisong Y., Nakouti I., Evans K., Eumkeb G., Hobbs G. Nitro-Carba test, a novel and simple chromogenic phenotypic method for rapid screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Glob Antimicrob Resist*. 2019;18:22–5.
255. Choquet M., Guiheneuf R., Castelain S., Cattoir V., Auzou M., Pluquet E., Decroix V. Comparison of MALDI-ToF MS with the Rapidec Carba NP test for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2018;37:149–55.