

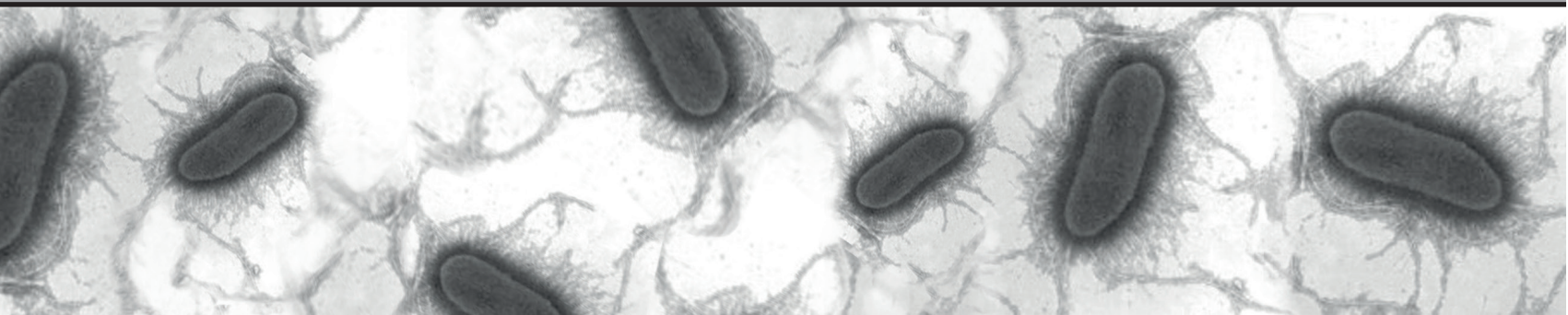


LABORATORIO DE REFERENCIA DE *E. COLI* (LREC)

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E PARASITOLOGÍA

FACULTADE DE VETERINARIA

EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR  
Y VIRULENCIA DE CEPAS DE  
*ESCHERICHIA COLI*  
DEL GRUPO CLONAL ST131:  
COMPARACIÓN DE LOS SUBCLONES  
016:H5 H41 Y 025b:H4 H30/H30-Rx



Ghizlane Dahbi Zbiti

LUGO  
2015

# TESIS DE DOCTORADO

EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Y VIRULENCIA  
DE CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* DEL GRUPO  
CLONAL ST131: COMPARACIÓN DE LOS  
SUBCLONES 016:H5 H41 Y 025b:H4 H30/H30-Rx

Ghizlane Dahbi Zbiti



LABORATORIO DE REFERENCIA DE *E. COLI* (LREC)  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E PARASITOLOGÍA  
FACULTADE DE VETERINARIA  
LUGO, 2015





## AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES

D. Jorge Blanco Álvarez.

Catedrático del Departamento de Microbiología e Parasitología de la USC.

Dña. Azucena Mora Gutiérrez.

Profesor Contratado Doctor del Departamento de Microbiología e Parasitología de la USC.

D. Miguel Blanco Álvarez

Profesor Titular del Departamento de Microbiología e Parasitología de la USC.

Como Directores de la Tesis Doctoral titulada "EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Y VIRULENCIA DE CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* DEL GRUPO CLONAL ST131: COMPARACIÓN DE LOS SUBCLONES O16:H5 H41 Y O25b:H4 H30/H30-Rx."

Presentada por Dña. GHIZLANE DAHBI ZBITI.

Alumna del Programa de Doctorado: Microbiología e Parasitología.

Autorizan la presentación de la Tesis indicada, considerando que reúne los requisitos exigidos en el artículo 34 del Reglamento de los Estudios de Doctorado, y que como Directores de la misma no incurrir en las causas de abstención establecidas en la Ley 30/1992.

Lugo, 1 de Septiembre de 2015

Fdo. Jorge Blanco

Fdo. Azucena Mora

Fdo. Miguel Blanco



## AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES

Jorge Blanco Álvarez, como Director del Laboratorio de Referencia de *E. coli* (LREC) del Departamento de Microbiología e Parasitología de la USC, informo:

Que la presente Memoria experimental de la Tesis Doctoral titulada “EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Y VIRULENCIA DE CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* DEL GRUPO CLONAL ST131: COMPARACIÓN DE LOS SUBCLONES O16:H5 H41 Y O25b:H4 H30/H30-Rx.”, elaborada por Dña. GHIZLANE DAH-BI ZBITI, ha sido realizada bajo mi dirección, la de la profesora Azucena Mora Gutiérrez y la del profesor Miguel Blanco Álvarez en el LREC-USC de la Facultad de Veterinaria.

Lugo, 1 de Septiembre de 2015.

Fdo. Jorge Blanco Álvarez  
Catedrático de Microbiología  
Director del Laboratorio de Referencia de *E.coli* (LREC).  
Laboratorio Nacional de Referencia para la Detección de *E.coli* en Alimentos  
Departamento de Microbiología e Parasitología  
Facultade de Veterinaria  
Universidade de Santiago de Compostela



*A mi familia.*

# Agradecimientos

**Este trabajo es el esfuerzo de todo un equipo, que han participado directa o indirectamente en su realización, deseo expresar mi más sincero agradecimiento a:**

**Jorge Blanco**, director del laboratorio LREC, por la confianza depositada en mí, por darme la oportunidad de realizar esta tesis bajo su dirección y por su ayuda en la revisión crítica de esta memoria.

**Miguel Blanco**, por la codirección de este trabajo, por enseñarme y resolver mis dudas, por el apoyo y ánimo que siempre me ofreció.

**Azucena Mora**, por la codirección de este trabajo, por la dirección de los estudios de tipado molecular por PFGE y MLST, por tantas horas compartidas en la realización de los ensayos de virulencia *in vivo* en el modelo de sepsis murino.

**Jesús Blanco**, por enseñarme todo lo relacionado con el serotipado, por apoyarme siempre y por darme ánimos.

**Alexandra Herrera**, mi hermana, mi amiga, mi apoyo, mi confidente, la segunda madre de mis hijos... y por tantas cosas. Gracias.

**Susana Viso**, mi pequeña gran "Seito", persona con la que compartí más horas en estos dos últimos años, gracias por tu amistad, apoyo, ánimos y por poner siempre un toque de alegría a cada día. Siempre tendrás un lugar especial en mi corazón.

**Juan Marzoa**, por su amistad y por animarme a terminar este trabajo.

**Montserrat Lamela**, por su ayuda en la preparación del material que he necesitado durante la parte experimental del estudio.

A mis compañeras de laboratorio **Cecilia López, Rosalia Mamani**, por la colaboración en los diferentes ensayos genotípicos (PCR, MLST, PFGE) incluidos en esta tesis doctoral.

**María Pilar Alonso, Fernando García-Garrote, Amparo Coira, Julia María Pita Carretero, Ángeles Espiño e Inés Trabado** (Unidad de Microbiología Clínica del Hospital Universitario Lucus Augusti, HULA) por el aislamiento e identificación de las cepas de *E. coli* obtenidas de pacientes con infecciones urinarias y bacteriemias y por la realización de los antibiogramas.

**Erick Denamur, Sara Dion y Bertrand Picard** (Université Paris Diderot, INSERM, IAME, UMR 1137, Sorbonne Paris Cité, París, Francia) por su colaboración en los ensayos de virulencia *in vivo* en el modelo de sepsis murino.

**A Veronika Tchesnokova y Mariya Billig** (Department of Microbiology, University of Washington School of Medicine, Steattle, WA, U.S.) por su colaboración en el tipado del alelo *fimH*.

**Fernando de la Cruz y María de Toro** (Instituto de Biomedicina y Biotecnología, Departamento de

Biología Molecular, Universidad de Cantabria, Santander) por su colaboración en los estudios de tipado molecular.

Y a los siguientes investigadores por la cesión de cepas de *E. coli* de origen clínico.

**Juan José González-López y Guillermo Prats** (Servei de Microbiologia, Hospital Vall d'Hebron, Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona).

**Lorena López-Cerezo y Álvaro Pascual** (Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Virgen Macarena, Departamento de Microbiología y Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla, Sevilla)

**Luis Martínez-Martínez** (Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IDIVAL, y Departamento de Biología Molecular, Universidad de Cantabria, Santander)

**Fernando Chaves** (Servicio de Microbiología, Hospital 12 de Octubre, Madrid)

Un agradecimiento especial a mis padres, gracias por dejarme salir de casa y cruzar el charco, por animarme siempre y creer en mí, y que a pesar de la distancia siempre estáis a mi lado. Sin vosotros yo no estaría aquí.

Por último, a Jorge y a mis hijos, gracias por estar aquí para permitirme avanzar cada día un poco más. Nos espera una nueva etapa que estoy deseando empezar y vivirla con vosotros. OS QUIERO.

#### **Esta tesis ha sido financiada por:**

El proyecto FIS PI09/01273 y la Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI RD06/008/1018 y 1016) (Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria, Ministerio de Economía y Competitividad, Gobierno de España), por los proyectos 09TAL007261PR y EM2014/001 y los programas de Consolidación y Estructuración de Unidades de Investigación Competitivas 2007/000044-0 y CN2012/303 de la Xunta de Galicia (Consellería de Economía e Industria y Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria, Fondo Europeo para el Desarrollo Regional), por el proyecto AGL2013-47852-R (Ministerio de Economía y Competitividad, Gobierno de España) y por el proyecto FEDER-INNTERCONNECTA-COLIVAC (CDTI, Ministerio de Economía y Competitividad, Gobierno de España; Consellería de Economía e Industria, Xunta de Galicia; The European Regional Development Fund, ERDF).

Por último agradecer a la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI) (Ministerio de Asuntos Exteriores y de Cooperación, Gobierno de España) por la beca recibida y a la USC por los contratos que me han permitido financiar mi estancia en España y completar la parte experimental de la Tesis Doctoral.

## ÍNDICE DE ACRÓNIMOS RESUMEN

### 1. INTRODUCCIÓN 1

- 1.1 Características generales de *Escherichia coli* 1
- 1.2 Clasificación serológica 3
- 1.3 Diversidad de las cepas de *E. coli* 7
- 1.4 *E. coli* patógeno intestinal 12
- 1.5 *E. coli* patógeno extraintestinal (ExPEC) 14
  - 1.5.1 Factores de virulencia 16
    - Adhesinas 17
    - Toxinas 17
    - Sideróforos 18
    - Resistencia al suero y a la fagocitosis 18
- 1.6 Antibióticos  $\beta$ -lactámicos 20
- 1.7 Resistencia a antibióticos 24
- 1.8  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) 25
  - 1.8.1 Distribución y prevalencia de BLEEs 27
    - A nivel mundial en humanos 27
    - Situación en España en humanos 31
    - Presencia de BLEE en otros nichos 35
  - 1.8.2 Diseminación de BLEEs 42
- 1.9 Emergencia de cepas clonales productoras de BLEE 45
- 1.10 Emergencia de clones de alto riesgo 49
  - 1.10.1 Grupo clonal ST131 53
    - Diseminación y prevalencia de ST131 55
    - Genes de virulencia y virotipos 60
    - Tipado molecular: PFGE y clonotipado 64
    - Carbapenemasas 71

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 73

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS 75

3.1 Cepas control y conservación de las cepas 75

3.2 Obtención de las cepas clínicas de *E. coli* 75

3.3 Estudio genotípico de las cepas ExPEC 76

3.3.1 PCR 76

3.3.2 Secuenciación 82

3.4 Caracterización fenotípica 82

3.4.1 Determinación de resistencias a antimicrobianos: detección fenotípica de BLEEs 82

3.4.2 Serotipado 83

·Determinación del antígeno O 83

·Determinación del antígeno H 85

3.5 Detección de las cepas ST131 y determinación de las relaciones clonales 88

3.5.1 Determinación de secuencias tipo (ST) 89

3.5.2 Clonotipado y detección de los subclones *H30* y *H30-Rx* 91

3.5.3 Electroforesis en campo pulsante (PFGE) 92

3.6 Ensayo de virulencia *in vivo* 94

3.7 Análisis estadístico 96

## 4. RESULTADOS 97

4.1 Estudio I : Emergencia de nuevas variantes del grupo clonal ST131 entre cepas de *E. coli* productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (ECBLEE) causantes de infecciones extra intestinales. 97

4.1.1 Aislados clínicos (cepas) 97

4.1.2 Análisis realizados 98

4.1.3 Prevalencia del grupo clonal ST131 y tipos de enzimas BLEE 98

4.1.4 Serotipos de las cepas del grupo clonal ST131 98

4.1.5 Secuencias tipo de las cepas del grupo clonal ST131 98

4.1.6 Genes de virulencia y virotipos de las cepas del grupo clonal ST131.

Comparación con las cepas no ST131 99

4.1.7 Pulsotipos (PFGE) de las cepas del grupo clonal ST131 101

4.1.8 Resistencias de las cepas del grupo clonal ST131.

Comparación con las cepas no ST131 103



4.2 Estudio II : Epidemiología molecular del subclón *H41* de *E. coli* O16:H5-ST131: comparación con los subclones *H30* y *H30-Rx* de O25b:H4-ST131. 104

4.2.1 Aislados clínicos (cepas) 104

4.2.2 Análisis realizados 106

4.2.3 Prevalencia del grupo clonal ST131 y de los subclones *H30* y *H30-Rx* 106

4.2.4 Alelos *fimH* de las cepas ST131 107

4.2.5 Secuencias tipo del esquema MLST del Instituto Pasteur de las cepas ST131 110

4.2.6 Resistencias y enzimas BLEE de las cepas ST131 110

4.2.7 Genes de virulencia de las cepas ST131 113

4.2.8 Virotipos de las cepas ST131 113

4.2.9 Pulsotipos (PFGE) de las cepas ST131 116

4.3 Estudio III: Virulencia de cepas de *E. coli* ST131 O16:H5 y O25b:H4 pertenecientes a diferentes virotipos y subclones en un modelo de sepsis murino. 120

4.3.1 Cepas investigadas 120

4.3.2 Estudios realizados 121

4.3.3 Virulencia *in vivo* 121

5. DISCUSIÓN 127

6. CONCLUSIONES 139

7. BIBLIOGRAFÍA 141

# Índice de acrónimos

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIEC	Del inglés “ <i>Adherent Invasive Escherichia coli</i> ”
BLEE	$\beta$ -lactamasas de espectro extendido
CDT	Del inglés “ <i>Cytolethal Distending Toxin</i> ”
CH	Colitis hemorrágica
CNF	Del inglés “Cytotoxic Necrotizing Factor”
CTX-M	Cefotaximasas
DAEC	Del inglés “ <i>Diffusely Adherent Escherichia coli</i> ”
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	Del inglés “ <i>Enteraggregative Escherichia coli</i> ”
EARSS	Del inglés “ <i>European Antimicrobial Resistance Surveillance System</i> ”
ECBLEE	<i>E. coli</i> productoras de $\beta$ -lactamasas de espectro extendido
EHEC	Del inglés “ <i>Enterohemorrhagic Escherichia coli</i> ”
EIEC	Del inglés “ <i>Enteroinvasive Escherichia coli</i> ”
EPEC	Del inglés “ <i>Enteropathogenic Escherichia coli</i> ”
ETEC	Del inglés “ <i>Enterotoxigenic Escherichia coli</i> ”
ExPEC	Del inglés “ <i>Extra-intestinal pathogenic Escherichia coli</i> ”
<i>fimH</i>	Gen que codifica la adhesina FimH
GEIH	Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria
H30	Subclón de ST131 con el alelo <i>fimH30</i>
H30-R	Subclón de ST131 con el alelo <i>fimH30</i> resistente a fluoroquinononas
H30-Rx	Subclón de ST131 con el alelo <i>fimH30</i> y un SNP (G723A) en el gen <i>ybbW</i> que generalmente es resistente a fluoroquinononas y productor de CTX-M-15

Hly	$\alpha$ -hemolisina
HULA	Hospital Universitario Lucus Augusti
<i>IbeA</i>	Del inglés " <i>Invasion of brain endothelium</i> "
IS	Del inglés " <i>Insertion Sequence</i> "
<i>Iss</i>	Del inglés " <i>Increased serum survival</i> "
ITU	Infección del tracto urinario
LPS	Lipopolisacárido
LREC-USC	Laboratorio de Referencia de <i>Escherichia coli</i> -Universidade de Santiago de Compostela
MLEE	Del inglés " <i>multilocus enzyme electrophoresis</i> "
MLST	Del inglés " <i>multilocus sequence typing</i> "
MYSTIC	Del inglés " <i>Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection</i> "
NMEC	Del inglés " <i>Neonatal meningitis Escherichia coli</i> "
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFGE	Del inglés " <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> "
<i>Sat</i>	Del inglés " <i>Secreted autotransporter toxin</i> "
SENTRY	<i>Antimicrobial surveillance program</i>
SMART	Del inglés " <i>Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends</i> "
SNP	Del inglés " <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> "
ST	Secuencia tipo
STEC	Del inglés " <i>Shiga-toxin Escherichia coli</i> "
SUH	Síndrome urémico hemolítico
<i>Tsh</i>	Del inglés " <i>Temperatura-sensitive hemagglutinin</i> "
UPEC	Del inglés " <i>Uropathogenic Escherichia coli</i> "
<i>Usp</i>	Del inglés " <i>Uropathogenic specific protein</i> "
VTEC	Del inglés " <i>Verotoxigenic Escherichia coli</i> "

La prevalencia y la epidemiología molecular de cepas de *E. coli* productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (ECBLEE) está cambiando rápidamente. En los últimos años, la producción de BLEE en *E. coli* se ha incrementado significativamente debido especialmente a la expansión de las enzimas de tipo CTX-M. La pandemia actual es debida en gran medida a clones exitosos de alto riesgo, entre los que destaca el grupo clonal ST131 asociado a la producción de CTX-M-15. El éxito de las cepas del grupo clonal ST131 se podría explicar por la adquisición de genes de virulencia y de resistencia a antibióticos, por la enorme diversidad genética que presentan y por su capacidad de colonización a nivel intestinal. Sin embargo, se desconoce si todas las variantes/linajes/subclones de este grupo clonal emergente poseen el mismo grado de virulencia y de capacidad expansiva. La presente tesis doctoral comprende tres estudios (Dahbi G, Mora A *et al.* 2013 *Int J Antimicrob Agents* 42:347-351; Dahbi G, Mora A *et al.* 2014 *Int J Med Microbiol* 304:1247-1257; Mora A, Dahbi G *et al.* 2014 *PLOS One* 9(1):e87025) realizados con los siguientes objetivos:

- (A) Evaluar la prevalencia real del grupo clonal ST131 identificando todas sus variantes conocidas.
- (B) Caracterizar y comparar los diferentes subclones del grupo clonal ST131, determinando sus serotipos O:H, genes de virulencia, perfiles de PFGE, secuencias tipo del esquema del Instituto Pasteur, alelos *fimH* y sus resistencias.
- (C) Estudiar la virulencia *in vivo* de las cepas ST131 pertenecientes a los diferentes subclones empleando un modelo de sepsis murino.

De los resultados obtenidos se deducen las siguientes conclusiones:

- (1) Es evidente que en el aumento de prevalencia de cepas ECBLEE registrado en el Hospital Universitario Lucus Augusti en los últimos años está implicado el grupo clonal ST131, ya que más del 50% de las cepas productoras de BLEE aisladas en el año 2012 eran ST131. Este hecho coincide con lo que está sucediendo en otros hospitales españoles, así como a nivel mundial.
- (2) Nuestros resultados confirman que las residencias de ancianos son un reservorio importante de cepas ECBLEE ST131.
- (3) También se confirma que las cepas ST131 productoras de BLEE poseen muchos más genes de virulencia que las productoras de BLEE que no pertenecen a dicho grupo clonal.
- (4) La diversidad genética de las cepas del grupo clonal ST131 es extraordinaria y continúan emergiendo nuevas cepas con diferentes combinaciones de genes de virulencia.

(5) El subclón *H30* está ampliamente expandido en España, siendo el predominante entre las cepas O25b:H4. Por otra parte, el subclón *H30-Rx* es el predominante entre las cepas productoras de CTX-M-15.

(6) Las cepas *H30-Rx* portan más genes de virulencia que las cepas *H30* que no pertenecen al subclón *H30-Rx*. Por lo tanto, las cepas ST131 que están más ampliamente expandidas en España y a nivel mundial son las que poseen más genes de virulencia y más resistencias.

(7) Como pasa en otros países, en España el subclón O16:H5-ST131-*H41* está mucho menos expandido y la mayoría de las cepas pertenecen a la secuencia tipo del Instituto Pasteur PST506 y producen CTX-M-14.

(8) Las cepas del subclón O16:H5-ST131-*H41* poseen muchos menos genes de virulencia que las cepas O25b:H4-ST131 y presentan distintos virotipos.

(9) Las cepas del subclón O16:H5-ST131-*H41* presentan una notable diversidad genética y poseen perfiles de PFGE-*Xba*I distintos de las cepas O25b:H4-ST131.

(10) El análisis de los perfiles de PFGE-*Xba*I se traduce en dendrogramas con *clusters* específicos de cepas pertenecientes a los diferentes subclones (*H30*, *H30-Rx*, *H22*, *H41*) y virotipos, lo que apoya un claro componente filogenético en el origen de los virotipos.

(11) Tanto las cepas O25b:H4-ST131 como las O16:H5-ST131 presentan un alto nivel de virulencia *in vivo* en el modelo de sepsis murino.

(12) Si consideramos que las cepas más virulentas son las que presentan una rápida letalidad en el modelo murino de sepsis, se concluye que las cepas O25b:H4-ST131 del subclón *H30-Rx* y especialmente las del virotipo A serían las más virulentas, estando dicha virulencia temprana asociada con significación estadística a los genes de virulencia *afaFM955459*, *sat* y *kpsMII-K2*.

## Resumo

---

A prevalencia e a epidemioloxía molecular das cepas de *E. coli* produtoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro estendido (ECBLEE) está a cambiar de xeito rápido. Nos últimos anos, a produción de BLEE en *E. coli* incrementouse de forma significativa, debido dun xeito especial á expansión das enzimas tipo CTX-M. A pandemia actual é debida en boa medida á clons exitosos de alto risco, entre os que destaca o grupo clonal ST131 asociado á produción de CTX-M-15. O éxito das cepas do grupo clonal ST131 poderíase explicar pola adquisición de xenes de virulencia e de resistencia a antibióticos, pola enorme diversidade xenética que presentan e pola súa capacidade de colonización a nivel intestinal. Non obstante, descoñécese se todas as variantes/liñaxes/subclóns deste grupo clonal emerxente posúen o mesmo grao de virulencia e de capacidade expansiva. A presente tese doutoral inclúe tres estudos (Dahbi G, Mora A *et al.* 2013 *Int J Antimicrob Agents* 42: 347-351; Dahbi G, Mora A *et al.* 2014 *Int J Med Microbiol* 304: 1247-1257; Mora A, Dahbi G *et al.*, 2014 *PLoS ONE* 9(1):e87025) realizados cos seguintes obxectivos:

- (A) Avaliar a prevalencia real do grupo clonal ST131 identificando todas as súas variantes coñecidas.
- (B) Caracterizar e comparar os diferentes subclóns do grupo clonal ST131, determinando os seus serotipos O:H, xenes de virulencia, perfís de PFGE, secuencias tipo do esquema do Instituto Pasteur, alelos *fimH* e as súas resistencias.
- (C) Estudiar a virulencia *in vivo* das cepas ST131 pertencentes aos diferentes subclóns empregando un modelo de sepsis murino.

Dos resultados obtidos dedúcense as seguintes conclusións:

- (1) É evidente que no aumento de prevalencia de cepas ECBLEE rexistrada no Hospital Universitario Lucus Augusti nos últimos anos está implicado o grupo clonal ST131 xa que máis do 50% das cepas produtoras de BLEE illadas no ano 2012 eran ST131. Este feito coincide co que está a suceder noutros hospitais españois, así como a nivel mundial.
- (2) Os nosos resultados confirman que as residencias de anciáns son un reservorio importante de cepas ECBLEE ST131.
- (3) Tamén confirmase que as cepas ST131 produtoras de BLEE posúen moitos máis xenes de virulencia que as produtoras de BLEE que non pertencen ao devandito grupo clonal.
- (4) A diversidade xenética das cepas do grupo clonal ST131 é extraordinaria e están a emerxer novas cepas con diferentes combinacións de xenes de virulencia.
- (5) O subclón H30 está amplamente expandido en España sendo o predominante entre as cepas O25b:H4. Por outra banda, o subclón H30-Rx é o predominante entre as cepas produtoras de CTX-M-15.

(6) As cepas *H30-Rx* posúen máis xenes de virulencia que as cepas *H30* que non pertencen ao subclón *H30-Rx*. Polo tanto, as cepas *ST131* que están máis amplamente expandidas en España e a nivel mundial son as que posúen máis xenes de virulencia e máis resistencias.

(7) Como pasa noutros países, en España o subclón *O16:H5-ST131-H41* está moito menos expandido e a maioría das cepas pertencen a secuencia tipo do Instituto Pasteur *PST506* e producen *CTX-M-14*.

(8) As cepas do subclón *O16:H5-ST131-H41* posúen moitos menos xenes de virulencia que as cepas *O25b:H4-ST131* e presentan distintos virotipos.

(9) As cepas do subclón *O16:H5-ST131-H41* presentan unha notable diversidade xenética e posúen perfís de *PFGE-XbaI* distintos das cepas *O25b:H4-ST131*.

(10) O análise dos perfís de *PFGE-XbaI* tradúcese en dendrogramas con *clusters* específicos de cepas pertencentes aos diferentes subclóns (*H30*, *H30-Rx*, *H22*, *H41*) e virotipos, o que apoia un claro compoñente filoxenético na orixe dos virotipos.

(11) Tanto as cepas *O25b:H4-ST131* como as *O16:H5-ST131* presentan un alto nivel de virulencia *in vivo* no modelo de sepsis murino.

(12) Se consideramos que as cepas máis virulentas son as que presentan unha rápida letalidade no modelo murino de sepsis, conclúese que as cepas *O25b:H4-ST131* do subclón *H30-Rx* e especialmente as do virotipo *A* serían as máis virulentas, estando a devandita virulencia temperá asociada con significación estatística aos xenes de virulencia *afaFM955459*, *sat* e *kpsMIII-K2*.





## Summary

---

The prevalence and molecular epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *E. coli* strains (ESBLEC) are changing rapidly. In the last years, the production of ESBL in *E. coli* has increased significantly especially due to the expansion of the CTX-M enzymes. The current pandemic is due mainly to the success of high-risk clones, being the ST131 the most notable associated with the production of CTX-M-15 enzyme. The success of the clonal group ST131 may be explained by the acquisition of virulence and resistance genes, by its enormous genetic diversity, and its capacity to colonize the intestine. However, it is unknown if all variants/lineages/subclones of this emerging clonal group possess the same level of virulence and ability to spread. The present doctoral thesis includes three studies (Dahbi G, Mora A *et al.* 2013 *Int J Antimicrob Agents* 42:347-351; Dahbi G, Mora A *et al.* 2014 *Int J Med Microbiol* 304:1247-1257; Mora A, Dahbi G *et al.* 2014 *PLOS One* 9(1):e87025) with the following aims:

- (A) To assess the real prevalence of clonal group ST131 identifying all its variants.
- (B) To characterize and compare the different ST131 subclones, determining their O:H serotypes, virulence genes, PFGE profiles, sequence types by the Institut Pasteur scheme, *fimH* alleles and their resistances.
- (C) To study the *in vivo* virulence of the strains ST131 belonging to different subclones using a murine sepsis model.

Of the results obtained, we concluded:

- (1) The clonal group ST131 is clearly implicated in the increasing prevalence of ESBLEC detected in the Hospital Universitario Lucus Augusti since more than 50% of the ESBL producing strains isolated in 2012 belonged to ST131. This fact has also been reported in other Spanish hospitals and worldwide.
- (2) Our results confirm that the nursing homes are an important reservoir of ESBLEC strains.
- (3) Our results also confirm that the ST131 strains producing ESBL carry more virulence genes than non-ST131 strains producing ESBL.
- (4) The genetic diversity of ST131 clonal group strains is extraordinary and new strains continue to emerge with different combinations of virulence genes.
- (5) The *H30* subclone is widely spread in Spain, being predominant among O25b:H4 strains. On the other hand, *H30-Rx* sublineage is predominant among strains producing CTX-M-15.
- (6) *H30-Rx* strains carry virulence genes than *H30* strains that do not belong to *H30-Rx* subclone. Therefore, the ST131 strains more widely spread in Spain and worldwide are those possessing more virulence and resistance genes.

(7) In Spain, like in other countries, the O16:H5-ST131-H41 subclone is less spread, and most strains belong to the sequence type PST506 according to the Institut Pasteur scheme and produce CTX-M-14.

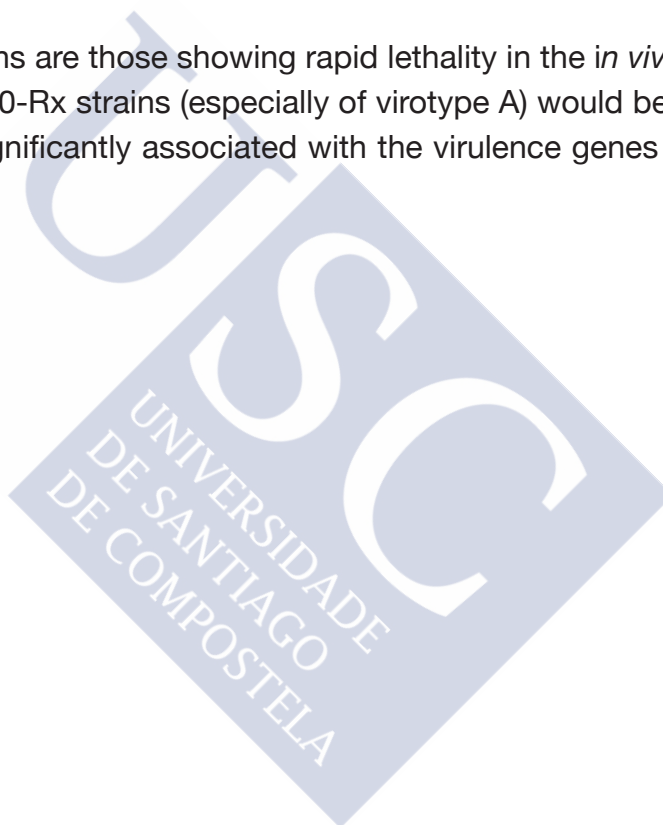
(8) Strains belonging to the subclone O16:H5-ST131-H41 show fewer virulence genes than O25b:H4-ST131 strains and also different virotypes.

(9) The O16:H5-ST131-H41 strains show a remarkable genetic diversity and possess different PFGE-*Xba*I profiles from those of O25b:H4-ST131 strains.

(10) The analysis of PFGE-*Xba*I profiles reveals a dendrogram with different clusters which group strains belonging to the same subclone (*H30*, *H30-Rx*, *H22*, and *H41*) and virotype. This fact supports a clear phylogenetic component in the origin of virotypes.

(11) Both O25b:H4-ST131 and O16:H5-ST131 strains show a high virulence level in the *in vivo* sepsis murine model.

(12) If the most virulent strains are those showing rapid lethality in the *in vivo* murine model of sepsis, O25b:H4-ST131 *H30-Rx* strains (especially of virotype A) would be the most virulent, being the rapid virulence significantly associated with the virulence genes *afaFM955459*, *sat* and *kpsMII-K2*.



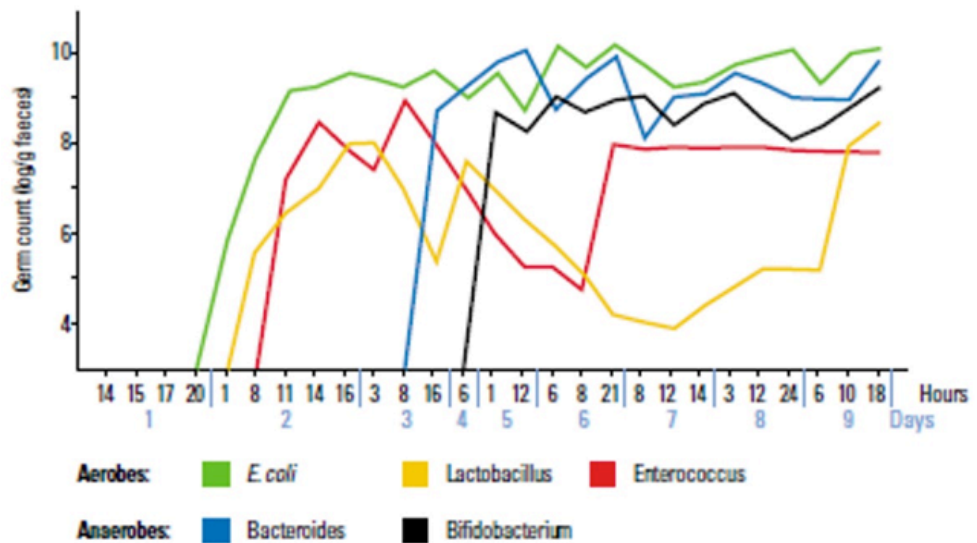
## 1.1 Características generales de *Escherichia coli*

*Escherichia coli*, también llamado colibacilo, fue descubierto en 1885 por el pediatra alemán Theodor Von Escherich (Escherich, 1885) tras aislarlo de las heces de un niño sano. Perteneció a la familia *Enterobacteriaceae* (Ewing, 1986), y es un bacilo gram-negativo, anaerobio facultativo, oxidasa negativo que puede presentar cápsula, capaz de fermentar glucosa y lactosa y las cepas móviles poseen flagelación peritrica (Ewing, 1986; Blanco *et al.* 2002; Kaper *et al.* 2004; Beutin, 2006; Bettelheim, 2007). Es quizás el organismo procarionta más estudiado debido a su temprano descubrimiento, a su facilidad de crecimiento (una división celular cada 20 minutos a 37°C en un medio nutritivo), a su importante significado clínico y a su gran diversidad genética. Su buen comportamiento ha hecho de este germen un candidato ideal para los experimentos de genética y biología molecular.

*E. coli* es una especie común de la microbiota intestinal. Su establecimiento en el sistema digestivo se produce desde el tracto urogenital de la madre en el momento del parto y desde el medio ambiente durante las primeras horas y días de vida. Los primeros microorganismos en colonizar el intestino de los recién nacidos son bacterias anaerobias facultativas, tales como enterobacterias y estreptococos, seguido de bacterias pertenecientes a los géneros *Staphylococcus*, *Enterococcus* y *Lactobacillus*. La reducción del oxígeno generado por el crecimiento de estas bacterias permite a las bacterias anaerobias, tales como *Bifidobacterium*, *Bacteroides* y *Clostridium*, establecerse en el tracto intestinal (**Figura 1**) (Schulze *et al.* 2006).

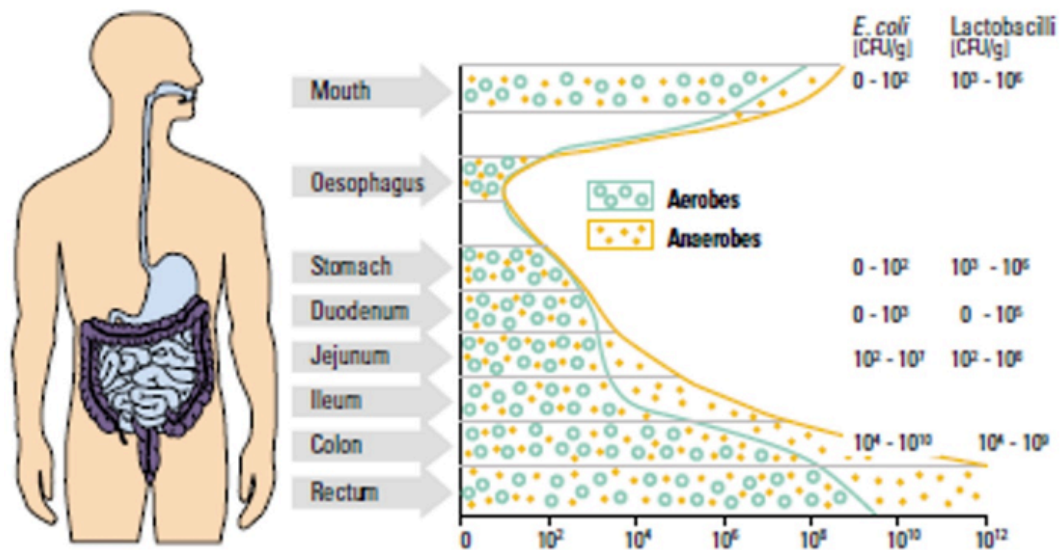
La presencia de *E. coli*, junto con otras bacterias, en el intestino, es necesaria para el correcto funcionamiento del proceso digestivo. Realiza diferentes funciones de carácter fisiológico beneficiosas para el hospedador, tales como la ayuda en la absorción de nutrientes, su papel en la síntesis de las vitaminas K y B, el procesamiento de los residuos alimenticios, el constante estímulo de la respuesta inmune en el hospedador y la inhibición competitiva que ejerce sobre el crecimiento de todo tipo de enteropatógenos (Kruis *et al.* 2004).

En un adulto, *E. coli* representa aproximadamente el 0,1% de la microbiota intestinal y el 80% de la microbiota anaerobia facultativa. Está presente en cantidades variables a lo largo de la cavidad oral y el tracto gastrointestinal con una ubicación sustancial en las partes distales del tubo digestivo (**Figura 2**) (Schulze *et al.* 2006; Tenailon *et al.* 2010).



**Figura 1**  
Colonización secuencial de los intestinos de los neonatos por bacterias aerobias e anaerobias tomado de (Schulze *et al.* 2006)

Existe una sucesión continua de las cepas de *E. coli* en el tracto intestinal. Mientras algunas están presentes y persisten en la flora durante varios meses, otras nos colonizan de manera transitoria y sólo son detectadas durante algunos días (Nowrouzian *et al.* 2003). Sin embargo, se han documentado la presencia de cinco biotipos en las heces de personas sanas al mismo tiempo, lo que indica la diversidad dentro de las cepas de *E. coli* pertenecientes a la microbiota intestinal (Apperloo-Renkema *et al.* 1990).



**Figura 2**  
Presencia de bacterias aerobias e anaerobias en las diferentes partes del tracto orogastrointestinal (tomado de Schulze *et al.* 2006)

*E. coli* es la especie predominante de la microbiota aerobia y anaerobia facultativa del tubo digestivo de la mayoría de los animales de sangre caliente. Al tratarse de una bacteria intestinal, se excreta diariamente con las heces de manera abundante. Las heces de un ser humano contienen entre  $10^8$  y  $10^9$  *E. coli* /g. Como la masa fecal media de una deposición es de unos 200 gramos, esta masa contendrá  $2 \times 10^{10} - 10^{11}$  *E.coli*. Por tanto, la población humana excreta diariamente sobre  $10^{20} - 10^{21}$  *E. coli* al medio ambiente, una cantidad que se ve incrementada por las excreciones de los animales. Se estima que aproximadamente el 90% de estos *E. coli* sobreviven, al menos inicialmente, porque en la mayor parte del mundo los sistemas de alcantarillado no se tratan adecuadamente. Es una bacteria de amplia distribución, pudiéndose encontrar en el medio ambiente, el agua y los alimentos, de ahí que su aislamiento sea un indicador de contaminación fecal reciente (Hartl y Dykhuizen, 1984; Gordon y Cowling, 2003).

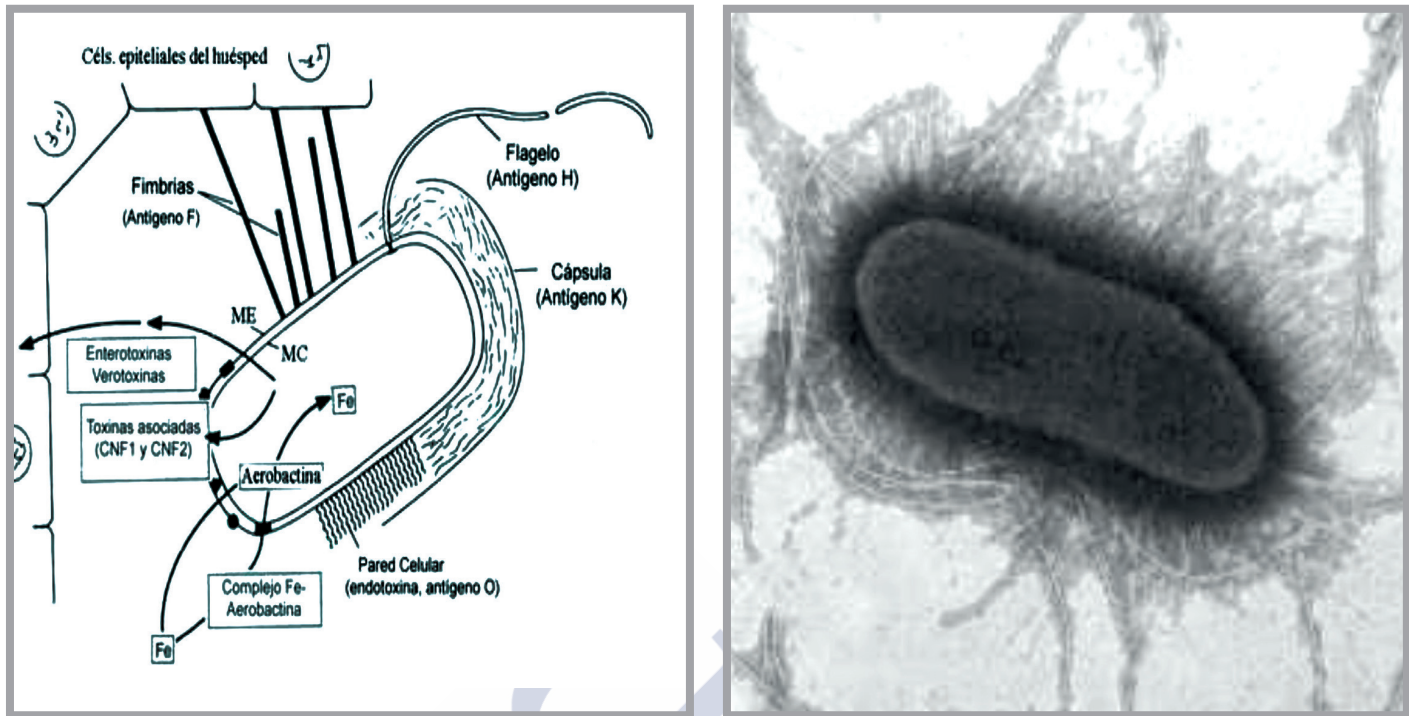
## 1.2 Clasificación serológica

Inicialmente, la clasificación o la diferenciación entre las cepas de *E. coli* se hacía mediante la determinación del biotipo, basado en pruebas bioquímicas como la capacidad de fermentar o no ciertos carbohidratos, pero este método no permitía diferenciar las cepas patógenas de las inocuas por su bajo nivel discriminatorio.

En 1947 Kauffman propone una forma de diferenciar las cepas de *E. coli* en base a sus principales antígenos de superficie determinando: los antígenos somáticos O, capsulares K y flagelares H (**Figura 3**).

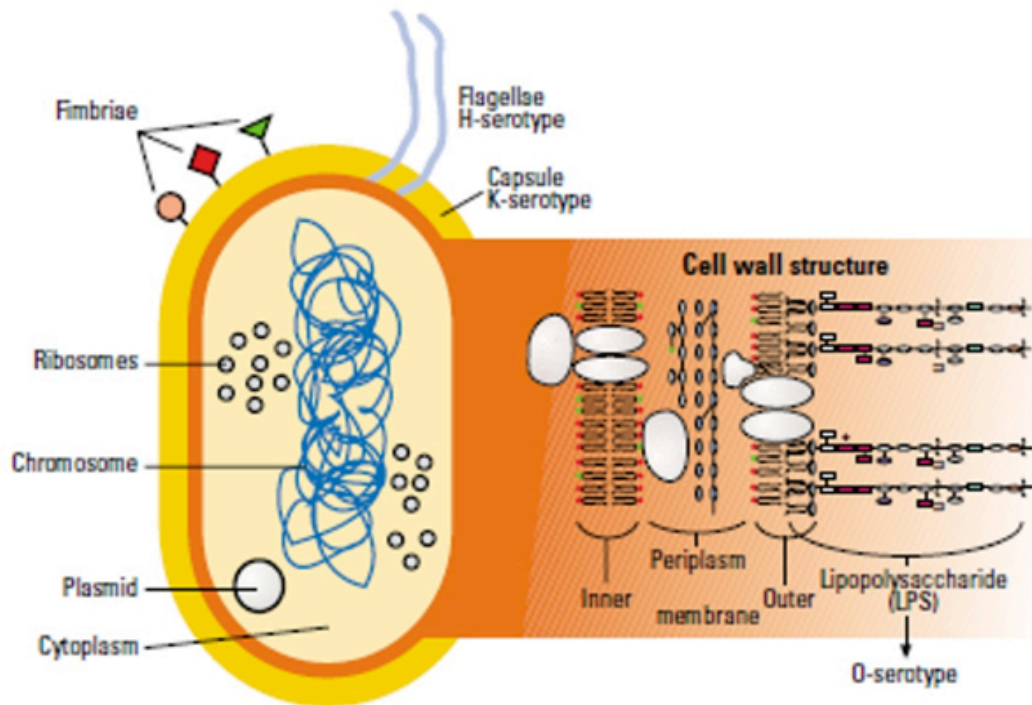
El esquema de clasificación inicialmente propuesto por Kauffman incluía 20 antígenos O, 55 antígenos K y 20 antígenos H. En la actualidad el esquema internacional de tipado reconoce 174 antígenos O (O1 a O185) (eliminando los antígenos O31, O47, O67, O72, O93, O94 y O122) y 53 antígenos H (H1 a H56) (eliminados los H13, H22 y H50) y más de 103 antígenos K. La determinación de los antígenos O y H se realiza por técnicas de aglutinación, mientras que la identificación del antígeno K se realiza por contraelectroforesis. Debido a su complejidad, la determinación del antígeno K no suele hacerse de manera rutinaria, por lo que el serotipo se expresa normalmente con la combinación O:H.





**Figura 3**

Esquema en el que se representan los antígenos de superficie (O, K, H y F) y algunos factores de virulencia (Basado en el original de Johnson , 1991) y fotografía de microscopía electrónica de la bacteria *E. coli* (LREC-USC).



**Figura 4**

Esquema de la estructura de la pared celular de *E. coli* (tomado de Schulze *et al.* 2006)

## Antígeno O

---

El antígeno O es un polisacárido termoestable (121°C/2h) que forma parte del lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa de la pared celular. El LPS, conocido también como endotoxina, consta de tres componentes: (a) el lípido A, que está insertado en la membrana externa, (b) el polisacárido central y (c) una cadena lateral que contiene un gran número de unidades repetitivas de 3 a 6 azúcares cuya combinación determina la diversidad del antígeno O (**Figura 4**).

La biosíntesis del antígeno O está codificada por un cluster de genes denominado el cluster *rfb*, que está generalmente delimitado por los genes *gnd* y *galF*. El número de genes que constituye este cluster puede variar entre 6 y 19, y su tamaño de 4,2 a 20 Kb. Dentro del *cluster rfb* se encuentran los genes que codifican para el antígeno O-flipasa (*wzx*) y antígeno O-polimerasa (*wzy*), responsables de la translocación a través de la membrana y la polimerización del antígeno O respectivamente. Estos genes están bastante conservados entre las cepas *E. coli* y son muy específicos de cada antígeno.

Una limitación importante para el serotipado es el gran número de antisueros necesarios para determinar el antígeno O, existiendo un reducido número de laboratorios nacionales de referencia que dispongan de todos ellos. Por esta razón, se han desarrollado pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específicas, basadas en los genes *wzx* y *wzy*, que permiten detectar e identificar los antígenos O más comunes en cepas implicadas en infecciones graves en seres humanos y animales. (Debroy *et al.* 2011, 2005; Clermont *et al.* 2007; Wang y Quinn, 2010; Ballmer *et al.* 2007; Dan li *et al.* 2010).

## Antígeno K

---

El antígeno K es el polisacárido capsular que envuelve la pared celular y su presencia puede enmascarar y bloquear el reconocimiento del antígeno O inhibiendo su aglutinación. Existen dos grupos de antígenos K, que se corresponden con las variedades K (A) y K (L). Los antígenos K (L) son eliminados al tratarlos a 100°C durante una hora, mientras que los antígenos K (A) requieren una exposición a 121°C durante dos horas y media y se asocian solamente a cepas de los serogrupos O8, O9, O20 y O101.

## Antígeno H

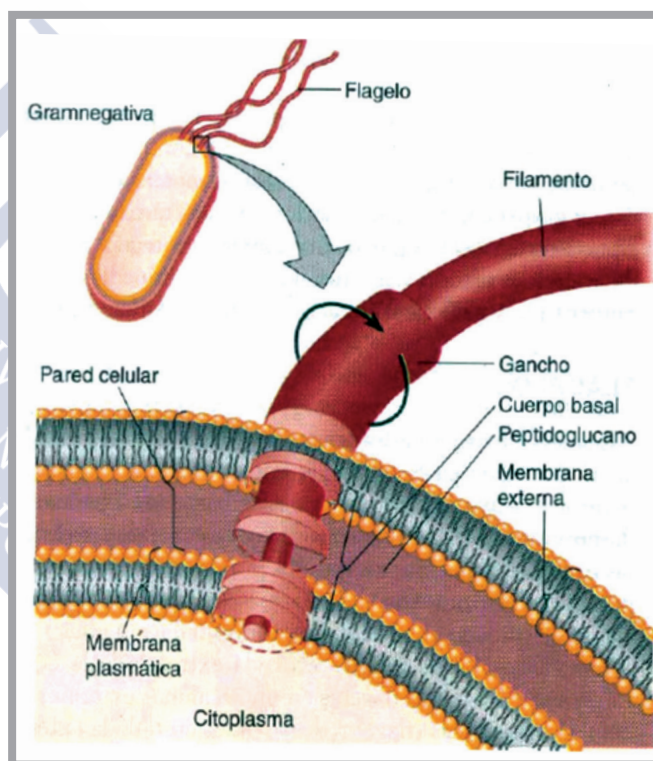
---

*E. coli* es una bacteria peritica, es decir tiene flagelos anclados en la membrana que se proyectan en todas direcciones. Los flagelos son filamentos proteicos, helicoidales, de longitud y diámetro uniforme, responsables de la movilidad de *E. coli* (**Figura 5**). Los flagelos se componen de tres partes: el filamento, el gancho y el cuerpo basal. Durante su síntesis, los componentes del flagelo son capaces de autoensamblarse, sin ayuda de enzimas o de otros factores. La diversidad del antígeno H es debida a los diferentes tipos de flagelina que componen la estructura del flagelo. El antígeno H está codificado por el gen *fliC* en 43 de las 53 antígenos H conocidos; los 10 restantes están codificados por otros genes (*flkA*, *fliA*, *flmA* y otros) que no están muy estudiados.



Las regiones 3' y 5' (N y C) terminal del gen *fliC* están muy conservadas, pero la parte central es variable lo que confiere especificidad al antígeno H.

Las cepas inmóviles poseen también el gen *fliC* pero son incapaces de expresar *in vitro* flagelos funcionales. Recientes estudios indican que la movilidad y, por lo tanto, la presencia de flagelos, puede contribuir a la virulencia. En los últimos años se han desarrollado técnicas moleculares para la determinación del antígeno H en los laboratorios que no disponen de antisueros, como la digestión enzimática del gen *fliC* (HhaI-RFPL) que permite obtener patrones de digestión específicos de cada antígeno H, salvo en los casos donde existen varios alelos para el mismo antígeno (como el H21). Se han puesto a punto también pruebas de PCR basadas en la variabilidad de la región central del gen *fliC* para desarrollar cebadores específicos de algunos antígenos H y también se han desarrollado microarrays. (Wang *et al.*, 2010; Ballmer *et al.*, 2007).



**Figura 5**

Flagelo de una bacteria gram negativa. Figura 4.8. de Introducción a la Microbiología (9ª edición) (2007) TORTORA GJ, FUNKE BR & CASE CL. Editorial Médica Panamericana.

Esta forma de clasificación serológica resultó muy útil en los primeros estudios epidemiológicos, facilitando la diferenciación entre cepas virulentas e inocuas, ya que aunque existen miles de serotipos O:H diferentes, tan solo algunos son especialmente frecuentes entre las cepas patógenas (Guinée *et al.*, 1981; Orskov y Orskov, 1984; Ewing, 1986).

Se puede considerar al serotipado como la primera técnica que ha permitido comparar cepas asociadas con brotes y realizar una primera aproximación al estudio de la clonalidad. No obstante,

el serotipo de las cepas no siempre se correlaciona con un origen evolutivo común o relacionado, ya que cepas genéticamente separadas pueden presentar el mismo serotipo mientras que otras genéticamente próximas pueden tener serotipos diferentes. Así, el desarrollo reciente de las modernas técnicas de Biología Molecular, como MLST (*multilocus sequence typing*), han puesto de manifiesto que las cepas pertenecientes a una misma secuencia tipo (ST) pueden pertenecer a diferentes serotipos.

No obstante, dentro de una determinada secuencia tipo predominan normalmente unos pocos serotipos. Así, la mayoría de las cepas de *E. coli* ST131 (grupo filogenético B2) pertenecen al serotipo O25b:H4, siendo el serotipo O16:H5 el segundo más frecuentemente asociado con esta secuencia tipo (Matsumura *et al.*, 2012; Johnson *et al.*, 2014). No obstante, también se han aislado cepas del serotipo O25b:H4 que presentan la secuencia tipo ST69 (grupo filogenético D) (Colomer-Lluch *et al.*, 2013).

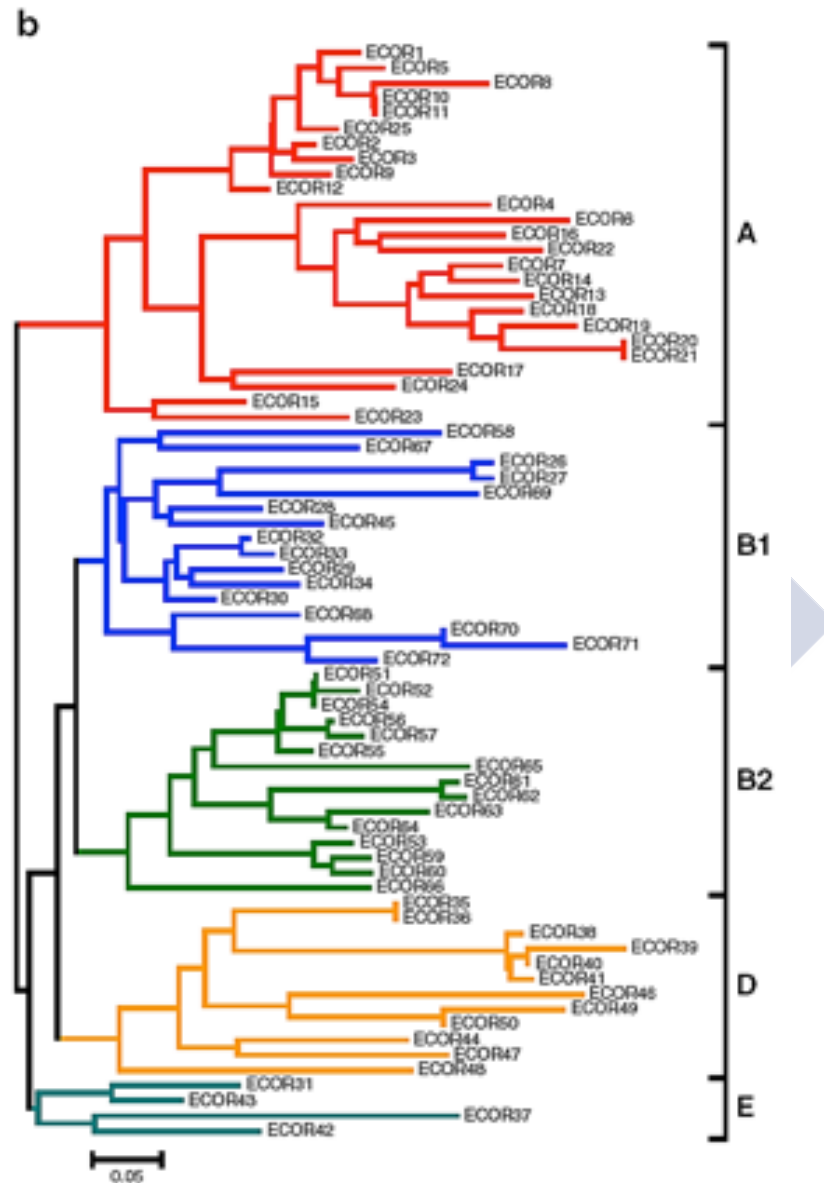
El serotipado, junto con la determinación de los factores/genes de virulencia (patotipo), ha permitido identificar los principales seropatotipos responsables de las infecciones en seres humanos y animales.

### 1.3 Diversidad de las cepas de *E. coli*

Las diferentes cepas de *E. coli* pueden clasificarse en tres categorías atendiendo a su patogenicidad: cepas comensales no patógenas, cepas responsables de patologías intestinales y cepas responsables de patologías extraintestinales (Russo y Johnson, 2000).

El estudio de la diversidad de *E. coli* comenzó en los años cuarenta del siglo pasado clasificando las cepas mediante el biotipado y el serotipado. Posteriormente también se ha utilizado el antibiograma especialmente para comparar las cepas clínicas. Milkman (1973) estudió el polimorfismo proteico de las cepas empleando una técnica llamada MLEE (*multilocus enzyme electrophoresis*), una de las primeras herramientas para el estudio de la variación genética en las poblaciones naturales de bacterias. Esta técnica detecta polimorfismos de proteínas similares mediante la separación de las iso-enzimas por sus diferencias de migración electroforética en condiciones no desnaturantes. La variación de los perfiles electroforéticos es debida en parte a sustituciones de aminoácidos que influyen en la carga electrostática de la proteína. Ochman y Selander (1984) aplicaron esta técnica para el estudio de 35 enzimas sobre una colección de cepas de referencia denominada ECOR. Esta colección está compuesta por 72 cepas patógenas y comensales aisladas de humanos

y animales de distintos orígenes geográficos. Aunque el objetivo de la creación de esta colección fue representar la diversidad de esta especie, no se incluyeron cepas diarregénicas. El resultado de este estudio fue la definición de seis grandes grupos filogenéticos: A, B1, B2, C, D y E. En estudios posteriores, donde se amplió el número de enzimas a 38, y aplicando un análisis informático más robusto, se eliminó el grupo C al ser englobado en los grupos B1 y B2 (**Figura 6**) (Chaudhuri *et al.* 2012).



**Figura 6**  
Clasificación filogenética de las cepas ECOR utilizando MLEE (Chaudhuri *et al.*, 2012)

El grupo A es considerado el más antiguo y la cepa K12 está incluida en él. La aplicación de estudios similares a otras colecciones de cepas, como la colección DEC, formada por 78 cepas diarragénicas, y utilizando diferentes métodos filogenéticos, confirmó la validez de esta clasificación y la predominancia de los grupos A, B1, B2 y D.

En el año 2000, Clermont y colaboradores desarrollaron un método más sencillo que MLEE para determinar el grupo filogenético, evaluando la presencia o ausencia de los genes *chuA* (presente en los grupos B2 y D, ausente en el grupo D) y *yjaA* (presente en el grupo B2, ausente en el D) y el fragmento de ADN TSPE4.C2 (presente en el grupo B1 pero ausente el grupo A). Sin embargo este método tiene sus limitaciones, puesto que algunas cepas no son clasificables en ninguno de los grupos propuestos, y existe un margen de error que limita la fiabilidad al 80-85%.

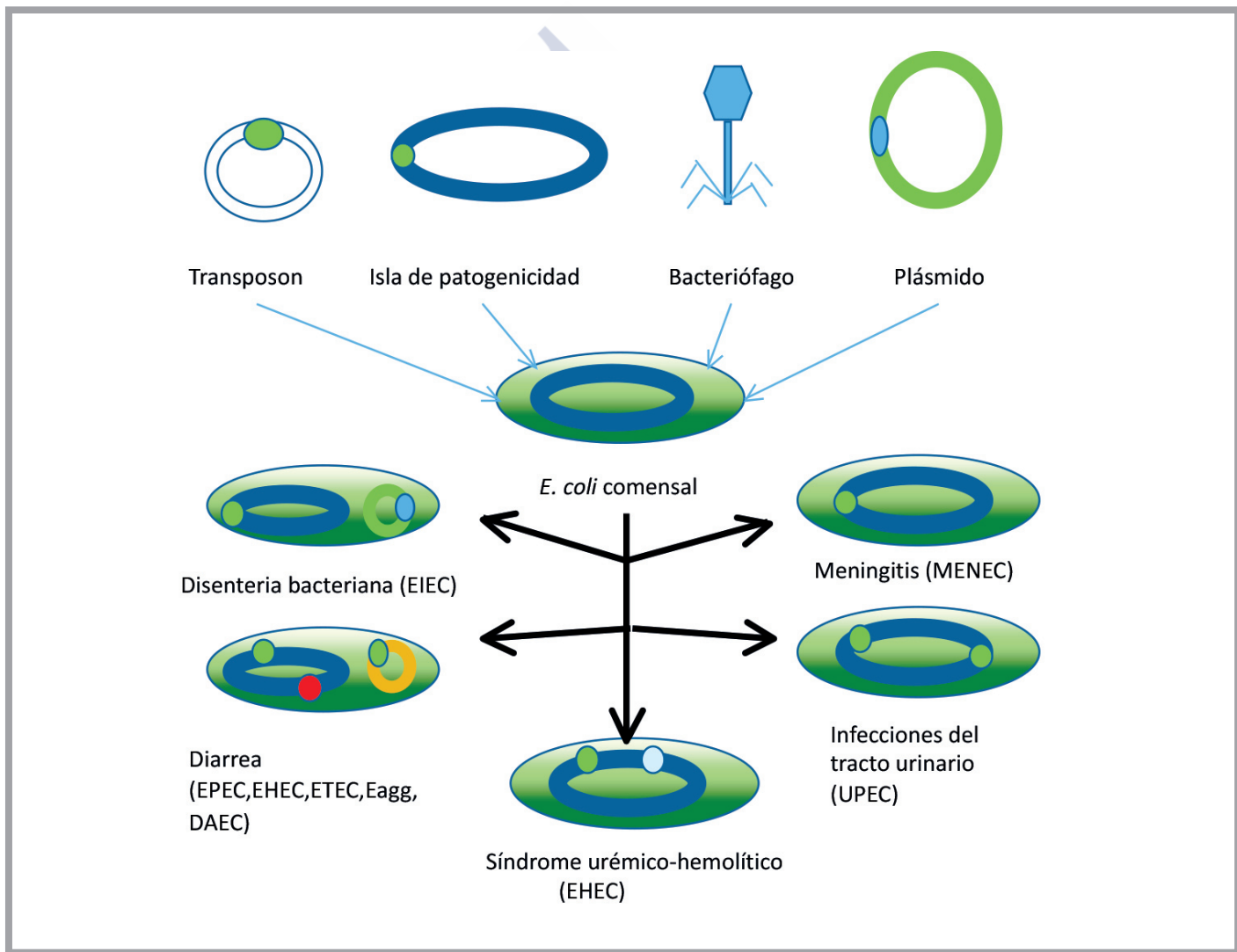
Las cepas comensales se clasifican mayoritariamente dentro de los grupos filogenéticos A y B1. La gran mayoría de las cepas patógenas intestinales pertenecen a los grupos A, B1 y D, mientras que las cepas patógenas extraintestinales pertenecen principalmente a los grupos B2 y D (Chaudhuri *et al.* 2012).

Los resultados del estudio de Rode y colaboradores (1999) sobre el análisis comparativo del genoma de diferentes cepas de *E. coli* confirmó los resultados preliminares de Bergthorsson y Ochman (1998) sobre la colección ECOR, revelando la gran variabilidad del tamaño del genoma que puede oscilar entre 4,5 y 5,5 Mb, siendo las cepas patógenas las que presentan un genoma mucho más grande. Esta variabilidad de tamaño entre cepas es debida principalmente a la adquisición o pérdida de material genético. Algunas cepas de *E. coli* fueron adquiriendo a lo largo de la evolución un amplio repertorio de genes de virulencia, los cuales a menudo se localizan en elementos genéticos transmisibles como transposones, plásmidos o bacteriófagos. Estos genes también pueden estar agrupados en grandes bloques de ADN llamados islas de patogenicidad (**Figura 7**). Además de la adquisición de genes de virulencia mediante elementos transmisibles, la delección, la inactivación o mutaciones puntuales en genes preexistentes pueden contribuir a la virulencia y/o cambios fenotípicos (Dobrindt *et al.* 2010; Schulze *et al.* 2006).

El análisis de los genomas secuenciados muestra un contenido promedio de G+C en *E. coli* del 50,8%, aunque un número importante de genes contiene diferentes proporciones de G+C y un índice de uso de codones muy diferente al resto del genoma, lo que sugiere que estos genes provienen de otros linajes bacterianos y fueron adquiridos por transferencia horizontal. Por ejemplo, el 17% del genoma de la cepa comensal K12 y el 26% de la patógena ECEH O157:H7 tiene un porcentaje de G+C distinto del promedio típico de *E. coli* (50,8%). Entre estos genes con contenido G+C diferente destacan las llamadas islas de patogenicidad, que son regiones donde se concentran algunos de los genes de virulencia. Este proceso de transferencia horizontal origina genomas bacterianos que consisten en mosaicos de genes con diferentes historias evolutivas (Boyd *et al.* 1996; Sandner *et al.* 2001).

Dentro de *E. coli* existe una gran diversidad genética y ecológica, así como una alta tasa de recombinación e intercambio genético, lo que permite generar gran cantidad de genotipos, aunque esto no suceda en todas las generaciones.

El resultado de estos movimientos genéticos puede dar lugar a una combinación exitosa que permita invadir nuevos nichos ambientales o nuevos hospedadores. Estos sucesos generan nuevas variantes de *E. coli* que pueden llegar a ser muy competitivas, como por ejemplo las cepas enterohemorrágicas del serotipo O157:H7. Esto sugiere que la biología básica de *E. coli* es mucho más compleja e interesante de lo que los estudios clásicos indicaban.

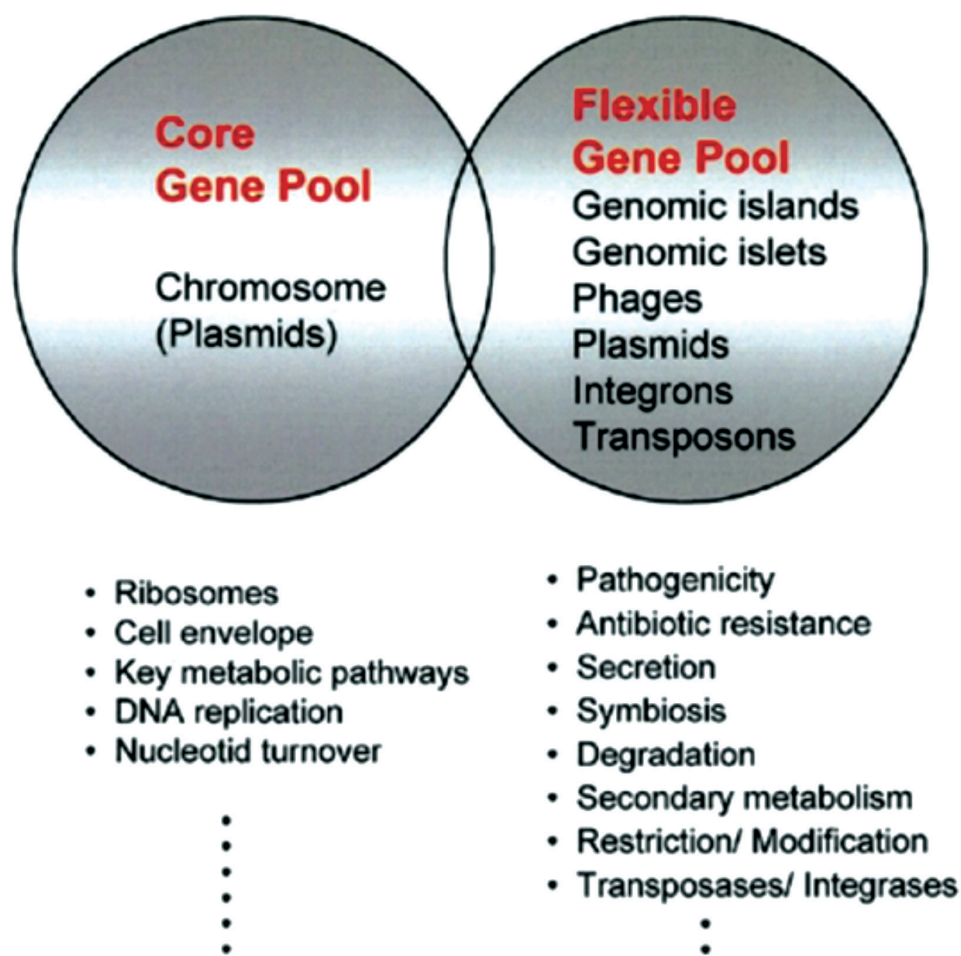


**Figura 7**

Evolución del genoma bacteriano por adquisición o pérdida de información genética (figura modificada de Kaper *et al.*, 2004).



El genoma de los *E. coli* se puede dividir en dos partes (**Figura 8**). La primera parte, llamada núcleo genómico (*core gene pool*), contiene todos los genes comunes de *E. coli* y proviene de un mismo ancestro. Estos genes son codificadores de proteínas esenciales en las funciones fisiológicas de la bacteria (proteínas implicadas en la traducción, el metabolismo, los ribosomas...). La segunda parte, llamada conjunto flexible de genes (*flexible gene pool*), contiene genes que codifican para funciones adicionales no esenciales para la vida de la bacteria y que, sin embargo, le confieren ciertas ventajas; tal es el caso de los genes que codifican para factores de virulencia, adaptación a diferentes ambientes, diseminación, resistencia a los antibióticos, etc (Hacker y Carniel, 2001; Tenailon *et al.* 2010).



**Figura 8**  
Representación de los elementos de un genoma bacteriano (Hacker y Carniel, 2001)

El proceso evolutivo ha hecho de *E. coli* una especie muy versátil, capaz de colonizar nuevos nichos ecológicos, multiplicarse y producir patologías particulares en animales y seres humanos, tanto de tipo entérico (diarreas, disentería, colitis hemorrágica (CH), síndrome urémico hemolítico (SUH) y enfermedad de los edemas) como extraintestinal (infección del tracto urinario (ITU), bacteriemias o septicemias, meningitis, peritonitis, mastitis, e infecciones pulmonares y de heridas). Sin

Sin embargo, *E. coli* puede ser también una especie probiótica. Su utilización como probiótico comenzó en los años 1920 por Alfred Nissle (Nissle, 1918) con el aislamiento de la cepa denominada Nissle 1917. Esta cepa se aisló de las heces de un soldado que no desarrolló diarrea durante la epidemia de *Shigella* en la primera guerra mundial. Los estudios demostraron la eficacia de la cepa Nissle 1917 en casos de enteritis, gastroenteritis, colitis ulcerosa y otras enfermedades inflamatorias crónicas (Kruis *et al.*, 2004; Schulze *et al.* 20006).

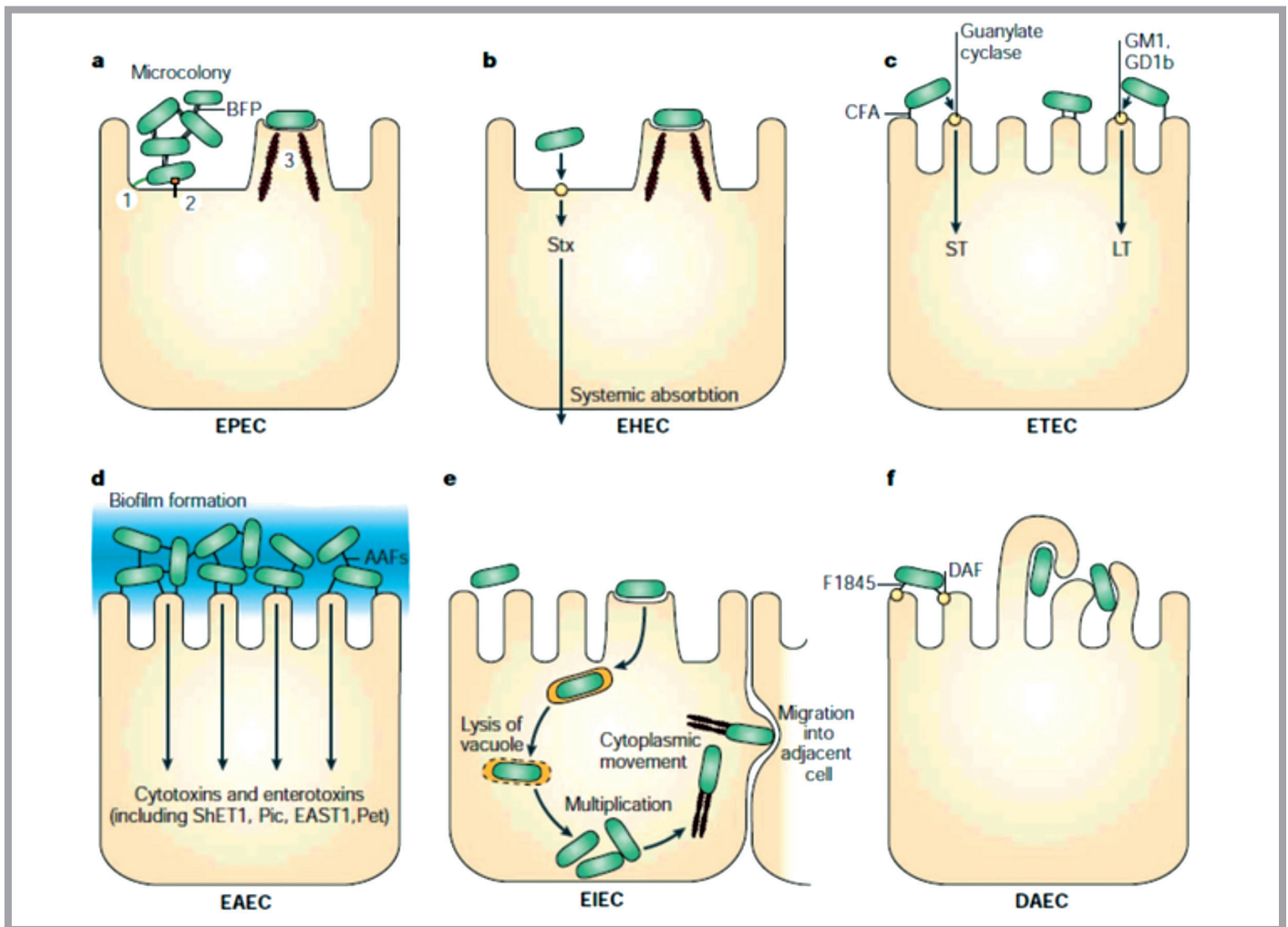
## 1.4 *E. coli* patógeno intestinal

*E. coli* provoca en seres humanos del orden de 630 millones de casos de diarrea en el mundo y aproximadamente 775.000 muertes al año, afectando fundamentalmente a la población infantil del tercer mundo. En animales domésticos las colibacilosis son muy frecuentes, incidiendo esencialmente en animales de pocos días de vida y en recién destetados, y ocasionan importantes pérdidas económicas en las explotaciones de ganado bovino, porcino y ovino, así como en las de cría intensiva de conejos.

Los *E. coli* patógenos intestinales se han englobado en diferentes grupos o patotipos: *E. coli* enteropatógenos (EPEC), al que pertenecen las cepas en las que por primera vez se reconoció capacidad patogénica de *E. coli* en la década de 1930; *E. coli* enterotoxigénicos (ETEC); *E. coli* enteroinvasivos (EIEC); *E. coli* verotoxigénicos (VTEC), también conocidos como productores de toxina Shiga (STEC) o enterohemorrágicos (EHEC); *E. coli* enteroagregativos (EAEC o EAggEC); *E. coli* con adherencia difusa (DAEC) y *E. coli* adherentes invasivos (AIEC). Las cepas de estos grupos presentan mecanismos de patogénesis específicos, serotipos distintos y producen infecciones y síndromes diferentes (Blanco *et al.* 1992, 1993, 1996, 1997, 2002, 2004a,b,c; De Rycke *et al.* 1990; Holland, 1990; Johnson, 1991; Cid *et al.* 1996; Nataro y Kaper, 1998; Dho y Fairbrother, 1999; Mora 2002; Kaper *et al.* 2004; Aidar-Ugrinovich *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2007; Martínez-Medina *et al.* 2009).

Para sobrevivir y multiplicarse en el tracto intestinal, las cepas de *E. coli* deben sobrepasar las primeras barreras de defensa del hospedador: el movimiento peristáltico del intestino y la barrera de la microflora comensal. Esta microbiota acapara los nutrientes, produce inhibidores y ocupa la superficie de la mucosa. Las cepas de *E. coli* patógenas pueden superar esta barrera gracias a su capacidad para competir, bajo condiciones de anaerobiosis, por las fuentes de energía, de carbono y de hierro, de producir bacteriocinas, así como por un rápido crecimiento.





**Figura 9**  
Mecanismos de patógenesis de las seis categorías reconocidas de *E. coli* diarregénicas (Kaper *et al.* 2004)

Las cepas de *E. coli* que causan infecciones entéricas en seres humanos y animales pueden compartir determinados factores de virulencia pero en general presentan diferentes serotipos y poseen adhesinas específicas que son responsables de su especificidad de hospedador. Por lo tanto, las cepas diarregénicas de *E. coli* para seres humanos no suelen producir infecciones en animales y viceversa. No obstante, se ha comprobado que los animales pueden ser un reservorio de *E. coli* enteropatógenos para las personas. Así, los *E. coli* verotoxigénicos (VTEC), que causan CH y SUH en humanos, forman parte de la microbiota intestinal de los rumiantes donde se comportan, en la mayor parte de los casos, como comensales.

Actualmente el término patotipo (menos comúnmente el de patovar) se emplea para identificar los diferentes tipos de *E. coli* en base a sus mecanismos de virulencia. Así, los principales patotipos entre *E. coli* causantes de infecciones entéricas serían: EPEC, ETEC, EIEC, VTEC/STEC/EHEC, EAEC, DAEC, AIEC (**Figura 9**).

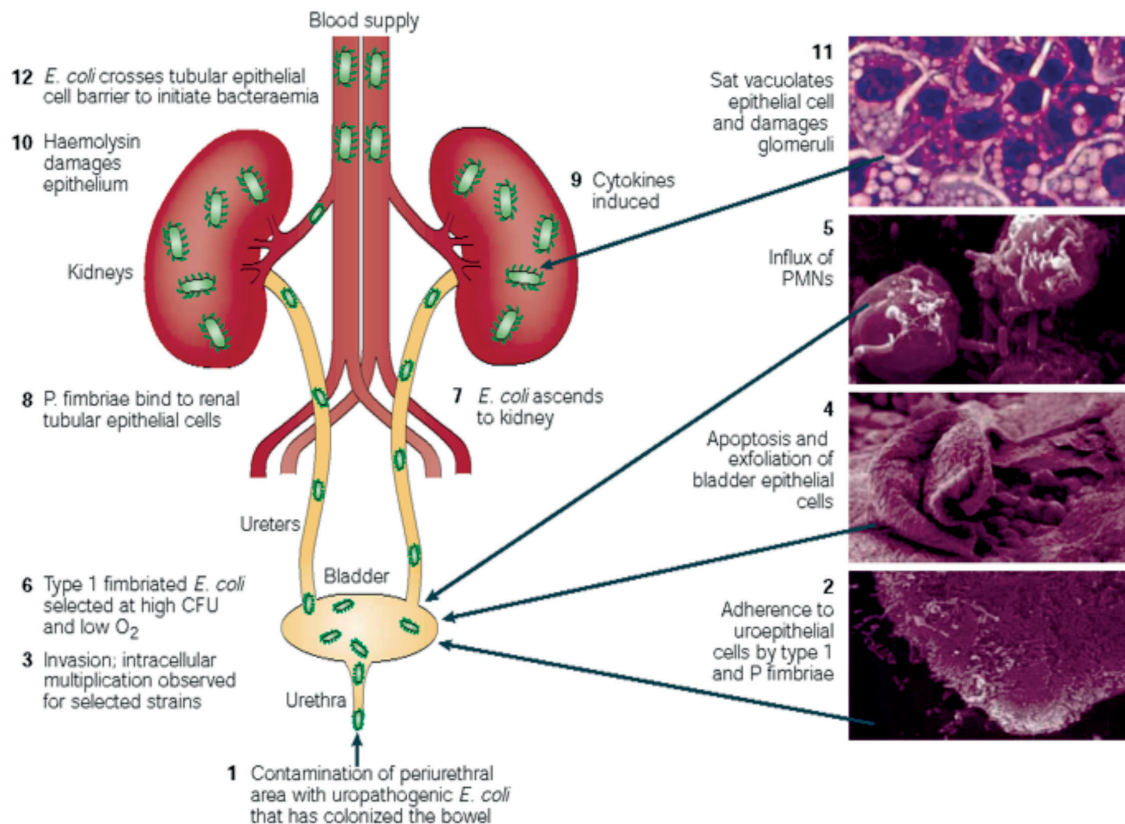
## 1.5 *E. coli* patógeno extraintestinal (ExPEC)

Las cepas patógenas extraintestinales de *E. coli* (ExPEC) son capaces de causar diferentes infecciones en los seres humanos y animales de sangre caliente. En los seres humanos *E. coli* es uno de los principales responsables de infecciones urinarias (*E. coli* uropatogénicos, UPEC), septicemias (*E. coli* bacteriémicos o septicémicos, SEC) y de meningitis en los recién nacidos (*E. coli* causantes de meningitis neonatales, NMEC) (Bidet *et al.* 2007; Blanco *et al.* 1992a, 1994, 1996; Russo y Johnson, 2000; Johnson y Russo, 2002; Smith *et al.* 2007). En los animales es de especial relevancia las elevadas pérdidas económicas que padece la industria avícola debido a las colibacilosis por APEC que causan infecciones respiratorias y sepsis (Blanco *et al.* 1997a, 1998; Mora *et al.* 2009, 2012, 2013; Moulin-Schouleur *et al.* 2006; Schouler *et al.* 2012). En el ganado bovino *E. coli* puede causar mamitis. Los animales de compañía como los perros y gatos también sufren infecciones por cepas ExPEC que pueden compartir genes de virulencia con cepas causantes de infecciones en seres humanos (Dho-Moulin y Fairbrother, 1999; Shpigel *et al.* 2008; Bélanger *et al.* 2011).

El tracto urinario es un medio protegido de los patógenos por el flujo urinario, por factores antibacterianos secretados por las células epiteliales y por la actividad del sistema inmune. Las infecciones del tracto urinario (ITUs) son infecciones comunes en los seres humanos, afectando mayoritariamente a las mujeres, siendo *E. coli* el agente etiológico más frecuentemente aislado. Se estima que cada año en el mundo tienen lugar unos 130-175 millones de ITUs en seres humanos, y un 80% de las mismas son causadas por cepas UPEC (también conocidas como ExPEC) (Russo y Johnson, 2003). Estas ITUs varían en severidad y localización y pueden ser incluso asintomáticas. Las infecciones urinarias empiezan por la entrada de una cepa patógena de *E. coli* en el tracto urinario, que asciende por la uretra hasta la vejiga donde se desarrolla la primera infección (cistitis). Algunas cepas pueden seguir ascendiendo por los uréteres y llegar al riñón causando pielonefritis, e incluso pueden atravesar la barrera endotelial y entrar en la circulación sanguínea provocando bacteriemias/septicemias/sepsis (**Figura 10**) (Wiles *et al.* 2008; Kaper *et al.* 2004).

Inicialmente se desarrollaron dos teorías para explicar la relación entre las cepas fecales de *E. coli* y las causantes de ITUs: la teoría de la prevalencia y la teoría de la especial patogenicidad. La primera sostenía que la cepa presente en mayor abundancia en la flora normal intestinal era la que usualmente causaba las ITUs, mientras que la segunda apoyaba la idea de que sólo determinadas cepas con factores de virulencia eran capaces de producir infecciones extraintestinales. Los resultados obtenidos en la década de los ochenta y noventa del siglo pasado confirmaron la validez de la teoría de la especial patogenicidad, ya que se comprobó que estas cepas presentaban una serie de factores de virulencia que les permiten invadir, colonizar y dañar el tracto urinario. No obstante,

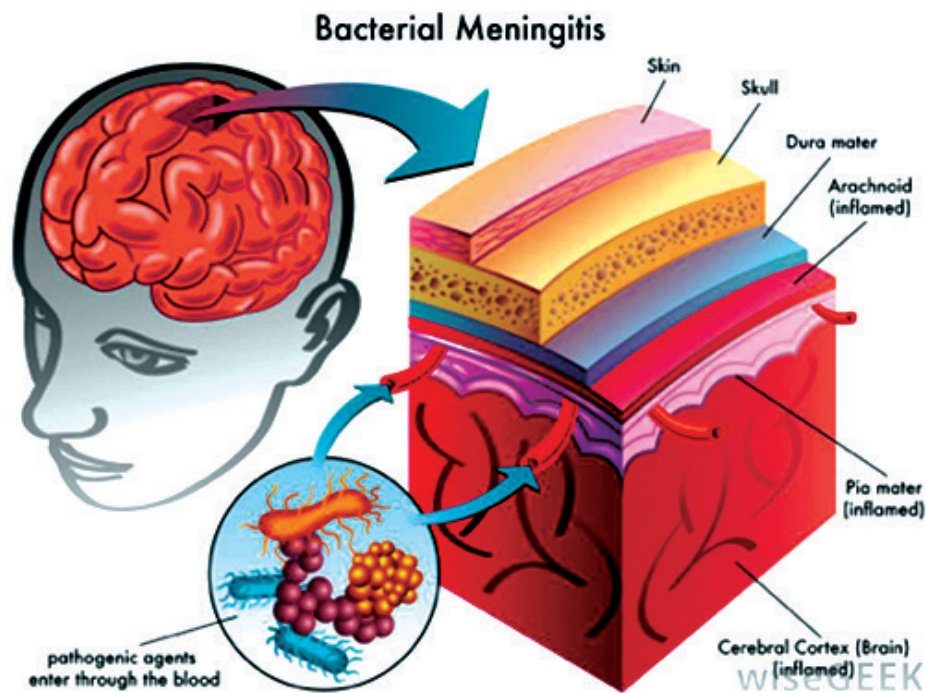
si las defensas del hospedador están suficientemente disminuidas, incluso cepas con escasos factores de virulencia presentes en la flora intestinal podrían ser potencialmente virulentas (Blanco *et al.* 1991, 1992a; Johnson, 1991; Mora *et al.* 2009).



**Figura 10**

Las diferentes etapas de la infección del tracto urinario (Kaper *et al.*, 2004).

*E. coli* es la primera causa de meningitis bacteriana neonatal dentro de las meningitis causadas por bacterias gram negativas. La tasa de mortalidad de estas infecciones varía del 15% al 40%, con secuelas neurológicas en aproximadamente el 60% de los casos (Unhanand *et al.* 1993; Dawson *et al.* 1999). La infección puede tener lugar a la hora del nacimiento o por transmisión a través del cordón umbilical infectado. El desarrollo de la enfermedad comienza con la colonización e invasión de las mucosas digestivas o respiratorias. A continuación, las bacterias migran al espacio intravascular donde sobreviven y se multiplican provocando una bacteriemia. A partir de una concentración elevada de bacterias en sangre, cruzan la barrera hematoencefálica e invaden las meninges y el sistema nervioso central, desencadenando una respuesta inflamatoria que conduce a una disminución de la presión intracraneal, a la formación de edemas y de lesiones neuronales (**Figura 11**) (Kim, 2002, 2003, 2008).



**Figura 11**

Meningitis bacteriana. Tomado de <http://es.dreamstime.com>

Por último, las cepas ExPEC también constituyen una de las principales causas de infecciones septicémicas nosocomiales en asilos y hospitales (Ron, 2006). Los pacientes de larga duración pueden desarrollar neumonía, bacteriemia o prostatitis (Russo y Johnson, 2003). Estas infecciones son más difíciles de combatir cuando las cepas implicadas son resistentes a los antibióticos (Ron, 2006).

### 1.5.1 Factores de virulencia

Las cepas patógenas de *E. coli* poseen diferentes tipos de factores de virulencia que contribuyen conjuntamente a potenciar su patogenicidad, por lo que se dice que su virulencia bacteriana es un fenómeno multifactorial. Las cepas ExPEC están implicadas en un amplio espectro de enfermedades que se puede asociar con la gran diversidad genómica que las caracteriza, como por ejemplo, la presencia de varios factores de virulencia tales como la presencia de varias combinaciones de adhesinas, distintos sistemas de adquisición de hierro, producción de toxinas, mecanismos de evasión del sistema de defensa del hospedador y otros... Sin embargo, no se puede establecer una relación entre algún factor de virulencia extraintestinal concreto y una patología específica. Actualmente se acepta que una cepa posee el estatus ExPEC cuando al menos posee dos de los siguientes genes de virulencia asociados con infecciones extraintestinales: *pap*, *sfa/foc*, *afa/dra*, *iutA* y *kpsMT II* (Johnsons *et al.* 2003). No obstante, en muchos estudios se engloban dentro del patotipo ExPEC a cualquier tipo de cepa de *E. coli* aislada de una infección extraintestinal.



## Adhesinas

La colonización del tracto urinario es un paso esencial en el proceso de la infección, a falta de unión de la bacteria a las células epiteliales sería expulsada del tracto urinario por la fuerza de la micción. Las cepas ExPEC poseen varias adhesinas como la fimbria común tipo 1, y las P, S y Afa/Dr.

- La fimbria tipo 1 está presente en el genoma del 99% de las cepas *E. coli* (Vigil *et al.* 2011 a, b) y está implicada en la adherencia e invasión de las células de la vejiga.
- La fimbria tipo P es un importante factor de virulencia de las cepas ExPEC, se encuentra presente en la mayor parte de las cepas aisladas de pacientes con pielonefritis y urosepsis. Esta fimbria permite a las bacterias fijarse a los receptores celulares y colonizar el epitelio urinario sin ser arrastradas por la orina (Vigil *et al.* 2011b).
- La fimbria tipo S ha sido asociada especialmente con cepas causantes de septicemias y meningitis. Muchas cepas uropatogénicas y septicémicas humanas expresan las fimbrias P y S al mismo tiempo (Spurbeck *et.* 2011).
- Las adhesinas Afa/Dr, asociadas con cepas causantes de infecciones urinarias y septicemias, ayudan a las bacterias a evadir la respuesta inmune humoral facilitando así la invasión de las células epiteliales (Fang *et al.* 2004).

Existe una jerarquía en la expresión de las fimbrias P, S y tipo 1. La fimbria tipo 1 se expresa en las primeras fases del desarrollo de la infección que tiene lugar en la vejiga. Sin embargo, deja de expresarse en el riñón ya que puede entorpecer la adherencia a las células renales, donde se expresarán las fimbrias P y S. Este tipo de regulación jerárquica puede ser esencial para el patógeno, ya que asegura que solo las fimbrias necesarias implicadas en la adherencia a un tejido determinado se expresen en su momento dado, y así limitar la exposición de los antígenos al sistema inmune, lo que permite al patógeno eludir una respuesta de anticuerpos (Lindberg *et al.* 2008).

Existen muchas más adhesinas presentes en las cepas ExPEC, pero también proteínas que cumplen funciones similares como es el caso de la *Tsh* (*Temperature Sensitive Hemagglutinin*). Esta proteína desempeña un papel de adhesión en las primeras fases de la infección (Kostakioti y Stathopoulos, 2004).

Al papel que desempeñan estas adhesinas en el proceso de infección, habría que añadir la función de los flagelos que juegan un papel muy importante en la colonización del tracto urinario. Sin movilidad, las bacterias tienen menos acceso a los tejidos diana para iniciar la adherencia y dar así comienzo a la infección.

## Toxinas

Las toxinas son factores de patogenicidad muy importantes en las infecciones tanto intestinales como extraintestinales. Gracias a su acción de destrucción de células del hospedador, la bacteria puede progresar en su diseminación por los tejidos y adquirir nutrientes y otros factores necesarios durante la infección.

- La  $\alpha$ -hemolisina (Hly) es una toxina presente en las cepas causantes de infecciones urinarias, sepsis y otras infecciones extraintestinales. Esta toxina ejerce una actividad citolítica sobre diferentes tipos de células como eritrocitos, monocitos, células endoteliales y células epiteliales tubulares renales. La  $\alpha$ -hemolisina contribuye también al suministro de hierro a la bacteria (Wiles *et al.* 2008).
- La toxina *Sat* (*Secreted Autotransporter Toxin*) está presente en cepas ExPEC y muy especialmente en cepas causantes de pielonefritis. Provoca efectos citopáticos sobre células renales y de la vejiga (Guyer *et al.* 2002).
- CDT (*Cytolethal Distending Toxin*) es una toxina con actividad catalítica asociada con infecciones intestinales y extraintestinales. Se han encontrado al menos cinco variantes en cepas implicadas en diferentes infecciones. Las variedades CDT-I, CDT-II y CDT-IV han sido identificadas en cepas ExPEC (Dubois *et al.* 2010).
- E. coli* puede producir tres tipos de factores necrosantes citotóxicos (*Cytotoxic Necrotizing Factor*): CNF1, CNF2 y CNF3 (De Rycke *et al.* 1990; Orden *et al.* 2007). Muchas cepas ExPEC causantes de ITUs y sepsis en seres humanos producen la variedad CNF1 y producen además  $\alpha$ -hemolisina (Hly) (Blanco *et al.* 1990 y 1997).

### Sideróforos

El hierro es un compuesto esencial para el crecimiento y supervivencia de las bacterias, convirtiéndose en uno de los factores que limitan su crecimiento en los tejidos corporales. Esta limitación se debe, en gran parte, al hecho de que dentro del hospedador casi todo el hierro está secuestrado en hemoproteínas o en proteínas quelantes de hierro involucradas en su transporte. Por lo tanto, los diferentes patógenos bacterianos, incluyendo *E. coli*, han desarrollado sistemas para su captación que representan importantes factores de virulencia. Estos sistemas se basan en el uso de moléculas con alta afinidad por el hierro (sideróforos) que captan el hierro presente en el medio ambiente circundante. Estas moléculas cargadas de hierro se internalizan a través de receptores presentes en la membrana de las bacterias (Skaar, 2010).

Para poder incorporar el hierro, las cepas ExPEC pueden sintetizar hasta cuatro sistemas de captación: enterobactina, salmoquelina, aerobactina y yersiniabactina. La adquisición del hierro mediante estos sistemas necesitan de varias etapas, como la síntesis del sideróforo en el citoplasma, la secreción del sideróforo (por ejemplo Aer en el sistema aerobactina), la recepción del complejo hierro-sideróforo mediante su receptor (*IutA* en el sistema aerobactina), internalización de este complejo y la liberación del hierro en el citoplasma (Garénaux *et al.* 2011).

### Resistencia al suero y a la fagocitosis

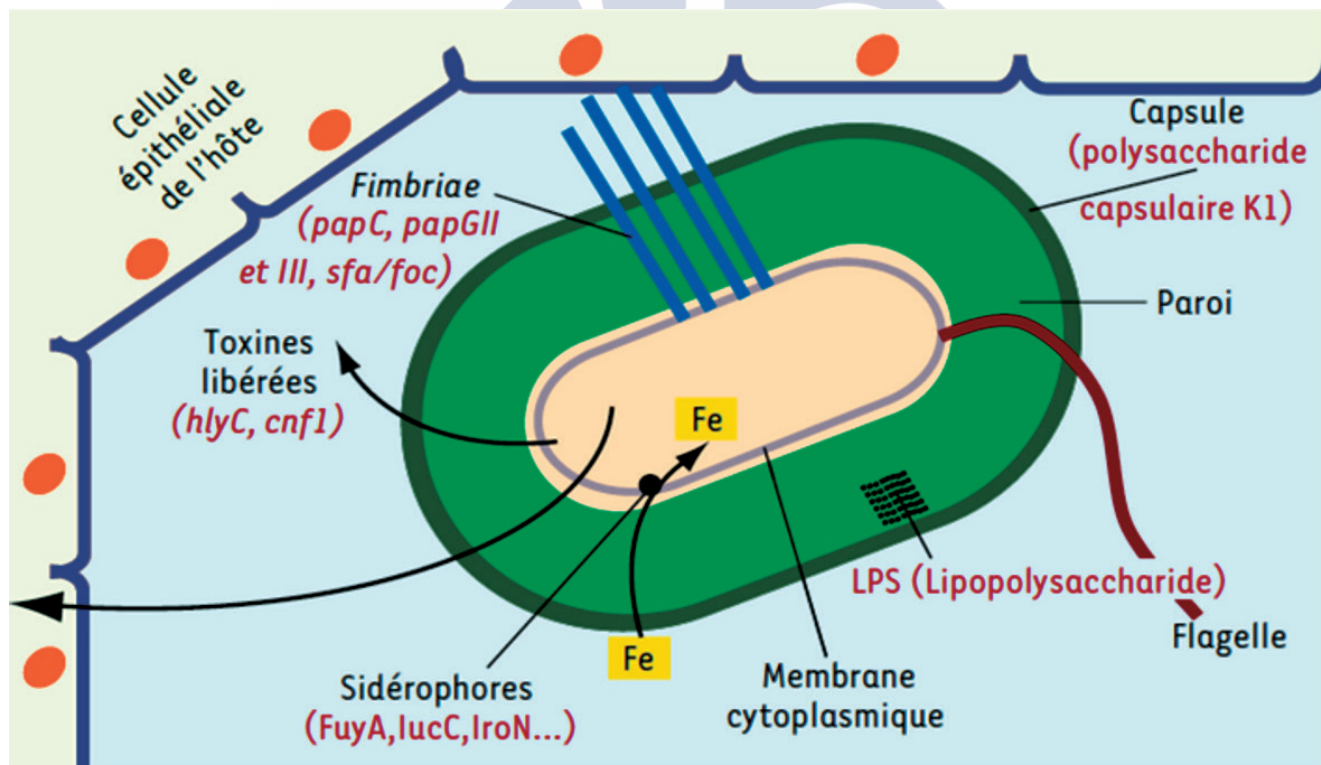
Una de las propiedades de las cepas ExPEC es la resistencia a la actividad bactericida del suero evitando su bacteriólisis.



La cápsula es la capa más externa de las cepas de *E. coli*, por lo que puede mediar interacciones entre la bacteria y su entorno inmediato. Los antígenos capsulares se dividen en cuatro grupos: IA, IB, II y III. La gran mayoría de las cepas ExPEC producen una cápsula de los grupos II o III. Estas cápsulas juegan un papel protector contra la fagocitosis y la actividad bactericida del suero (Whitfield, 2006).

El lipopolisacárido (LPS) o antígeno somático O es otro elemento de la membrana externa de *E. coli* implicado en la resistencia al suero. El LPS también llamado endotoxina, puede ser considerado un factor de patogenicidad debido a su efecto tóxico en el hospedador y la respuesta inflamatoria asociada (Johnson, 2003).

Entre las proteínas de membrana externa involucradas en la resistencia al suero podemos nombrar las lipoproteínas TraT e Iss (*Increased Serum Survival*). Iss incrementa la supervivencia en suero y TraT aumenta la resistencia de la bacteria a la acción lítica del complemento debido a la interacción de estas proteínas con el complemento, lo que produce una disminución de interacción entre la membrana bacteriana y el propio complemento, reduciendo así la fagocitosis (Sukupolvi y O'Connor, 1990).



**Figura 12**

Representación de los diferentes factores de virulencia de ExPEC (Jauréguy, 2009).

Se han descrito muchos más factores de virulencia extraintestinales, como la proteína IbeA (*Invasion of Brain Endothelium*), relacionada con la formación de biopelículas que ayudan a la supervivencia de las bacterias y la capacidad invasiva (Germon *et al.* 2005; Wang *et al.* 2011). También la proteína Usp (*Uropathogenic Specific Protein*) y las colicinas. Estas últimas son moléculas antimicrobianas capaces de lisar otras cepas, lo que les permitirá competir contra ellas y aumentar su infectividad (Parret y De Mot, 2002).

Podemos concluir que las cepas ExPEC son capaces de causar diversas infecciones gracias al gran arsenal de factores de virulencia que presentan, que les permiten adherirse a los receptores celulares, colonizar los diferentes tejidos, captar hierro, invadir y dañar las células, resistir la actividad lítica del suero y la fagocitosis y evadir el sistema inmune específico gracias a su enorme diversidad genética (**Figura 12**).

## 1.6 Antibióticos $\beta$ -lactámicos

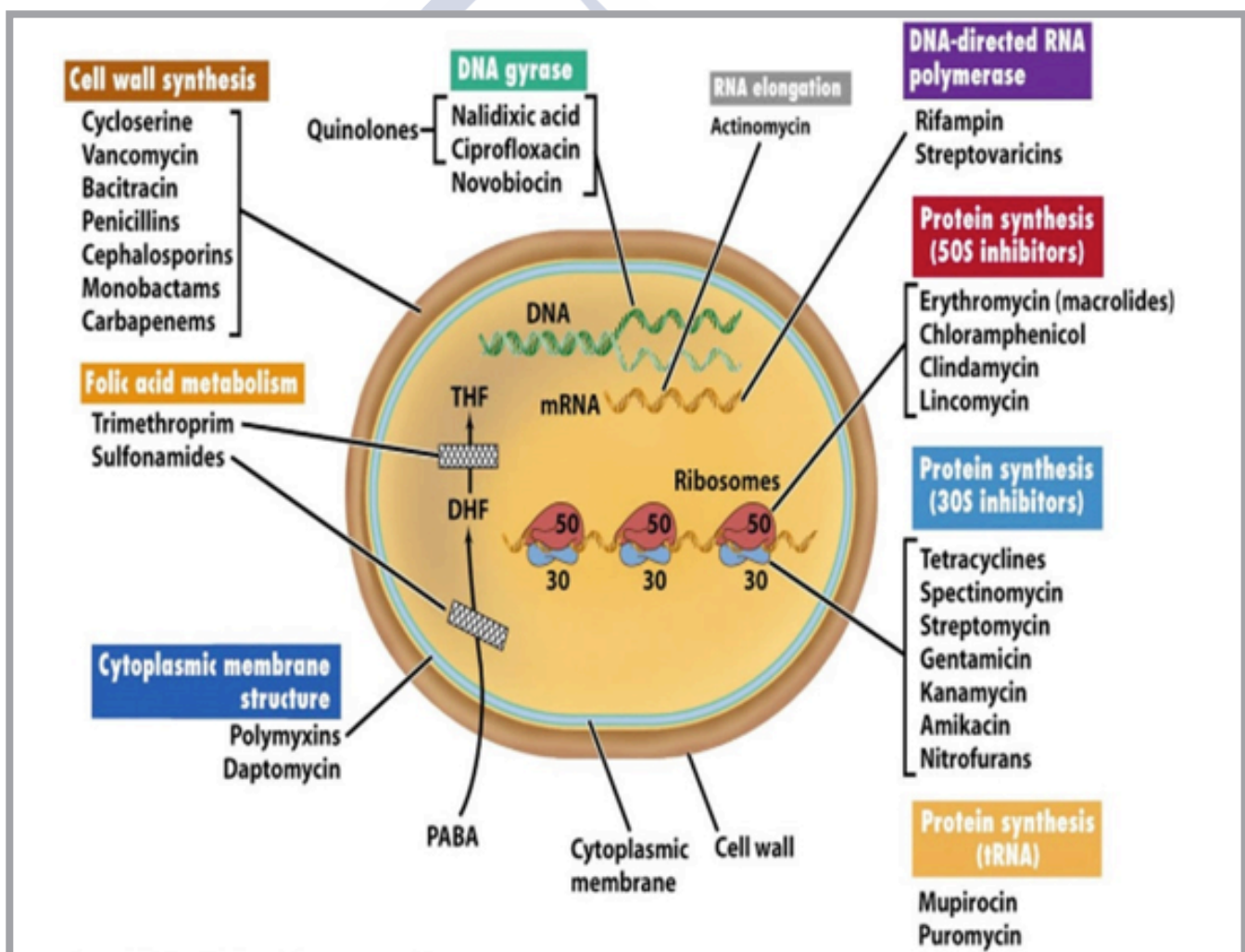
Un antibiótico es una molécula natural (producida por un organismo vivo, hongo o bacteria), sintética o semisintética, capaz de inducir la muerte o la detención del crecimiento de ciertos microorganismos.

Dos descubrimientos importantes señalaron el comienzo de una nueva era y revolucionaron el tratamiento de las enfermedades infecciosas. El primero fue el descubrimiento en 1935 de los efectos curativos del colorante rojo de Prontosil en las infecciones por estreptococos. Éste fue el precursor de las sulfonamidas. El segundo descubrimiento fue el que dio inicio a la edad de oro de la antibioterapia, el descubrimiento por Fleming en 1929 de la penicilina y su posterior desarrollo.

Los antibióticos pueden clasificarse según el mecanismo por el cual son capaces de inhibir el crecimiento o destruir una célula bacteriana. Se dividen en: inhibidores de la síntesis de la pared bacteriana, inhibidores de la membrana citoplasmática (mediante la alteración de su capacidad para actuar como barrera selectiva), inhibidores de los ácidos nucleicos (replicación, transcripción) o inhibidores de la síntesis de proteínas (inciden sobre ribosomas) (**Figura 13**) (Calvo y Martínez-Martínez, 2009).

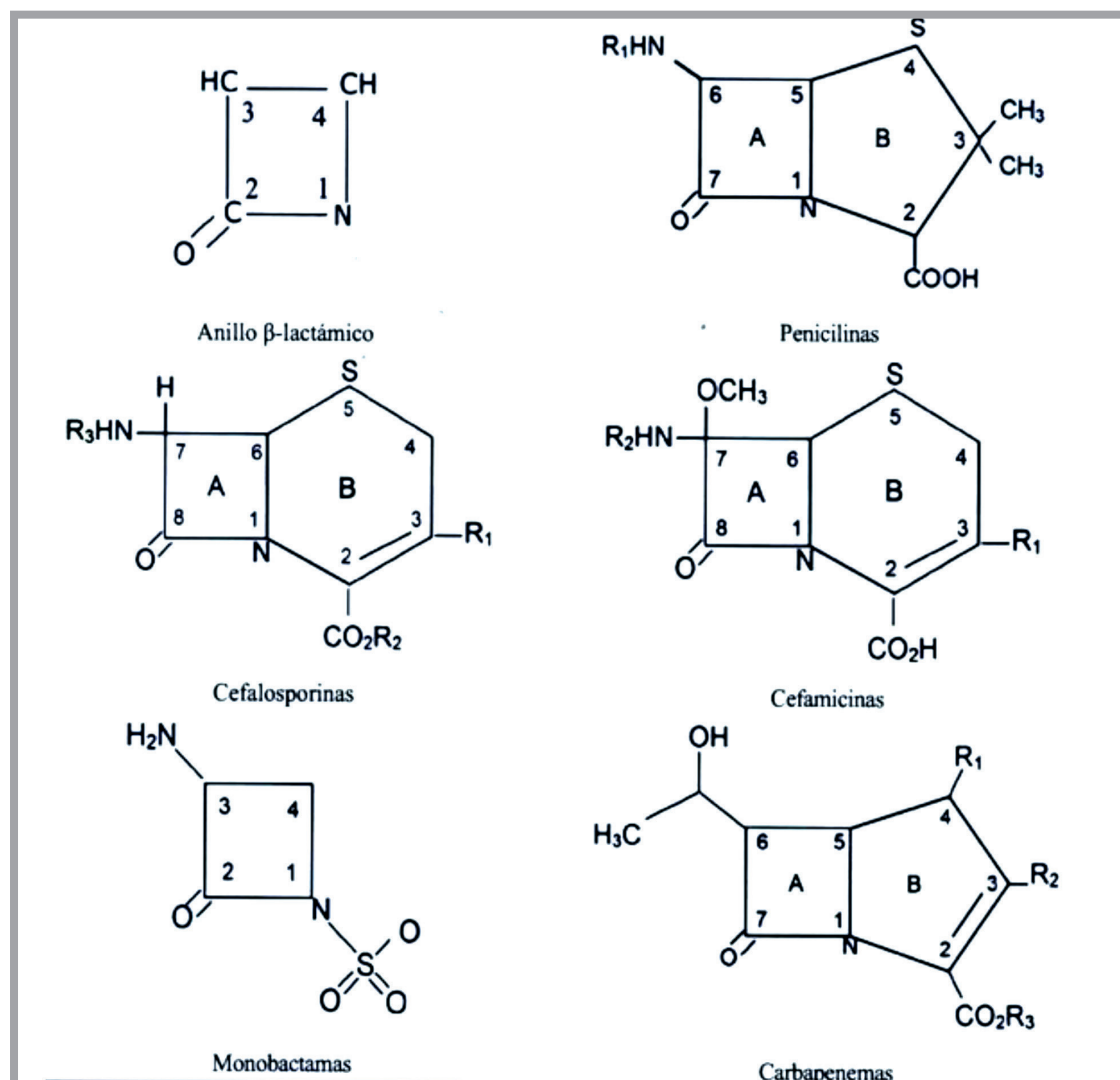
Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos son antibióticos bactericidas que actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana, produciendo la activación de enzimas autolíticas que provocan la destrucción de la bacteria. Ejercen su actividad actuando como análogos estructurales del sustrato natural (D-alanil-D-alanina) de las transpeptidasas y carboxipeptidasas. Actúan siempre en la fase de reproducción celular, no son activos contra formas latentes ni contra gérmenes que no poseen pared bacteriana (Coira 2008; Murray *et al.* 2006).

La historia de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos comienza en 1929 cuando Fleming descubrió los efectos que tenía sobre las bacterias la penicilina producida por el hongo *Penicillium notatum*. Sin embargo, el verdadero punto de partida tuvo lugar con la síntesis del núcleo de las penicilinas y las cefalosporinas, el ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) y el ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA), que permitió la obtención de numerosas penicilinas y cefalosporinas semisintéticas. Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos representan el grupo más numeroso y de mayor uso clínico.

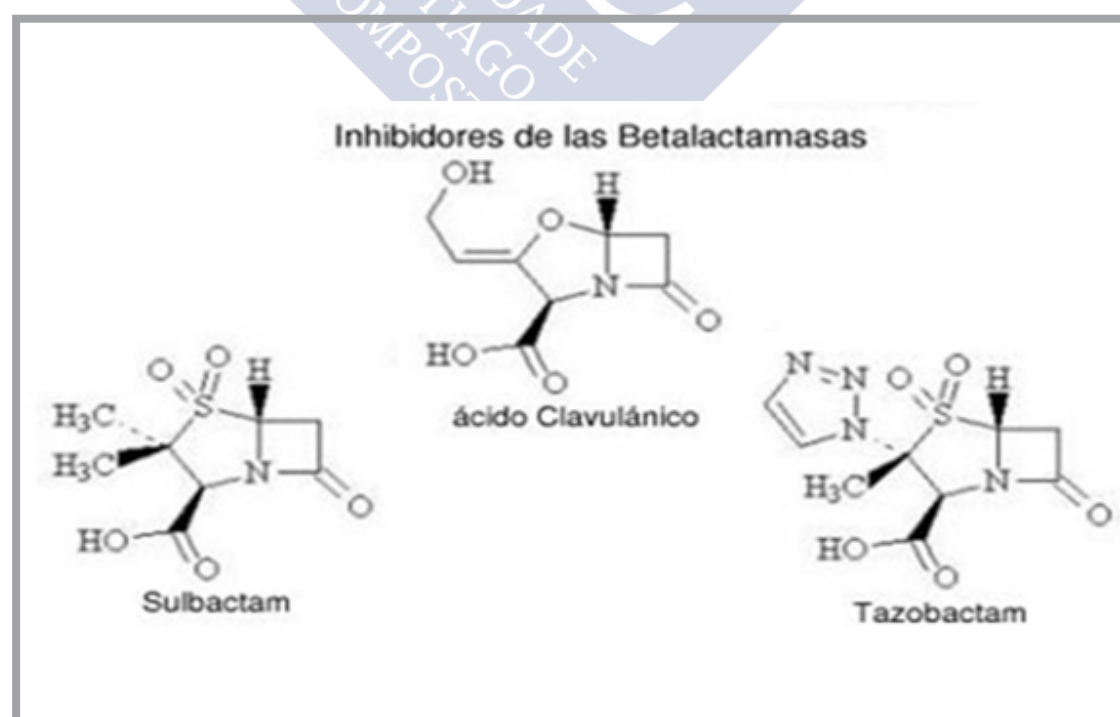


**Figura 13**

Representación de los diferentes mecanismos de actuación de los antibióticos. Figura 20-14 de Brock Biology of Microorganisms (11ª edición) (2006) Pearson Prentice Hall, Inc. MADIGAN MT8 MARTINKO JM (EDS)



**Figura 14**  
Procede de la tesis doctoral de Coira (2008)



**Figura 15**  
Inhibidores de betalactamasas (tomado de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1727-897X2010000100004&script=sci\\_arttext](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1727-897X2010000100004&script=sci_arttext))

Estos antibióticos son generalmente bicíclicos y presentan un anillo central en su estructura llamado anillo betalactámico que da nombre al grupo. Se distinguen diferentes tipos en función de los radicales que se unen a este anillo. Sin embargo, también existen preparados monocíclicos, como los monobactamas. Las principales familias son las penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, carbapenemas y monobactamas (**Figura 14 y Tabla 1**).

**Tabla 1**  
Antibióticos  $\beta$ -lactámicos.

Grupo	Subgrupo	Antibióticos
Penilina	Penicilinas naturales	Bencilpenicilina/penicilina G, penicilina V
	Resistentes a penicilinasas	Meticilina, nafcilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina
	Penicilinas de amplio espectro	Aminopenicilinas: ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, ticarcilina
		Ureidopenicilina: piperacilina, mezlocilina
	Combinaciones con inhibidores de $\beta$ -lactamasas	Ampicilina/sulbactam
		Amoxicilina/ácido clavulánico
		Ticarcilina/ácido clavulánico
Piperacilina/tazobactam		
Cefalosporinas y Cefamicinas	Cefalosporinas 1 <sup>a</sup> generación	Cefadroxilo, Cefalexina, Cefradina, Cefatolina, Cefazolina
	Cefalosporinas 2 <sup>a</sup> generación	Cefaclor, Cefuroxina axetilo, cefprozilo, cefuroxima, cefonicida
		cefoxina, cefminox
	Cefalosporinas 3 <sup>a</sup> generación	Cefixima, cefpodoxima, proxetilo, ceftibuteno, cefditoreno
		cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxano
Cefalosporinas 4 <sup>a</sup> generación	Cefepima, cefpiroma	
Monobactamas		Aztreonam
Carbapenemes		Imipenem, meropenem, ertapenem



Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos se pueden usar asociados a inhibidores de betalactamasas que se caracterizan por una actividad antibacteriana muy limitada, pero tienen una gran afinidad por las betalactamasas fijándose a ellas de forma irreversible. Estos inhibidores bloquean uno de los principales mecanismos de resistencia que desarrollan las bacterias (**Figura 15**).

## 1.7 Resistencia a antibióticos

La resistencia a antibióticos se puede definir como la capacidad de un microorganismo para crecer en presencia de un antibiótico. Los antibióticos están presentes en la naturaleza como productos metabólicos de algunos microorganismos, de manera que la resistencia a los mismos puede surgir como un fenómeno natural que permite su supervivencia. El aumento de la resistencia bacteriana es un hecho evidente a la vez que un problema antiguo puesto que en los primeros años del comienzo del empleo de antibióticos se puso de manifiesto la capacidad de las bacterias de desarrollar mecanismos de resistencia. Así, en los años 50 ya se conocían cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la penicilina. El consumo y abuso de los antibióticos influye en la resistencia, no sólo de las bacterias patógenas, sino también de las saprofitas y oportunistas (García Sánchez *et al.* 1997). Las cepas resistentes se hacen predominantes por la presión selectiva de los antibióticos que hacen desaparecer las bacterias sensibles, no estando implicados solamente los antibióticos utilizados en medicina humana, sino también, y de forma muy importante, los empleados en veterinaria (Daza Pérez, 1998).

La resistencia bacteriana es una resistencia natural cuando el microorganismo carece de diana para un antibiótico (como la falta de pared bacteriana en relación con los  $\beta$ -lactámicos). Sin embargo, y gracias a la espectacular capacidad de adaptación de las bacterias, esta resistencia puede ser adquirida mediante modificaciones a nivel genético, como pueden ser mutaciones o adquisición de plásmidos, transposones o integrones (Daza Pérez, 1998).

Los mecanismos de resistencia que impiden al antibiótico ejercer su mecanismo de acción son fundamentalmente tres: modificaciones bacterianas que impiden la llegada del antibiótico al punto diana (como por ejemplo mutaciones en las porinas que impiden la entrada de ciertos antibióticos), alteraciones por parte de la bacteria de su punto diana (impidiendo o dificultando la acción del antibiótico) o inactivación del antibiótico mediante la producción de enzimas.



## 1.8 $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEEs)

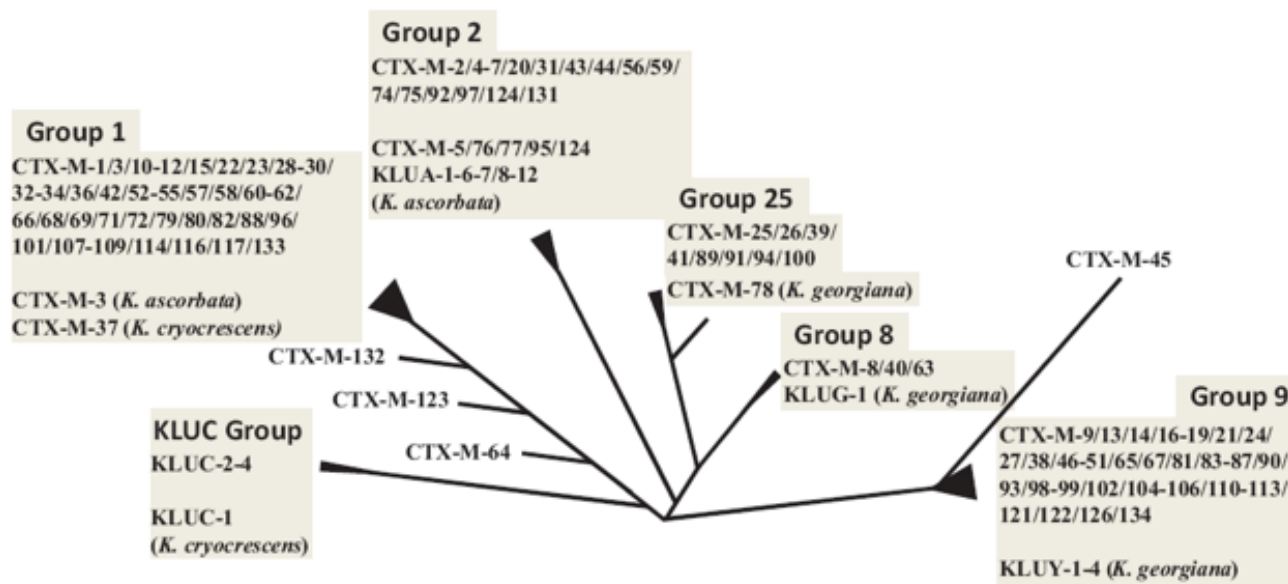
La resistencia a  $\beta$ -lactámicos representa un grave problema sanitario, puesto que son los antibióticos más utilizados en medicina humana y animal. Las bacterias pueden adquirir resistencias a estos antibióticos mediante la producción de  $\beta$ -lactamasas. Se han descrito más de 500  $\beta$ -lactamasas diferentes, algunas son específicas para penicilinas (penicilinasas), cefalosporinas (cefalosporinasas) o carbapenémicos (carbapenemasas); mientras que otras poseen un amplio espectro de actividad, incluyendo algunas que son capaces de inactivar a la mayoría de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Murray *et al.* 2006).

Las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) se definen como enzimas capaces de hidrolizar las cefalosporinas de amplio espectro y los monobactamas, pero no las cefamicinas o los carbapenemes. Se caracterizan por ser inhibidas por inhibidores de  $\beta$ -lactamasas de clase A (p.e. ácido clavulánico). Están codificadas generalmente por plásmidos y derivan por mutaciones puntuales en el centro activo de otras  $\beta$ -lactamasas con menor espectro como TEM-1, TEM-2 y SHV-1 (TEM en referencia a “Temoniera”, nombre de la paciente en cuyo hemocultivo se aisló por primera vez una *E. coli* productora de esta enzima; y SHV, iniciales de “sulphydryl variable”, nombre que describe las propiedades bioquímicas de la enzima). Estas modificaciones de la cadena aminoacídica surgen como respuesta a la presión ejercida por el amplio uso de las cefalosporinas de tercera generación, permitiendo así modificar su perfil de sustrato y mejorar su capacidad de hidrólisis frente a los betalactámicos (Alpuche y Daza, 2002).

Existen dos tipos de clasificaciones de las  $\beta$ -lactamasas, la clasificación estructural de Ambler y la funcional de Bush, Jacoby y Medeiros. En 1980 Ambler clasificó las betalactamasas en función de su secuencia aminoacídica en cuatro grupos (A, B, C y D) indicando que las clases A, C y D tienen una serina en su centro activo mientras la clase B son metaloenzimas. La clase A está compuesta de penicilinasas inhibidas por el ácido clavulánico, la clase B corresponde a los metalobetalactamasas inhibidas por el ácido tetra-acético de etileno diamina, mientras que la clase C agrupa las cefalosporinasas que no son inhibidas por el ácido clavulánico y la clase D corresponde a las oxacilinasas de sensibilidad variable frente al ácido clavulánico. Según la clasificación de Bush, Jacoby y Medeiros, las  $\beta$ -lactamasas se pueden clasificar en base a su actividad hidrolítica y a la sensibilidad de las enzimas a los inhibidores en un gran número de grupos funcionales (Bush *et al.* 1995; Vodovar *et al.* 2013).

En 1983 se describió en Alemania la primera enzima capaz de hidrolizar las cefalosporinas de tercera generación (SHV-2) a partir de una cepa de *Klebsiella ozaenae*. En España, la primera SHV-2 se describió en 1988. En Francia, en 1984 se describió una TEM-3 con fenotipo semejante. Hasta la fecha, se han descrito 223  $\beta$ -lactamasas del tipo TEM y 193 del tipo SHV (<http://www.lahey.org/studies/>).

Este gran número de enzimas producido en un corto plazo de tiempo es una prueba de la alta capacidad evolutiva de las bacterias en respuesta a la presión selectiva del uso de los antibióticos. En 1989 se detectó un aislado clínico de *E. coli* con una enzima diferente a TEM y SHV, que se denominó CTX-M-1 por su actividad hidrolítica preferente por la cefotaxima. Se considera que las cefalotaximasas CTX-M plasmídicas derivan de las penicilinasas cromosómicas naturales de *Kluyvera* spp. El grupo CTX-M ha adquirido una gran relevancia epidemiológica debido a su dispersión intra y extrahospitalaria. Actualmente se detectan sobre todo en pacientes con infecciones contraídas en la comunidad, produciéndose un flujo de aislados desde este ambiente al medio hospitalario (García *et al.* 2010).



**Figura 16**

Diagrama en árbol representando los diferentes grupos de CTX-M que se elaboró con el programa TREEVIEW comparando las secuencias aminoácidas de CTX-M y proteínas afines a ellas de *Kluyvera* spp disponibles en la web Lahey Clinic (<http://www.lahey.org/studies/>) y en la base de datos RED-DB (<http://www.fibim.unisi.it/REDDB/>). El tamaño de los triángulos sombreados al final de algunas ramas reflejan el número de variantes dentro de cada grupo (D'Andrea *et al.* 2013).

Se han descrito 168 enzimas de CTX-M (<http://www.lahey.org/studies/>). Al contrario de otras BLEE, la familia CTX-M es muy compleja y no homogénea. El alinamiento de sus secuencias aminoacídicas ha permitido su clasificación en cinco grupos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25 (**Figura 16**). Dos grupos adicionales se han identificado recientemente CTX-M-74 y CTX-M-75 (Lahlaoui *et al.* 2014). El nombre de los grupos es el nombre de la enzima arquetipo de cada uno. El análisis filogenético sugiere que las CTX-M provienen de  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de diferentes especies del genero *Kluyvera* cuyo gen *bla* ha sido integrado en un elemento genético móvil. *Kluyvera* pertenece a la microflora intestinal natural del ser humano y está considerado como saprofita y patógeno oportunista. El grupo CTX-M-1 está relacionado con el gen *bla* identificado en *Kluyvera cryocrescens*. El gen *Klua* de *Kluyvera ascrobatata* es considerado el gen ancestral de CTX-M-2 y tres genes cromosómicos diferentes de *Kluyvera georgiana* son los orígenes de los grupos CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25 (Poirel *et al.* 2008).

### 1.8.1 Distribución y prevalencia de BLEEs

#### *A nivel mundial en humanos*

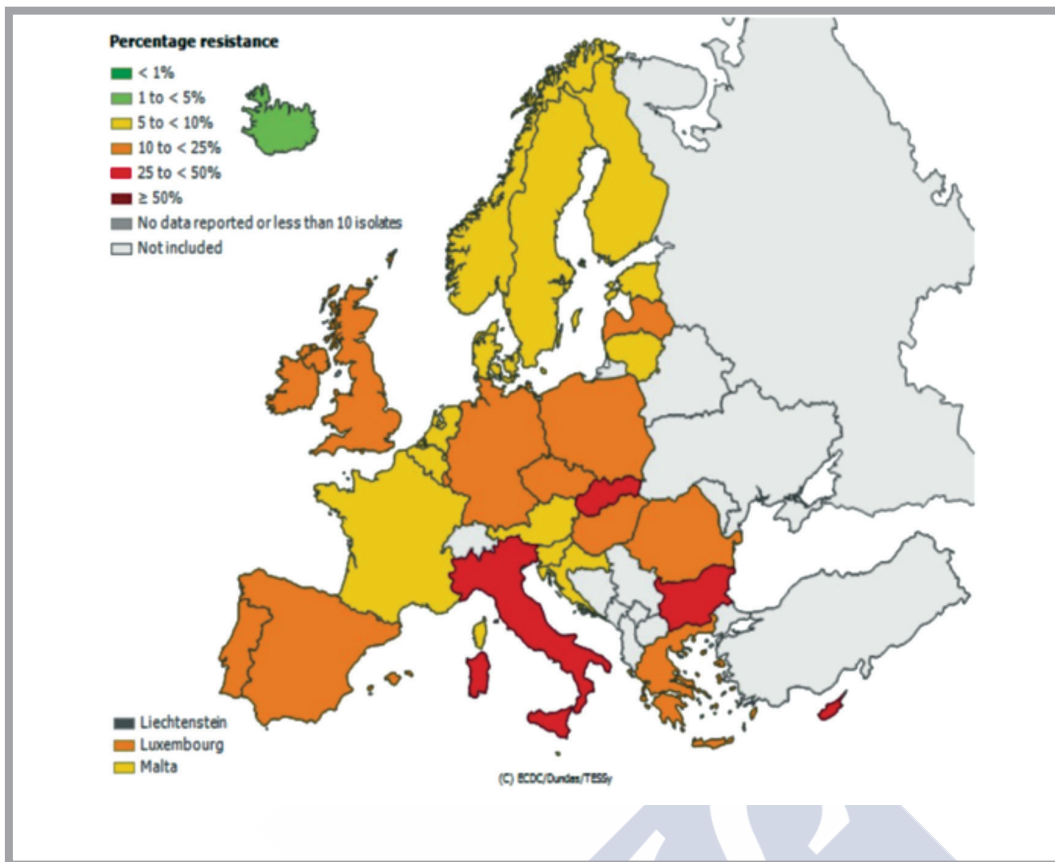
Las cepas de *E. coli* productoras de BLEE han experimentado un aumento de prevalencia espectacular en las dos últimas décadas, causando infecciones nosocomiales y comunitarias (Pérez *et al.* 2007; Pitout *et al.* 2009). Existen diferentes estudios de vigilancia realizados en Europa y otras áreas geográficas que reflejan el incremento de presencia y dispersión de las cepas productoras de BLEE. Los últimos datos registrados por el European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) que se encarga de monitorizar las resistencias antibióticas en patógenos invasivos desde 1998, muestran un aumento en la frecuencia de cepas de *E. coli* resistentes a cefalosporinas de tercera generación en Europa a lo largo de todos estos años (**Figura 17**). Comparando los resultados publicados los últimos tres años, observamos un aumento del 9,5% al 12,6%. En la **Tabla 2** se observa que un alto porcentaje de estas cepas resistentes a cefalosporinas de tercera generación fueron identificadas como productoras de BLEE.

Existe una prevalencia no homogénea a nivel mundial de cepas de *E. coli* productoras de BLEE. Vodovar y colaboradores (2013) han recopilado los datos publicados de diferentes redes de vigilancia internacionales de prevalencia de BLEE entre 1998 y 2008 (EARSS y SMART-Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends) (redes Europeas), MYSTIC-Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection) (red americana) y SENTRY-red Asia-pacífico y Sud África) **Figura 18**. Los datos provienen de la recogida de cepas a partir de muestras con fines de diagnóstico. Estas redes no proporcionan una cartografía precisa de la prevalencia en diferentes partes del mundo, es simplemente una visión general a gran escala. Los datos recopilados muestran una distribución heterogénea de cepas de *E. coli* productoras de BLEE entre los diferentes continentes, con el siguiente orden decreciente Asia, Sudamérica, Europa, África y USA, con prevalencias de 36,1%, 26,8%, 7,4%, 5,1% y 2,8% respectivamente.

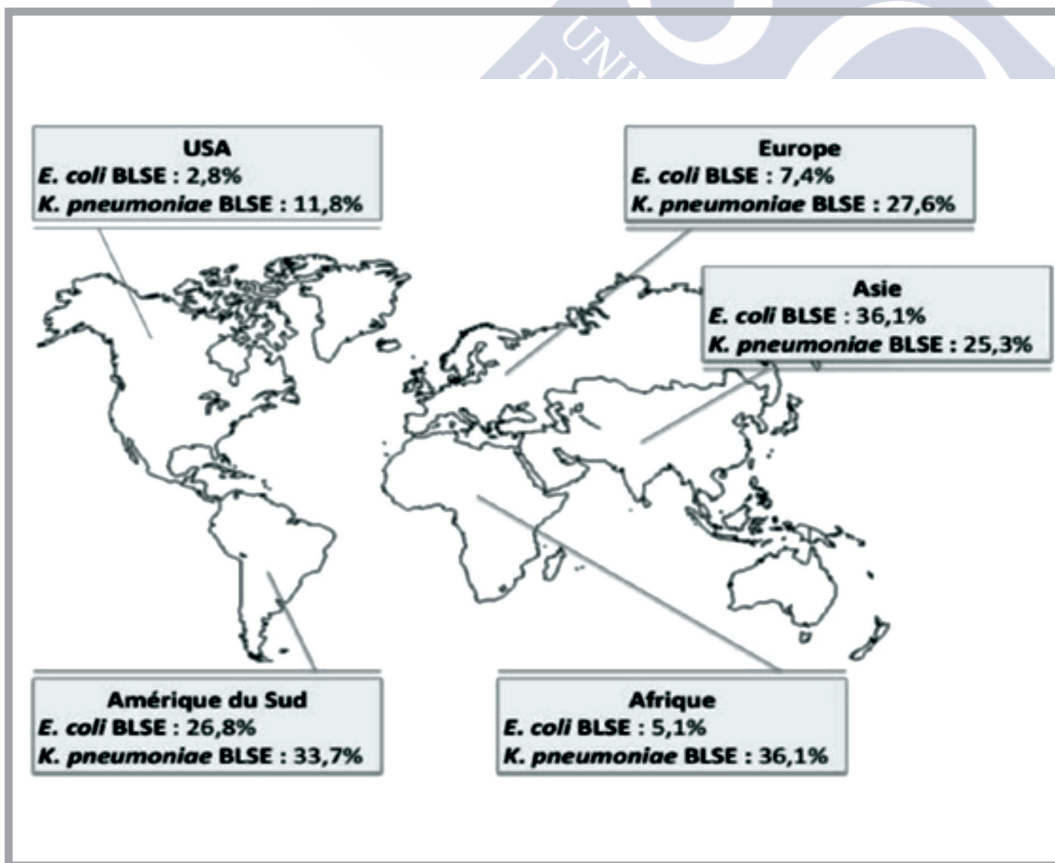
**Tabla 2**

Cepas invasivas de *E. coli* resistentes a cefalosporinas de tercera generación y porcentajes de cepas BLEE positivas, determinados por los laboratorios participantes de 22 países europeos en 2013 (EARSS 2013).

País	Número de laboratorios	Número de cepas 3GCREC	% ESBL
Dinamarca	5	121	73,6
Eslovaquia	14	240	74,6
Francia	51	861	76,5
Austria	21	196	81,6
Estonia	6	25	84
España	33	672	86,3
Polonia	36	113	87,6
Holanda	12	111	88,3
Letonia	5	18	88,9
Irlanda	32	245	89,8
Bulgaria	11	66	90,9
Croacia	14	91	91,2
República Checa	44	387	91,2
Eslovenia	10	107	91,6
Portugal	26	328	92,1
Finlandia	18	263	93,5
Italia	3	33	93,9
Rumanía	11	56	94,6
Luxemburgo	5	22	95,5
Suecia	16	382	97,4
Hungría	7	40	100
Lituania	8	33	100



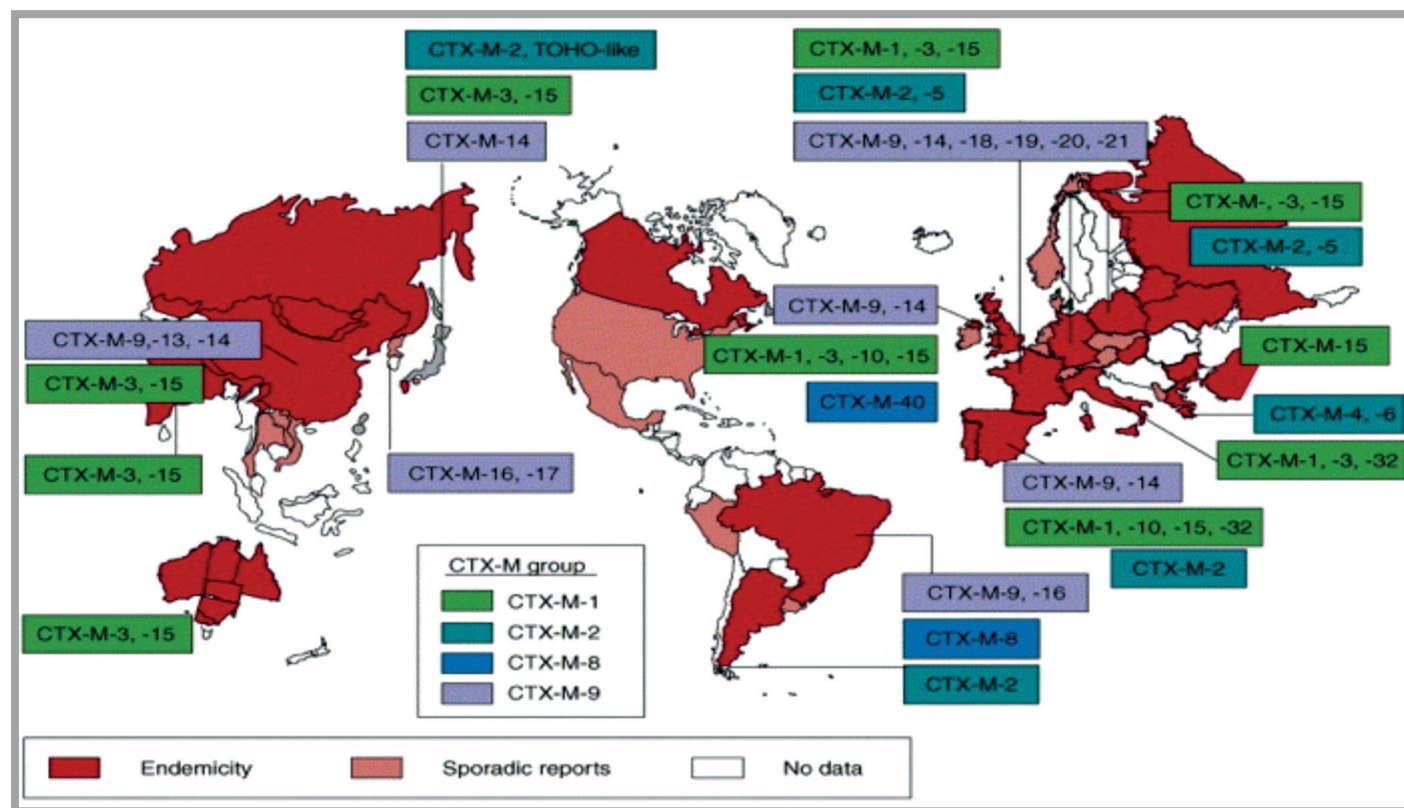
**Figura 17**  
 Porcentaje de cepas invasivas de *E. coli* resistentes a cefalosporinas de tercera generación (EARSS 2013).



**Figura 18**  
 Visión general de la prevalencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEE a nivel mundial (Vodovar *et al.* 2013)



La capacidad de diseminación de las BLEEs es extraordinaria, debido a que están codificadas en plásmidos, lo que posibilita la dispersión de esta resistencia entre distintas cepas de la misma especie y también entre diferentes especies bacterianas. Hasta finales de los años noventa la mayoría de las BLEE eran de tipo TEM y SHV. Se asociaban mayoritariamente con brotes nosocomiales, sobre todo en unidades de cuidados intensivos, causados por *Klebsiella pneumoniae* y en menor medida por *E. coli* y otras enterobacterias.



**Figura 19**  
Distribución mundial de las enzimas CTX-M (Cantón y Coque, 2006)

Actualmente la atención se centra en el cambio epidemiológico que se está produciendo en cuanto a los tipos de BLEE más prevalentes y su distribución. Las enzimas CTX-M no alcanzaron superioridad sobre las otras enzimas BLEE hasta la primera década del 2000, cuando se observó una evolución y dispersión extraordinaria de este grupo de enzimas. Se detectaban tanto en infecciones hospitalarias como en las comunitarias, relacionadas principalmente con infecciones del tracto urinario y bacteriemias (Cantón y Coque, 2006; Cantón *et al.* 2007; Hernández *et al.* 2005).

Actualmente las BLEE tipo CTX-M son las más frecuentes en la mayoría de los países (**Figura 19**). Estudios epidemiológicos recientes indican que este tipo de BLEE son endémicas en muchos países de Europa, Asia y América Latina, con prevalencias que varían entre el 30% y el 90% en *E. coli* (Livermore *et al.* 2007). Sin embargo, se han identificado variaciones en la presencia de estas

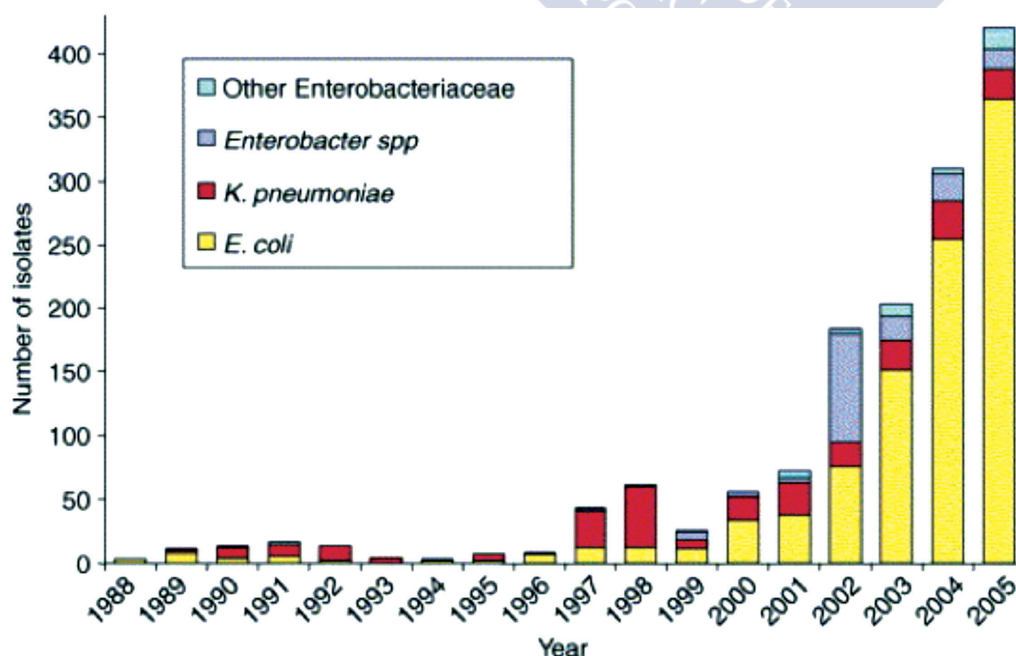


enzimas en distintas áreas geográficas y reflejan una presencia local y específica de algunas de ellas, como la presencia de CTX-M-9 y CTX-M-14 en España, CTX-M-14 en Canadá y Japón, CTX-M-1 en Italia o CTX-M-2 en Sudamérica y Japón. Sin embargo CTX-M-15 está presente en todo el mundo (Cantón y Coque, 2006; Lahlaoui *et al.* 2014; Pitout *et al.* 2005; Suzuki *et al.* 2009).

### Situación en España en humanos

Los primeros aislados con BLEE reconocidos en España se detectaron en 1988 en dos hospitales de Madrid (Hospital Universitario Ramón y Cajal y Hospital Clínico) y correspondían a cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* que producían SHV-2. Durante la década de los noventa se describieron epidemias importantes en distintos hospitales españoles (Cantón *et al.* 2007). En un estudio realizado en Barcelona entre 1994 y 1996, se observa el aumento paulatino de las cepas BLEE, aunque tan solo un 0,2% y un 0,1% de los aislados de *K. pneumoniae* y *E. coli* respectivamente presentaban BLEE. CTX-M-9, TEM-12 y SHV-2 fueron las más identificadas (Sabaté *et al.* 2002).

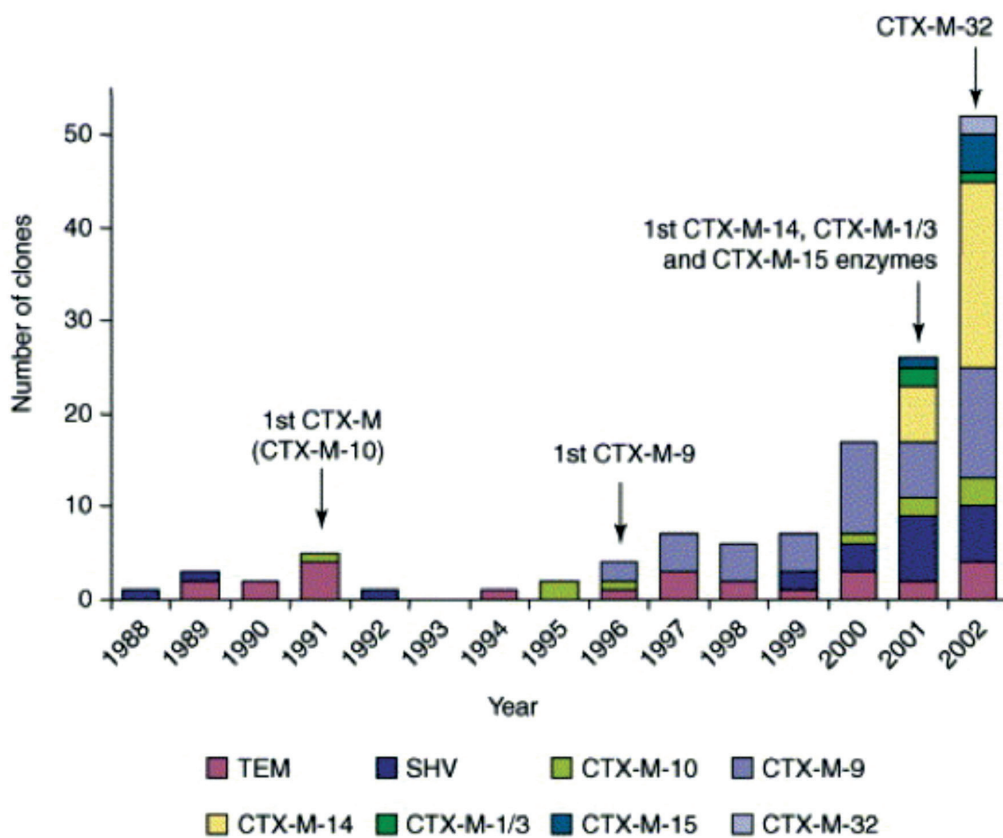
Entre Marzo y Junio del 2000 se llevó a cabo el primer estudio epidemiológico multicéntrico por el Grupo de Estudio de Infecciones Hospitalarias (proyecto GEIH-BLEE 2000). Se abarcaron 40 hospitales distribuidos por toda la geografía española. Fue el primer estudio que puso de manifiesto la relevancia de las BLEE en *E. coli* y *K. pneumoniae* en nuestra geografía, con una prevalencia del 0,5% y 2,7% respectivamente. Además, se publicó un dato alarmante: la identificación de aislados con BLEE en el 90% de los hospitales que participaron. En este estudio las BLEE más prevalentes en *E. coli* fueron CTX-M-9 (27,3%), SHV-12 (23,9%) y CTX-M-14 (16,7%). Además, no se detectaron aislados epidémicos, lo que evidenciaba una situación policlonal (Hernández *et al.* 2003).



**Figura 20**

Aparición de la primera cepa de *E. coli* productora de BLEE y aumento de prevalencia entre los años 1988 y 2005 en Madrid (Cantón y Coque 2006)

El monitoreo continuo de bacterias productoras de BLEE en el norte de Madrid permitió observar el aparición de la primera cepa de *E. coli* productora de BLEE en 1989 (**Figura 20**). A lo largo de los años la presencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEE ha ido en aumento apareciendo la primera cepa productora de CTX-M (CTX-M-10) en 1991 (**Figura 21**). A partir de ese momento se produjo una epidemiología cambiante con diferentes tipos de CTX-M. Se observó un predominio de CTX-M-9 a finales de la década de 1990 y la aparición de enzimas CTX-M-14 y CTX-M del grupo 1, incluyendo CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-15 y CTX-M-32, desde 2001 (Cantón y Coque, 2006).



**Figura 21**  
Aparición de cepas de *E. coli* productoras de distintos tipos de CTX-M y prevalencia entre los años 1988 y 2002 en Madrid (Cantón y Coque, 2006).

En el primer trimestre del año 2004 se recogieron los 15 primeros aislamientos de *E. coli* en 11 hospitales españoles distribuidos en la comunidad de Cataluña, comunidad de Valencia, Palma de Mallorca y Sevilla. Entre las 92 cepas de *E. coli* productoras de BLEE se encontró un predominio de CTX-M-14 (45,7%), CTX-M-9 (20,6%) y SHV-12 (21,7%). Únicamente 3 cepas resultaron ser productoras del enzima CTX-M-15. El análisis de los patrones de restricción obtenidos por PFGE mostró una gran diversidad clonal entre los aislamientos de *E. coli* (Diestra *et al.* 2008).

Entre Febrero y Marzo del 2006 se llevó a cabo el segundo estudio multicéntrico realizado por el GEIH. Comparando los resultados obtenidos en este estudio con los resultados del estudio del 2000 se observa que el porcentaje de aislados de *E. coli* productores de BLEE en España se había multiplicado por 8, pasando del 0,5% al 4,04%. Observamos también un cambio en la prevalencia del tipo de BLEE entre los dos estudios. La prevalencia de las TEM disminuyó del 19% al 1,2%,



*E. coli* forma parte de la flora intestinal de los humanos y los animales, y existen estudios que evidencian la presencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEE en el tracto gastrointestinal. Por lo tanto, el aparato digestivo puede ser considerado como un reservorio para estas cepas, jugando un papel muy importante para su epidemiología, ya que la mayoría de los casos de infección por estas bacterias son precedidos por esta colonización. La **Tabla 3** resume los resultados de algunos estudios que se han llevado a cabo para evaluar la presencia de estas bacterias en muestras de heces de personas sanas.

**Tabla 3**

Algunos estudios que demuestran la presencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEE en las heces de personas sanas.

Muestras de heces de personas sanas	Año	País	BLEE descritas	Referencias
Revisiones médicas	2011	Francia	CTX-M-1,-2,-14,-15 SHV-12	Nicholas-Chanoine <i>et al.</i> 2012
Voluntarios	2007	España	CTX-M-1,-8,-14,-32 TEM-52	Vinue <i>et al.</i> 2009
Niños	2011	Bolivia	CTX-M-2,-3,-8,-14, 15,65	Bartoloni <i>et al.</i> 2012
Voluntarios	2006	Guayana francesa	CTX-M-2,-8 CMY-2 SHV-2	Woerther <i>et al.</i> 2010
Voluntarios	2009-2010	Túnez	CTX-M-1 TEM-1b,-52c	Ben Sallem <i>et al.</i> 2012
Estudiantes universitarios	No se informó	Senegal	CTX-M-15 TEM-1 OXA-1	Ruppe <i>et al.</i> 2009

Se desconocen los factores que pueden estar involucrados en el aumento de cepas portadoras de BLEE en infecciones nosocomiales y comunitarias, y también el aumento en la prevalencia de estas cepas en muestras fecales de personas, tanto en pacientes hospitalizados como extrahospitalarios (Valverde *et al.* 2004; Mirelis *et al.* 2003). A la vista de todos estos datos se puede afirmar que las cepas de *E. coli* productoras de BLEE son y van a ser en los próximos años un gran problema para la salud pública.



## Presencia de BLEE en otros nichos

### BLEE en animales destinados al consumo

Se han llevado a cabo varios estudios relativos a la presencia de cepas productoras de BLEE tanto en animales destinados al consumo humano como en animales de compañía y silvestres. El empleo de antibióticos en veterinaria es un tema de amplio debate en los últimos años ya que puede tener alguna relación con el aumento de la resistencia en bacterias de importancia clínica humana y animal, y acarrea consecuencias en la salud pública. Los antibióticos son utilizados en veterinaria con fines terapéuticos (para el tratamiento de enfermedades) o con fines profilácticos cuando resulta imposible tratar por separado a cada animal, como en la cría intensiva de aves. También se han usado como promotor en el crecimiento de los animales destinados a consumo aunque ya no está permitido en Europa desde su prohibición en el 2006. Hay que puntualizar que el factor económico crea diferencias importantes en el uso de antibióticos en animales de compañía y en los animales destinados al consumo. El uso de cefalosporinas está más generalizado en animales de compañía mientras que en animales de consumo los antibióticos de elección son las penicilinas. No obstante, ya se están utilizando en aves destinadas a la producción de alimentos cefalosporinas de tercera generación (cefoperazona, ceftiofur y ceftriaxona) e incluso de cuarta generación (cefquinoma) (Organización Mundial de Sanidad Animal, OIE; <http://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica/productos-veterinarios/antimicrobianos/>).

La primera cepa de *E. coli* portadora de BLEE de origen animal de la que se tuvo noticias fue una cepa SHV-12 aislada en España en 1998 de un perro con infecciones urinarias recurrentes (Teshager *et al.* 2000). El número de publicaciones que hacen referencia a la detección de cepas de *E. coli* productoras de BLEE ha ido creciendo en los últimos años. Torres y Zarazaga (2007) recopilan los resultados obtenidos de estos estudios hasta el 2007 (**Tabla 4**) y pusieron de manifiesto la implicación de cepas de *E. coli* portadoras de BLEE en distintos animales tanto sanos como enfermos, destinados al consumo en diferentes países. Resultados de otros estudios posteriores van en la misma dirección (Ewers *et al.* 2012; Guenther *et al.* 2011).

Recientemente, se ha publicado un extenso e interesantísimo estudio realizado por Blaak y colaboradores (2015) en 3 granjas de pollos de engorde (broiler) y 5 de gallinas en Holanda, en el que detectan cepas de *E. coli* productoras de BLEE en las 8 granjas muestreadas, en el 65% de las muestras fecales de pollos y el 81% de las de gallinas. Entre las cepas aviares productoras de BLEE predominaban las de los grupos filogenéticos B1 (42%) y A (35%), siendo menos frecuentes la de los grupos filogenéticos D (18%) y B2 (5%). Por su parte el 98% de las cepas BLEE eran productoras de CTX-M-1 (41%), SHV-12 (29%) y TEM-52 (28%). Las cepas CTX-M-14 (0,3%) y CTX-M-15 (0,3%) eran muy raramente detectadas. La diversidad de secuencias tipo observada fue enorme, identificándose 65 diferentes, 13 de las cuales se observaron en varias granjas (ST10, ST48, ST58, ST155, ST162, ST212, ST746, ST1276 y ST3249), siendo las más diseminadas la ST48 y la ST155 que estaban presentes en 6 de las 8 granjas de aves muestreadas en los años 2011 y 2012 y distribuidas por toda la geografía de Holanda.

**Tabla 4** (parte 1)

Presencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEE en diferentes especies animales destinadas al consumo humano. Se incluyen animales sanos y enfermos y animales de compañía y salvajes (Torres y Zarazaga, 2007)

Tipo de animal	Año de aislamiento	País	BLEE descritas			Referencias
			Tipo CTX-M	Otras BLEE	Combinación de BLEE	
<b>Especies destinadas al consumo humano. Animales sanos (muestras fecales)</b>						
aves	2000-2001	España	CTX-M-14	SHV-12		Briñas <i>et al.</i> , 2003
	1999-2002	Japón	CTX-M-1, -14			Kojima <i>et al.</i> , 2005
	2002	China	CTX-M-14			Duan <i>et al.</i> , 2006
	2003	España	CTX-M-9, -14	SHV-12		Briñas <i>et al.</i> , 2005
	2003	España	CTX-M-1, -9, 14, -32	SHV-12 TEM-52	CTX-M-1+CTX-M-14 CTX-M-1+SHV-2 CTX-M-9+SHV-5	Blanc <i>et al.</i> , 2006
	2004-2005	China	CTX-M-14, -27			Liu <i>et al.</i> , 2007
cerdos	2002	China	CTX-M-3, -14, 24			Duan <i>et al.</i> , 2006
	2003	España	CTX-M-1	SHV-5, -12		Blanc <i>et al.</i> , 2006
	2005	China	CTX-M-14			Liu <i>et al.</i> , 2007
conejos	2003	España	CTX-M-9, -14			Blanc <i>et al.</i> , 2006
vacuno	2000-2001	Japón	CTX-M-2			Shiraki <i>et al.</i> , 2004
	2002		CTX-M-13			Duan <i>et al.</i> , 2006
	2004			TEM-52		Jensen <i>et al.</i> 2006
	2004-2005		CTX-M			Liébana <i>et al.</i> 2006
<b>Especies destinadas al consumo humano. Animales enfermos (muestras clínicas)</b>						
aves	2003	España	CTX-M-9, -14	SHV-12		Briñas <i>et al.</i> , 2005
	2003-2004	Francia	CTX-M-1			Meunier <i>et al.</i> , 2006
	2005	China	CTX-M-14			Liu <i>et al.</i> , 2007
cerdos	2003	España	CTX-M-14, -32	SHV-12		Briñas <i>et al.</i> , 2005
	200-2004	Francia	CTX-M-1			Meunier <i>et al.</i> , 2006
	2005	Dinamarca	CTX-M-1			Aarestrup <i>et al.</i> 2006
conejos	2003	España		TEM-52		Briñas <i>et al.</i> , 2005
vacuno	2003	España	CTX-M-1			Briñas <i>et al.</i> , 2005
	2004	Francia	CTX-M-1, -15			Meunier <i>et al.</i> , 2006
	2004	Reino Unido	CTX-M-14			Teale <i>et al.</i> , 2005
	2004-2005	Reino Unido	CTX-M-14			Hopkins <i>et al.</i> , 2006



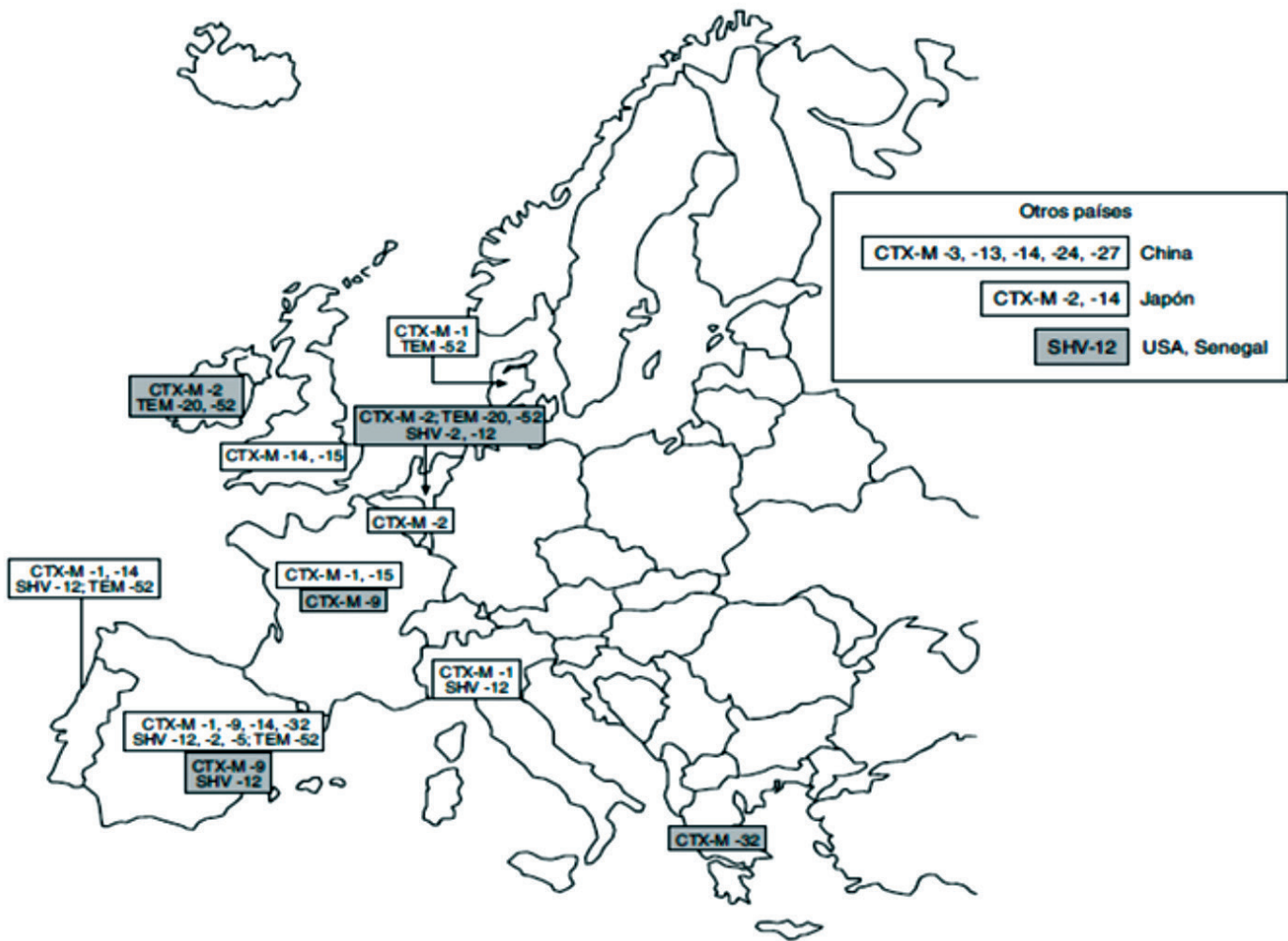
**Tabla 4** (parte 2)

Presencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEE en diferentes especies animales destinadas al consumo humano. Se incluyen animales sanos y enfermos y animales de compañía y salvajes (Torres y Zarazaga, 2007)

Tipo de animal	Año de aislamiento	País	BLEE descritas			Referencias
			Tipo CTX-M	Otras BLEE	Combinación de BLEE	
<b>Animales no destinados al consumo humano</b>						
animales de compañía sanos	2001-2003	Italia	CTX-M-1			Carattoli <i>et al.</i> , 2005
	2003	Portugal	CTX-M-1	TEM-52		Costa <i>et al.</i> , 2004
animales de compañía enfermos	1998	España		SHV-12		Teshager <i>et al.</i> 2000
	2001-2003	Italia	CTX-M-1	SHV-12	CTX-M-1+SHV-12	Carattoli <i>et al.</i> , 2005
animales salvajes	2003-2004	Portugal	CTX-M-1, -14	SHV-12, TEM-52	CTX-M-14+TEM-52	Costa <i>et al.</i> , 2006

Aunque hasta unos años el uso de cefalosporinas no era habitual en el tratamiento de infecciones aviarias, se han detectado cepas productoras de CTX-M en muestras de aves tanto sanas como enfermas. Esto se puede explicar con una posible coselección por el uso de otros antibióticos (como las sulfamidas, trimetropim o quinolonas) muy empleados en avicultura. Los genes de resistencia a estos antibióticos están codificados por genes localizados en integrones o plásmidos que muchas veces portan también genes blaCTX-M que confieren resistencia a las cefalosporinas (Cantón *et al.* 2012; Jones *et al.* 2008). El sistema de cría intensiva de las aves que implica la presencia de un gran número de animales en un espacio reducido facilita la transferencia horizontal de material genético y el intercambio de bacterias entre los animales, lo que hace de estos sistemas de cría una vía de diseminación de bacterias y de genes de resistencia.

Los diferentes tipos de enzimas BLEE obtenidos de muestras de origen animal procedentes de diferentes países están representados en la **Figura 23** (recuadro blanco: *E. coli* portadoras de BLEE, recuadro gris: *Salmonella* entérica portadoras de BLEE).



**Figura 23**

Distribución de los diferentes tipos de enzimas BLEE de muestras de animales sanos (Torres y Zarazaga, 2007).

Comparando los resultados de la **Figura 23** con los de la **Figura 19** se observa una cierta relación entre la distribución de los diferentes tipos de BLEE de origen humano y animal según las distintas áreas geográficas. Por ejemplo, en España las CTX-M predominantes de origen humano son CTX-M-9 y CTX-M-14 y éstas también son predominantes en animales sanos destinados al consumo humano (Blanc *et al.* 2006; Cantón y Coque., 2006). En Francia y Portugal el grupo CTX-M1 es el más frecuente entre cepas tanto de origen humano como animal (Girlich *et al.* 2007; Gonçalves *et al.* 2010). Sin embargo, en Suiza la enzima CTX-M-15 es la más prevalente en humanos mientras que la CTX-M-1 es el más frecuente en los animales (Geser *et al.* 2011, 2012). Así pues, la microbiota intestinal de los animales sanos destinados al consumo humano puede representar un reservorio de BLEE de tipo CTX-M.

## BLEE en fauna silvestre

Se han detectado también BLEE en animales de compañía (perros y gatos) sanos y enfermos (Carattoli *et al.* 2005; Costa *et al.* 2004; Ewers *et al.* 2012), y en animales de fauna silvestre. El primer estudio realizado sobre la presencia de *E. coli* portadoras de BLEE en animales silvestres fue realizado en Portugal entre los años 2003 y 2004 por Costa y colaboradores (2006). En este trabajo pusieron de manifiesto la presencia de estas bacterias en la fauna silvestre. Encontraron cepas de *E. coli* portadoras de BLEE en aves de rapiña, una lechuza, 2 ciervos y 1 zorro. Se han realizado varios estudios a posteriori para tener una idea más clara de la presencia de estas bacterias en la fauna silvestre. En la **Tabla 5** se presentan algunos de estos estudios (Guenther *et al.* 2011). La llegada de estas bacterias resistentes a la fauna silvestre puede ser debida al consumo de aguas contaminadas, por la ingesta de presas o cadáveres de animales domésticos portadores o por el contacto con los humanos. La presencia de cepas de *E. coli* portadoras de BLEE en este tipo de fauna podría crear nuevos ciclos de infección entre la vida salvaje, los animales domésticos y los humanos y contribuir a la diseminación y transmisión de estas resistencias a nichos ecológicos frágiles y, como consecuencia, acentuar la dificultad en los tratamientos de infecciones por estas bacterias.

**Tabla 5** (parte 1)

Cepas de *E. coli* productoras de BLEE en fauna silvestre (Guenther *et al.* 2011)

Tipo de animal	Año de aislamiento	País	BLEE descritas	Referencias
ave rapaz ciervo zorro búho	2003-2004	Portugal	CTX-M-1, -14 TEM-1, -52 SHV-12	Costa <i>et al.</i> , 2006
gaviota ( <i>Larus sp.</i> )	2007	Portugal	CTX-M-1, -14, -32 TEM-52	Poeta <i>et al.</i> , 2008
gabiota reidora ( <i>C. ridibundus</i> )	2005	República Checa	CTX-M-1, -15 SHV-2, -12	Dolejska <i>et al.</i> , 2009
gaviota patiamarilla ( <i>L. michahellis</i> )	2008	Francia	CTX-M-1, -15 TEM-1 SHV	Bonnedahl <i>et al.</i> , 2009
jabalí ( <i>S. scrofa</i> )	2005-2007	Portugal	CTX-M-1 TEM-1	Poeta <i>et al.</i> , 2009
rata marrón ( <i>R. rattus</i> )	2007	Senegal	CTX-M-15	Literak <i>et al.</i> , 2009
gaviota de Bering ( <i>L. glaucescens</i> )	2007	Rusia	CTX-M-14, -15	Hernandez <i>et al.</i> , 2010
pato silvestre ( <i>A. platyrhynchos</i> )	2008	Suecia	CTX-M-14, -15	Bonnedahl <i>et al.</i> , 2010

**Tabla 5** (parte 2)Cepas de *E. coli* productoras de BLEE en fauna silvestre (Guenther *et al.* 2011)

Tipo de animal	Año de aislamiento	País	BLEE descritas	Referencias
pato silvestre ( <i>A. platyrhynchos</i> ) gaviota agréntea ( <i>L. argentatus</i> )	2008-2009	Polonia	CTX-M-1, -9, -15 TEM-1 SHV-12 OXA-1	Literak <i>et al.</i> , 2010
águila ratonera ( <i>B. buteo</i> ) lechuza ( <i>T. alba</i> ) cárabo ( <i>S. aluco</i> ) águila calzada ( <i>A. pennata</i> ) aguilucho cenizo ( <i>C. pygargus</i> ) milano negro ( <i>M. migrans</i> ) buitre negro ( <i>C. atratus</i> ) águila perdicera ( <i>A. fasciata</i> ) búho real ( <i>B. bubo</i> ) cuervo ( <i>C. corax</i> )	2008	Portugal	CTX-M-1 TEM-1, -20 SHV-5	Pinto <i>et al.</i> , 2010
buitre ( <i>B. buteo</i> )	2007-2008	Portugal	CTX-M-1, -32 TEM-1	Radhouani <i>et al.</i> , 2010
gaviota ( <i>Larus sp.</i> )	2007-2008	Portugal	CTX-M-1, -9, -15, -32	Simoes <i>et al.</i> , 2010
gaviota ( <i>Larus sp.</i> )	2010	Suecia	CTX-M-1, -14 TEM-1 SHV-12	Wallensten <i>et al.</i> , 2011
curruca capirotata ( <i>S. atricapilla</i> )	2006-2010	Portugal	CTX-M-14, -15 SHV-12	Silva <i>et al.</i> , 2011
roedores (no especificado)	2008-2010	China	CTX-M-1, -9	Ho <i>et al.</i> , 2011
rata noruega ( <i>R. norvegicus</i> )	2009	Alemania	CTX-M-9	Guenther <i>et al.</i> , 2010
mirlo asiático ( <i>T. merula</i> ) ganso careto ( <i>A. albifrons</i> ) paloma de roca ( <i>C. livia</i> )	2009	Alemania	CTX-M-15	Guenther <i>et al.</i> , 2010a
jabalí ( <i>S. scrofa</i> )	2009	República Checa	CTX-M-1 TEM-1, -52b	Literack <i>et al.</i> , 2009b
barnada canadiense ( <i>B. canadensis</i> ) ánsar común ( <i>A. anser</i> )	2010	Bélgica	TEM-52 SHV-12	Garmyn <i>et al.</i> , 2011

## BLEE en aguas

Se han detectado cepas de *E. coli* productoras de BLEE también en muestras de aguas de diferentes orígenes. En la **Tabla 6** se presentan algunos de los estudios realizados a nivel mundial para evaluar la presencia en aguas de río, lagos y aguas residuales. Se ha aislado también una cepa de *E. coli* productora de CTX-M-15 en un estudio donde evaluaron la presencia de bacterias productoras de BLEE en algunas playas de Argel (Alouache *et al.* 2012). Los resultados de estos estudios indican que estas aguas se pueden considerar como un reservorio importante para la diseminación de BLEE. (Chen *et al.* 2010; Tacao *et al.* 2012; Dhanji *et al.* 2011 ; Woerther *et al.* 2013).

**Tabla 6**

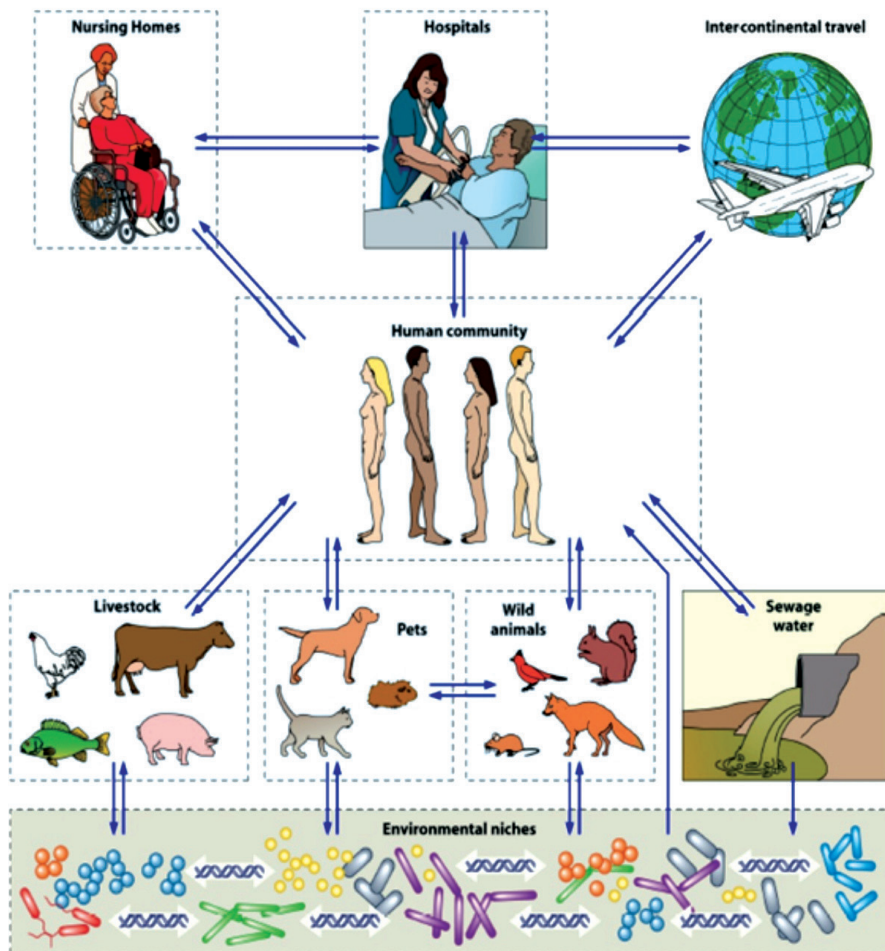
Resultados de algunos estudios sobre presencia de *E. coli* productoras de BLEE en muestras de agua de diferentes orígenes.

Origen de muestra	Año	País	BLEE descritas	Referencias
Efluente de depuradora	2008-2009	República Checa	CTX-M-15	Dolejska <i>et al.</i> 2011
Aguas residuales de hospital Agua potable Agua de pozo Afluente y efluente de depuradora Efluente cloacal de un hospital	2008-2009	India	CTX-M-15 TEM-1	Diwan <i>et al.</i> 2012
Ríos y lagos	2012	Suiza	CTX-M-1,-3,-14, 15, 27,-55,-75 TEM-1 SHV-11,-12	Zurfluth <i>et al.</i> 2013
Río (estudio sesgado CTX-M-14,-15)	2010	Reino Unido	CTX-M-14	Dhanji <i>et al.</i> 2011
Río (Hen de Seul)	2010-2011	Corea	CTX-M-14 TEM-52 CMY-1	Kim <i>et al.</i> 2008
Agua de mar (cerca de estaciones de investigaciones)	2011	Antártida	CTX-M-1,-15	Hernández <i>et al.</i> 2012



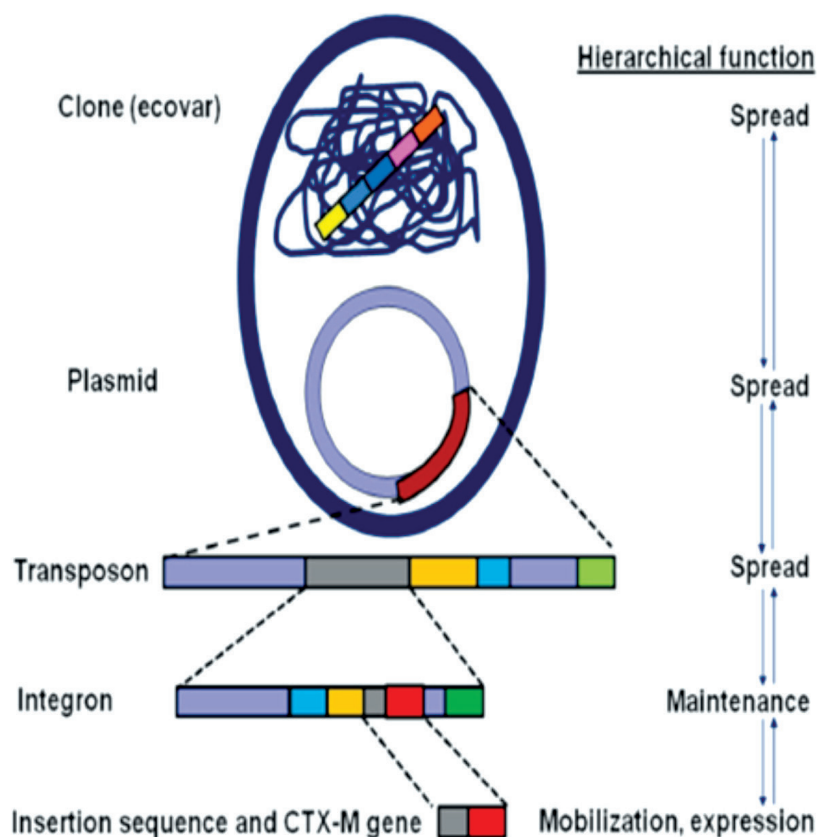
## 1.8.2 Diseminación de BLEEs

Como se ha indicado, la diseminación de las bacterias portadoras de BLEE se ha producido en ecosistemas muy diversos. La **Figura 24** resume los posibles reservorios de estas bacterias a los cuales la comunidad pertenece y a su vez está expuesta. En esta figura también se observan las posibles transmisiones cruzadas que podrían ocurrir entre los diferentes nichos. No podemos obviar el papel de la globalización en la diseminación de las resistencias. Por un lado los viajeros internacionales, que pueden facilitar la diseminación de estas resistencias de un país a otro, o incluso de un continente a otro (Van der Bij y Pitout, 2012), y por el otro lado el consumo de carnes de exportación de países donde la legislación del uso de antibióticos puede variar. El abuso en el empleo de los antibióticos está muy relacionado con la explosión en la diseminación de BLEE. El dominio de este fenómeno no es necesariamente el descubrimiento de nuevos antibióticos sino el uso racional de los mismos, el respeto de las normas básicas de higiene y la comprensión de los mecanismos implicados en la evolución y diseminación de estas resistencias.



**Figura 24**  
Representación de los diferentes reservorios de cepas productoras de BLEE y posible transmisión cruzada entre ellos (Woerther *et al.* 2013).

Estamos pues asistiendo a una diseminación explosiva de las enzimas CTX-M a nivel mundial. Estudios realizados a lo largo de la última década han revelado que estas enzimas han llegado a desplazar casi totalmente a las otras enzimas resistentes, como TEM y SHV. Este éxito ha estado facilitado no solamente por la presencia de los genes responsables de la producción de estas enzimas, localizados en plataformas con eficiente capacidad de transferencia (plásmidos y transposones), su asociación con elementos capaces de reclutar e integrar genes de resistencia a otros antimicrobianos (integrones) y su localización en clones bien adaptados al hombre (Horcajo y Cantón. 2014) (**Figura 25**), sino también gracias a la presencia de una co-resistencia expresada en estos plásmidos, sobre todo para fluoquinolonas y aminoglucósidos, que pueden facilitar los procesos de co-selección (Cantón *et al.* 2012).



**Figura 25**

Los elementos genéticos que participan en la movilización, propagación y mantenimiento de los genes  $bla_{CTX-M}$  (Cantón *et al.* 2012).

La emergencia temporal y penetración de estas enzimas en diferentes escenarios epidemiológicos pueden explicar la epidemiología actual. La distribución de BLEEs se puede dividir en tres etapas: (1) la emergencia de diferentes CTX-M en distintas y distantes áreas geográficas (podría haber ocurrido hasta mediados de la década de los noventa), (2) la emergencia de las CTX-M más diseminadas (incluyendo CTX-M-3, CTX-M-9, CTX-M-14 y CTX-M-15), que podría haber ocurrido entre 1994 y 2000, y (3) finalmente la dispersión mundial de estas enzimas (Cantón *et al.* 2012).

**Tabla 7**

Aparición de variedades de CTX-M en diferentes países.

CTX-M	CTX-M relacionado	Año	País	Referencias
CTX-M-3	CTX-M-1 (4 AA)	1996-1997	Polonia	Gniadkiwski <i>et al.</i> 1998
		1998	Francia	De Champs <i>et al.</i> 2000
		1999	Taiwan	Yan <i>et al.</i> 2000
CTX-M-9		1996	España	Sabaté <i>et al.</i> 2000
		1996	Brasil	Bonnet <i>et al.</i> 2001
		1997	China	Chanawong <i>et al.</i> 2002
		1994	Francia (estudio retrospectivo 2002)	Saladin <i>et al.</i> 2002
CTX-M-14	CTX-M-9 (1 AA)	1995	Korea	Pai <i>et al.</i> 2001
		1996?	España	Sabaté <i>et al.</i> 2000
		1997-1998	China	Chanawong <i>et al.</i> 2002
		1998-1999	Taiwan	Ma <i>et al.</i> 2002
		1999	Francia	Dutour <i>et al.</i> 2002
		1999	Brasil	Bonnet, 2004
CTX-M-15		1999	India	Karimet <i>et al.</i> 2001
		2000	Japón	Livermoere and Hawkey, 2005
		2001	Reino Unido	Woodford <i>et al.</i> 2004
		1998	Polonia (estudio retrospectivo 2002)	Baraniak <i>et al.</i> 2002

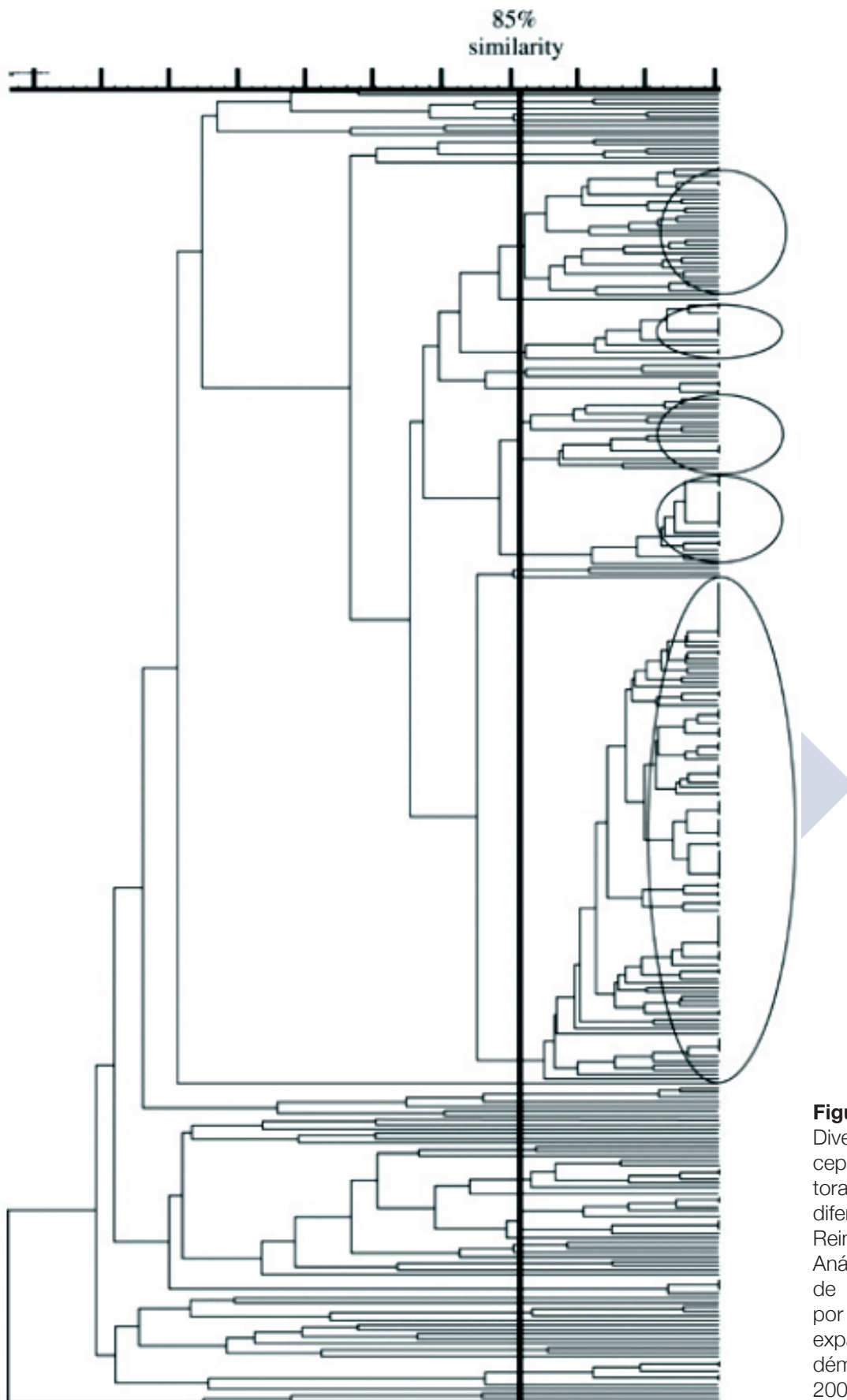
En 1986 se aisló la primera cepa de *E. coli* productora de CTX-M en las heces de un perro de laboratorio utilizado en los estudios farmacocinéticos de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos en Japón. Esta enzima, nombrada inicialmente FEC-1 (Fecal *E. coli*), resultó ser idéntica a la secuencia de CTX-M-3 aislada en Polonia de un paciente con una infección urinaria en 1996. En ese mismo año se aisló un *E. coli* productor de CTX-M-1 de una otitis de un niño de cuatro meses en Munich. En 1989, se aisló en Francia un *E. coli* con un fenotipo idéntico a la cepa de Munich de un paciente italiano. A esta enzima se le dio el nombre de MEN-1 (según el nombre del paciente) que en 1996 resultó ser idéntica a la secuencia de CTX-M-1. Durante la década de los noventa se han identificada nuevas variedades de CTX-M casi al mismo tiempo en diferentes países (**Tabla 7**).

Después de la aparición de las diferentes variedades de CTX-M su prevalencia ha aumentado de manera espectacular y así han desplazado a las otras enzimas resistentes a antibióticos  $\beta$ -lactámicos como las TEM y SHV. Existe una cierta especificidad geográfica de diferentes variedades de CTX-M como CTX-M-1 en Italia, CTX-M-2 en Sudamérica, CTX-M-3 en Japón, CTX-M-9 en España, CTX-M-14 en España y Canadá y CTX-M-15 con una presencia en todo el mundo (Cantón y Coque, 2006). Esta variabilidad podría estar relacionada con las características de cada región como la presencia de algunos clones o de la posible abundancia del organismo del cual derivan.

## 1.9 Emergencia de cepas clonales productoras de BLEE

Entre Octubre 2001 y Octubre 2002 en un Hospital Geriátrico (650 camas) de París se detectó la emergencia y expansión de tres cepas de *E. coli* clonalmente relacionadas del grupo filogenético B2 productoras de CTX-M-15. Todas las cepas eran resistentes a los betalactámicos y fluoroquinolonas y algunas también a gentamicina. Además, las cepas clonales presentaban varios genes de virulencia (*aer*, *fyuA*, y *irp2*) y presentaban el estatus ExPEC. Las cepas clonales estaban diseminadas en el hospital geriátrico, donde las quinolonas fluoradas y la ceftriaxona se prescribían con mucha frecuencia, pero no se expandieron en la unidad de cuidados intensivos de un hospital de referencia donde se aislaron los pacientes. Se trata del primer estudio donde se pone de manifiesto la emergencia de cepas clonales productoras de BLEE (Leflon-Guibout *et al.* 2004).

Lavollay y colaboradores (2006) tras estudiar 120 cepas de *E. coli* productoras de CTX-M-15 aisladas en 10 hospitales diferentes de París, en el Hospital Charles Nicolle de Túnez y en el Instituto Pasteur de Bangui (República Central Africana), entre 2000 y 2004, identificaron 80 cepas en los tres países que estaban clonalmente relacionadas (PFGE). Además, caracterizaron los plásmidos que codifican para CTX-M-15 y comprobaron que pertenecían al grupo de incompatibilidad II y portaban una región de resistencia múltiple (MDR).

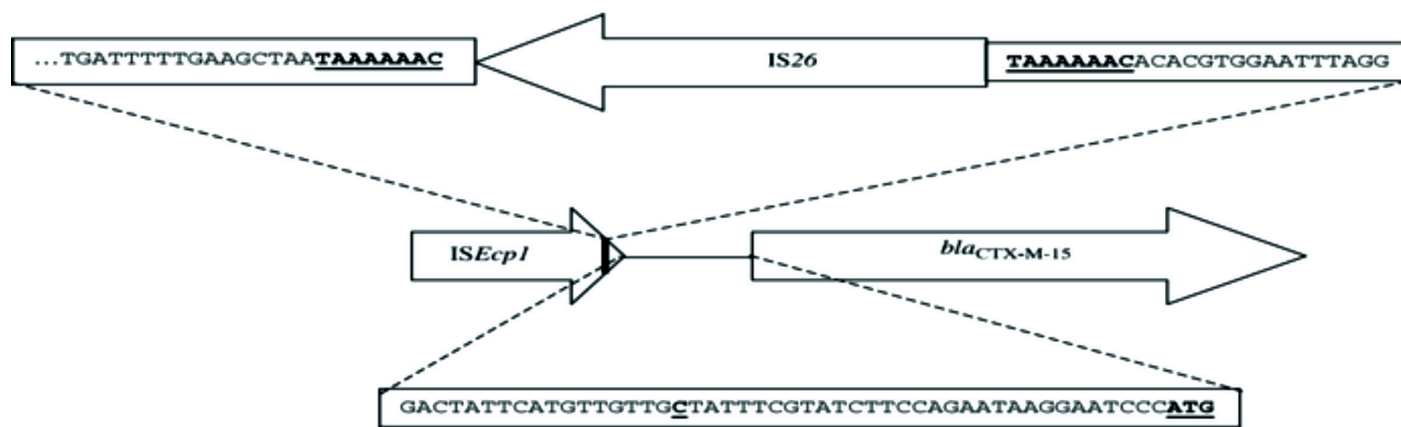


**Figura 26**

Diversidad genética de cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas en diferentes hospitales del Reino Unido (2003-2004). Análisis de los patrones de restricción obtenidos por PFGE. Se detecta la expansión de la cepa epidémica A (Woodford *et al.* 2004).



Woodford y colaboradores (2004), llevaron a cabo un estudio en el Reino Unido donde se examinaron 291 cepas de *E. coli* productoras de CTX-M aisladas en 42 centros sanitarios entre Enero 2003 y Marzo 2004. El 24% eran de infecciones comunitarias. La gran mayoría (96%) eran productoras de enzimas CTX-M del grupo 1. Se identificó una cepa epidémica (cepa A) productora de CTX-M-15 que englobaba 110 aislamientos procedentes de seis centros. Además, identificaron otras cuatro cepas (cepas B, C, D, E) CTX-M-15 asociadas con varios casos esporádicos (**Figura 26**). La mayoría de las cepas eran resistentes a fluoroquinolonas, trimetoprim, tetraciclina y aminoglucósidos.

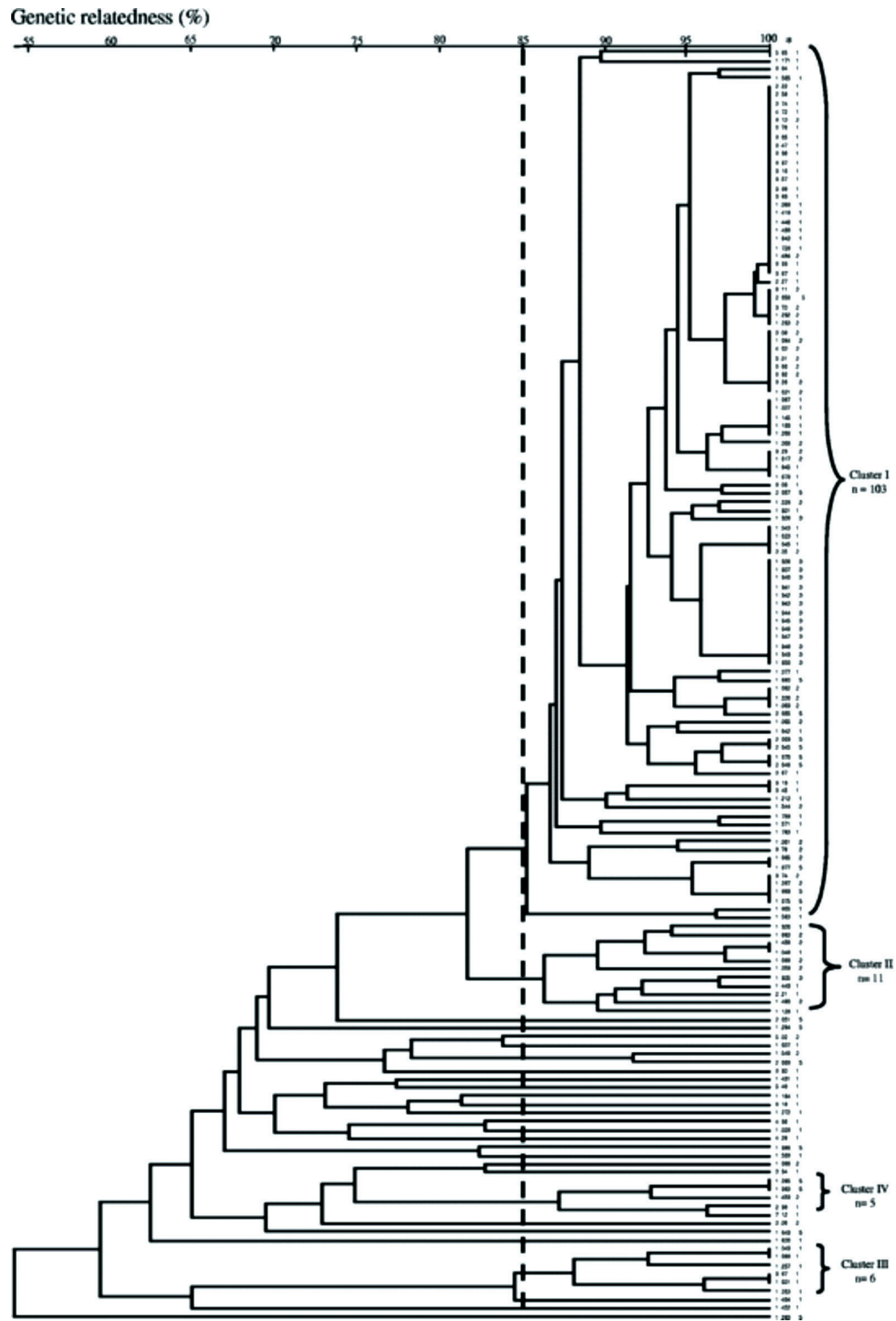


**Figura 27**

Entorno genético del gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> de la cepa epidémica A con la IS26 insertada al final de ISEcp1 que actúa como secuencia movilizadora y promotora (Woodford *et al.* 2004).

La cepa epidémica A, extendida ampliamente en el Reino Unido, presentaba un gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> con un entorno genético peculiar, ya que tenía insertada la secuencia IS26 en la secuencia movilizadora ISEcp1, lo que interrumpe su secuencia promotora y provoca una expresión fenotípica menor del enzima CTX-M-15 (**Figura 27**) (Woodford *et al.* 2004).

En la Comunidad de Madrid también se ha observado la dispersión de clones epidémicos de cepas de *E. coli* productoras de CTX-M-15 en instituciones de pacientes crónicos y en residencias de la tercera edad. Entre Enero 2004 y Agosto 2005 se aislaron 151 cepas de *E. coli* BLEE resistentes a la cefotaxima y a la ceftazidima. Se identificaron 4 *clusters* con 103, 11, 6 y 5 aislados respectivamente. El *cluster* (I) más expandido se detectó en las muestras de todos los centros examinados. La mayoría de las cepas del *cluster* I eran resistentes a la ciprofloxacina (96%), gentamicina (83%) y tobramicina (90%). Ocho de las 11 cepas del *cluster* II contenían la secuencia de inserción IS26 en el mismo lugar que la cepa A del Reino Unido (**Figura 28**) (Oteo *et al.* 2006).



**Figura 28**

Diversidad genética de cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas en diferentes hospitales de Madrid. Análisis de los patrones de restricción obtenidos por PFGE. Se detecta la expansión de una cepa epidémica CTX-M-15 resistente a la gentamicina (*Cluster I*) (Oteo *et al.* 2006).

## 1.10 Emergencia de clones de alto riesgo

El término clon se utiliza para describir la progenie de una célula bacteriana a través de la reproducción asexual, lo que implica que el mismo linaje clonal consta de aislados estrechamente relacionados que han ido divergiendo del mismo ancestro común (Dijkshoorn *et al.* 2000). Sin embargo, las bacterias se caracterizan por su plasticidad genómica, estando sometidas a diferentes eventos genéticos (como mutaciones, deleciones o inserciones de fragmentos de ADN) que producen cambios genotípicos. Por lo tanto, las cepas pertenecientes al mismo clon pueden no ser idénticas genéticamente. En este sentido la definición estricta de un clon tiende a ser flexible y se define como aislados altamente parecidos procedentes del mismo ancestro, que pueden ser identificados mediante métodos moleculares. El término clon es muy útil en la epidemiología molecular permitiendo relacionar cepas distantes geográficamente y temporalmente.

Los primeros estudios indicaban la policlonalidad de las cepas productoras de CTX-M. Sin embargo, con la aplicación de la técnica genotípica MLST (*Multilocus Sequence Typing*) se ha demostrado que, a pesar de la gran diversidad de las enzimas CTX-M, existe una cierta clonalidad puesto que determinadas secuencias tipo están relacionadas con algunas CTX-M. La técnica de MLST fue propuesta en 1998 por Maiden y ha revolucionado los conocimientos sobre la evolución, la ecología, la epidemiología y la genética de poblaciones de las bacterias. Este método se basa en la secuenciación de fragmentos internos altamente conservados dentro de una especie bacteriana. Existen dos esquemas de MLST utilizados para *E. coli*. El primero es el esquema de Achtman (<http://mlst.uss.ie/mlst/dbs/Ecoli>) basado en la amplificación y posterior secuenciación de 7 genes de 583 a 932 pb (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* y *recA*). El segundo es el esquema del instituto Pasteur ([www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/EColi.html](http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/EColi.html)) que se basa en la secuenciación de 8 genes (*dinB*, *icdA*, *pabB*, *polB*, *putP*, *trpA*, *trpB* y *uidA*), las secuencias se analizan empleando el programa Clustalw2. Existen bases de datos electrónicas gratuitas que aseguran una nomenclatura uniforme y fácilmente accesible a todos los interesados. Estas bases de datos analizan las secuencias y les asigna un número que corresponde a la secuencia tipo (ST). De esta manera es posible relacionar las cepas parecidas genéticamente entre si ya que van a tener el mismo código. Últimamente el uso de esta técnica es muy común debido a su bajo coste económico y a la mejora de las bases de datos.

La técnica de MLST se utilizó en cepas de *E. coli* productoras de  $\beta$ -lactamasas para determinar si existe clonalidad entre las cepas aisladas en la misma región o en lugares muy distantes geográficamente.

Ciertos estudios basados en la aplicación de MLST han demostrado que, a pesar de la alta diversidad de las enzimas CTX-M presente en *E. coli*, existe una cierta clonalidad y algunas STs han sido encontradas repetidamente relacionadas con algunas enzimas CTX-M. Ello sugiere que estas secuencias tipo pueden estar involucradas en la diseminación de estas enzimas y el éxito adaptativo de algunas de ellas (Cantón *et al.* 2012). Pueden citarse las secuencias ST38, ST393 y ST405 que han sido relacionados especialmente con las enzimas CTX-M-9, CTX-M-14 y CTX-M-15 respectivamente (Coque *et al.* 2008; Blanco *et al.* 2011). Uno de los ejemplos más destacados de la clonalidad de las cepas de *E. coli* productoras de CTX-M es el grupo clonal con la secuencia tipo ST131, distribuida alrededor de todo el mundo. Este clon está mayoritariamente relacionado con CTX-M-15, y también con las variedades de CTX-M-9 y CTX-M-14 presentes tanto de aislados de origen humano como animal (Mora *et al.* 2010; Cao *et al.* 2011).

Las secuencias tipo más frecuentemente encontradas entre las cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas en diversos países fueron las siguientes: ST10, ST38, ST69, ST131, ST167, ST315, ST393, ST405, ST410 y ST648 (**Tabla 8** y **Figura 29**) (Woodford *et al.* 2011; Brisse *et al.* 2012; Nasser *et al.* 2012; Peirano *et al.* 2012; Van der Bij *et al.* 2012; Colpan *et al.* 2013; Izdebski *et al.* 2013). Concretamente, en el estudio multicéntrico de Izdebski y colaboradores (2013) se determinó la secuencia tipo de 240 cepas aisladas entre los años 2008 y 2011 en España, Francia, Italia e Israel, y aunque se encontraron 76 diferentes STs, únicamente 7 secuencias englobaron el 65% de las cepas (ST10, ST38, ST69, ST131, ST405, ST410, y ST648). Similares resultados fueron encontrados en el estudio que Nasser y colaboradores (2012) realizaron con 100 cepas aisladas en España, Noruega, el Reino Unido y Suecia entre los años 2000 y 2008, ya que el 68% de las cepas pertenecieron únicamente a 6 secuencias tipo (ST10, ST38, ST131, ST167, ST405 y ST648). En Canadá, Peirano y colaboradores (2012) observaron que el 91% de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de hemocultivos entre los años 2000 y 2010 pertenecían únicamente a 8 secuencias tipo (ST10, ST38, ST131, ST315, ST393, ST405, ST61 y ST648).

Por lo tanto, existen clones exitosos entre las cepas de *E. coli* productoras de BLEE que son (o representan) el modo principal de diseminación de las resistencias a antibióticos a nivel global (Willems *et al.* 2011; Woodford *et al.* 2011). Estos clones son una fuente poderosa de propagación de estas resistencias actuando como donante y receptor de los elementos genéticos que confieren la resistencia antimicrobiana tanto por vía vertical a su descendencia como por vía horizontal a otras bacterias. Estos clones se caracterizan por la capacidad de diseminación y colonización de diferentes nichos ecológicos adquiriendo rasgos adaptativos que incrementan su patogenicidad y resistencia a antibióticos, proporcionando una ventaja Darwiniana a las cepas de estos clones sobre otras de la misma especie (Riley, 2014), convirtiéndose así en la parte principal de la población bacteriana en muchas áreas geográficas.

**Tabla 8**

STs más frecuentes a nivel global en cepas ExPEC productoras de BLEE.

Número de cepas BLEE	Año	País	ST más frecuentes entre cepas productoras de BLEE	Referencias
240	2008-2009	Francia, Italia, España e Israel	<b>131</b> (41,2%), <b>10</b> (5,1%), <b>405</b> (4,9%), <b>38</b> (4,3%), 410 (3,7%), <b>648</b> (3,5%), 69 (2,7%)	Izdebski <i>et al.</i> 2013
100	2000-2008	Noruega, Reino Unido, España y Suecia	<b>131</b> (39%), <b>38</b> (8%), <b>648</b> (8%), <b>405</b> (6%), 167 (4%), 10 (3%)	Naseer <i>et al.</i> 2012
197	2000-2010	Canadá	<b>131</b> (59,4%), <b>405</b> (7,1%), CC10 ( <b>10</b> +617) (6,6%), <b>38</b> (5,6%), <b>648</b> (5,6%), 315 (4,6%), 393 (2,5%)	Peirano <i>et al.</i> 2012

Para que un clon sea considerado un clon de alto riesgo debe de cumplir los requisitos siguientes: una capacidad de diseminación a nivel global, multiresistencia, presencia de múltiples genes de virulencia, capacidad de colonizar y persistir en los hospedadores durante largos intervalos de tiempo (más de seis meses) y la capacidad de causar infecciones severas que pueden ser recurrentes (Mathers *et al.* 2015).

Se han llevado a cabo numerosos estudios en diferentes países para conocer las STs más prevalentes a nivel global relacionadas con cepas ExPEC. Para realizar estos estudios se han seleccionado cepas ExPEC consecutivas, no duplicadas y no seleccionadas por resistencia a antibióticos, los resultados de estos estudios están resumidos en la **Tabla 9** y **Figura 29**. Cabe destacar la presencia de cuatro clones especialmente exitosos: ST69, ST73, ST95 y ST131.



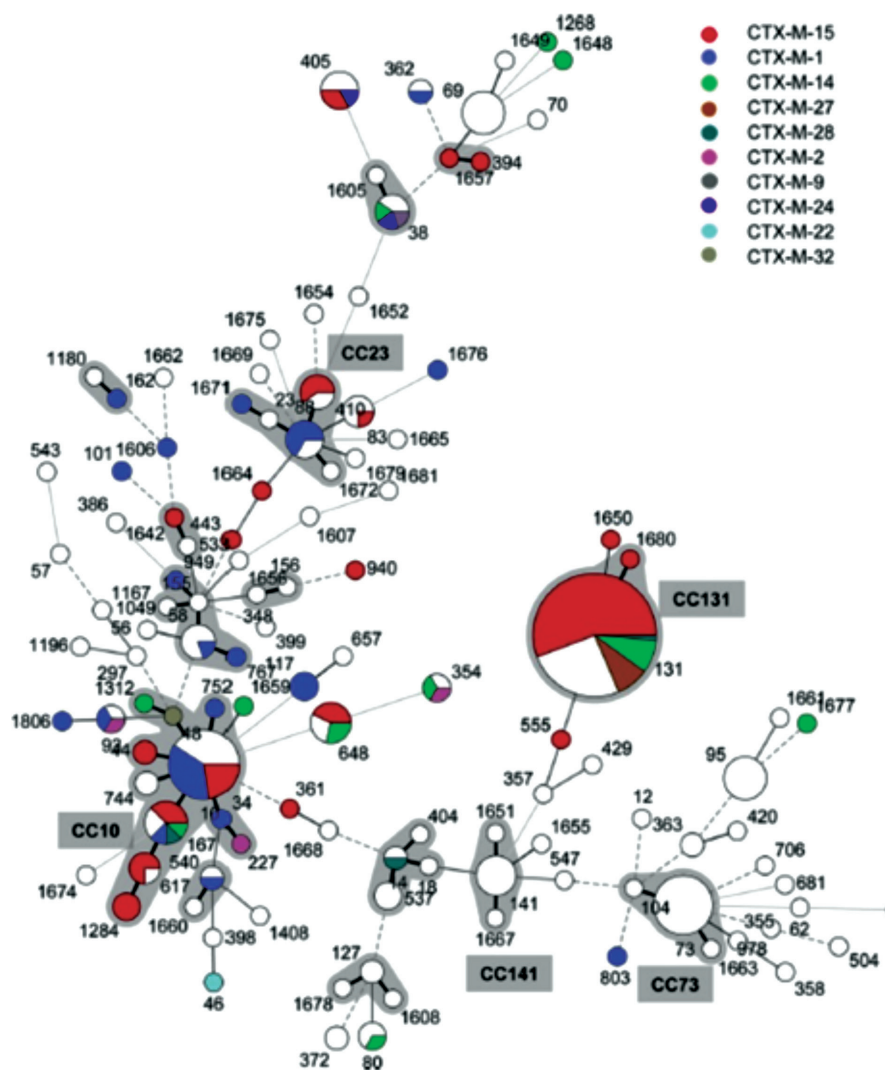
**Tabla 9**

STs más prevalentes a nivel global en cepas ExPEC.

Número de cepas ExPEC	Año	País	ST más prevalentes	Referencias
246 (septicemias)	2007-2010	USA	<b>131</b> (21%), <b>95</b> (16%), <b>73</b> (8%), <b>69</b> (8%), 12, 10, 405, 38	Adams-Sapper <i>et al.</i> 2013
300 (ITU)	2007-2009	Reino Unido	<b>73</b> (16,6%), <b>131</b> (13,3%), <b>69</b> (9%), <b>95</b> (6,5%), 10 (4,3%), 127	Gibreel <i>et al.</i> 2012
88 (ITU y septicemias)	2004-2005	Inglaterra	<b>131</b> (59%), <b>73</b> (7%), <b>95</b> (7%), <b>69</b> (2%), 410 (2%), 416 (2%), 155 (2%), 391 (2%)	Lau <i>et al.</i> 2008
256 (ITU)	2006	Canadá	<b>69</b> , <b>131</b> , <b>95</b> , <b>73</b> (no se aplicó MLST a todas las cepas)	Manges <i>et al.</i> 2008
121 (ITU)	2008-2009	Reino Unido	<b>131</b> (22%), <b>73</b> (11%), <b>69</b> (9%), <b>95</b> (3%)	Croxall <i>et al.</i> 2011
770 (septicemias)	2010-2012	Reino Unido	<b>73</b> (18%), <b>131</b> (17%), <b>69</b> (12%), <b>95</b> (4%), 12 (3%), 404 (3%), 10 (3%), 127 (3%), 141 (3%)	Homer <i>et al.</i> 2014
500 (diferentes infecciones)	2009	España	<b>131</b> (12%), <b>69</b> (4%), 393 (3%)	Blanco <i>et al.</i> 2011
304 (diferentes infecciones)	2008-2009	Francia	<b>131</b> (23%), 10 (7%), <b>73</b> (5%)	Brisse <i>et al.</i> 2012

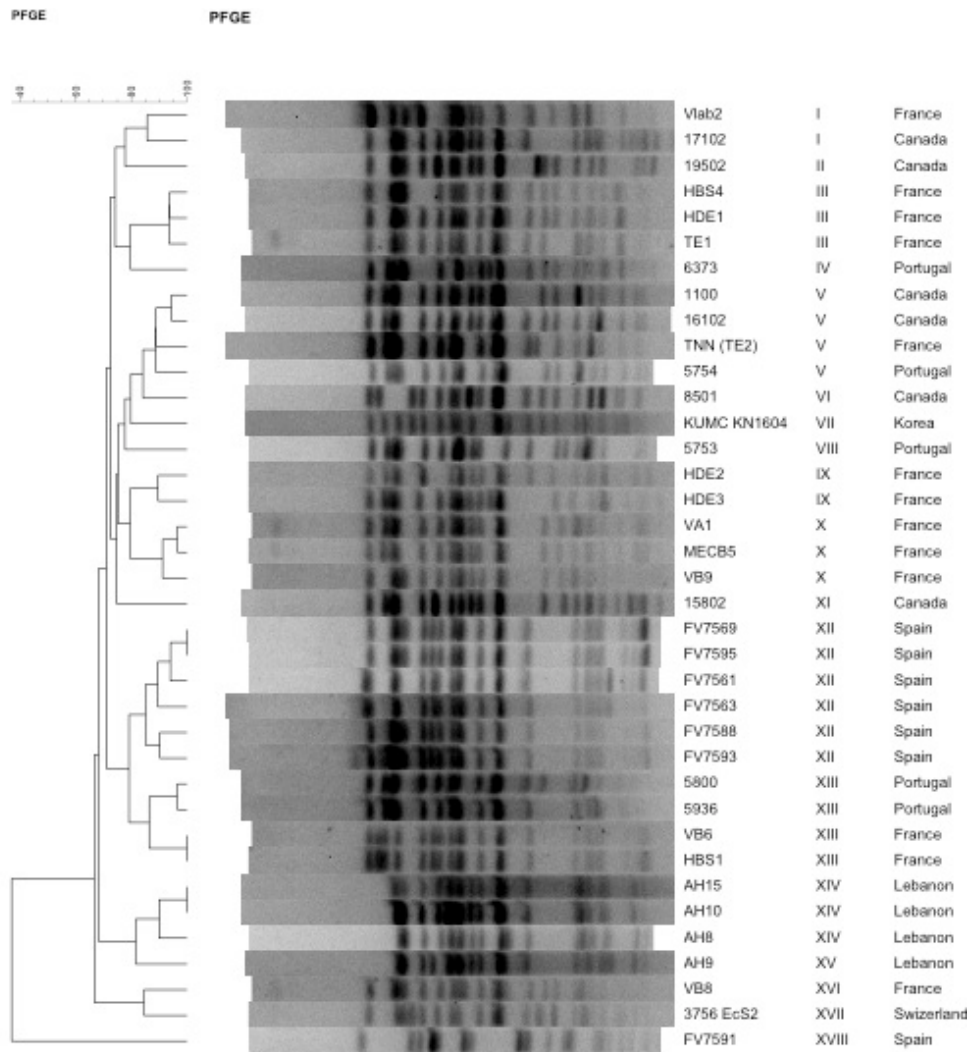
**Figura 29**

Composición clonal de 304 cepas de *E. coli* aisladas en 10 hospitales de París (2008-2009): 152 cepas productoras de CTX-M y 152 cepas no productoras de BLEE (Brisse *et al.* 2012). Las secuencias tipo más frecuentes fueron ST131 (B2) (23%), ST10 (A) (7%) y ST73 (B2) (5%). Hay un total de 13 complejos clonales (CCs), siendo cuatro de ellos altamente prevalentes: CC131 (23%), CC10 (15%), CC73 (6%) y CC23 (5%).



### 1.10.1 Grupo clonal ST131

En el año 2008, varios grupos de investigadores internacionales liderados por Nicolas-Chanoine y con la participación de nuestro grupo (LREC-USC) identificaron el grupo clonal O25:H4-ST131 en un estudio donde se caracterizaron 36 cepas de *E. coli* productoras de CTX-M-15 aisladas de siete países (Francia, España, Portugal, Suiza, Corea, Líbano y Canadá) de tres continentes. Estas cepas presentaban características similares entre sí: el mismo grupo filogenético (B2), mismo serotipo (O25:H4), resistencia a ciprofloxacina y secuencia tipo ST131 (Nicolas-Chanoine *et al.* 2008). Las cepas de este clon poseían de 7 a 14 genes de virulencia de los cuales 5 eran comunes (*fimH*, *sat*, *fyuA*, *usp* y *malX*) lo que las clasificaba como ExPEC. El dendrograma de las 36 cepas obtenido mediante PFGE muestra perfiles de restricción similares, si bien, las cepas se agrupaban en varios *clusters* relacionados genéticamente. Las 6 cepas españolas incluidas en este estudio procedían del Hospital Universitario Lucus Augusti (HULA) de Lugo y se englobaron en un mismo *cluster* (Figura 30).



**Figura 30**

Dendrograma por PFGE de 36 cepas O25b:H4-ST131 productoras de CTX-M-15. La cepa FV7591 pertenece al serotipo O25a:H4 y a la secuencia tipo ST648. (Nicolas-Chanoine *et al.* 2008)

Otro estudio donde se identificó también el grupo clonal ST131 es el realizado por varios investigadores internacionales liderado por Coque, donde se analizaron 43 cepas de *E. coli* productoras de CTX-M-15 procedentes de seis países (Canadá, India, Kuwait, Francia, Suiza, Portugal y España). Detectaron la secuencia tipo ST131 en todos ellos (Coque *et al.* 2008).

En el estudio realizado por Woodford y colaboradores (2004) donde examinaron 291 cepas de *E. coli* productoras de CTX-M, encontraron que el 96% eran productoras de CTX-M-15. El dendrograma de estas cepas identificó una cepa epidémica A y otras cuatro cepas (B, C, D y E). Posteriormente, Lau y colaboradores (2008) aplicaron MLST a algunas de estas cepas (A, B, C, D y E) y determinaron que pertenecían al clon ST131.

En el 2008, Clermont y colaboradores comprobaron que las cepas del grupo clonal O25:H4-ST131 tienen una variante del antígeno somático O25 a la que denominaron O25b. Además, desarrollaron una PCR específica para detectar el antígeno O25b. En un trabajo de los mismos autores (Clermont *et al.* 2009) se utilizó esta prueba para analizar la presencia del clon ST131 en 627 cepas de *E. coli* procedentes de 4 continentes (Europa, Asia, África y América). Ciento cuarenta y tres cepas del total de las cepas fueron productoras de BLEE, y todas ellas fueron O25b-ST131.

### Diseminación y prevalencia de ST131

Se están buscando explicaciones a la emergencia del clon ST131 a nivel mundial casi simultáneamente y entre pacientes que aparentemente no tienen ninguna relación obvia entre ellos. Freeman y colaboradores (2008) realizaron un estudio en Nueva Zelanda en el que observaron que los pacientes de un centro de salud con infecciones urinarias causadas por ST131 habían realizado un viaje reciente a la India o eran emigrantes procedentes de ese país. En Canadá, se ha llevado a cabo un estudio similar donde relacionaron el papel de los viajeros en la diseminación de este clon (Laupland *et al.* 2008; Pitout *et al.* 2009). Así, concluyeron que las personas incluidas en el estudio que habían realizado un viaje en los últimos tres meses a la India, África o Medio Oriente y que habían sufrido una ITU estaban en su mayoría relacionadas con el clon ST131.

Tras la identificación inicial en el 2008 del clon ST131, este clon se expandió de una forma espectacular por todo el mundo cambiando el panorama epidemiológico de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE. En España, en un estudio realizado entre Febrero de 2006 y Mayo de 2008 por nuestro grupo en colaboración con la Unidad de Microbiología del HULA se determinó la prevalencia y el tipo de BLEE producido por las cepas de *E. coli*. La enzima CTX-M-15 (22%) fue la segunda más prevalente después de CTX-M-14 (57%). Además, todas las cepas CTX-M-15 pertenecieron al serotipo O25b:H4, al grupo filogenético B2 y tenían la secuencia tipo ST131 y pertenecían a un mismo cluster de PFGE (Blanco *et al.* 2009). En otro estudio realizado en el Hospital Vall d'Hebron en Barcelona entre Mayo y Diciembre del 2008, analizamos 94 cepas consecutivas no duplicadas de *E. coli* productoras de BLEE, observando que la enzima CTX-M-15 (26%) era la segunda más prevalente después de CTX-M-14 (47%). En total 30 cepas pertenecieron al grupo clonal O25b:H4-B2-ST131, siendo 19 cepas de este clon productoras de CTX-M-15 y 8 de SHV-12 (Coelho *et al.* 2011). De estos dos estudios (donde hay una diferencia de dos años en los muestreos) se deduce un incremento significativo en la prevalencia de este clon en cepas productoras de BLEE en este período de tiempo (del 22% en 2006 al 32% en 2008).

Estudios similares se han realizado alrededor de todo el mundo para evaluar la prevalencia del clon ST131 en cepas ExPEC productoras de BLEE (**Tabla 10**). De estos estudios puede concluirse que la prevalencia media de este clon es del 50% de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE a nivel global.

**Tabla 10**Prevalencia del clon ST131 en cepas de *E. coli* productoras de BLEE.

País	Año	Prevalencia de ST131 en cepas BLEE	Referencias
Dinamarca	2008-2009	38%	Olesen <i>et al.</i> 2013
Francia	2008-2009	36%	Brisse <i>et al.</i> 2012
	2008-2011	42%	Izdebski <i>et al.</i> 2013
Italia	2008-2011	51%	
Israel	2008-2011	33%-41%	
Noruega	2000-2008	27%	Nasser <i>et al.</i> 2012
Reino Unido	2000-2008	60%	
Suecia	2000-2008	58%	
Canadá	2000-2010	59%	Peirano <i>et al.</i> 2012
USA	2011	64%	Colpan <i>et al.</i> 2013

La emergencia del grupo clonal O25b:H4-B2-ST131 se ha asociado con la enzima CTX-M-15 en numerosos países, como por ejemplo en el Reino Unido (Lau *et al.* 2008), Canadá (Peirano *et al.* 2010a), Italia (Cagnacci *et al.* 2008), Turquía (Yumuk *et al.* 2008), Croacia (Literacka *et al.* 2009), Japón (Suzuki *et al.* 2009), USA (Peirano *et al.* 2010b), Sudáfrica (Peirano *et al.* 2011), Brasil (Peirano *et al.* 2011a) y Noruega (Naseer *et al.* 2009). La adquisición por parte del clon ST131 de plásmidos portadores de múltiples genes de resistencia, entre ellos los que codifican para la enzima CTX-M-15, ha aportado a este clon una multirresistencia que combinada con la presencia de un alto número de genes de virulencia le ha permitido una expansión global espectacular. Sin embargo, se han descrito otras variedades de enzimas relacionadas con este clon, como por ejemplo CTX-M-14 en Canadá, China y Japón (Cao *et al.* 2011; Matsumura *et al.* 2013; Peirano *et al.* 2012), CTX-M-3 en Irlanda (Dhanji *et al.* 2011a), y la variedad CTX-M-27, muy frecuente en Francia, Japón y Suiza (Blanc *et al.* 2014; Matsumura *et al.* 2013; Seiffert *et al.* 2013). Se ha relacionado este clon también con cepas que producen otros tipos de enzimas BLEE como SHV (SHV-12 en Barcelona, SHV-5 y SHV-7 en USA) y TEM (TEM-24 en Francia) (Coelho *et al.* 2011; Sidjabat *et al.* 2009; Clermont *et al.* 2009).



Desde que emergieron, las cepas ST131 se han diseminado rápidamente y han contribuido en gran parte a la creciente prevalencia de cepas de *E. coli* multiresistentes a nivel mundial. No obstante, no todas las cepas del clon son productoras de BLEE, la mayoría de estas cepas son resistentes a fluoroquinolonas y algunas son corresponsivas a aminoglucósidos, trimetoprim/sulfametoxazol y cefalosporinas. En un trabajo de investigación doctoral realizado en nuestro laboratorio (Mamani 2014) donde se han analizado 3.164 cepas procedentes de bacteriemias (1989-2011) se encontró una prevalencia de 4,8% de cepas del grupo clonal ST131. En los primeros 11 años (1989-1999) del estudio, la prevalencia del grupo clonal ST131 fue del 1%, pero en el segundo período (2000-2011) emergió con fuerza hasta alcanzar una prevalencia del 6,2%. Las cepas ST131 representaban el 42% de las productoras de BLEE y el 4% de las no BLEE. López-Cerero y colaboradores (2014) analizaron 1.077 cepas causantes de infecciones extraintestinales en Sevilla durante el año 2010 y comprobaron que el 15% eran ST131, representando el 23% de las cepas productoras de BLEE y el 12% de las no BLEE. Johnson y colaboradores (2011), estudiando 127 cepas (en su mayoría bacteriémicas) obtenidas durante el año 2007 en USA, han encontrado que el clon ST131 suponía el 17% de las cepas estudiadas y que englobaba el 51% de las cepas productoras de BLEE y el 35% de las no BLEE. Horner y colaboradores (2014) realizaron un amplio estudio multicéntrico en el Reino Unido en el que analizaron 770 cepas aisladas de hemocultivos entre 2010 y 2012. El 17% de las cepas pertenecieron al grupo clonal ST131, representando el 62% de las productoras de BLEE y el 13% de las no BLEE. Por su parte, Adams-Sapper *et al.* (2013), trabajando con cepas bacteriémicas aisladas en USA entre 2007 y 2010, encontraron que el 26% eran ST131 y que dicho clon representaba el 72% de las productoras de BLEE y el 25% de las no BLEE.

Aunque el principal reservorio de las cepas ExPEC es la microbiota intestinal, existen muy pocos estudios que evalúan la colonización del intestino de personas sanas por el grupo clonal ST131 sin tener en cuenta si son cepas productoras de BLEE o resistentes a fluoroquinolonas. En Australia se ha llevado a cabo estudios entre los años 2010 y 2011 donde han encontrado que el 1% de los niños sanos y el 4% de mujeres en edad fértil eran portadores de ST131 en el intestino (Kudniha *et al.* 2013, 2013 a). En Francia, concretamente en París, han evaluado la presencia del clon ST131 en el año 2006 y en el año 2011 y han observado un aumento de prevalencia del 7% al 14% (Leflon-Guibout *et al.* 2008; Nicolas-Chanoine *et al.* 2013). Otros estudios han evaluado la presencia de cepas productoras de BLEE pertenecientes al clon ST131 en las heces de personas sanas, y se ha encontrado una prevalencia de 7% en China en el año 2009 (Li *et al.* 2011) y de 9,5% en Francia en 2011 (Nicolas-Chanoine *et al.* 2013). Sin embargo, se ha encontrado una prevalencia mucho más baja en Holanda en un estudio realizado por Van Hoek y colaboradores (2015), donde solamente 6 de 1033 personas analizadas eran portadoras de cepas ST131 productoras de BLEE.

La prevalencia del clon ST131 se dispara cuando las muestras analizadas provienen de personas de residencias de la tercera edad o en residencias de ancianos con cuidados sanitarios especiales. Blanco y colaboradores (2009) en un estudio realizado entre los años 2006 y 2008 observaron que el 50% de las cepas ST131 eran aisladas de pacientes del HULA ingresados en residencias de

ancianos. En Alemania, en un muestreo realizado en diferentes residencias de ancianos entre los años 2010 y 2011 han encontrado que el 44% de las cepas BLEE eran ST131 (Arvand *et al.* 2013). En Irlanda, las cepas ST131 productoras de BLEE han sido encontradas en el 55% de las personas muestreadas en una misma residencia de ancianos. En el Reino Unido encontraron una prevalencia de 40% en un muestreo realizado en 16 residencias en Belfast entre los años 2004 y 2006 (Dhanji *et al.* 2011a). Por todo, las personas mayores en residencias de ancianos pueden ser considerados como un reservorio importante para la diseminación de las cepas del clon ST131 productoras de BLEE.

Blanc *et al.* (2014) en colaboración con el LREC-USC analizamos para la presencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEE las muestras fecales de 419 niños de 25 guarderías infantiles francesas en el año 2012. Un total de 27 (6,4%) de los niños eliminaban en sus heces cepas productoras de enzimas CTX-M: 37% CTX-M-15, 26% CTX-M-1, 22% CTX-M-14, 11% CTX-M-27 y 4% CTX-M-22. El 44% de las 27 cepas BLEE aisladas eran ST131 y el resto pertenecían a un amplísimo abanico de secuencias ST diferentes (ST28, ST38, ST56, ST101, ST127, ST350, ST602, ST742, ST744, ST1193, ST3841, ST3842, ST3843, ST3867). Ocho de las 12 cepas ST131 producían CTX-M-15, 3 CTX-M-27 y una CTX-M-1.

La presencia de este clon en el tracto intestinal tanto de personas sanas como enfermas, hace que estas cepas se liberen al medio ambiente directamente o indirectamente. Las depuradoras reducen significativamente la presencia de las cepas *E. coli* después del tratamiento al que someten las aguas residuales, sin embargo, parece ser que las cepas productoras de BLEE presentan una ventaja sobre otras cepas *E. coli* no productoras de BLEE (Galvin *et al.* 2010). Se han realizado varios estudios que han puesto de manifiesto la presencia de cepas de *E. coli* ST131 tanto en aguas residuales urbanas como en agua de ríos. Concretamente el LREC-USC ha participado en el estudio de Colomer-Lluch y colaboradores (2013) en el que evaluamos la presencia de cepas O25b:H4-B2-ST131 en aguas residuales urbanas y de río en Barcelona en 2009 y 2010. En total recuperamos 51 cepas ST131: 25 obtenidas de 9 de las 10 muestras de aguas residuales urbanas examinadas y 26 de 6 de las 6 muestras de agua del río Llobregat. No obstante, únicamente 6 (12%) de las 51 cepas ST131 aisladas eran productoras de BLEE: 5 CTX-M-15 aisladas de 3 muestras de aguas residuales urbanas y una cepa CTX-M-1 procedente de agua de río. Al comparar los genes de virulencia y los perfiles de PFGE-*Xba*I de las 51 cepas ST131 de aguas con 59 cepas O25b:H4-B2-ST131 aisladas de muestras clínicas humanas en diferentes hospitales españoles observamos que tenían similares combinaciones de genes de virulencia y perfiles de macrorrestricción. Dhanji y colaboradores (2011) aislaron en el año 2010 un total de 20 cepas ST131 de muestras de aguas del río Támesis a su paso por Londres. Diez de las cepas eran productoras de CTX-M-14, pero ninguna producía CTX-M-15. Dolejska y colaboradores (2011) detectaron cepas ST131 en 12 (27%) de 45 muestras de aguas residuales depuradas en la ciudad de Brno (República de Checolovaquia) en los años 2008 y 2009. Diecisiete de las 19 cepas ST131 aisladas eran productoras de CTX-M-15.

### ST131 en animales de compañía

---

La primera cepa ST131 se identificó en un perro con UTI en Portugal y resultó ser resistente a las fluoroquinolonas y productora de CTX-M-15 (Pomba *et al.* 2009). En un estudio donde se analizaron 177 muestras de gatos, perros y caballos con ITUs, heridas infectadas y diarrea procedentes de 8 países europeos (Alemania, Italia, Holanda, Francia, España, Dinamarca, Austria y Luxemburgo) encontraron una prevalencia de este clon en 5,6%. Todas las cepas ST131 eran productoras de CTX-M-15 salvo una que era productora de SHV-12; y estas cepas fueron muy parecidas a cepas ST131-CTX-M-15 de origen humano (Ewers *et al.* 2010). En Japón, aislaron cepas ST131 productoras de CTX-M-27 de 12% de muestras procedentes de perros y gatos (Harada *et al.* 2012). La presencia de este clon en animales de compañía representa un alto riesgo de transmisión entre humanos y mascotas por su contacto estrecho. No obstante, es necesario realizar nuevos estudios para saber si las cepas aisladas en los animales de compañía pueden causar también infecciones en seres humanos, y conocer el sentido de la transmisión, ya que es probable que al menos algunas de las cepas ST131 que se aíslan de los perros y los gatos sean de procedencia humana.

### ST131 en animales destinados a consumo

---

Según nuestra información la primera cepa O25b:H4-ST131-BLEE aislada a nivel mundial la detectamos en una muestra fecal de una granja de pollos de Cataluña analizada el año 2003 y se trataba de una cepa productora de CTX-M-9 que presentó un 81% de identidad en su perfil de PFGE-*Xba*I con tres cepas de origen clínico humanas O25b:H4-ST131-CTX-M-9 (Cortés *et al.* 2010). Posteriormente, en los años 2008 y 2009, aislamos cepas O25b:H4-ST131 productoras de CTX-M-9 y no productoras de BLEE tanto de aves enfermas como de carne de pollo (Mora *et al.* 2010). Algunas de las cepas aviares O25b:H4-ST131-CTX-M-9 aisladas en este estudio resultaron tener el mismo patrón de genes de virulencia que varias cepas clínicas humanas con las que presentaron también >90% de identidad en sus patrones de macrorrestricción. Por su parte, Vincent y colaboradores (2010) aislaron una cepa O25:H4-ST131 no BLEE de una muestra de carne obtenida en Montreal en el año 2006 que también resultó ser similar a dos cepas clínicas humanas. Por último, Schink y colaboradores (2013) identificaron una cepa ST131 productora de CTX-M-1 procedente de un cerdo con diarrea entre 1378 cepas *E. coli* de cerdos, aves y vacuno.

### ST131 en fauna silvestre

---

También se ha identificado el clon ST131 en animales silvestres. Concretamente, en Rusia, Hernández y colaboradores (2010), encontraron una cepa ST131 productora de BLEE entre 4 cepas BLEE detectadas entre 532 cepas de *E. coli* de gaviotas de Bering (*L. glaucescens*); en Portugal, Simoes y colaboradores (2010), aislaron 4 cepas ST1831 productoras de BLEE entre 45 muestras de gaviotas; y en Alemania, Guenther y colaboradores (2010), investigaron 220 cepas procedentes de ratas de alcantarilla (*R. norvegicus*) e identificaron una cepa ST131-CTX-M-9.

## Genes de virulencia y virotipos

Las cepas del grupo clonal ST131 se caracterizan por ser la causa de un amplio espectro de infecciones nosocomiales y extrahospitalarias, por ser resistentes a numerosos antibióticos y por la presencia de numerosos genes de virulencia. Estas características contradicen la incompatibilidad de los genes de virulencia y los de resistencia a antibióticos observada en otros clones mayoritarios entre las cepas ExPEC. Estos genes de virulencia les permiten adherirse, evitar y subvertir los mecanismos de defensa del hospedador además de adquirir los nutrientes necesarios para la bacteria. Se pueden repartir al menos en cinco grupos: adhesinas, toxinas, síntesis de capsula, sideróforos y resistencia al suero. Se han descrito 10 genes codificantes de factores de virulencia comunes entre las cepas ExPEC ST131: *iha* y *fimH* (adhesinas), *sat* (toxina), *kpsM II* (capsula del grupo 2), *fyuA* y *iutA* (sistema de adquisición de hierro), *usp* (proteína específica uropatogénica), *traT* (resistencia al suero), *ompT* (proteasa de la membrana externa) y *malX* (marcador de isla de patogenicidad) (Rogers *et al.* 2011; Riley *et al.* 2014).

Existen varios estudios donde caracterizan los genes de virulencia presentes en este clon. Uno de ellos es el estudio realizado por Johnson y colaboradores (2010) en el que caracterizaron 127 cepas ExPEC de USA, de las cuales el 17% pertenecían al clon ST131. Estas cepas se caracterizaron por su multiresistencia y su alto contenido en genes de virulencia en comparación con el resto de las cepas no ST131 de dicho estudio. Es muy interesante destacar que las cepas ST131 de este estudio, además de su alto contenido en genes de virulencia presentaban 5 genes de virulencia (*usp*, *ompT*, *iutA*, *sat* y *malX*) no presentes en las cepas no ST131. En un estudio reciente realizado en nuestro laboratorio (Mamani 2014) en el que se analizaró la presencia de 30 genes que codifican para genes de virulencia típicos de cepas ExPEC en 94 cepas productoras de BLEE de Barcelona (2008), comprobamos que 11 genes de virulencia (*papGIII*, *afaFM955459*, *cnf1*, *sat*, *hlyA*, *kpsM II-K2*, *kpsM II-K5*, *traT*, *ibeA*, *malX* y *usp*) estaban significativamente asociados con las cepas ST131 y que coincidían en parte con los resultados de Johnson y colaboradores (2010) (*iha*, *fimH*, *sat*, *astA*, *fyuA*, *iutA*, *kpsM II-K2*, *kpsM-K5*, *usp*, *traT*, *ompT* y *malX*). Resultados similares se han encontrado en otros estudios (Matsumura *et al.* 2012; Platell *et al.* 2011a; Blanco *et al.* 2009). De esta forma, podemos anotar que existen algunos genes presentes uniformemente en todos o casi todos estos estudios: *sat*, *fimH*, *fyuA*, *kpsM II*, *usp*, *malX*, *iha*, *ompT*, *iucD*, *iutA* y *traT*. Estos genes de virulencia pueden estar más implicados en el aumento de la capacidad de una colonización eficiente del hospedador que en la virulencia de estas cepas causando la infección.

Numerosos autores sugieren que no solo podría ser importante la presencia acumulativa de factores de virulencia, sino la presencia de determinados factores de virulencia especializados, debido a la función que desempeñen cada uno de ellos en la infección (Sannes *et al.* 2004; Moreno *et al.* 2005; Moreno *et al.* 2006). En este sentido, recientemente Spurbeck y colaboradores (2012) y Vigil y colaboradores (2012) han señalado a otros genes de virulencia alternativos (*vat*, *fyuA*, *chuA*, *yfcV* y *tosA*) como indicadores del potencial de virulencia de las cepas que colonizan el tracto urinario y producen bacteriemia. Los genes *vat*, *fyuA*, *chuA*, y *fcV* se encontraron en proporciones 10 veces



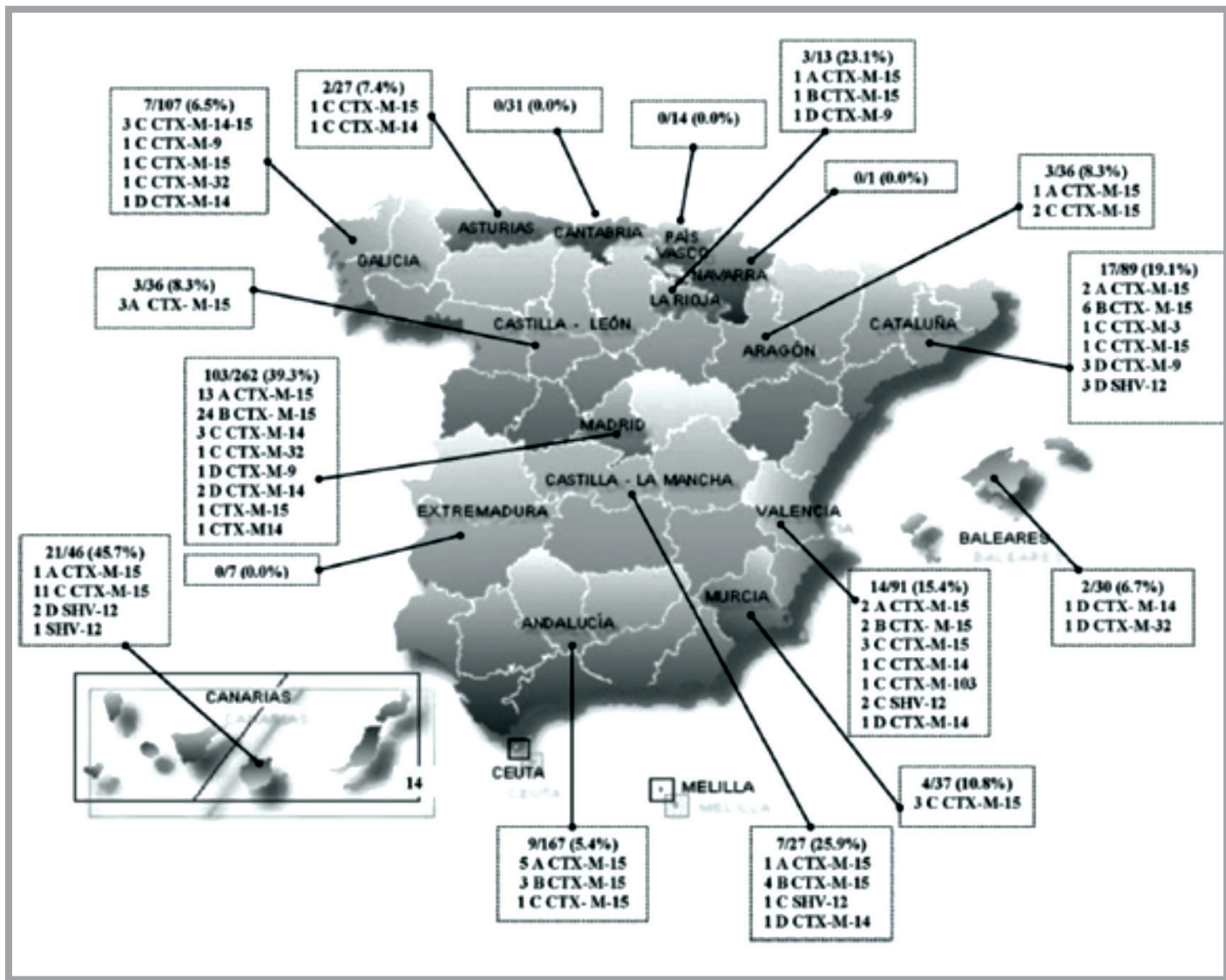
superiores en cepas de *E. coli* causantes de infecciones urinarias (UPEC) y meningitis (NMEC) que en cepas fecales comensales. El gen *vat* codifica para una toxina serina proteasa autotransportadora, el *fyuA* para un receptor de yersiniabactina, el *chuA* para una proteína de unión a un grupo hemo; el gen *yfcV* para la subunidad mayor de un posible chaperon fimbrial; y por su parte el gen *tosA* codifica para una toxina RTX. Estos genes pueden jugar un papel importante en la patogénesis y el éxito expansivo de este grupo clonal. La combinación de multirresistencia y ciertos genes de virulencia son los factores que hacen que este clon sea uno de los más expandidos a nivel global (Pitout, 2012).

Blanco y colaboradores (2013), con el objetivo principal de analizar la diversidad de las cepas productoras de BLEE procedentes de diferentes hospitales, analizaron 1.021 cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de pacientes internos y externos en Febrero y Marzo del 2006 en 44 hospitales que participaron en el proyecto GEIH-BLEE-2006 y estaban distribuidos por todas las comunidades autónomas de España. Además, analizaron 52 cepas ST131 internacionales pertenecientes a 8 países que representan 3 continentes y forman parte de las colecciones de referencia de Nicolas-Chanoine y colaboradores (2008) y Johnson y colaboradores (2012a). Encontramos que un total de 195 cepas (19%) de las 1.021 pertenecían al grupo clonal O25b:ST131 y que estas cepas estaban presentes casi en todas las comunidades autónomas, con especial prevalencia en las comunidades de Madrid y las Islas Canarias (**Figura 31**).

De las 195 cepas ST131 aisladas en el proyecto GEIH-BLEE-2006 (Blanco *et al.* 2013) se analizaron 130 para la presencia de 40 genes de virulencia asociados a ExPEC, de los cuales 13 fueron detectados en la mayoría de ellas. Aunque los patrones de genes de virulencia fueron bastante homogéneos, establecieron un esquema de clasificación por virotipos de las cepas del clon ST131, basándose en la presencia o ausencia de cuatro genes de virulencia. Estos genes son *afa* FM955459 (alelo específico de las cepas O25b:ST131), *iroN*, *ibeA* y *sat* (**Tabla 11**).

Con este sistema de clasificación se han podido repartir 127 de las 130 cepas ST131 en los 4 virotipos. Un 22% correspondían al virotipo A, 31% al virotipo B, 32% al virotipo C y 13% al virotipo D. Las cepas pertenecientes a los diferentes virotipos presentaban diferentes patrones de resistencia. Se observó también una relación entre los virotipos y los perfiles de restricción por PFGE. Ciento dieciséis de las 130 cepas ST131 fueron distribuidas en 4 grandes *clusters* que correspondían a los 4 virotipos lo que sugiere la existencia de una base clonal para los virotipos que podrían representar 4 subclones principales (**Figura 32**). Las 52 cepas internacionales se han repartido también en dichos *clusters*, siendo el virotipo C el más diseminado a nivel mundial.





**Figura 31**  
Distribución de cepas ST131-O25b:H4 en el año 2006 en España (Blanco *et al.* 2013)

**Tabla 11**  
Clasificación en virotipos de cepas ST131 desarrollada por Blanco *et al.* 2013.

Virotipo	Genes de virulencia			
	<i>afaFM955459</i>	<i>iroN</i>	<i>ibeA</i>	<i>sat</i>
A	+	-	-	+/-
B	-	+	-	+/-
C	-	-	-	+
D	-	+/-	+	+/-



### Tipado molecular: PFGE y clonotipado

Las técnicas de genotipado como MLST y PFGE son las más utilizadas para relacionar clonalmente las cepas. Con la PFGE se puede lograr una mayor resolución. Así, las cepas que poseen la misma ST y que no están relacionadas epidemiológicamente, suelen presentar diferentes pulsotipos. La PFGE es una herramienta de tipado molecular especialmente útil en casos de brotes. Tenover y colaboradores (1995) han proporcionado una guía que facilita la interpretación de los dendrogramas resultantes de PFGE poniendo un punto de corte  $\geq 85\%$  de similitud para considerar que las cepas pertenecen al mismo *cluster*. Las cepas del mismo clon se pueden repartir en diferentes pulsotipos. MLST y PFGE son técnicas complementarias entre ellas para la determinación de un clon y la variabilidad dentro de ese clon. No obstante, se han encontrado pulsotipos similares entre cepas ST131 aisladas en áreas geográficas distantes y pulsotipos divergentes entre cepas aisladas en áreas geográficas relacionadas (Nicolas-Chanoine *et al.* 2008).

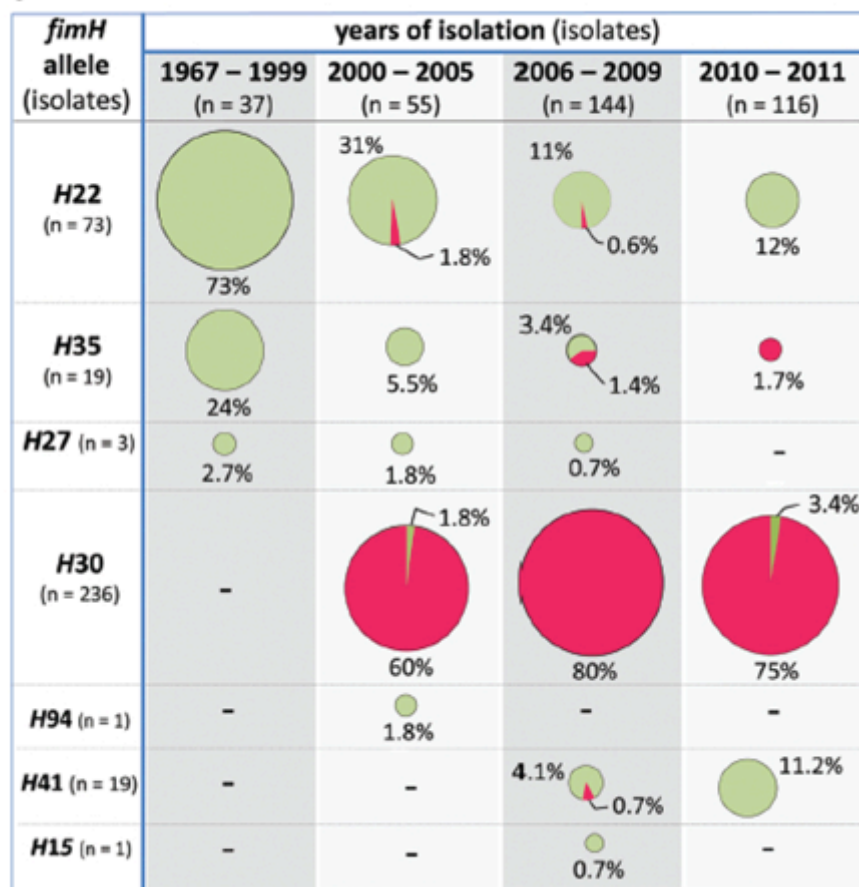
Un estudio que ha analizado una amplia colección de cepas ST131 de diferentes países identificaron 15 pulsotipos diferentes, aunque casi la mitad de las cepas pertenecían a cuatro pulsotipos (Peirano *et al.* 2014). Cepas con pulsotipos diferentes se pueden aislar de la misma localidad (Gibreel *et al.* 2012; Peirano *et al.* 2014). Johnson y colaboradores (2012b) han estudiado más de 500 cepas ST131 entre 1960 y 2010 de origen humano, animal y del medio ambiente, y han demostrado que las cepas ST131 son muy divergentes cuando se analizan por PFGE. Además, han demostrado también que un cierto número de pulsotipos estrechamente relacionados son predominantes a nivel mundial y que aparecieron en los últimos 10 años. Esta diversidad de pulsotipos, genes de virulencia y perfiles de resistencia sugiere que las cepas ST131 son heterogéneas y que seguramente algunas están mejor adaptados y son más exitosos que otras (Woodford *et al.* 2011). El hecho de que este clon este diseminado mundialmente, le permite la adquisición de plásmidos con genes de resistencia endémicos en las áreas geográficas donde está presente (Woodford *et al.* 2009).

Todas las cepas del clon ST131 se caracterizan por ser positivas para el gen *fimH* (como la mayoría de las cepas *E. coli*). Este gen codifica para la adhesina FimH, localizada en el extremo de la fimbria tipo 1. Se caracteriza por una gran diversidad alélica. Tartof y colaboradores (2007) hicieron alusión al poder discriminatorio de este gen que puede ser utilizado como una prueba fácil y económica para establecer cierta relación entre las cepas uropatogénicas. Weissman y colaboradores (2012) describieron un esquema de tipificación muy útil para identificar subclones dentro de los grupos clonales de cepas ExPEC, basado en el tipado de la región *fimH* (*fimH*<sub>TR</sub>) secuenciando un fragmento interno de este gen y también de un fragmento del gen *fumC* utilizado en MLST. Johnson y colaboradores (2013) utilizaron este método para el tipado de cepas del grupo clonal ST131 históricas y recientes aisladas en USA (1967-2011) de diferentes áreas geográficas y de diferentes orígenes, identificaron 7 alelos *fimH* (*H15*, *H22*, *H27*, *H30*, *H35*, *H41* y *H94*), siendo *fimH30*, *fimH22*, *fimH41* y *fimH35* los más prevalentes. Durante el primer período (1967-1999) encontraron solamente cepas ST131 susceptibles a las quinolonas fluoradas y entre dichas cepas predominaban los subclones *H22* y *H35*. Las cepas ST131 resistentes a las quinolonas fluoradas aparecieron durante

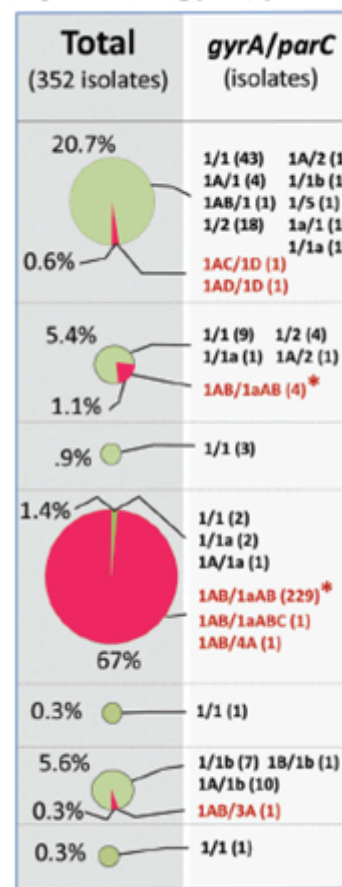


el período 2000-2005 y se asociaron casi exclusivamente con el subclón *H30* englobando el 70% de estas cepas. Dieciocho de las 19 cepas del subclón *H41* eran susceptibles a las quinolonas fluoradas y fueron aisladas entre los años 2006 y 2011 (**Figura 33**).

**A *fimH* alleles vs. time and FQ resistance**



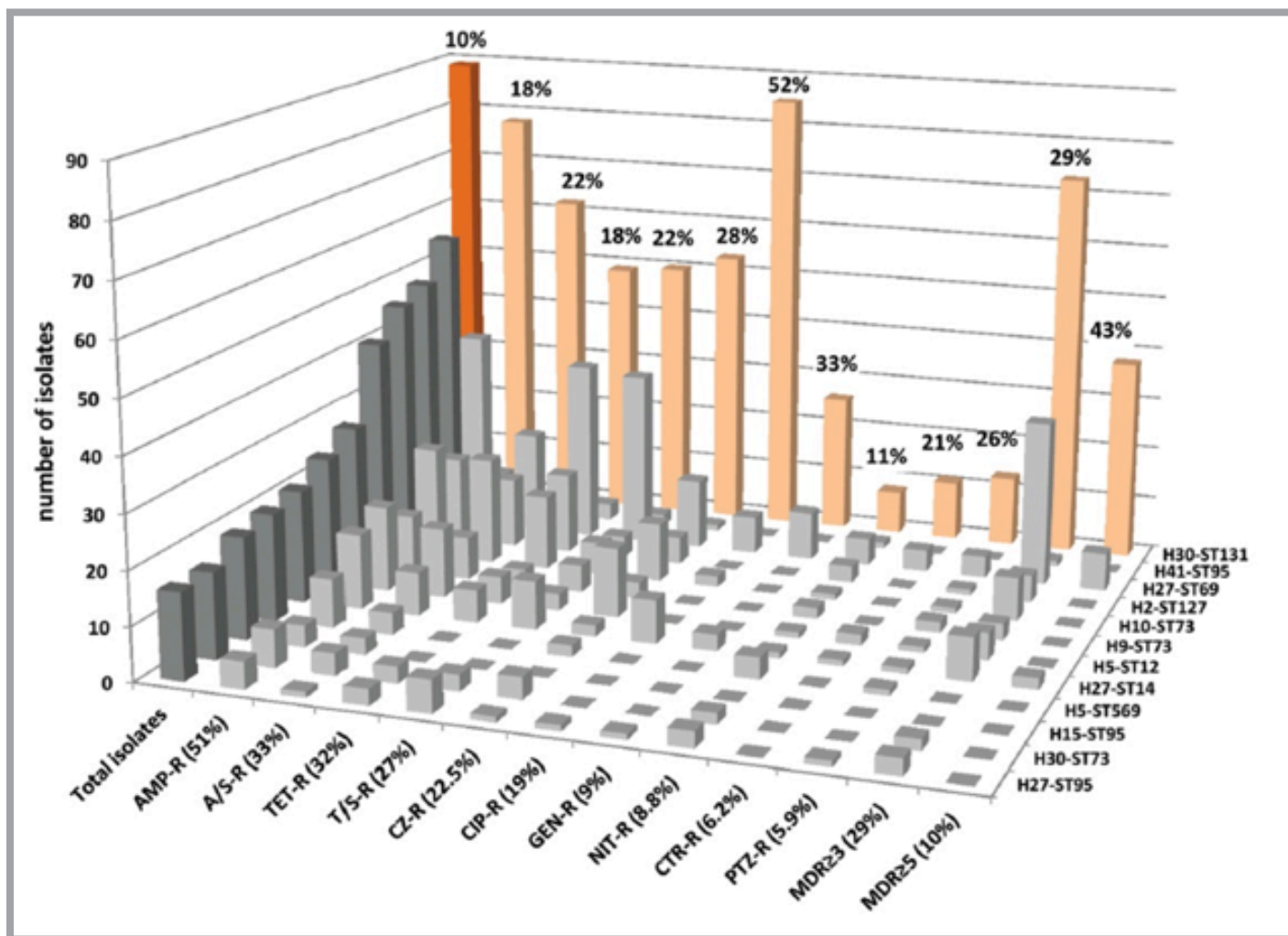
**B *fimH* vs. *gyrA/parC***



**Figura 33**

Distribución de cepas susceptibles a la fluoroquinolonas (FQ-S) (en verde) y resistentes (FQ-R) (en rojo) entre los siete subclones *fimH* detectados en cepas ST131 por Johnson *et al.* (2013).

Johnson y colaboradores (2013) también realizaron el clonotipado de 853 cepas causantes de infecciones extraintestinales y aisladas en los años 2010 y 2011 en cinco hospitales de USA, comprobando que el subclón *H30* de ST131 era el más prevalente (10%) seguido a distancia por las cepas de las secuencias tipo ST95, ST69, ST127 y ST73. Además el subclón *H30* dominaba entre las cepas resistentes a las fluoroquinolonas (52%) y las resistentes a otros muchos antimicrobianos (**Figura 34**).



**Figura 34**

Prevalencia de cepas del subclón *H30* de ST131y otros subclones entre 853 cepas causantes de infecciones extraintestinales y aisladas en cinco hospitales de USA en los años 2010 y 2011 (Johnson *et al.* (2013). AMP, ampicilina ; A/S, ampicilina/sulbactam; CIP, ciprofloxacina; CZ, cefazolina; GM, gentamicina; NIT, nitrofurantoina; PTZ, piperacilina/tazobactam; TET, tetraciclina; T/S, trimetoprim/sulfametoxazol. No se encontró ninguna resistencia al imipenem. MDR, multiresistencia ( $\geq 3$  o  $\geq 5$  clases, separando las penicilina de las cefalosporinas).

Price y colaboradores (2013) han analizado inicialmente 524 cepas ST131 aisladas entre 1967 y 2011 de diferentes áreas geográficas utilizando PFGE y han encontrado que el linaje *fimH30* pertenecía a diferentes clusters independientemente si las cepas incluidas en cada *cluster* eran resistentes o no a las fluoroquinolonas o contenían o no la enzima CTX-M-15, lo que sugiere que la adquisición de la resistencia a las fluoroquinolonas y los genes codificantes de las enzimas CTX-M-15 ha ocurrido de manera horizontal durante un largo periodo de tiempo. Sin embargo, cuando se analizó el genoma completo de las 105 cepas con pulsotipos diferentes en PFGE, y combinado con el análisis del polimorfismo de un solo nucleótido SNP (Single Nucleotide Polymorphism) para reconstruir la filogenia de las cepas ST131, encontraron que las cepas *fimH30* resistentes a fluoroquinolonas

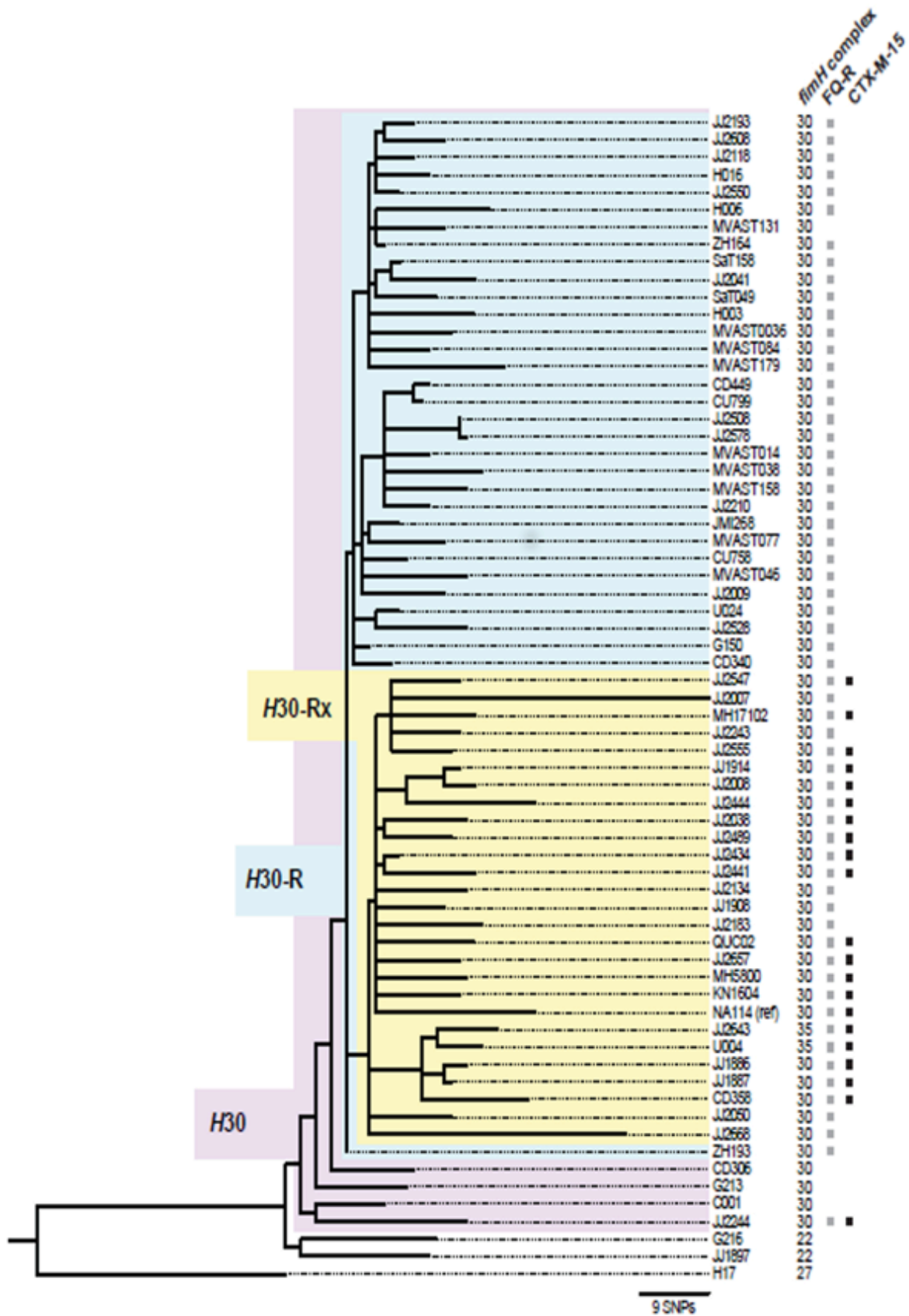


BLEE negativas y las resistentes a fluoroquinolonas productoras de CTX-M-15 formaban *clusters* diferentes. De tal forma que las cepas resistentes a fluoroquinolonas con CTX-M-15 forman un *cluster* bien definido dentro del *cluster* de las cepas resistentes a fluoroquinolonas no productoras de BLEE (**Figura 35**). Este análisis filogenético indica que el clon ST131 *fimH30* comprende subclones que derivan del mismo ancestro sensible a las fluoroquinolonas (Banerjee y Johnson, 2014). Price y colaboradores (2013) han nombrado estos subclones como *H30-R* (incluye las cepas resistentes a fluoroquinolonas) y *H30-Rx* (engloba las cepas resistentes a fluoroquinolonas y productoras de CTX-M-15). Esta estructura clonal da lugar a una sucesión de resistencias antimicrobianas entre linajes asociados al clon *fimH30*, desde los más susceptibles a las fluoroquinolonas a los resistentes a estas y finalmente las resistentes a fluoroquinolonas y productoras de CTX-M-15 (**Figura 36**). La secuenciación del genoma completo y el análisis de SNP indican que la expansión del linaje ST131 *fimH30* a nivel mundial es el vehículo más importante para el aumento y la expansión del clon ST131 resistente a las fluoroquinolonas y productores de CTX-M-15 entre las cepas ExPEC (Petty *et al.* 2014).

El linaje *fimH30* apareció por primera vez a principios de la década del 2000 convirtiéndose en el más predominante a finales de esa década seguido por una rápida expansión. La mayoría de las cepas *fimH30* están estrechamente relacionadas genéticamente entre si sugiriendo que se originaron a partir del mismo ancestro portador del mismo alelo (Price *et al.*, 2013). Parece ser que la dramática emergencia global de las cepas ST131 resistentes a fluoroquinolonas ha sido impulsada por la expansión y diseminación de este subclón *fimH30* (**Figura 37**) (Mathers *et al.* 2015).

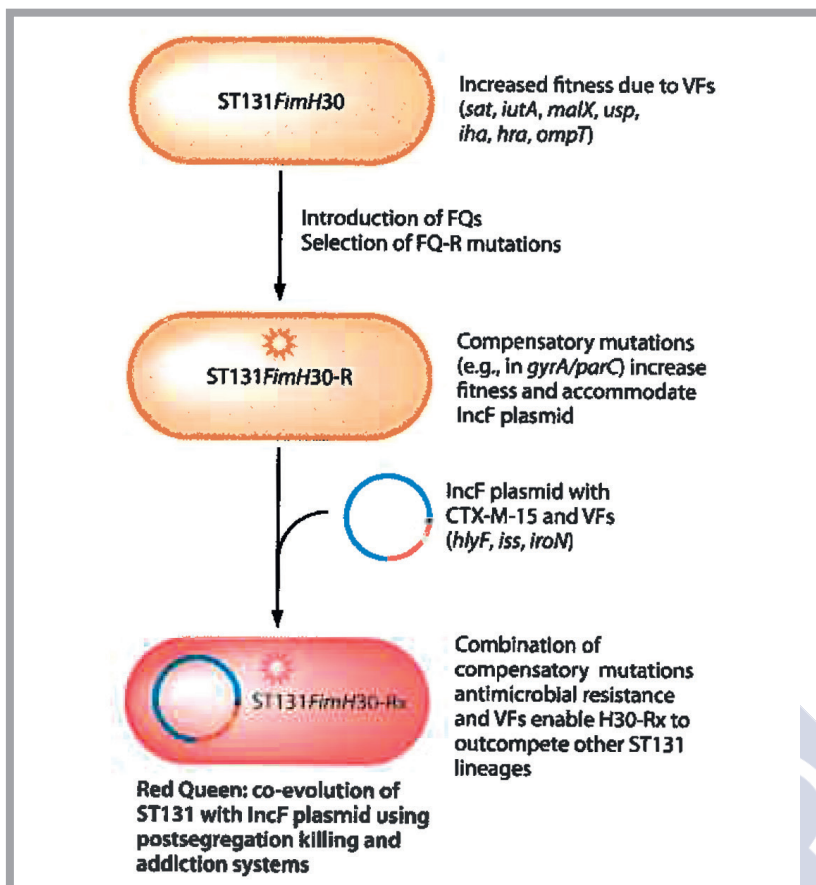
Existe una relación muy estrecha entre el subclón *H30-Rx* y la enzima CTX-M-15. Sin embargo, no todas las cepas ST131 productoras de CTX-M-15 pertenecen al subclón *H30-Rx* (Colpan *et al.* 2013; Banerjee *et al.* 2013b) y también se han detectado cepas *H30-Rx* no productoras de CTX-M-15.

Blanco y colaboradores (2009) desarrollaron una triple PCR que permite la detección específica y rápida de cepas O25b del grupo clonal ST131. El serotipo O25b:H4 es el más predominante en este clon, sin embargo, se han descrito recientemente otros serotipos relacionados con este clon: O16:H5 y ONT:H4 en USA, Europa, Japón y Australia (Blanc *et al.* 2014; Johnson *et al.* 2014; Olesen *et al.* 2013; Matsumura *et al.* 2012a). Se ha detectado también el serogrupo O157 en una cepa ST131 en Australia (Patell *et al.* 2011) y recientemente se ha descrito una cepa aviar del serogrupo O142 con la secuencia tipo ST131 (Wang *et al.* 2015). Johnson y colaboradores (2009) han desarrollado una PCR específica de SNPs de los genes *gyrB* y *mdh* que detecta todas las cepas del grupo clonal ST131, tanto las del serotipo O25b:H4 como las de los otros serotipos y serogrupos.



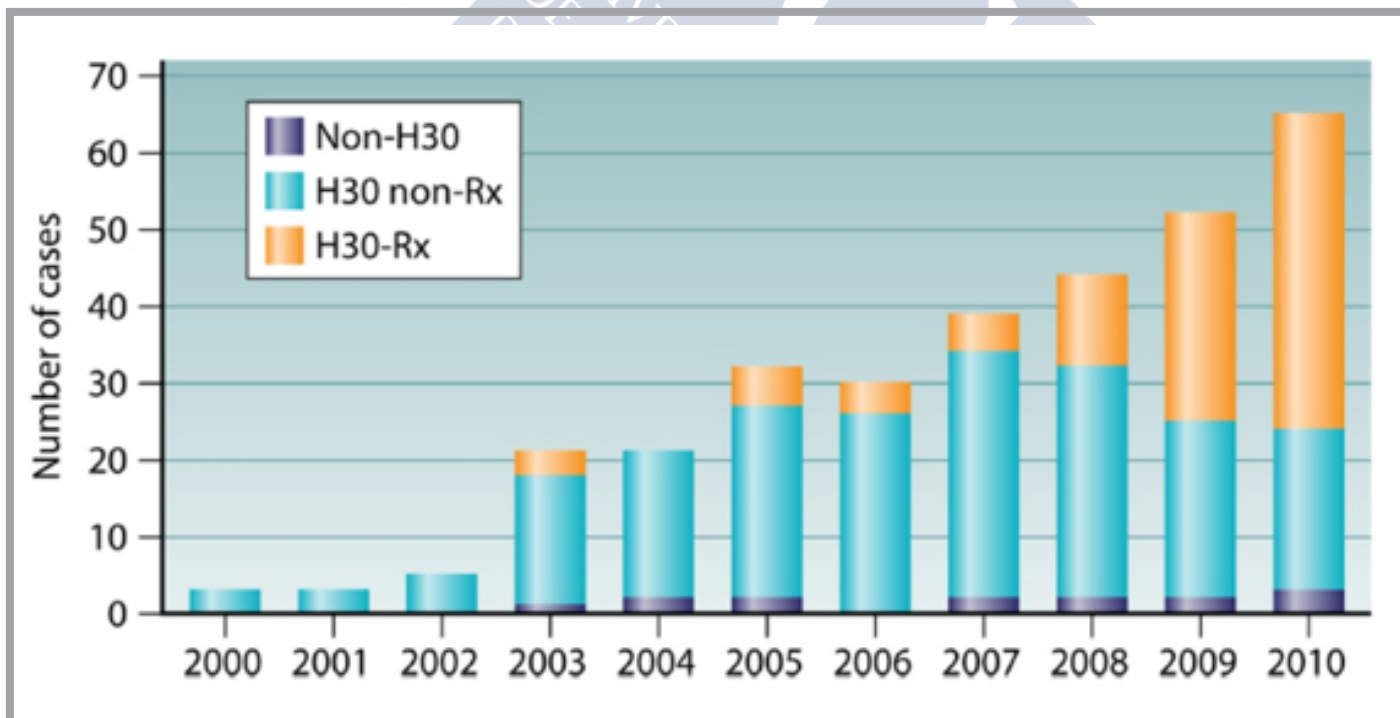
**Figura 35**

El análisis del genoma y SNPs de 105 cepas ST131 muestra la relación entre las cepas *fimH30*, *fimH30-R* y *fimH30-Rx* (Price *et al.* 2013).



**Figura 36**

Posibles factores que han contribuido a la evolución de cepas *E. coli* ST131 del subclón *fimH30* sensibles a las fluoroquinolonas al subclón *fimH30-Rx* resistentes a fluoroquinolonas, con más contenido de factores de virulencia y adquiriendo la enzima CTX-M-15 (Mathers *et al.* 2015)



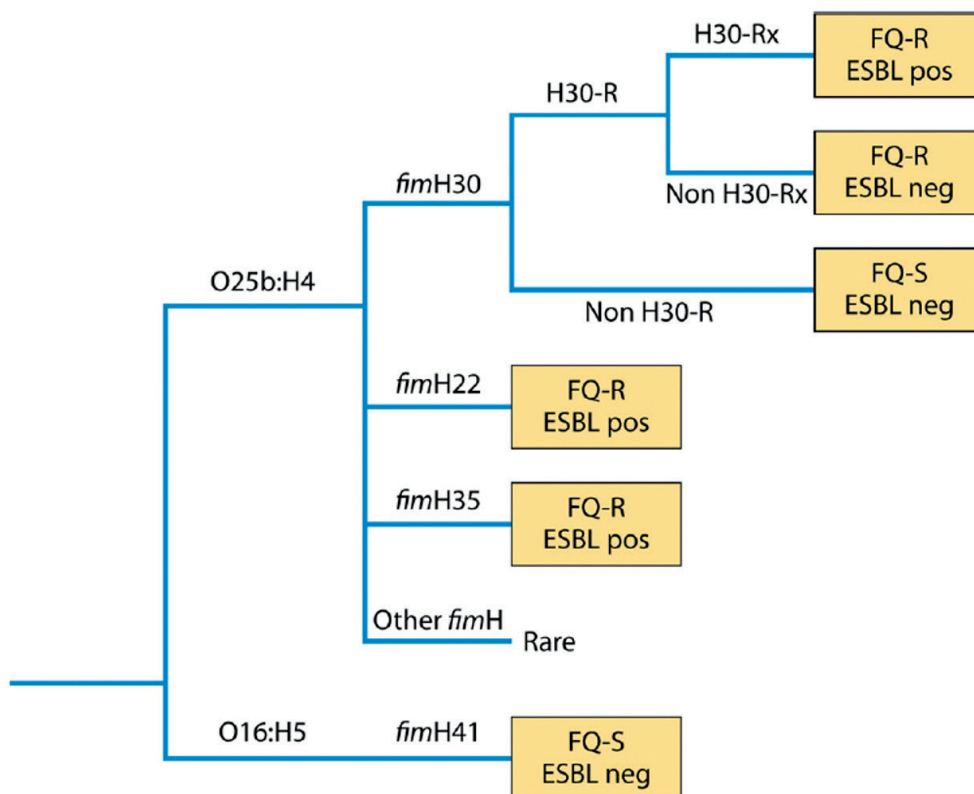
**Figura 37**

Número de cepas de *E. coli* ST131 y de los suclones *H30-R* y *H30-Rx* entre aislados de hemocultivos en la región de Calgary (Canadá) del año 2000 a 2010 (Mathers *et al.* 2015)

Existen pocos estudios realizados hasta el momento que caracterizan y comparan las cepas O16:H5 ST131 con las cepas O25b:H4 ST131, de estos estudios se concluye que las cepas O16:H5 forman perfiles de PFGE bien definidos y separados de las cepas O25b:H4, suelen ser productoras de CTX-M-14 y siempre presentan el alelo *fimH41*. Aunque, las cepas O16:H5 y las O25b:H4 presentan la misma ST del esquema de Achtman, sin embargo, pertenecen a STs diferentes si aplicamos el esquema del Instituto Pasteur (Johnson *et al.* 2014; Peirano *et al.* 2014; Banerjee y Johnson, 2014; Matsumura *et al.* 2014; Rogers *et al.* 2015). El subclon *fimH41* está relacionado con resistencias a trimetoprim sulfametoxazol y gentamicina y generalmente son sensibles a fluoroquinolonas y también pueden ser no productoras de BLEE.

Se han desarrollado PCRs para la detección rápida y fácil del alelo *fimH30* de las cepas ST131 O25b (Colpan *et al.* 2013) y del alelo *fimH41* combinada con la detección del *rffB* O16 de las cepas ST131 O16 (Johnson *et al.* 2014).

Existe un orden de aparición de los subclones en la estructura poblacional del clon ST131, que se deduce tras analizar los genomas completos de cepas ST131 pertenecientes a los diferentes subclones. Las primeras cepas ST131 H30 eran susceptibles a las quinolonas fluoradas, después emergieron las cepas H30-R resistentes a las quinolonas fluoradas y por último las H30-Rx resistentes a las quinolonas fluoradas y productoras de CTX-M-15. Las cepas H41 se separan de los subclones H30, H22, H35 y otros en una fase anterior y forman una rama independiente con el alelo *fimH41* (Figura 38) (Mathers *et al.* 2015).



**Figura 38**  
Estructura poblacional de *E. coli* ST131: subclón *fimH30* y otros subclones.  
FQ-R, resistentes a fluoroquinolonas, FQ-S, sensibles a fluoroquinolonas (Mathers *et al.* 2015)



## Carbapenemasas

El desarrollo de resistencias frente a carbapenemas es preocupante (Pitout, 2012). Las enzimas tipo NDM y OXA-48 son las carbapenemasas más prevalentes entre cepas de *E. coli* productoras de BLEE tanto en infecciones nosocomiales como comunitarias, mientras, las del tipo VIM, IPM y KPC  $\beta$ -lactamasas son poco comunes entre las cepas BLEE (Nordmann y Poirel, 2014). Las infecciones suelen aparecer en personas que han realizado recientemente un viaje algunas regiones donde las carbapenemasas son endémicas como África del norte y Turquía donde la enzima OXA-48 es muy prevalente. La aparición de estas resistencias en cepas del clon ST131 es muy preocupante debido a la gran expansión y prevalencia a nivel mundial, especialmente de cepas pertenecientes al subclón exitoso *fimH30* (Mathers *et al.* 2015). Las primeras cepas ST131 productoras de enzimas carbapenemasas aparecieron en Chicago y París en el año 2010 (Bonnin *et al.* 2012; Peirano *et al.* 2011). Ambos pacientes habían visitado recientemente la India.

Peirano y colaboradores (2014b) recientemente han publicado un interesante estudio en el que caracterizaron 116 cepas productoras de carbapenemasas aisladas en 16 países durante el período 2008-2013. Cuarenta y una (35%) de las 116 cepas pertenecían al grupo clonal ST131. Las cepas ST131 productoras de carbapenemasas procedían de 16 países de 5 continentes: Filipinas, India, China, Tailandia, Vietnam, Argentina, Colombia, Ecuador, Panamá, Puerto Rico, USA, Jordania, Marruecos, Emiratos Arabes Unidos, Turquía e Italia. La mayoría de las cepas ST131 eran *bla*<sub>KPC</sub> (58%), *bla*<sub>OXA-48-like</sub> (32%), *bla*<sub>NDM-1</sub> (7%), y *bla*<sub>IMP-14</sub> (2%). La secuenciación de los alelos *fimH* de las cepas permitió establecer los siguientes subclones entre las cepas ST131 productoras de carbapenemasas: *H30* (58%), *H41* (7%), *H54* (7%), *H22* (5%), *H27* (5%), *H191* (5%), *H24* (2%), *H32* (2%), *H65* (2%), *H434* (2%) y *H435* (2%). De las 24 cepas del subclón *H30*, 5 pertenecían al subclón *H30-Rx* y 19 al subclón *H30-R*. En otro interesante estudio, O'Hara y colaboradores (2014) caracterizaron 20 cepas productoras de KPC aisladas en USA entre los años 2008 y 2012, comprobando que 12 (60%) eran ST131. Las 12 cepas pertenecían al subclón *H30*.

En España, Tórtola y colaboradores (2005) detectaron una cepa de *E. coli* VIM-1 en el año 2003 en el Hospital Vall d'Hebron de Barcelona. Miró y colaboradores (2013) examinaron en el año 2009 cepas procedentes de 35 hospitales españoles y únicamente detectaron una cepa de *E. coli* que también era positiva para VIM-1. Oteo y colaboradores (2013) identificaron 4 cepas (1 OXA-48 y 3 VIM) aisladas en el año 2012 en hospitales españoles. Las 3 cepas productoras de VIM-1 pertenecían a las secuencias tipo ST10, ST226 y ST1152, mientras que la cepa productora de OXA-48 era ST131. También en el año 2012 eran detectadas en el Hospital Universitario Central de Asturias 3 cepas de las secuencias tipo ST58, ST83 y ST131 que llevaban el gen *bla*OXA-48 (Fernández *et al.* 2014). En un estudio reciente, Oteo y colaboradores (2015) en España, en un estudio multicéntrico prospectivo realizado en 83 hospitales, han encontrado 27 cepas *E. coli* productoras de carbapenemasas. Estas cepas se han repartido en 16 STs diferentes siendo ST131 (7 cepas) y ST156 (3 cepas) las más prevalentes.



## 2. Hipótesis y objetivos

La prevalencia y la epidemiología de ECBLEE están cambiando rápidamente. En los últimos años, la producción de enzimas BLEE en *E. coli* se ha incrementado significativamente debido especialmente a la expansión de las cepas CTX-M (Canton y Coque 2006; Lahlaoui *et al.* 2014). La pandemia actual es debida en gran medida a clones exitosos de alto riesgo, entre los que destaca el grupo clonal ST131 asociado a la producción de CTX-M-15 (Coque *et al.* 2008; Nicolas-Chanoine *et al.* 2008).

Se han identificado variantes/linajes/subclones del grupo clonal ST131 en base al contenido de genes de virulencia (virotipos A, B, C, D), perfiles de PFGE (pulsotipos como el 800, 812 y 968), patrones de resistencia a antibióticos, diversidad de alelos *fimH* (subclones como H22, H30 y H41), secuenciación del genoma completo y análisis de SNPs (identificación del subclón H30-Rx) y diferentes secuencias tipo del esquema de MLST del Instituto Pasteur (como PST43, PST9 y PST506). Aunque, la mayoría de las cepas ST131 pertenecen al serotipo O25b:H4, recientemente se han identificado cepas de los serogrupos O16, O142 y O157, y cepas O no tipables (ONT) (Blanco *et al.* 2013; Johnson *et al.* 2012a; Johnson *et al.* 2013; Johnson *et al.* 2014; Matsumura *et al.* 2012a, Pirano *et al.* 2014).

En un estudio previo (Blanco *et al.* 2009) realizado con cepas de *E. coli* productoras de enzimas BLEE aisladas de pacientes con infecciones extraintestinales del Complejo Hospitalario Xeral-Calde de Lugo observamos que las enzimas más frecuentemente producidas eran CTX-M-14 y CTX-M-15, y que casi todas las cepas CTX-M-15 pertenecían al grupo clonal emergente ST131. En dicho estudio se observó que las cepas productoras de CTX-M-14 pertenecían a un amplísimo abanico de serotipos diferentes y que presentaban perfiles de PFGE muy diversos. En contraste, todas las cepas ST131 eran del serotipo O25b:H4, presentaban un patrón de genes de virulencia casi idéntico perteneciendo al virotipo A, y se englobaban en un *cluster* de PFGE con >85% de identidad. En este estudio desarrollamos una PCR múltiple para detectar las cepas del grupo clonal ST131 del serotipo O25b:H4 que empleamos para identificar las cepas de dicho clón entre cepas ECBLEE aisladas en otros 44 hospitales españoles (Blanco *et al.* 2013). Estos estudios pusieron

de manifiesto que las cepas del grupo clonal ST131-O25b:H4 estaban ampliamente expandidas en todos los hospitales y permitieron identificar diferentes virotipos (A, B, C y D). No obstante, la PCR múltiple que empleamos no permitía detectar todas las cepas del grupo clonal ST131 ya que estaba dirigida específicamente para identificar las que presentaban el antígeno O25b.

El éxito de las cepas del grupo clonal ST131 se podría explicar por la adquisición de genes de virulencia y de resistencia a antibióticos (fenómeno muy raramente observado dentro del grupo filogénico B2), por la enorme diversidad genética que presentan, y por su capacidad de colonización a nivel intestinal, lo que implicaría la existencia de numerosos portadores asintomáticos (Banerjee y Johson, 2014; Mathers *et al.* 2015 y 2015a; Nicolas-Chanoine *et al.* 2014). Sin embargo, se desconoce si todas las variantes/linajes/subclones de este grupo clonal emergente poseen el mismo grado de virulencia y de capacidad de diseminación.

Por todo lo comentado anteriormente, se realizaron los tres estudios que comprenden la presente Tesis Doctoral, y cuyos objetivos son los siguientes:

- Evaluar la prevalencia real del grupo clonal ST131 identificando todas sus variantes conocidas.
- Caracterizar y comparar las diferentes variantes/linajes/subclones del grupo clonal ST131, determinando sus serotipos O:H, genes de virulencia, perfiles de PFGE, secuencias tipo del esquema del Instituto Pasteur, alelos *fimH* y sus resistencias.
- Estudiar la virulencia *in vivo* de las cepas ST131 pertenecientes a los diferentes variantes/linajes/subclones empleando un modelo de sepsis murino.

## 3. Materiales y métodos

### 3.1 Cepas control y conservación de las cepas

En todos los ensayos fenotípicos y genotípicos se emplearon cepas control positivas y negativas de la colección del LREC-USC.

Todas las cepas ExPEC incluidas en los tres estudios y las cepas control se conservaron en agar nutritivo con 0,75% (p/v) de agar a temperatura ambiente. En este medio, las cepas mantienen su viabilidad sin necesidad de resiembra al menos durante 5 años. Para preparar este medio de conservación se mezclan agar nutritivo 11,5 g/l y caldo nutritivo 4 g/l.

### 3.2 Obtención de las cepas clínicas de *E. coli*

#### Estudio I

---

**Emergencia de nuevas variantes del grupo clonal ST131 entre cepas de *E. coli* productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (ECBLEE) causantes de infecciones extraintestinales.**

Se llevó a cabo un estudio prospectivo entre Enero y Abril del año 2012 en el Hospital Universitario Lucus Augusti (HULA). Se caracterizaron 77 cepas de ECBLEE aisladas de otros tantos pacientes. La mayoría procedían de ITUs (69 cepas) y únicamente cuatro de sepsis y otras cuatro de otro tipo de infecciones.

#### Estudio II

---

**Epidemiología molecular del subclón H41 de *E. coli* O16:H5-ST131: comparación con los subclones H30 y H30-Rx de O25b:H4-ST131.**

Los 2.995 aislados de *E. coli* analizados en este estudio procedían de cinco hospitales de diferentes regiones (Lugo, Barcelona, Santander, Madrid y Sevilla) y fueron obtenidas entre los años 2005 y 2012. Únicamente fue incluido en el estudio un aislado por paciente con infección urinaria, sepsis u otra infección extraintestinal. En algunos muestreos se incluyeron únicamente aislados de ECBLEE y en otros todos los aislados de *E. coli* independientemente de que fuesen resistentes o sensibles a los antibióticos. Entre los aislados analizados también se incluyeron los 77 del estudio anterior.

### Estudio III

---

#### Virulencia en un modelo de sepsis murino de cepas de *E. coli* ST131 O16:H5 y O25b:H4 pertenecientes a diferentes virotipos y subclones.

Se seleccionaron un total de 36 cepas de *E. coli* del grupo clonal ST131 aisladas de pacientes con infecciones extraintestinales en diferentes hospitales españoles entre los años 2005 y 2012. La selección se realizó entre más de 700 cepas ST131 siguiendo como criterio que estuviesen representados los virotipos A, B, C1, C2, C3, D1, D2, D3, D4, D5, E, F y G, los subclones H22, H30 y H41, y los serotipos O25b:H4 y O16:H5.

## 3.3 Estudio genotípico de las cepas ExPEC

### 3.3.1 PCR

La detección de los genes de virulencia se realizó mediante PCR convencional, para cada prueba de PCR, se utilizaron cebadores y controles positivos y negativos específicos para los genes a estudiar.

### Extracción del ADN

---

Todas las PCRs se realizaron a partir de cultivos puros.

- Sembrar la cepa problema en medio TSA (agar de triptona de soja (Oxoid)) e incubar a 37 °C/18 h.
- Recoger el crecimiento equivalente a una o dos colonias y suspender en 300 µl de agua bi-distilada estéril contenidos en un tubo eppendorf.

- Calentar la suspensión 100 °C/5 minutos.
- Centrifugar la suspensión calentada (11.000 rpm/2 min).
- Del sobrenadante se toman 7 µl para la prueba.

### Preparación de la mezcla de reacción

---

La mezcla de reacción se prepara para un volumen final de 30 µl por cada muestra y contiene:

- El ADN extraído de la muestra problema (7 µl).
- Cebadores (0,2-0,5 µM).
- Master mix coloreado (5X My Taq™ Red Reaction Buffer, Bioline) (6 µl) que contiene: los cuatro nucleótidos (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), Tris HCl 10 mM (pH 8,8), ClK 50 mM y Cl<sub>2</sub>Mg 1,5 mM.
- Una unidad de polimerasa (My Taq™ DNA polymerase, Bioline) (0,2 µl).
- Agua bidestilada estéril hasta completar los 30 µl del volumen final.

### Amplificación

---

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (modelo 2720 Thermal Cycler Applied Biosystems). Las mezclas de reacción fueron sometidas a:

- Un ciclo de desnaturalización inicial (94 °C/3 min).
- Seguido de 35 ciclos de 94°C/1 min (desnaturalización), T°C de hibridación del cebador/40 seg y 72°C/2 min (polimerización).
- Un ciclo de polimerización final 72 °C/2 min.

### Revelado de los resultados de la PCR

---

Los productos amplificados en las pruebas de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Seakem® LE agarose, Lonza) al 2% en tampón TBE (89 mM Tris, 89 mM ácido bórico, 2,5 mM EDTA), cargando en cada pocillo 12 µl de muestra. En todas las PCRs se incluyeron cepas control positivas y negativas. La electroforesis se realizó con fuentes y cubetas de electroforesis de Bio-Rad. El voltaje aplicado a los geles fue de 130 V durante 20 a 40 min dependiendo del tamaño del gel. Los geles de agarosa se tiñeron en un baña con bromuro de etidio (10 µl/ml) (Merck) y se observaron bajo luz ultravioleta (transiluminador modelo 2010 Mecrovue, LKB).

### Cebadores

---

Los cebadores usados en las pruebas de PCR, sus secuencias nucleotídica y el tamaño del producto amplificado de pares de bases se indican en las **Tablas 12 y 13**.

La identificación de los grupos filogenéticos A, B1, B2 y D de *E. coli* se realizó por PCR siguiendo el método descrito por Clermont y colaboradores (2000) **Tabla 14 y Tabla 15**.



**Tabla 12** (parte 1)

Cebadores utilizados en la detección de los genes de virulencia de los ExPEC.

Nombre del gen	Primers	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Tamaño (pb)	T <sup>a</sup> de hibridación °C	Referencias
<i>fimH</i>	<i>fimH</i> f	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG	508	66	Johnson y Stell, 2000
	<i>fimH</i> r	GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA			
<i>fimAvMT78</i>	<i>fimA</i> 201	TCTGGCTGATACTACACC	266	52	Marc y Dho -Moulin, 1996
	<i>fimA</i> 215	ACTTTAGGATGAGTACTG			
<i>F10 papA</i>	Ff	GGCAGTGGTGTCTTTTGGTG	312	56	Johnson <i>et al.</i> 2000
	F10r	CTCCTCATTATGACCGAAACCCT			
<i>papEF</i>	<i>PapEF</i> f	GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT	336	64	Yamamoto <i>et al.</i> 1995
	<i>PapEF</i> r	AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA			
<i>papG I</i>	<i>Pap-I</i> f	TTAGCTGGATGGCACAATG	335	54	Mora <i>et al.</i> 2013
	<i>Pap-I</i> r	TTGTCCATGTATCCCATTAT			
<i>papG II</i>	<i>Pap-II</i> f	GGCATTGCTACGGTAACCTG	545	54	Mora <i>et al.</i> 2013
	<i>Pap-II</i> r	CGCTATTAATAGACAGATCACC			
<i>papG III</i>	<i>Pap-III</i> f	CGGCAACTTTAAGCTATGTG	720	56	Mora <i>et al.</i> 2013
	<i>Pap-III</i> r	TGTACCATCTCATCGTTGTCTC			
<i>papG IV</i>	<i>Pap-IV-f</i>	TCCGAGAAGTACCCAAACCAC	493	58	LREC (sin publicar)
	<i>Pap-IV-r</i>	GTCACAATAAATGGTAACAGCT			
<i>sfa/focDE</i>	<i>sfa</i> 1	CTCCGGGAGAACTGGGTGCATCTTAC	410	64	Le Bouguenec <i>et al.</i> 1992
	<i>sfa</i> 2	CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA			
<i>afa/draBC</i>	<i>afa</i> 1	GCTGGGCAGCAAACCTGATAACTCTC	750	58	Le Bouguenec <i>et al.</i> 1992
	<i>afa</i> 2	CATCAAGCTGTTTGTTCGTCCGCCG			
<i>afa FM955459</i>	<i>Afa-O25F</i>	GAGTCACGGCAGTCGCGGCGG	207	55	Blanco <i>et al.</i> 2009
	<i>Afa-O25R</i>	TTCACCGGCGACCAGCCATCTCC			
<i>bmaE</i>	<i>bmaE-f</i>	ATGGCGCTAACTTGCCATGCTG	507	56	Johnson y Stell, 2000
	<i>bmaE-r</i>	AGGGGGACATATAGCCCCCTTC			
<i>gafD</i>	<i>gafD-f</i>	TGTTGGACCGTCTCAGGGCTC	952	56	Johnson y Stell, 2000
	<i>gafD-r</i>	CTCCCGGAACTCGCTGTTACT			
<i>cnfI</i>	<i>cnf1-f2</i>	CAGGAGGTACTTAGCAGCGT	468	50	Mora <i>et al.</i> 2013
	<i>cnf1-rc</i>	TAATTTTGGGTTTGTATC			
<i>cdtB</i>	<i>cdt-s1</i>	GAAAGTAAATGGAATATAAATGTCCG	466	58	Tóth <i>et al.</i> 2003
	<i>cdt-as1</i>	AAATCACCAAGAATCATCCAGTTA			
	<i>cdt-s2</i>	GAAAATAAATGGAACACACATGTCCG			
	<i>cdt-as2</i>	AAATCTCCTGCAATCATCCAGTTA			
<i>sat</i>	<i>SatF</i>	GCAGCTACCGCAATAGGAGGT	937	58	Johnson <i>et al.</i> 2003a
	<i>SatF</i>	CATTCAGAGTACCGGGGCCTA			

**Tabla 12** (parte 2)

Cebadores utilizados en la detección de los genes de virulencia de los ExPEC.

Nombre del gen	Primers	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Tamaño (pb)	T <sup>a</sup> de hibridación °C	Referencias
<i>hlyA</i>	<i>hly f</i>	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	1177	58	Yamamoto <i>et al.</i> 1995
	<i>hly r</i>	ACCATATAAGCGGTCATTCCCCTCA			
<i>iucD</i>	<i>Aer f</i>	TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT	602	60	Yamamoto <i>et al.</i> 1995
	<i>Aer r</i>	AATATCTTCCTCCAGTCCGGAGAAG			
<i>iutA</i>	<i>aer-851f</i>	GGCTGGACATCATGGGAACTGG	301	58-62	Johnson <i>et al.</i> 1997
	<i>aer-1152r</i>	CGTCGGGAACGGGTAGAATCG			
<i>iroN</i>	<i>Ironec-f</i>	AAGTCAAAGCAGGGTTGCCCG	665	54	Johnson <i>et al.</i> 2000a
	<i>Ironec-r</i>	GACGCCGACATTAAGACGCAG			
<i>chuA</i>	<i>ChuA.1</i>	GCAGAACCAACGGTCAGGAT	279	62	Clermont <i>et al.</i> 2000
	<i>ChuA.2</i>	TGCCGCCAGTACCAAAGACA			
<i>kpsM II</i>	<i>KpsII f</i>	GCGCATTGCTGATACTGTTG	272	56	Johnson y Stell 2000
	<i>KpsII r</i>	CATCCAGACGATAAGCATGAGCA			
<i>kpsM II-K2</i>	<i>KpsII f</i>	GCGCATTGCTGATACTGTTG	570	56	Johnson y O'bryan, 2004
	<i>KpsII-K2r</i>	AGGTAGTTCAGACTCACACCT			
<i>kpsM II-K5</i>	<i>K5-f</i>	CAGTATCAGCAATCGTTCTGTA	159	56	Johnson y Stell 2000
	<i>KpsII r</i>	CATCCAGACGATAAGCATGAGCA			
<i>neuC</i>	<i>neu1</i>	AGGTGAAAAGCCTGGTAGTGTG	676	52	Moulin-Schouleur <i>et al.</i> 2006
	<i>neu2</i>	GGTGGTACATCCCGGGATGTC			
<i>kpsM III</i>	<i>KpsIII f</i>	TCCTTTGCTACTATTCCCCCT	392	56	Johnson y Stell 2000
	<i>KpsIII r</i>	AGGCGTATCCATCCCTCCTAAC			
<i>cvaC</i>	<i>ColV-Cf</i>	CACACACAAACGGGAGCTGTT	680	55	Johnson y Stell 2000
	<i>ColV-Cr</i>	CACACACAAACGGGAGCTGTT			
<i>iss</i>	<i>is-f</i>	CAGCAACCCGAACCACTTGATG	323	66	Rodríguez-Siek <i>et al.</i> 2005
	<i>is-r</i>	AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA			
<i>traT</i>	<i>TraT f</i>	GGTGTGGTGCGATGAGCACAG	290	66	Johnson y Stell 2000
	<i>TraT r</i>	CACGGTTCAGCCATCCCTGAG			
<i>ibeA</i>	<i>ibe10 f</i>	AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC	170	52	Johnson y Stell 2000
	<i>ibe10 r</i>	TGGTGCTCCGGCAAACCATGC			
<i>malX (PAI)</i>	<i>MALX-F</i>	GCATGAGCAGTGCGATACATCGC	828	56	Mora <i>et al.</i> 2013
	<i>MALX-R</i>	AGGGCTGGGAAGTGGTTTAGCC			
<i>usp</i>	<i>usp-f</i>	ACATTCACGGCAAGCCTCAG	440	66	Bauer <i>et al.</i> 2002
	<i>usp-r</i>	AGCGAGTTCCTGGTGAAAGC			
<i>tsh</i>	<i>tsh03</i>	GGTGGTGCCTGGAGTGG	640	64	Dozois <i>et al.</i> 2000
	<i>tsh15</i>	AGTCCAGCGTGATAGTGG			

**Tabla 13**

Cebadores utilizados para la detección de enzimas BLEE.

Nombre del gen	Primers	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Tamaño (pb)	T <sup>a</sup> de hibridación °C	Referencias
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	CTX-C3	ATGTGCAGCACCCAGTAAAGTGATG	542	58	Mora <i>et al.</i> 2013
	CTX-C4	ACCGCGATATCGTTGGTGGTGCC			
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> grupo 1	M13U	GGTTAAAAAATCACTGCGTC	863	52	Saladin <i>et al.</i> 2002
	M13L	TTGGTGACGATTTTAGCCGC			
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> grupo 9	CTX-M9-F	GTGACAAAGAGAGTGCAACGG	856	56	Simarro <i>et al.</i> , 2000
	CTX-M9-R	ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC			
<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> extremo 3'	CTX-M-F1	ATAAAACCGGCAGCGGTG	483	55	Leflon-Guibout <i>et al.</i> , 2004
	CTX-M-F2	GAATTTTGACGATCGGGG			
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	SHV-F2	TTGTCGCTTCTTTACTCGCC	879	58	Mora <i>et al.</i> 2013
	SHV-R2	CCCGGCGATTGCTGATTCGC			
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	TEM-1-F	ATGAGTATTCAACATTTCCG	8668	50	Rasheed <i>et al.</i> , 1997
	TEM-1-R	CTGACAGTTACCAATGCTTA			

**Tabla 14**

Cebadores para la identificación de los grupos filogenéticos.

Nombre del gen	Primers	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Tamaño (pb)	T <sup>a</sup> de hibridación °C	Referencias
<i>chuA</i>	<i>ChuA.1</i>	GCAGAACCAACGGTCAGGAT	279	62	Clemont <i>et al.</i> 2000
	<i>ChuA.2</i>	TGCCGCCAGTACCAAAGACA			
<i>yjaA</i>	<i>YjaA.1</i>	TGCAGTGTGAGGAGACGCTG	211	54	
	<i>YjaA.2</i>	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC			
TspE4.C2	TspE.C2.1	GAGTAATGTGGGGCATTCA	152	54	
	TspE.C2.2	CGCGCCAACAAAGTATTACG			

**Tabla 15**

Determinación de los grupos filogenéticos.

Grupo	Genes		
	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TSPE4.C2
A	-	+/-	-
B1	-	+/-	+
B2	+	+	+/-
D	+	-	+/-

**Tabla 16**

Cebadores utilizados para la secuenciación de los tipos de BLEE.

Nombre del gen	Primers	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Tamaño (pb)	T <sup>a</sup> de hibridación °C	Referencias
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> grupo 1	CTX-15-F1	GAAAGCTAATAAAAAACACACGTGG	1044-1123	52	Mora <i>et al.</i> 2013
	CTX-15-R	GTATGCGCAAGCGCAGGTGG			
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> grupo 9	CTX-M9-F	GTGACAAAGAGAGTGCAACGG	856	56	Simarro <i>et al.</i> 2000
	CTX-M9-R	ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC			
	CTX-M9 -14-14B 24F	GAATACTGATGTAACACGGA	998	44	LREC (sin publicar)
	CTX-M9-R	AGCTGAAGATGTATATCAAG			
	CTX-M9 -14-14B 24F	GAATACTGATGTAACACGGA	989	52	
	CTX-M14-24-R	CTGCGTTGTCGGGAAGATACG			
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> grupo 9	CTX-M9-14B-F	CCTATACCCGAGGCGCGACAG	1059	1059	LREC (sin publicar)
	CTX-M9-R	AGCTGAAGATGTATATCAAG			
	CTX-M14-24-F	CTAAATTCTTCGTGAAATAGTG	1049	1049	
	CTX-M14-24-R	CTGCGTTGTCGGGAAGATACG			
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	SHV-1	GGGTATTCTTATTGTGCGC	930	930	Rasheed <i>et al.</i> 1997
	SHV-2	TTAGCGTTGCCAGTGCTC			
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	TEM-1-F	ATGAGTATCAACATTTCCG	868	868	
	TEM-1-R	CTGACAGTTACCAATGCTTA			

### 3.3.2 Secuenciación

La secuenciación se utilizó para determinar el tipo de enzima de las cepas productoras de BLEE (**Tabla 16**), para determinar la secuencia tipo y el clonotipo de las cepas. Se realizó en el Departamento de Genética (Plataforma de Secuenciación y Genómica Funcional) de la Facultad de Veterinaria (USC) mediante el método Sanger, empleando el analizador genético ABI 3100 (Applied Bio-Systems) con el kit BigDye Terminador v3.1 cycle sequencing.

## 3.4 Caracterización fenotípica

### 3.4.1 Determinación de resistencias a antimicrobianos: detección fenotípica de BLEEs.

El estudio de la susceptibilidad de las cepas a los antimicrobianos se realizó en el laboratorio de Microbiología del Hospital donde se aislaron. Concretamente, en la Unidad de Microbiología del Hospital Universitario Lucus Augusti, se utilizó el sistema MicroScan WalkAway® Plus (Siemens) que determina la concentración mínima inhibitoria (CMIs). En los otros hospitales se empleó este mismo sistema u otros similares. Se analizó la sensibilidad para sulfa-trimetoprim, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, gentamicina, tobramicina, amikacina, fosfomicina, nitrofurantoina, amoxicilina/ácido clavulánico, piperacilina/tazobactam, cefepima, ceftazidima, aztreonam y cefotaxima.

Las cepas se clasificaron como sensibles (S), intermedias (I) o resistentes (R) a los diferentes antimicrobianos siguiendo las normas del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013). Las cepas con valores intermedios (I) no se englobaron dentro de las resistentes.

La producción de BLEEs se detectaba si se observaba sinergia entre amoxicilina/ácido clavulánico y al menos uno de los siguientes antimicrobianos: cefotaxima, ceftazidima, aztreonam o cefepima (Jarlier *et al.* 1988).



## 3.4.2 Serotipado

### *Determinación del antígeno O*

El método empleado para la determinación del antígeno O de las cepas está basado en el originalmente descrito por Guinée y colaboradores (1981) y modificado por Blanco y colaboradores (1996).

### **Preparación de los antisueros O de *E. coli***

---

Para la determinación del antígeno O se emplearon 174 antisueros O que reconocen las variedades de la O1 a la O185. Estos antisueros se obtienen en el LREC mediante inmunización de conejos con las cepas de referencia disponibles en nuestro laboratorio, después de la obtención de los antisueros se adsorben para eliminar las reacciones cruzadas. Los antisueros se emplean a dos diluciones de ensayo: 1/80 (la mayoría) o 1/40. Dicha dilución se determina al ensayar cada antisuero una vez se ha completado el proceso de adsorción, frente a su cepa O homóloga de referencia. Si el título es  $\geq 1/640$  con la cepa control, la dilución de ensayo es 1/80, mientras que si es  $< 1/640$ , la dilución de ensayo es 1/40. Todas las diluciones se preparan con solución salina estéril (CINa 0,85%).

Agrupamos los antisueros monovalentes se agrupan en seis o siete antisueros formando 24 antisueros polivalentes (de A a X). Las cepas problema se enfrentan en un primer momento con los antisueros polivalentes.

### **Preparación de las suspensiones bacterianas**

---

- Cultivar las cepas en agar triptona-soja (TSA) e incubar (37 °C/18 h).
- Suspender el crecimiento que hemos obtenido en TSA en 2 ml de solución salina (0,85% CINa, p/v) y ajustar la concentración bacteriana ( $1,8 \times 10^9$  bacterias/ml) por comparación con el tubo número 6 de la escala McFarland.
- Calentar las suspensiones a 100 °C/1 h en un baño de agua, para destruir el antígeno K (en el caso de que la cepa posea cápsula) y desenmascarar el antígeno O.
- Una vez enfriadas las suspensiones, añadir a cada tubo 2 ml de solución salina formalinizada (0,5%, v/v) con violeta de genciana (0,005%, p/v). Conservar las suspensiones bacterianas a 4 °C. Dichas suspensiones se mantienen estables durante muchos meses si los viales están bien cerrados.
- Algunas cepas de los serogrupos O8, O9, O20 y O101 se caracterizan por tener una variedad de antígeno K (A) que es termorresistente y, a diferencia del resto de las cepas de *E. coli*, necesita una exposición a 121 °C/2,5 h. Por ello, si las cepas problema dan un resultado negativo después de enfrentarlas con todos los antisueros O, se deberían preparar unas segundas suspensiones y autoclavarlas a 121 °C/2,5 h y enfrentarlas solamente con los antisueros O8, O9, O20 y O101.

## Determinación presuntiva del serogrupo O

---

En la determinación del antígeno O se emplean placas de microtitulación de 96 pocillos (fondo "V" preferiblemente). Este tipo de soporte permite una fácil lectura de los resultados y un importante ahorro de antisuero.

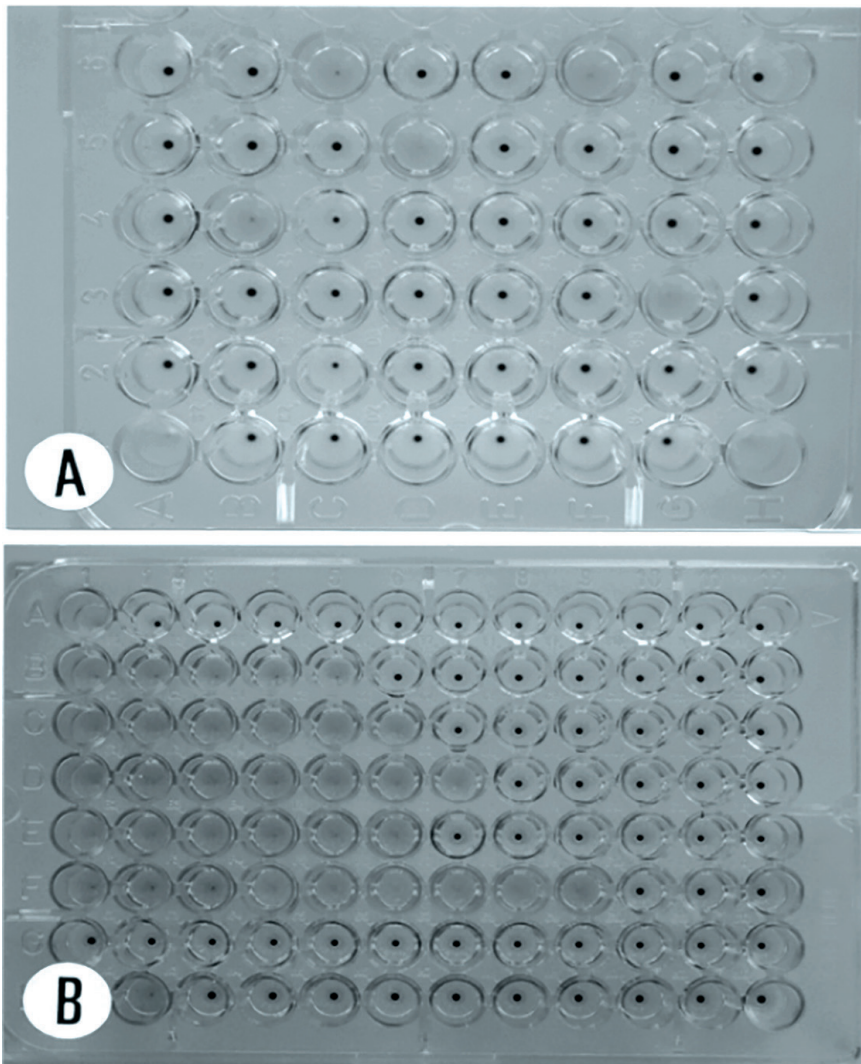
- Repartir los antisueros O polivalentes en los pocillos de la placa de microtitulación.
- Enfrentar las suspensiones bacterianas calentadas a 100 °C/1 h formalinizadas y teñidas con los antisueros O polivalentes. Y las calentadas a 121 °C/2,5 h con los antisueros O8, O9, O20 y O101. Para ello añadir a 50µl de cada antisuero 50µl de la suspensión bacteriana, tapar la placa (con otra placa) e incubar a 37°C durante 18 horas.
- La interpretación de los resultados se realiza estudiando las reacciones de aglutinación. Cuando la cepa problema resulta reconocida por alguno de los antisueros O incluidos en un antisuero polivalente (resultado positivo), se forma una película que impide la sedimentación de las bacterias. En los pocillos donde no existe reconocimiento (negativos), las bacterias sedimentan visualizándose en forma de botones azulados (**Figura 39-A**). Si la cepa bacteriana da aglutinación con uno de los antisueros polivalentes empleados, se realiza a continuación el mismo proceso con los antisueros O monovalentes incluidos en el polivalente correspondiente, si da negativo con todos los antisueros polivalentes se considera no tipable (ONT).

## Confirmación del serogrupo O

---

La determinación del antígeno O de una cepa de *E. coli*, se completa con el proceso de confirmación en el que se establece el título de la cepa. El título representa la máxima dilución del suero que aglutina la cepa problema (**Figura 39-B**).

- Colocar 50µl de solución salina en los pocillos 2 a 12 de una fila de una placa de microtitulación.
- Añadir a los pocillos nº1 y nº2, 50 µl de la dilución de ensayo del antisuero O correspondiente y hacer diluciones seriadas (1/2) transfiriendo 50 µl de la mezcla del pocillo nº2 al nº3, mezclando y repitiendo la operación hasta llegar al pocillo nº10. Utilizar los pocillos nº11 y nº12 como controles negativos, desechando los 50µl que sobran después de mezclar en el pocillo nº10.
- Añadir 50 µl de la suspensión bacteriana calentada, formalinizada y teñida a los 12 pocillos de cada fila, empezando por el nº12 y avanzando hasta el nº1. Tapar las placas e incubar 37°C/18h y realizar la lectura de los resultados determinando los títulos.
- Una vez añadida la suspensión bacteriana, si el antisuero usado tiene una dilución de ensayo de 1/80, el título en el primer pocillo será de 1/160, en el segundo de 1/320 y así sucesivamente hasta el pocillo nº 10.



**Figura 39**

A. Determinación del antígeno O (serogrupo)  
B. Establecimiento del título de la cepa.

### *Determinación del antígeno H*

El método empleado para la determinación del antígeno H está basado en el originalmente descrito por Guinée y colaboradores (1981).

### **Preparación de los antisueros H de *E. coli***

Para la determinación del antígeno H se emplearon 53 antisueros H que reconocen las variedades de la H1 a la H56. Estos antisueros se obtienen en el LREC mediante inmunización de conejos con las cepas de referencia disponibles en nuestro laboratorio. El título de todos los antisueros una vez completado el proceso de obtención, resultó ser igual o superior a 1/10240, y su dilución de ensayo se fijó en 1/200.

Todos los antisueros diluidos se preparan con solución salina estéril (CINa 0,85%). Agrupamos los antisueros monovalentes en seis o siete antisueros formando 9 antisueros polivalentes (de A a I). Las cepas problema se enfrentan en un primer momento con los antisueros polivalentes.

### Preparación de los antisueros H de *E. coli*

---

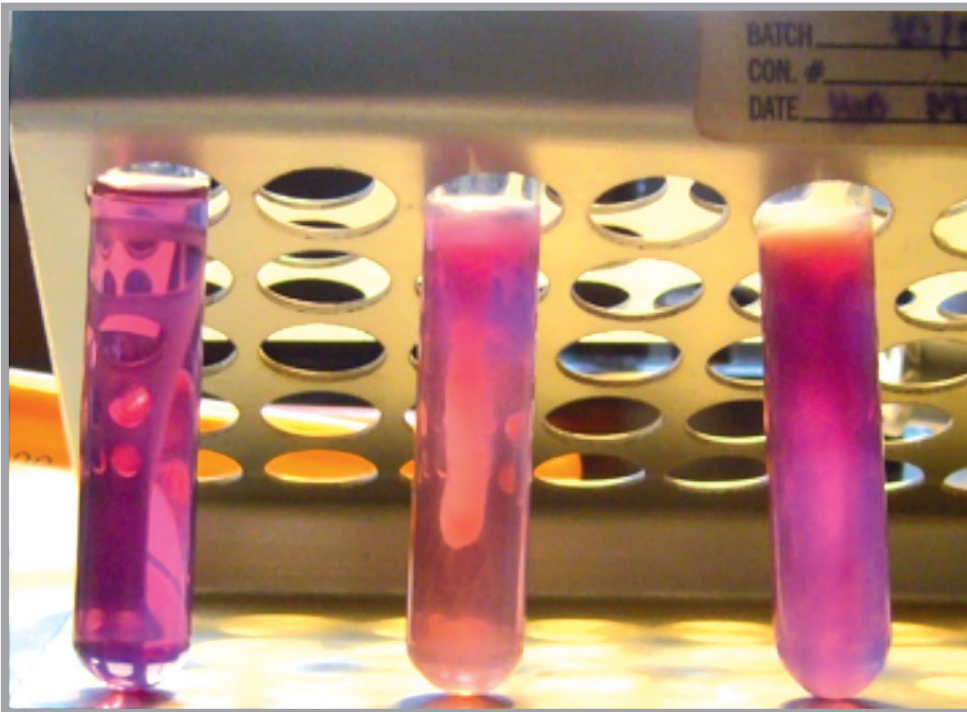
Para la determinación del antígeno H se emplearon 53 antisueros H que reconocen las variedades de la H1 a la H56. Estos antisueros se obtienen en el LREC mediante inmunización de conejos con las cepas de referencia disponibles en nuestro laboratorio. El título de todos los antisueros una vez completado el proceso de obtención, resultó ser igual o superior a 1/10240, y su dilución de ensayo se fijó en 1/200. Todos los antisueros diluidos se preparan con solución salina estéril (CINa 0,85%). Agrupamos los antisueros monovalentes en seis o siete antisueros formando 9 antisueros polivalentes (de A a I). Las cepas problema se enfrentan en un primer momento con los antisueros polivalentes.

### Preparación de las suspensiones bacterianas

---

- Cultivar las cepas problema en agar triptona-soja (TSA) e incubar (37 °C/18 h).
- Sembrar la cepa crecida en agar TSA, en un tubo con 5 ml de medio MIL (medio semisólido, movilidad, indol, lisina decarboxilasa) (Becton Dickinson-Difco) e incubar (37 °C/18 h). El objetivo de la siembra es el de potenciar el desarrollo de los flagelos (en caso de que la cepa objeto de estudio sea móvil). La siembra se realiza en picadura.
- Si la cepa es inmóvil (**Figura 40**), dar cinco pases más usando tubos de MIL con 5 ml ya que algunas cepas empiezan a mostrar movilidad en el cuarto incluso quinto pase. Si después de los seis pases la cepa sigue siendo inmóvil se considerará no móvil (HNM).
- Si la cepa es móvil, dar de 3 (si expresa muy bien la movilidad) a 6 pases consecutivos en tubos de MIL en forma de “U”. Para ello, la cepa se siembra en profundidad en el extremo izquierdo del tubo. Incubar a 37 °C/18 h y observar el crecimiento bacteriano en el tubo. Si la cepa se ha desplazado por el tubo y ha alcanzado su extremo derecho, la siembra del siguiente pase se hace recogiendo con un asa bacterias del borde superior de este extremo, transfiriéndose a continuación a otro tubo en “U”, y así consecutivamente hasta completar los 3 pases. Si la cepa es móvil, pero después de un período de incubación a 37 °C/18 h no ha alcanzado el extremo opuesto del tubo, debe permanecer en la estufa un día más y necesitará completar los 6 pases.
- Una vez completados los pases en los tubos en “U” con medio MIL se recoge con un asa bacterias a partir del extremo derecho del tubo correspondiente al 3 ° ó 6° pase y se trasfiere a un tubo con 7 ml de infusión Cerebro-Corazón (Difco) se incuba a 37 °C/6-8 h/80 rpm.
- Añadir al crecimiento obtenido, 7 ml de solución salina estéril (0,85%, p/v) formalinizada (0,5% v/v) y dejar los tubos a temperatura ambiente una noche. La turbidez de los tubos tratados con solución salina formalinizada debe ser comparable a la del tubo nº2 de la escala McFarland (6,0x10<sup>8</sup> bacterias/ml).





**Figura 40**

Observamos de izquierda a derecha: Tubo con medio MIL sin inocular. Tubo con una cepa móvil, solamente se observa crecimiento en la zona donde la cepa fue inoculada. Tubo con una cepa móvil, el desplazamiento provoca la turbidez total del medio de cultivo.

## Determinación del antígeno H

- Colocar en una gradilla 10 tubos tipo Kahn, y repartir 250  $\mu$ l de cada uno de los 9 antisueros H polivalentes diluidos a 1/200 en cada uno de los 9 primeros tubos. Colocar 250  $\mu$ l de solución salina (0,85%, p/v) en el décimo tubo y utilizarlo como control negativo. Añadir a los 10 tubos, 250  $\mu$ l de la suspensión bacteriana e incubar la mezcla en baño María a 45 °C/2 h.
- Realizar la lectura de los resultados. Reacción positiva: Cuando uno de los antisueros monovalentes que forman parte del antisuero polivalente reconoce el antígeno flagelar que porta la cepa problema, los anticuerpos reaccionan con el antígeno homólogo produciéndose la unión de las bacterias y la consiguiente reacción aglutinante. Después de 2 horas de incubación, las bacterias aglutinadas sedimentan, quedando el sobrenadante del tubo completamente libre de bacterias. Reacción negativa: En los tubos donde no existe reconocimiento del antígeno flagelar de la cepa problema por parte de los antisueros monovalentes, la falta de aglutinación supone que la suspensión continúe turbia, una turbidez que se corresponde con la del tubo 10 utilizado como control negativo (**Figura 41**). Si no hay aglutinación con ninguno de los antisueros H polivalentes, se considera que la cepa es no tipable (HNT).
- Si la cepa reacciona positivamente con algún antisuero H polivalente, se enfrenta con los antisueros monovalentes incluidos en el mismo. Para ello, se añaden en tubos tipo Kahn, 250  $\mu$ l de cada antisuero H monovalente y a continuación se añade a cada uno de ellos 250  $\mu$ l de la suspensión bacteriana problema. El tubo en el que se observe una reacción aglutinante nos indicará el antígeno H que posee la cepa de problema.





**Figura 41**

Observamos de izquierda a derecha: Tubo Khan con una reacción positiva y tubo Khan con una reacción negativa.

### 3.5 **D**etección de las cepas ST131 y determinación de las relaciones clonales

La detección de las cepas ST131 y de los subclones *H30* y *H30-Rx* se realizó por PCR convencional, mientras que la determinación de las relaciones clonales entre las cepas se realizó mediante la determinación de la ST, el clonotipado y la PFGE.

Blanco y colaboradores (2009) han desarrollado un PCR múltiple para la determinación de una forma rápida y sencilla de las cepas O25b:H4-ST131 productoras de CTX-M-15. Esta PCR se basa en la amplificación de tres genes: el gen *afaFM955459*, el gen *rfbO25b* y el extremo 3' del gen *bla<sub>C</sub>*.

*TX-M-15* (Tabla 17).

**Tabla 17**

Cebadores empleados para la detección por PCR de cepas O25b:H4-ST131 CTX-M-15.

Nombre del gen	Primers	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Tamaño (pb)	T <sup>a</sup> de hibridación °C	Referencias		
<i>afa</i> <i>FM955459</i>	Afa-O25F	GAGTCACGGCAGTCGCGGCGG	207	55	Blanco <i>et al.</i> 2009		
	Afa-O25R	TTCACCGGCGACCAGCCATCTCC					
<i>rfbO25b</i>	rfb.1bis	ATACCGACGACGCCGATCTG	300		55	Clermont <i>et al.</i> 2008	
	rfbO25b.r	TGCTATTCATTATGCGCAGC					
<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> <i>extremo 3'</i>	CTX-M-F1	ATAAAACCGGCAGCGGTG	483			55	Leflon-Guibout <i>et al.</i> 2004
	CTX-M-F2	GAATTTTGACGATCGGGG					

Johnson y colaboradores (2009) desarrollaron una PCR para la detección de todas las cepas del grupo glonal ST131, incluidas las O25b:H4, O16:H5 y de otros serotipos (**Tabla 18**).

**Tabla 18**

Cebadores utilizados para la identificación de las cepas ST131 por PCR.

Nombre del gen	Primers	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Tamaño (pb)	T <sup>a</sup> de hibridación °C	Referencias	
SNPs- gen <i>mdh</i>	<i>mdh</i>	GTTTAAACGTTAACGCCGGT	275	58	Johnson <i>et al.</i> , 2009	
	<i>mdh36-R</i>	GGTAACACCAGAGTGACCA				
SNPs- gen <i>gyrB</i>	<i>gyrB47-F</i>	CGCGATAAGCGCGAC	132	54		Johnson <i>et al.</i> , 2009
	<i>gyrB47-R</i>	ACCGTCTTTTTTCGGTGGAA				

### 3.5.1 Determinación de secuencias tipo (ST)

La técnica MLST se ha revelado como una herramienta de tipado filogenético poderosa, tanto para estudios de evolución como epidemiológicos globales. Existen dos esquemas de MLST: el esquema de Achtman y el esquema del Instituto Pasteur, en el primero, se utilizan las secuencias de fragmentos internos amplificadas por PCR de siete genes altamente conservados (*adhA*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* y *recA*), mientras que en el segundo esquema se utilizan las secuencias de fragmentos internos amplificadas por PCR de ocho genes (*dinB*, *icdA*, *pabB*, *polB*, *putP*, *trpA*, *trpB* y *uidA*). Estas secuencias definen el perfil alélico o ST para cada cepa.

Para la amplificación de los fragmentos y su secuenciación se usaron cebadores específicos para MLST en *E. coli* de la website <http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli> para el esquema de Achtman (**Tabla 19**) y de la website para el esquema del Instituto Pasteur (**Tabla 20**) ([www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/EColi.html](http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/EColi.html)).

Las secuencias se analizaron visualmente empleando el programa BioEdit Sequence Alignment editor (versión 7.0.9; Ibis Biosciences) y fueron alineados con el programa ClustalW2. El perfil alélico de las siete secuencias correspondientes a los genes, las STs y Complejos de Secuencia (definidos como STs relacionados con una distancia máxima de uno o dos alelos de diferencia) se obtuvieron a través de la base de datos electrónica de la página web <http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli> para el esquema de Achtman y de la página web [www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/EColi.html](http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/EColi.html) para el esquema del Instituto Pasteur.

**Tabla 19**

Cebadores empleados para amplificar los genes para MLST del esquema de Achtman.

Nombre del gen	Primers	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Tamaño (pb)	T <sup>a</sup> de hibridación °C	
<i>adk</i>	adk.F	ATTCTGCTTGCGCTCCGGG	583	56	
	adk.R	CCGTCAACTTTCGCGTATTT			
<i>fumC</i>	fumC-F	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC	806		
	fumC-R	GTACGCAGCGAAAAAGATTC			
<i>gyrB</i>	gyrB-F	TCGGCGACACGGATGACGGC	911		
	gyrB-R	ATCAGGCCTTCACGCGCATC			
<i>icd</i>	icd-F	ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA	878		
	icd-R	GGACGCAGCAGGATCTGTT			
<i>mdh</i>	mdh-F	ATGAAAGTCGCAGTCCTCGGCGCTGCTGGCGG	932		64
	mdh-R	TAACGAACTCCTGCCCCAGAGCGATATCTTTCTT			
<i>purA</i>	purA-F	CGCGCTGATGAAAGAGATGA	816	56	
	purA-R	CATACGGTAAGCCACGCAGA			
<i>recA</i>	recA-F1	ACCTTTGTAGCTGTACCACG	780		
	recA-R1	AGCGTGAAGGTAAAACCTGTG			

**Tabla 20**

Cebadores empleados para amplificar los genes para MLST del esquema del Instituto Pasteur.

Nombre del gen	Primers	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Tamaño (pb)	T <sup>a</sup> de hibridación °C
<i>dinB</i>	dinBoF	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTATGAGAGGTGAGCAATGCGTA	450	55
	dinBoR	TTGTGAGCGGATAACAATTTCCGTAGCCCCATCGCTTCCAG		
<i>icdA</i>	icd2oF	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAATTCGCTTCCCAGAACATTG	516	
	icd2oR	TTGTGAGCGGATAACAATTTTCATGATCGCGTCACCAAATC		
<i>pabB</i>	pabB2oF	GTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAATCCAATATGACCCGCGAG	468	
	pabBoR	TTGTGAGCGGATAACAATTTTCGTTTCCACTTCGTGATAAT		
<i>polB</i>	polB2oF	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAGGCGGCTATGTGATGGATTG	450	
	polBoR	TTGTGAGCGGATAAGAATTTTCGTTGGCATCAGAAAACGGC		
<i>putP</i>	putP2oF	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGACTGTTTAAACCCGTGGATTGC	456	
	putPoR	TTGTGAGCGGATAACAATTTTCGCATCGGCCTCGGCAAAGCG		
<i>trpA</i>	trpAoF	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAGCTACGAATCTCTGTTTGCC	561	
	trpAoR	TTGTGAGCGGATAACAATTTTCGCTTTCATCGGTTGTACAAA		
<i>trpB</i>	trpB2oF	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTACTATATGCTGGGCACCGC	594	
	trpBoR	TTGTGAGCGGATAACAATTTCCCTCGTGCTTTCAAAATATC		
<i>uidA</i>	uidAoF	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTACATTACGGCAAAGTGTGGGTCAAT	600	
	uidAoR	TTGTGAGCGGATAACAATTTCCCATCAGCACGTTATCGAATCCTT		

### 3.5.2 Clonotipado y detección de los subclones H30 y H30-Rx

Weissman y colaboradores (2012) describieron un esquema de tipificación muy útil para identificar subclones dentro de los grupos clonales de cepas ExPEC, basado en el tipado de la región *fimH* (*fimH<sub>TR</sub>*) secuenciando un fragmento interno de este gen (gen que codifica para la adhesina tipo 1) y también de un fragmento del gen *fumC* utilizado en el esquema de Achtman de MLST (**Tabla 21**). Por su parte Colpan y colaboradores (2013) diseñaron una PCR para detectar las cepas del subclón H30 y Banerjee y colaboradores (2013b) una PCR para identificar las cepas del subclón H30-Rx (**Tabla 22**).

**Tabla 21**

Cebadores empleados en el clonotipado.

Nombre del gen	Primers	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Tamaño (pb)	T <sup>a</sup> de hibridación °C
<i>fimH</i>	fimH-F	CACTCAGGGAACCATTTCAGGCA	975	54
	fimH-R	CTTATTGATAAACAAAAGTCAC		
<i>fumC</i>	fumCF	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC	806	56
	fumCR	GTACGCAGCGAAAAAGATTC		

**Tabla 22**Cebadores utilizados para la detección de las variedades *fimH30* y *fimH30-Rx* por PCR.

Nombre del gen	Primers	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Tamaño (pb)	T <sup>a</sup> de hibridación °C	Referencias
<i>ybbW</i>	APfor63	GGTTGCGGTCTGGGCA	194	64	Banerjee <i>et al.</i> 2013b
	APrev66	CAATATCCAGCACGTTCCAGGTG			
<i>fimH30</i>	fimHF-21	CCGCCAATGGTACCGCTATT	354	62	Colpan <i>et al.</i> 2013
	fimHR-20	CAGCTTTAATCGCCACCCCA			

Subclón *H30-Rx*: SNP-gen *ybbW*

### 3.5.3 Electroforesis en campo pulsante (PFGE)

Una mayor resolución de las relaciones clonales entre cepas de la misma ST puede lograrse con PFGE. Se trata de una herramienta de subtipado molecular con mayor poder discriminatorio que el MLST. Se utiliza en varias redes internacionales de salud (PulseNet, FoodNet y vetNet) para estudios epidemiológicos locales en los que interesa detectar cepas implicadas en brotes.

En esta técnica se usan enzimas de restricción (en nuestro caso *XbaI*) con bajo número de puntos de corte del ADN cromosómico para generar fragmentos muy grandes (mayores de 40 Kb), que no se podrían separar mediante electroforesis convencional. Para conseguirlo, se alterna cíclicamente la orientación del campo eléctrico durante el proceso electroforético.



Para analizar los perfiles de macrorrestricción obtenidos con la endonucleasa XbaI se utilizó el programa BioNumerics versión 5.0. (Applied Maths, Sint-Martens-Latem) empleando el índice estadístico Dice, mediante el algoritmo UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) para la construcción de dendrogramas que reflejan la distribución de las cepas en clusters con más de un 85% de homología (cepas clonalmente relacionadas, con seis o menos bandas de diferencia).

La técnica PFGE se llevó a cabo en un equipo CHEF MAPPER (Bio-Rad) de acuerdo con el protocolo estandarizado de PulseNet (CDC, 2001).

## Lisis celular

---

- Preparar una suspensión en 2 ml de CSB (100 mM Tris:100 mM EDTA; pH 8) de las cepas bacterianas crecidas en TSA 18-24 h a 37 °C.
- Medir absorbancia a 420 nm.
- Preparar 400 µl de la suspensión a una concentración de 0,9 (ajustar con CSB)
- Añadir a cada suspensión 20 µl de proteinasa K (de una concentración de 20 mg/ml).
- Mezclar los 400 µl de la suspensión bacteriana anterior con 400 µl de agarosa al 1% previamente atemperada a 55 °C (agarosa para bloques = 0,50 g de agarosa SeakemGold, 45 ml de TE, 5 ml de SDS 10%) y preparar los bloques (2 bloques por muestra). Dejar solidificar unos 15 min a temperatura ambiente ó 5 min a 4 °C.
- En tubos de 10 ml añadir 5 ml de buffer de lisis (50 mM Tris: 50 mM EDTA + 1% Sarkosyl; pH 8) y 25 µl de proteinasa K (20 mg/ml). Depositar los bloques en los tubos correspondientes.
- Incubar 3 horas a 55 °C en agitación.
- Retirar el buffer de lisis. Lavar con 5 ml de agua bidestilada previamente atemperada a 50 °C; 20 min en agitación a 50 °C.
- Realizar otro lavado con agua en las mismas condiciones.
- Retirar el agua y realizar 3 lavados con 5 ml de buffer TE (10 mM Tris: 1 mM EDTA; pH 8) previamente atemperado a 50 °C; cada lavado será de 20 min a 50 °C en agitación.
- Retirar el TE y añadir 5 ml de TE fresco. Conservar así los bloques a 4 °C hasta el día siguiente

## Digestión del ADN

---

- Cortar una porción del bloque de agarosa del grosor de un porta e introducirlo en un tubo eppendorf. La digestión se realiza en dos pasos:
  - a.Preincubación: termobloque a 37 °C/15 min en 200 µl del buffer H 10X diluido en agua bidestilada. Pasado ese tiempo retiramos el buffer de preincubación y añadimos la enzima.
  - b.Incubación: termobloque a 37 °C/180 min en 200 µl de la enzima XbaI (10 U/µl por muestra) diluida en buffer H.

## Electroforesis

---

Una vez terminada la digestión, montar los cortes de bloque sobre los dientes del peine para la electroforesis. Preparar el gel con 150 ml de agarosa SeakemGold al 1% en TBE 0,5X. Atemperar la agarosa a 55 °C antes de añadirla al molde en el que se ha colocado el peine. Condiciones de electroforesis en el CHEF Mapper para *E. coli*:

- Auto Algorithm
- 30 kb-low MW      600 kb-high MW
- Pulso inicial: 2,16 s Pulso final: 54,17 s Tiempo: 21.30 h

## Revelado del gel

---

Tinción del gel en agua destilada con 10 µl/ml de bromuro de etidio (de la solución stock 10 mg/ml) durante 20-30 min en agitación. A continuación, eliminamos el baño y lavamos el gel al menos 1 h en agua destilada en agitación. La captura de imagen de los geles para su posterior tratamiento con el programa BioNumerics se realizó con el sistema de fotodocumentación GelDoc (BioRad) y el programa Quantity One 4.6.3.

## 3.6 Ensayo de virulencia en vivo

Los ensayos de experimentación animal realizados en la presente tesis se llevaron a cabo siguiendo la normativa Europea (Directiva 2010/63/UE relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos) y Nacional (RD 53/2013 por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación, otros fines científicos, incluyendo la docencia). El protocolo utilizado fue previamente aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad de Santiago de Compostela (AE-LU-002/12/INV MED.02/OUTROS 04).

El modelo de sepsis murino empleado para el estudio de la virulencia en vivo de las cepas está basado en el descrito originalmente por Picard y colaboradores (1999). Para nuestros ensayos utilizamos ratones SPF (specimen pathogen free) hembra RjOrl:Swiss de 3 a 4 semanas de vida (16-18 g) suministrados por Janvier-Labs, que se acomodaron según condiciones normalizadas, con agua y alimento *ad libitum*, en lotes de 10 ratones por jaula. Todas las jaulas se mantuvieron en una unidad tipo armario con presión negativa, ubicada en un espacio de uso exclusivo para llevar a cabo estas infecciones, dotado con un nivel de contención 2, y situado en el Animalario de Experimentación de la RIAIDT de la USC.

Los ratones se inocularon por vía subcutánea en la región del cuello con 200  $\mu$ l de suspensión bacteriana conteniendo aproximadamente  $2 \times 10^8$  UFC (unidades formadoras de colonias) en fase exponencial de crecimiento. Se emplearon 10 ratones para cada cepa ensayada, y para validar cada ensayo de letalidad, se incluyeron 2 cepas control inoculadas en 5 ratones cada una de ellas: la K-12 MG1655, que es una cepa comensal inocua, que no debe mostrar letalidad en los 7 días de ensayo; y CFT073, que es una cepa ExPEC que muestra una letalidad  $\geq 80\%$  a lo largo de los 7 días de ensayo. Los ratones supervivientes son eutanasiados el día 7 mediante dislocación cervical.

La preparación de los inóculos bacterianos se realizó en cabinas de seguridad biológica Clase II equipadas con filtros HEPA y utilizando materiales estériles. Las cepas de *E. coli* utilizadas en los ensayos, así como los controles positivos y negativos, fueron realizadas previamente en ML y TSA para confirmar que se trataba de cultivos puros. De dichos reislamientos se cepó una colonia que es con la que se trabajó en la preparación de inóculos:

**Día 1:** Siembra de las cepas en estría en medio LB Agar (Lennox L agar, Invitrogen), incubación 37 °C/24 h.

**Día 2:** Recoger una colonia de la placa LBA, o crecimiento equivalente, con asa de 1  $\mu$ l y suspender en 10 ml de caldo LB contenidos en un tubo falcon de 50 ml e incubar 37 °C/180 rpm/24 h. Por cada ensayo se incluyó un tubo falcon con 10 ml de caldo LB sin inocular como control de esterilidad del medio.

**Día 3:** Observar el tubo control de caldo LB por si hubiese turbidez, lo que sería indicativo de contaminación del caldo, y si no se observa contaminación, centrifugar los cultivos de caldo LB en los tubos falcon (3500 rpm/15 min/T<sup>a</sup> ambiente). Eliminar sobrenadante y resuspender en 10 ml de suero fisiológico estéril, agitar en vortex y de nuevo centrifugar (3500 rpm/15 min/T<sup>a</sup> ambiente). Eliminar de nuevo el sobrenadante y resuspender con 10 ml de suero fisiológico y agitar en vortex.

Medir la absorbancia del inóculo obtenido a 420 nm y ajustar a 1,4 con suero fisiológico. Conservar las suspensiones a 4°C hasta el momento de realizar la inoculación. La inoculación subcutánea, en la región del cuello, se realizó con jeringuillas de insulina, inoculando 200  $\mu$ l (aproximadamente  $2 \times 10^8$  UFC/200  $\mu$ l). Para el control de letalidad se anotó la hora de inicio y finalización de la inoculación para cada ensayo con objeto de llevar el control de letalidad (<24h, >24-48h, >48h).

Para el conteo de las UFC inoculadas a los ratones, se hicieron diluciones seriadas de cada inóculo, sembrándose las diluciones  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$  en dos placas de LBA cada una (100  $\mu$ l/placa). Utilizando digralsky para la siembra, las placas se incubaron a 37 °C/18-24 h.

**Día 3-7:** Tras la inoculación, los ratones fueron monitorizados e inspeccionados clínicamente varias veces al día durante al menos las 72 h post-inoculación, y a diario hasta el séptimo día post-inoculación, ajustándose la frecuencia en función del estado sanitario se registró la fecha y hora de cada muerte, así como cualquier incidencia clínica. En el séptimo día del ensayo se observaron las lesiones en los supervivientes, y se sacrificaron por dislocación cervical.

Las cepas fueron clasificadas como:

- Rápidamente letales, si producían la muerte de  $\geq 50\%$  de los ratones inoculados en  $\leq 24$  h.
- Altamente letales, si producían la muerte de  $\geq 90\%$  de los ratones inoculados a lo largo de los siete días de ensayo.
- Letales, si al menos producían la muerte del 50% de los ratones inoculados a lo largo de los siete días de ensayo.

### 3.7 **A**nálisis estadístico

Para determinar el grado de asociación estadística entre las variables en estudio, se aplicó el test de Fisher, considerando significativos valores iguales o menores a 0,05 ( $P \leq 0,05$ ).

### 4.1 Estudio I

#### **Emergencia de nuevas variantes del grupo clonal ST131 entre cepas de *E. coli* productoras de $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (ECBLEE) causantes de infecciones extraintestinales.**

*Emergence of new variants of ST131 clonal group among extraintestinal pathogenic Escherichia coli producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. (2003).*

Dahbi G, Mora A, López C, Alonso MP, Mamani R, Marzoa J, Coira A, García-Garrote F, Pita JM, Velasco D, Herrera A, Viso S, Blanco JE, Blanco M, Blanco J. Int J Antimicrob Agents 42(4):347-51.

#### 4.1.1 Aislados clínicos (cepas)

Se llevó a cabo un estudio prospectivo entre Enero y Abril del año 2012 en el Hospital Universitario Lucus Augusti (HULA). Se trata de un hospital de 740 camas que atiende a una población urbana y rural de 265.000 habitantes y es de referencia para otros dos hospitales regionales de los que dependen sanitariamente otras 118.000 personas. Durante los cuatro meses del estudio, se aislaron 1.763 cepas de *E. coli* de pacientes con infecciones del tracto urinario (ITU), sepsis y otros tipos de infecciones extraintestinales. Un total de 141 (8,0%) resultaron ser productoras de BLEE. Teniendo en cuenta que de muchos de los pacientes se obtuvieron varios aislados productores de BLEE de diferentes muestras, únicamente se incluyeron en el estudio 77 cepas aisladas de otros tantos pacientes eliminando los posibles duplicados. La mayoría procedían de ITUs (69 cepas) y únicamente cuatro de sepsis y otras cuatro de otro tipo de infecciones.



## 4.1.2 Análisis realizados

Con respecto a los estudios previos realizados en el LREC-USC (Blanco *et al.* 2009 y 2013) como novedad se incluye la identificación de todas las cepas del grupo clonal ST131 (O25b, O16, O142, O157 y de otros posibles serogrupos, incluidas las ONT) utilizando una PCR múltiple específica de SNPs de los genes *gyrB* y *mdh* desarrollada por Johnson y colaboradores (2009).

Además se determinó el tipo de enzimas BLEE, serotipos, genes de virulencia, grupos filogenéticos, perfiles de PFGE, las secuencias tipo por MLST siguiendo los esquemas de Achtman y del Instituto Pasteur, y las resistencias a antibióticos en las cepas del grupo clonal ST13.

## 4.1.3 Prevalencia del grupo clonal ST131 y tipos de enzimas BLEE

Un total de 47 (61%) de las 77 cepas ECBLEE del estudio pertenecían al grupo clonal ST131: 41 CTX-M-15, cuatro CTX-M-14, una CTX-M-1 y una CTX-M-27.

De las 47 cepas ST131, 28 (60%) procedían de pacientes ingresados en cinco residencias de ancianos (A, B, C, D y E), mientras que ninguna de las 30 cepas no-ST131 se aisló de pacientes ingresados en este tipo de instituciones ( $P < 0,001$ ).

De la residencia A proceden las cepas FV17616, 17565, 17543, 17563, 17604, 17561, 17526, 17541, 17583, 17618, 17557, 17536, 17602, 17607, 17592, 17534, 17564 y 17582; de la residencia B las cepas FV17613, 17605, 17608, 17620, 17546 y 17598; de la residencia C las cepas FV17578 y 17621; y de las residencias D y E las cepas FV17558 y FV17539 respectivamente.

## 4.1.4 Serotipos de las cepas del grupo clonal ST131

El gen *rfbO25b* se detectó en 38 cepas pertenecientes al serotipo O25b:H4. De las nueve cepas ST131 restantes, siete resultaron ser ONT:H4 y dos del serotipo O16:H5.

## 4.1.5 Secuencias tipo de las cepas del grupo clonal ST131

La secuenciación de los siete genes (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* y *recA*) del esquema de Achtman (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>) confirmó que las 47 cepas presentaban realmente la secuencia tipo ST131. Cuando se secuenciaron los ocho genes (*dinB*, *icdA*, *pabB*, *polB*, *putP*, *trpA*, *trpB* and *uidA*) del esquema del Instituto Pasteur (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/EColi.html>) en 23 cepas ST131 representativas comprobamos que pertenecían a cinco secuencias tipo diferentes. Concretamente, 16 cepas pertenecían a la secuencia tipo PST43 (13 O25b:H4 y 3 ONT:H4), cuatro cepas a la nueva secuencia tipo PST621 (tres O25b:H4 y una cepa

ONT:H4), y una cepa a las secuencias tipo PST506 (O16:H5), PST527 (O25b:H4) y PST625 (O16:H5). Las secuencia tipo PST621 y PST527 identificadas en las cepas O25b:H4 y ONT:H4 varían únicamente en la secuencia de uno y dos genes respectivamente con respecto a PST43 también asociada con las cepas de dichos serotipos, mientras que las secuencias PST506 y PST625 observadas en las cepas del serotipo O16:H5 varían en las secuencias de cinco genes con respecto a PST43 y entre ellas en únicamente en un gen (**Tabla 23**).

**Tabla 23**

Secuencias tipo del esquema del Instituto Pasteur de las cepas del grupo clonal ST131

Serotipo	ST Achtman	MLST del Instituto Pasteur								
		PST	dinB	icdA	pabB	polB	putP	trpA	trpB	uidA
O25b:H4 y ONT:H4	131	43	9	1	15	7	4	9	6	9
		621 nuevo	9	234	15	7	4	9	6	9
O25b:H4		527	9	20	15	7	4	9	6	129
O16:H5		506	9	134	74	134	4	72	1	9
		625 nuevo	9	134	74	134	4	162	1	9

#### 4.1.6 Genes de virulencia y virotipos de las cepas del grupo clonal ST131. Comparación con las cepas no ST131

Las 77 cepas de ECBLEE fueron analizadas por PCR para la presencia de 32 genes que codifican para factores de virulencia típicos de cepas ExPEC que causan infecciones del tracto urinario, sepsis y meningitis (**Tabla 24**).

Quince genes de virulencia fueron significativamente asociados con las cepas ST131 (*fimH*, *F10 papA*, *papGII*, *afa/draBC*, *afaFM955459*, *cnf1*, *sat*, *hlyA*, *iucD*, *chuA*, *kpsMII*, *kpsMII-K2*, *kpsMII-K5*, *malX* y *usp*). Ocho de los cuales se han detectado en > 90% de las cepas ST131 (*fimH*, *F10 papA*, *sat*, *iucD*, *chuA*, *kpsMII*, *malX* y *usp*).

**Tabla 24**

Genes de virulencia de cepas ST131 y no-ST131

<sup>a</sup>ONT (O no tipable).

<sup>b</sup>Se muestran únicamente los valores de P < 0,05 (Test exacto de Fisher).

ST131 O25b:H4 (n=38)	ST131 ONT <sup>a</sup> :H4 (n=7)	ST131 O16:H5 (n=2)	Total ST131 (n=47)	Total no-ST131(n=30)	valor P <sup>b</sup> ST131vs no-ST131	
<b>Adhesinas</b>						
<i>fimH</i>	38 (100%)	7 (100%)	2 (100%)	47 (100%)	26 (87%)	0,020
<i>fimAvMT78</i>	0	0	0	0	9 (30%)	<0,001
F10papA	37 (100%)	7 (100%)	2 (100%)	46 (98%)	0	<0,001
<i>papEF</i>	20 (53%)	1 (14%)	0	21 (45%)	13 (43%)	
<i>papGI</i>	0	0	0	0	1 (3%)	
<i>papGII</i>	20 (53%)	1 (14%)	0	21 (45%)	3 (10%)	0,001
<i>papGIII</i>	0	0	0	0	4 (13%)	0,020
<i>papGIV</i>	0	0	0	0	0	
<i>sfa/focDE</i>	0	0	0	0	0	
<i>afa/draBC</i>	15 (39%)	6 (86%)	0	21 (45%)	0	<0,001
<i>afaFM955459</i>	15 (39%)	6 (86%)	0	21 (45%)	0	<0,001
<i>bmaE</i>	0	0	0	0	0	
<i>gafD</i>	0	0	0	0	0	
<b>Toxinas</b>						
<i>cnfl</i>	13 (34%)	1 (14%)	0	14 (30%)	0	<0,001
<i>cdtB</i>	0	0	0	0	1 (3%)	
<i>sat</i>	37 (97%)	7 (100%)	2 (100%)	46 (98%)	3 (10%)	<0,001
<i>hlyA</i>	13 (34%)	1 (14%)	0	14 (30%)	1 (3%)	0,003
<b>Sideróforos</b>						
<i>iucD</i>	38 (100%)	7 (100%)	2 (100%)	47 (100%)	16 (53%)	<0,001
<i>iroN</i>	2 (5%)	0	0	2 (4%)	11 (33%)	<0,001
<i>chuA</i>	38 (100%)	7 (100%)	2 (100%)	47 (100%)	0	<0,001
<b>Cápsulas</b>						
<i>kpsMII</i>	38 (100%)	7 (100%)	0	45 (96%)	8 (24%)	<0,001
<i>kpsMII-K2</i>	15 (39%)	6 (86%)	0	21 (45%)	0	<0,001
<i>kpsMII-K5</i>	22 (58%)	1 (14%)	0	23 (49%)	7 (23%)	0,021
<i>neuC-K1</i>	1 (2%)	0	0	1 (2%)	1 (3%)	
<i>kpsMIII</i>	0	0	0	0	0	
<b>Otros</b>						
<i>cvaC</i>	1 (3%)	0	0	1 (2%)	6 (20%)	0,012
<i>iss</i>	2 (5%)	0	0	2 (4%)	12 (40%)	<0,001
<i>traT</i>	24 (63%)	2 (29%)	2 (100%)	28 (60%)	17 (57%)	
<i>ibeA</i>	1 (3%)	0	0	1 (2%)	0	
<i>malX (PAI)</i>	38 (100%)	7 (100%)	2 (100%)	47 (100%)	3 (10%)	<0,001
<i>usp</i>	38 (100%)	7 (100%)	2 (100%)	47 (100%)	1 (3%)	<0,001
<i>tsh</i>	0	0	0	0	3 (10%)	
<b>Estatus ExPEC</b>	38 (100%)	7 (100%)	0	45 (96%)	11 (37%)	<0,001
<b>Cepas con ≥8 genes virulencia</b>	26 (68%)	2	0	28 (60%)	1 (3%)	<0,001
<b>Media y (rango) de genes de virulencia</b>	9,3 (7 a 11)	8,6 (8 a 11)	7 (7 a 7)	9,1 (7 a 11)	4,3 (1 a 8)	

El estatus ExPEC entre las cepas del grupo clonal ST131 fue muchísimo más frecuente (96%) que entre las cepas no ST131 (37%) ( $P < 0,001$ ).

Además, las 47 cepas ST131 exhibieron un significativo mayor número de genes de virulencia (media 9,1) que las 30 cepas no ST131 (media 4,3).

La diversidad de combinaciones de genes de virulencia encontrada entre las cepas no ST131 (25 combinaciones entre 30 cepas) resultó ser claramente superior a la encontrada entre cepas ST131 (10 combinaciones entre 47 cepas). Además, las combinaciones de genes de virulencia de las cepas ST131 eran muy diferentes a las encontradas entre las cepas no ST131.

Al analizar las combinaciones de genes de virulencia observamos que 20 cepas ST131 presentaron dos nuevos virotipos que en el próximo estudio definiremos como “virotipos E y F” caracterizados por la presencia de los genes *papGII*, *sat*, *cnf1*, *hlyA*, *kpsMIII-K5* y *papGII*, *sat*, *kpsMIII-K5* respectivamente.

Como en los estudios previamente realizados en el HULA, el virotipo A, caracterizado por la presencia de los genes *afa/draBC*, *afaFM955459*, *sat* y *kpsMIII-K2*, fue el más frecuentemente identificado, observándose en 21 (45%) de las 47 cepas ST131.

#### 4.1.7 Pulsotipos (PFGE) de las cepas del grupo clonal ST131

Al analizar los perfiles de macrorrestricción definidos con la enzima *XbaI* de las cepas del grupo clonal ST131, observamos una amplia heterogeneidad, con únicamente un 60,4% de similitud entre todos los perfiles generados. No obstante, las 47 cepas se distribuyeron en seis grupos (I-VI) con 85%, 83,1%, 90,3%, 84,2%, 88,9% y 82,4% de identidad. Los grupos II, III, IV y VI quedaron claramente definidos por su combinación característica de genes de virulencia (**Figura 42**). La mayoría de las cepas se englobaron en los grupos II, III y IV.

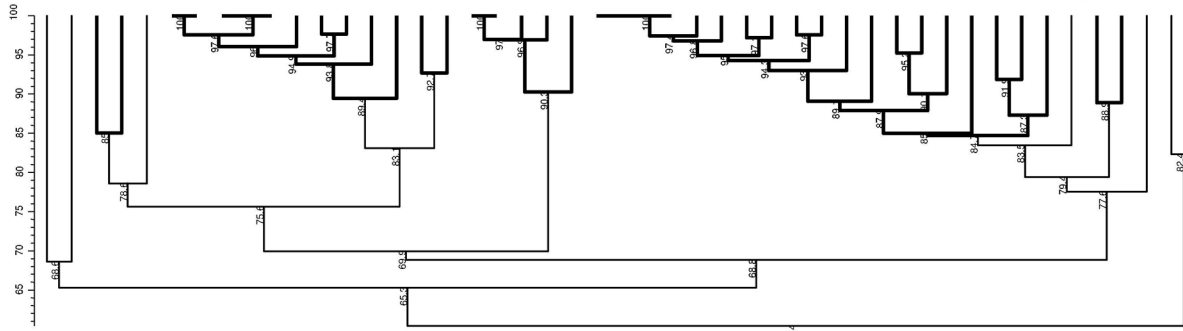
El grupo I incluye 2 cepas del serotipo O25b:H4 y de la secuencia tipo PST43 que producen dos tipos distintos de enzimas BLEE (CTX-M-15 y CTX-M-27) y presentan diferentes patrones de genes de virulencia.

En el grupo II se incluyen 12 cepas productoras de CTX-M-15 del virotipo E (11 O25b:H4 y una ONT:H4, con la nueva secuencia tipo PST621), 11 de las cuales presentaron la misma combinación de genes de virulencia: *fimH*, *papGII*, *sat*, *cnf1*, *hlyA*, *iucD*, *kpsMIII-K5*, *tratT*, *malX* y *usp*. Diez cepas del grupo II presentaron una identidad  $>85\%$  y seis de estas 10 cepas procedían de pacientes ingresados en la misma residencia de ancianos (Residencia A).



Dist (τ = 1.0%, 1.0%) (H=0.0% S=0.0%) (0.0% = 100.0%)  
PFGE-XbaI

PFGE-XbaI



Strain	ST	Genotype	Genotype
FV 17573	025b:H4	CTX-M-14	fimH papG II sat cnf1 hiyA lucD kpsM II-K5 traT malX usp
FV 17588	025b:H4	CTX-M-15	fimH papG II sat cnf1 hiyA lucD kpsM II-K5 traT malX usp
FV 17595	025b:H4	CTX-M-15	fimH papG II sat cnf1 hiyA lucD kpsM II-K5 traT malX usp
FV 17597	025b:H4	CTX-M-27	fimH sat lucD kpsM II-K5 traT malX usp
FV 17616	025b:H4	CTX-M-1	fimH lucD iron kpsM II-K7 cvaC iss traT bsaA malX usp
FV 17544	025b:H4	CTX-M-15	fimH papG II sat cnf1 hiyA lucD kpsM II-K5 traT malX usp
FV 17565	ONT:H4	CTX-M-15	fimH papG II sat cnf1 hiyA lucD kpsM II-K5 traT malX usp
FV 17543	025b:H4	CTX-M-15	fimH papG II sat cnf1 hiyA lucD kpsM II-K5 traT malX usp
FV 17563	025b:H4	CTX-M-15	fimH papG II sat cnf1 hiyA lucD kpsM II-K5 traT malX usp
FV 17604	025b:H4	CTX-M-15	fimH papG II sat cnf1 hiyA lucD kpsM II-K5 traT malX usp
FV 17590	025b:H4	CTX-M-15	fimH papG II sat cnf1 hiyA lucD kpsM II-K5 traT malX usp
FV 17548	025b:H4	CTX-M-15	fimH papG II sat cnf1 hiyA lucD kpsM II-K5 traT malX usp
FV 17561	025b:H4	CTX-M-15	fimH papG II sat cnf1 hiyA lucD kpsM II-K5 traT malX usp
FV 17601	025b:H4	CTX-M-15	fimH papG II sat cnf1 hiyA lucD kpsM II-K5 traT malX usp
FV 17526	025b:H4	CTX-M-15	fimH papG II sat cnf1 hiyA lucD kpsM II-K5 traT malX usp
FV 17578	025b:H4	CTX-M-15	fimH papG II sat cnf1 hiyA lucD kpsM II-K5 traT malX usp
FV 17621	025b:H4	CTX-M-15	fimH papG II sat cnf1 hiyA lucD kpsM II-K5 traT malX usp
FV 17621	025b:H4	CTX-M-15	fimH papG II sat cnf1 hiyA lucD kpsM II-K5 traT malX usp
FV 17568	025b:H4	CTX-M-15	fimH papG II sat lucD kpsM II-K5 traT malX usp
FV 17613	025b:H4	CTX-M-15	fimH papG II sat lucD kpsM II-K5 traT malX usp
FV 17605	025b:H4	CTX-M-15	fimH papG II sat lucD kpsM II-K5 traT malX usp
FV 17608	025b:H4	CTX-M-15	fimH papG II sat lucD kpsM II-K5 traT malX usp
FV 17620	025b:H4	CTX-M-15	fimH papG II sat lucD kpsM II-K5 traT malX usp
FV 17541	ONT:H4	CTX-M-15	fimH atadraBC sat lucD kpsM II-K2 malX usp
FV 17575	025b:H4	CTX-M-15	fimH atadraBC sat lucD kpsM II-K2 malX usp
FV 17583	ONT:H4	CTX-M-15	fimH atadraBC sat lucD kpsM II-K2 malX usp
FV 17596	ONT:H4	CTX-M-15	fimH atadraBC sat lucD kpsM II-K2 malX usp
FV 17618	ONT:H4	CTX-M-15	fimH atadraBC sat lucD kpsM II-K2 traT malX usp
FV 17557	025b:H4	CTX-M-15	fimH atadraBC sat lucD kpsM II-K2 traT malX usp
FV 17536	025b:H4	CTX-M-15	fimH atadraBC sat lucD kpsM II-K2 malX usp
FV 17595	025b:H4	CTX-M-15	fimH atadraBC sat lucD kpsM II-K2 malX usp
FV 17602	ONT:H4	CTX-M-15	fimH atadraBC sat lucD kpsM II-K2 malX usp
FV 17607	025b:H4	CTX-M-15	fimH atadraBC sat lucD kpsM II-K2 malX usp
FV 17558	025b:H4	CTX-M-15	fimH atadraBC sat lucD kpsM II-K2 malX usp
FV 17551	ONT:H4	CTX-M-15	fimH atadraBC sat lucD kpsM II-K2 malX usp
FV 17560	025b:H4	CTX-M-15	fimH atadraBC sat lucD kpsM II-K2 traT malX usp
FV 17611	025b:H4	CTX-M-15	fimH atadraBC sat lucD kpsM II-K2 traT malX usp
FV 17623	025b:H4	CTX-M-15	fimH atadraBC sat lucD kpsM II-K2 malX usp
FV 17592	025b:H4	CTX-M-15	fimH atadraBC sat lucD kpsM II-K2 traT malX usp
FV 17534	025b:H4	CTX-M-15	fimH atadraBC sat lucD kpsM II-K2 malX usp
FV 17564	025b:H4	CTX-M-15	fimH atadraBC sat lucD kpsM II-K2 malX usp
FV 17584	025b:H4	CTX-M-15	fimH atadraBC sat lucD kpsM II-K2 malX usp
FV 17546	025b:H4	CTX-M-15	fimH atadraBC sat lucD kpsM II-K2 malX usp
FV 17580	025b:H4	CTX-M-15	fimH papG II sat lucD kpsM II-K5 traT malX usp
FV 17582	025b:H4	CTX-M-15	fimH atadraBC sat lucD kpsM II-K2 malX usp
FV 17591	025b:H4	CTX-M-14	fimH sat lucD kpsM II-K5 malX usp
FV 17539	O16:H5	CTX-M-14	fimH sat lucD traT malX usp
FV 17598	O16:H5	CTX-M-14	fimH sat lucD traT malX usp

I  
II  
III  
IV  
V  
VI



**Figura 42** (página anterior)

Dendrograma con los perfiles de macrorrestricción (pulsotipos) obtenidos por PFGE empleando el enzima XbaI de las 47 cepas ST131. Estas cepas se distribuyeron en seis grupos (I a VI) con 85%, 83,1%, 90,3%, 84,2%, 88,9% y 82,4% de identidad. Se indica el código de la cepa, el serotipo, la secuencia tipo del esquema del Instituto Pasteur, el tipo de enzima BLEE, los genes de virulencia, las resistencias, y el grupo. NAL, ácido nalidixico; CIP, ciprofloxacina; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina, FOF, fosfomicina; AMC, amoxicilina-ácido clavulánico.

El grupo III incluye cinco cepas CTX-M-15 del serotipo O25b:H4 y la secuencia tipo PST43 positivas para los genes de virulencia: *fimH*, *papGII*, *sat*, *iucD*, *kpsMIIIK5*, *traT*, *malX* y *usp* (virotipo F). Cuatro de las cinco cepas de este grupo eran aisladas de pacientes de la Residencia B.

El grupo IV está formado por 20 cepas CTX-M-15 con un 84,2% de identidad (14 O25b:H4 y seis ONT:H4, con la secuencia tipo PST43) que poseen una combinación de genes de virulencia característica: *fimH*, *afa/draBC*, *sat*, *iucD*, *kpsMIII-K2*, *malX* y *usp* (virotipo A). Diez (seis O25b:H4 y cuatro ONT:H4) de las 20 cepas de este grupo eran obtenidas de pacientes de la residencia A.

Por su parte el grupo V incluye únicamente 2 cepas que presentan el mismo serotipo (O25b:H4), secuencia tipo (PST43) y producen CTX-M-15, pero que poseen diferentes combinaciones de genes de virulencia.

Por último, el grupo VI incluye dos cepas productoras de CTX-M-14 del serotipo O16:H5 (PST506 y ST625) con los genes de virulencia *fimH*, *sat*, *iucD*, *traT*, *malX* y *usp* (virotipo C). Estas dos cepas procedían de pacientes ingresados en las residencias B y C.

#### 4.1.8 Resistencias de las cepas del grupo clonal ST131 Comparación con las cepas no ST131

Las tasas de resistencia al ácido nalidixico (100% vs 77%;  $P=0,001$ ), ciprofloxacina (100% vs 70%;  $P<0,001$ ), tobramicina (72% vs 33%;  $P=0,001$ ), trimetoprim/sulfametoxazol (77% vs 57%;  $P=0,057$ ) y fosfomicina (15% vs 0%;  $P=0,026$ ) fueron mayores entre las cepas del grupo clonal ST131 que entre las cepas no ST131.

## 4.2 Estudio II

### **Epidemiología molecular del subclón H41 de *E. coli* O16:H5-ST131: comparación con los subclones H30 y H30-Rx de O25b:H4-ST131.**

*Molecular epidemiology and virulence of Escherichia coli O16:H5-ST131: Comparison with H30 and H30-Rx subclones of O25b:H4-ST131.* (2014)

Dahbi G, Mora A, Mamani R, López C, Alonso MP, Marzoa J, Blanco M, Herrera A, Viso S, García-Garrote F, Tchesnokova V, Billig M, de la Cruz F, de Toro M, González-López JJ, Prats G, Chaves F, Martínez-Martínez L, López-Cerezo L, Denamur E, Blanco J. *Int J Med Microbiol* 304(8):1247-57.

En el estudio previo (4.1. Estudio I) aunque empleamos una PCR capaz de detectar todas las variantes del grupo clonal ST131, desconocíamos los subclones a los que pertenecían las cepas. Además, disponíamos únicamente de dos cepas del serotipo O16:H5 que no eran suficientes para poder comparar sus características con las aisladas en otros países y con las del serotipo O25b:H4. Por ello planificamos el presente estudio en el que conseguimos una colección de 27 cepas del serotipo O16:H5 que comparamos con 127 cepas del serotipo O25b:H4, estableciendo los subclones.

Según nuestra información, este estudio es el primero realizado en Europa en el que se investiga la prevalencia y los genotipos de cepas ST131 del serotipo O16:H5 y se comparan con cepas ST131 del serotipo O25b:H4 y sus subclones H30 y H30-Rx.

#### 4.2.1 Aislados clínicos (cepas)

Los 2.995 aislados de *E. coli* analizados en este estudio procedían de cinco hospitales de diferentes regiones (Lugo, Barcelona, Santander, Madrid y Sevilla) y fueron obtenidos entre los años 2005 y 2012. Únicamente se incluyó en el estudio un aislado por paciente con infección urinaria, sepsis u otra infección extraintestinal. Se trataba de aislados de *E. coli* clínicamente relevantes obtenidos de pacientes no hospitalizados y de pacientes ingresados de todos los grupos de edad.

En la **Tabla 25** se muestra la distribución y el origen clínico por hospital. Como se puede ver en algunos muestreos se incluyeron únicamente aislados de ECBLEE y en otros todos los aislados de *E. coli* independientemente de que fuesen resistentes o sensibles a los antibióticos. Entre los aislados analizados también se incluyeron los 77 del estudio anterior.

Los datos reflejan la prevalencia real de los diferentes serotipos y subclones de ST131 entre aislados de ITUs, sepsis y otros tipos de infecciones extraintestinales.

**Tabla 25**

Origen de las 27 cepas O16:H5-ST131 caracterizadas en el estudio y prevalencia de cepas ST131 y de los subclones H30 y H30-Rx

Tipo de estudio	Hospital <sup>a</sup>	Año muestreo clínico	Nº de aislados	Nº.ST131 (%)				Referencias
				O25b:H4	subción H30	subción H30-Rx	O16:H5	
<b>Estudio multicéntrico</b>								
100 aislados consecutivos de <i>E.coli</i> clínicamente relevantes obtenidos en cada hospital. UTI (84%). Prevalencia ECBLEE 7%	Lucus Augusti	2009 <sup>b</sup>	500	59 (12%)	43 (9%)	16 (3%)	8 (2%)	Blanco <i>et al.</i> 2001
	Vall d'Hebron							
	Marqués de Valdecilla							
	12 Octubre							
	Virgen Macarena							
100 aislados consecutivos de ECBLEE clínicamente relevantes obtenidos en cada hospital. UTI (75%)	Lucus Augusti	2009 <sup>b</sup>	500	142 (28%)	126 (25%)	120 (24%)	11 (2%)	Dahbi <i>et al.</i> 2014
	Vall d'Hebron							
	Marqués de Valdecilla							
	12 Octubre							
	Virgen Macarena							
<b>Estudios locales</b>								
ECBLEE obtenidos de ITU (72%) y otras infecciones extraintestinales	Lucus Augusti	2006 a 2008	354	77 (22%)	76 (21%)	76 (21%)	0	Blanco <i>et al.</i> 2009
ECBLEE obtenidos de ITU (73%) y otras infecciones extraintestinales	Vall d'Hebron	2008	94	30 (32%)	19 (20%)	18 (19%)	0	Coelho <i>et al.</i> 2011
Aislados de <i>E.coli</i> causantes de bacteremia. Prevalencia ECBLEE 4,4%	Lucus Augusti	2005 a 2010	1470	110 (7%)	73 (5%)	30 (2%)	6 (0,4%)	Dahbi <i>et al.</i> 2014
ECBLEE obtenidos de ITU (90%) y otras infecciones extraintestinales	Lucus Augusti	2012	77	38 (49%)	44 (57%)	42 (54%)	2 (3%)	Dahbi <i>et al.</i> 2013 <sup>c</sup>
<b>Número total de aislados de <i>E.coli</i></b>		2005 a 2012	2995	456 (15%)	381 (13%)	302 (10%)	27 (0,9%)	
<b>Total ECBLEE</b>			1125	320 (28%)	295 (26%)	286 (25%)	14 (1%)	
<b>Total no- ECBLEE</b>			1870	136 (7%)	86 (5%)	16 (0,9%)	13 (0,7%)	

<sup>a</sup> Participaron cinco hospitales de diferentes regiones de España: Hospital Universitario Lucus Augusti de Lugo, Vall d'Hebron de Barcelona, Marqués de Valdecilla de Santander, 12 Octubre de Madrid y Virgen Macarena de Sevilla.

<sup>b</sup> Se seleccionaron los primeros 100 aislados de *E. coli* clínicamente relevantes en cada hospital (7% ECBLEE) y a continuación otros 100 consecutivos de ECBLEE.

<sup>c</sup> Siete aislados ST131 fueron ONT:H4 y pertenecieron al subclón H30-Rx.

NOTA: Por cada paciente se seleccionó una única cepa.

## 4.2.2 Análisis realizados

Identificación de las cepas ST131 incluyendo los subclones *H30* y *H30-Rx*

Un total de 2.995 aislados de *E. coli* fueron analizados para la identificación del grupo clonal ST131 utilizando una PCR múltiple específica de SNPs de los genes *gyrB* y *mdh* desarrollada por Johnson y colaboradores (2009). Las cepas ST131 así identificadas se ensayaron con la triple PCR que amplifica los genes *afa* *FM955459*, *rfbO25b* y *bla*<sub>CTX-M-15</sub> gene 3'end (Blanco *et al.* 2009).

Todas las cepas ST131 detectadas se ensayaron también con cebadores específicos para amplificar el alelo *fimH30* (codifica para una variante de la adhesina fimbrial tipo 1) e identificar el subclón *H30* (Colpan *et al.* 2013).

Dentro del subclón *H30* se identificaron las cepas del subclón *H30-Rx* usando otra PCR específica para un SNP (G723A) dentro del gen *ybbW* (codifica alantoína) (Banerjee *et al.* 2013b).

Además se determinó el tipo de enzimas BLEE, serotipos, genes de virulencia, grupos filogenéticos, perfiles de PFGE, las secuencias tipo por MLST siguiendo los esquemas de Achtman y del Instituto Pasteur, y las resistencias a antibióticos en las cepas del grupo clonal ST131.

## 4.2.3 Prevalencia del grupo clonal ST131 y de los subclones *H30* y *H30-Rx*

Un total de 490 (16%) de los 2.995 aislados de *E. coli* obtenidos de muestras clínicas de cinco hospitales españoles entre los años 2005 y 2012 resultaron pertenecer al grupo clonal ST131 (**Tabla 25**). El grupo clonal ST131 fue más prevalente entre los aislados de ECBLEE (341/1125; 30%) que entre los aislados no productores de BLEE (149/1870; 8%) ( $P < 0,001$ ).

Las 490 cepas ST131 pertenecieron al grupo filogenético B2, y 456 (93%) fueron positivas para el gen *rfbO25b* y eran del serotipo O25b:H4. De las 34 cepas no O25b, 27 pertenecieron al serotipo O16:H5 y siete resultaron ser ONT:H4. La secuenciación de los siete genes del esquema MLST de Achtman confirmó el estatus ST131 de las 34 cepas no O25b.

La mayoría (381/490; 78%) de las cepas ST131 pertenecían al subclón *H30*, y 302 (79%) de las 381 cepas *H30* eran del subclón *H30-Rx*.

Entre los 1.125 aislados ECBLEE, 295 (26%) representaron el subclón *H30*, y 286 (97%) de estos eran *H30-Rx*. En contraste, entre los 1.870 aislados no productores de BLEE, únicamente 86 (5%) representaron el subclón *H30* ( $P < 0,001$ ), y solamente 16 (18%) de estos eran *H30-Rx* ( $P < 0,001$ ) (**Tabla 25**).

El tipo de enzima BLEE variaba significativamente dependiendo del subclón, con el enzima CTX-M-15 claramente asociado al subclón H30-Rx. Así, las 286 cepas H30-Rx productoras de BLEE eran CTX-M-15 positivas. Cabe destacar que las siete cepas ONT:H4 ST131 eran del subclón H30-Rx y producían CTX-M-15.

Dentro de la colección de los 2.995 aislados analizados, las cepas O16:H5-ST131 representaron el 0,9% comparado con el 15% de las cepas O25b:H4-ST131.

Con respecto al tipo de muestra clínica de la que procedían las cepas O16:H5-ST131, significar que predominaban las de infecciones del tracto urinario (19 casos) y de sepsis (7 casos). Un total de 15 cepas procedían de infecciones comunitarias (incluyendo infecciones asociadas con cuidados sanitarios especiales y de pacientes de residencias) y 12 de infecciones nosocomiales (aislados obtenidos de infecciones ocurridas 48 h después de la admisión hospitalaria). Dos de las cepas O16:H5-ST131 habían sido obtenidas de pacientes ingresados en residencias.

#### 4.2.4 Alelos *fimH* de las cepas ST131

El análisis de las secuencias nucleotídicas de los alelos *fimH* fue realizado en las 27 cepas detectadas del serotipo O16:H5 y en un grupo representativo de 127 cepas del serotipo O25b:H4, incluyendo BLEE (n=74) y no BLEE (n=53) de cinco diferentes hospitales (Blanco *et al.* 2011; Coelho *et al.* 2011; Dahbi *et al.* 2013) (**Tabla 26**).

Se identificaron nueve alelos *fimH* diferentes entre las 154 cepas ST131. Las 27 cepas O16:H5-ST131 presentaban el alelo *fimH41*, mientras que 99 (78%) y 20 (16%) de las cepas O25b:H4-ST131 presentaban los alelos *fimH30* y *fimH22*, respectivamente ( $P < 0,001$  /  $P = 0,01$ , respectivamente).

Siete cepas O25b:H4-ST131 tenían derivados mutantes del alelo *fimH22* (*fimH207*, *fimH324*, *fimH375*, *fimH376*, *fimH378*) y una cepa el derivado mutante *fimH381* del alelo *fimH30* (**Tablas 26 y 27 y Figura 43**).

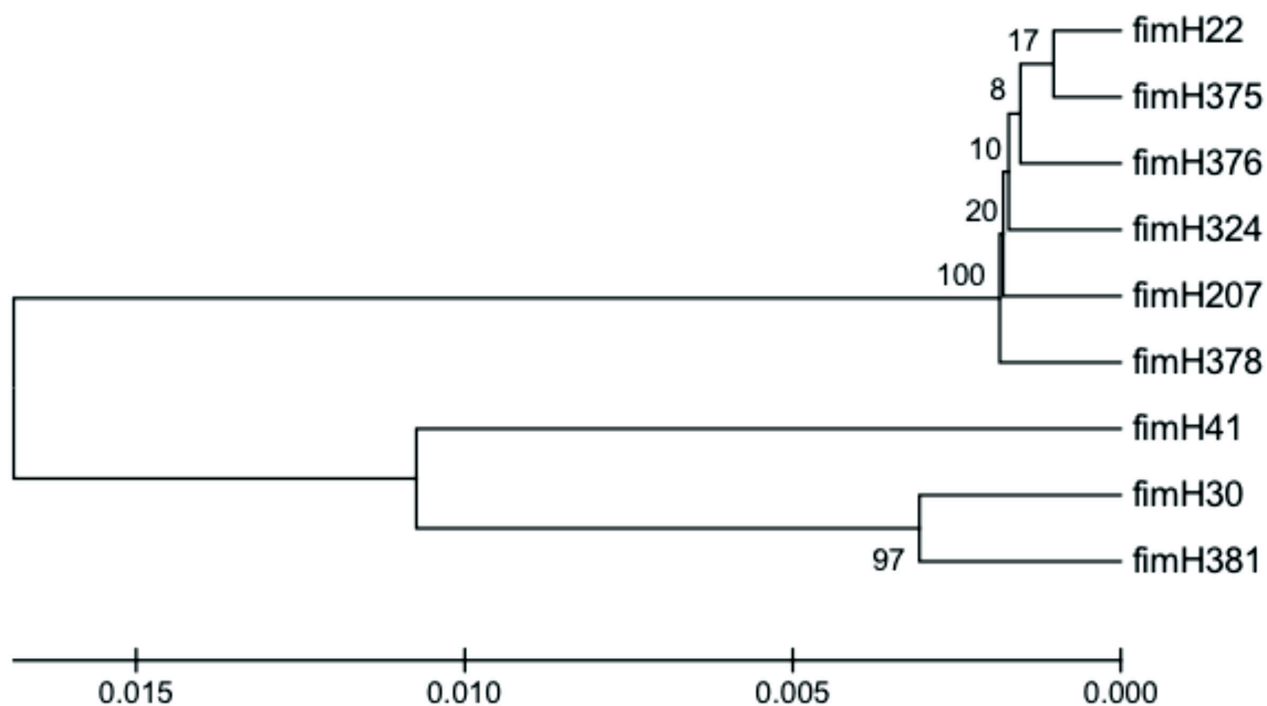


**Tabla 26**Alelos *fimH* de cepas ST131 de los serotipos O16:H5 y O25b:H4

Alelo <i>fimH</i>	O16:H5 (n=27)	O25b:H4 (n=127)	Valor P <sup>c</sup>
<i>fimH41</i>	<b>27 (100%)</b>	0	<0,001
<i>fimH30</i>	0	<b>99 (78%)</b>	<0,001
<i>fimH381<sup>a</sup></i>	0	1 (0.8%)	
<i>fimH22</i>	0	<b>20 (16%)</b>	0,01
<i>fimH207<sup>b</sup></i>	0	1 (0.8%)	
<i>fimH324<sup>b</sup></i>	0	3 (2%)	
<i>fimH375<sup>b</sup></i>	0	1 (0.8%)	
<i>fimH376<sup>b</sup></i>	0	1 (0.8%)	
<i>fimH378<sup>b</sup></i>	0	1 (0.8%)	

<sup>a</sup> Derivado mutante del alelo *fimH30*.<sup>b</sup> Derivado mutante del alelo *fimH22*.<sup>c</sup> Se muestran únicamente los valores de P<0.05 (Test exacto de Fisher).

Las diferencias significativas se destacan en negrilla.

**Figura 43**Árbol filogenético elaborado a partir de las secuencias nucleotídicas de los alelos *fimH* de las cepas ST131. Método UPGMA (distancias p no corregidas) de MEGA 5.05

**Tabla 27**  
Diferencias nucleotídicas y aminoacídicas entre los nueve alelos *fimH* de las cepas ST131

Posición SNP	90	93	96	117	140	141	171	182	185	207	225	244	259	260	296	298	312	315	318	321	339	353	411	414	450	534	546
<i>fimmH41</i>	A	T	C	T	C	C	A	C	A	T	C	G	G	G	G	G	A	T	T	C	C	C	C	G	T	C	T
<i>fimH30</i>	C	.	T	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	T	G	.	T	.	.	T	C
<i>fimH381</i>	C	.	T	.	.	T	.	G	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	G	T	G	T	.	.	.	T	C
<i>fimH22</i>	C	A	.	C	.	T	G	.	C	.	T	.	.	.	A	.	T	C	.	T	G	.	G	A	A	T	.
<i>fimH207</i>	C	A	.	C	.	T	G	.	C	.	T	.	.	A	A	.	T	C	.	T	G	.	G	A	A	T	.
<i>fimH324</i>	C	A	.	C	.	T	G	.	C	.	T	.	T	.	A	.	T	C	.	T	G	.	G	A	A	T	.
<i>fimH375</i>	C	A	.	C	T	T	G	.	C	T	T	.	.	.	A	.	T	C	.	T	G	.	G	A	A	T	.
<i>fimH376</i>	C	A	.	C	.	T	G	.	C	T	A	A	.	.	A	.	T	C	.	T	G	.	G	A	A	T	.
<i>fimH378</i>	C	A	.	C	.	T	G	.	T	C	T	.	.	.	A	.	T	C	.	T	G	.	G	A	A	T	.
cambio aa					P-L			T-R	Q-L			G-S	G-C	G-D	S-N	G-S						S-L					
posición aa					26			40	41		61	66	66	66	78	79						97					

## 4.2.5 Secuencias tipo del esquema MLST del Instituto Pasteur de las cepas ST131

Se determinaron las secuencias tipo por el esquema del Instituto Pasteur de 69 cepas ST131 (27 O16:H5 y 42 O25b:H4). La selección de las 42 cepas O25b:H4 representativas se basó en los virotipos y en los alelos *fimH*, de tal forma que estuviesen representadas todas las variantes diferentes posibles.

Se identificaron siete secuencias tipo Pasteur (PST) (**Tabla 28**). Las 27 cepas del serotipo O16:H5 mostraron PSTs específicas: PST506 (93%, 25 cepas) y dos variantes de un único *locus* de PST506 (PST567 y PST625). La mayoría de las cepas del serotipo O25b:H4 (33 de 42; 79%) presentaron la secuencia tipo PST43 (20 cepas *H30*, 16 cepas *H30-Rx* y 13 cepas *H22*). Ocho cepas O25b:H4 presentaron variantes de un único *locus* de PST43 (5 PST9 y 3 PST621). Cuatro cepas PST9 eran del subclón *H22* y las tres cepas PST621 pertenecían al subclón *H30-Rx*. Por último, una cepa O25b:H4 del subclón *H22* presentó la secuencia tipo PST527 (una doble *locus* variante de PST43).

## 4.2.6 Resistencias y enzimas BLEE de las cepas ST131

El análisis de resistencias fue realizado en las 27 cepas O16:H5 y en las 127 cepas representativas O25b:H4. Las cepas del serotipo O16:H5 presentaron diferentes tasas de resistencia comparadas con las de las cepas O25b:H4-ST131, siendo significativamente mayores para la gentamicina (59% vs 16%) ( $P < 0,001$ ) y significativamente menores para la ciprofloxacina (26% vs 78%) ( $P < 0,001$ ) (**Tabla 29**).

Entre las 27 cepas O16:H5, 13 (48%) producían CTX-M-14; mientras que ninguna de las cepas O16:H5 resultó positiva para la enzima CTX-M-15. En contraste, 59 (46%) de las cepas O25b:H4-ST131 eran CTX-M-15 ( $P < 0,001$ ) y únicamente 3 (2%) CTX-M-14 ( $P < 0,001$ ). La producción de enzima CTX-M-15 se asoció significativamente con el subclón *H30-Rx* (85% *H30-Rx* vs 0% *H30 no-Rx* vs 0% *H22*) ( $P < 0,001$ ).

El tipo de enzima BLEE variaba significativamente dependiendo del subclón, con el enzima CTX-M-15 claramente asociado al subclón *H30-Rx*. Así, las 286 cepas *H30-Rx* productoras de BLEE eran CTX-M-15 positivas. Cabe destacar que las siete cepas ONT:H4 ST131 eran del subclón *H30-Rx* y que producían CTX-M-15.

**Tabla 28**  
Secuencias tipo del esquema MLST del Instituto Pasteur de cepas ST131 de los serotipos O16:H5 y O25b:H4.

PST	MLST Instituto Pasteur										O16:H5 <i>fimH41</i> (n = 27)	O25b:H4 <i>fimH30</i> (n=23)	O25b:H4 <i>H30-Rx</i> (n=19)	O25b:H4 <i>fimH22</i> (n=18)	Valor P <sup>a</sup> O16:H5 vs O25b:H4
	<i>dinB</i>	<i>icdA</i>	<i>pabB</i>	<i>polB</i>	<i>putP</i>	<i>trpA</i>	<i>trpB</i>	<i>uidA</i>							
506	9	134	74	134	4	72	1	9	25 (93%) <sup>a</sup>	0	0	0	<0,001		
567	9	20	74	134	4	72	1	9	1 (4%)	0	0	0			
625	9	134	74	134	4	162	1	9	1 (4%)	0	0	0			
9 <sup>b</sup>	9	20	15	7	4	9	6	9	0	0	0	4 (22%)			
43	9	1	15	7	4	9	6	9	0	20 (87%)	16 (84%)	13 (72%)	<0,001		
527	9	20	15	7	4	9	6	129	0	0	0	1 (6%)			
621	9	234	15	7	4	9	6	9	0	3 (13%)	3 (16%)	0			

<sup>a</sup> Se muestran únicamente los valores de P < 0,05 (Test exacto de Fisher). Las diferencias significativas se destacan en negrilla.

<sup>b</sup> Una cepa PST9 perteneció al serotipo O25b:H4 y presentó el alelo *fimH324*

**Tabla 29**  
Resistencias y enzimas BLEE de cepas ST131 de los serotipos O16:H5 y O25b:H4.

O16:H5 <i>fimH41</i> (n=27)	O25b:H4 <i>fimH30</i> (n=99)	O25b:H4 H30-Rx (n=68)	O25b:H4 H30 noRx (n=31)	O25b:H4 <i>fimH22</i> (n=20)	Total O25b:H4 (n= 127)	Valor P (b) O16:H5 vs O25b:H4	Valor P (b) <i>fimH30</i> vs <i>fimH22</i>	Valor P <sup>b</sup> H30-Rx vs H30no-Rx
<b>resistencias<sup>a</sup></b>								
CIP	7 (26%)	68 (100%)	29 (94%)	1 (5%)	<b>99 (78%)</b>	<0,001	<0,001	
SXT	14 (52%)	<b>48 (71%)</b>	15 (48%)	8 (40%)	77 (61%)		0,04	0,03
GEN	<b>16 (59%)</b>	9 (13%)	<b>10 (32%)</b>	0	20 (16%)	<0,001	0,02	0,03
TOB	10 (37%)	52 (76%)	2 (6%)	0	56 (44%)		<0,001	<0,001
<b>enzimas BLEE</b>								
CTX-M-1	0	0	0	1 (5%)	1 (0.8%)			
CTX-M-9	0	0	0	1 (5%)	1 (0.8%)			
CTX-M-14	<b>13 (48%)</b>	0	2 (6%)	1 (5%)	3 (2%)	<0,001		
CTX-M-15	0	<b>58 (85%)</b>	0	0	<b>59 (46%)</b>	<0,001	<0,001	<0,001
CTX-M-27	0	1 (1%)	1 (3%)	0	2 (2%)			
SHV-12	0	1 (1%)	1 (3%)	<b>6 (30%)</b>	8 (6%)		<0,001	
TEM-19	1 (4%)	0	0	0	0			

<sup>a</sup> Resistencias: CIP = ciprofloxacina, SXT = trimetoprim/sulfametoxazol, GEN = gentamicina, TOB = tobramicina.

<sup>b</sup> Se muestran únicamente los valores de P < 0,05 (Test exacto de Fisher). Las diferencias significativas se destacan en negrilla



También se encontraron diferentes patrones de resistencias asociados con los distintos alelos *fimH* y subclones en las cepas O25b:H4. Así, las resistencias a la ciprofloxacina, trimetoprim-sulfamethoxazol, gentamicina y tobramicina se asociaron significativamente con las cepas del subclón H30 ( $P < 0,05$  para todas las comparaciones) en comparación con el subclón H22. Las tasas de resistencia también variaban entre los subclones H30-Rx y H30 no-Rx, mostrando las cepas H30-Rx una mayor tasa de resistencia al trimetoprim/sulfamethoxazol ( $P = 0,03$ ) y a la tobramicina ( $P < 0,001$ ). En contraste, las cepas H30 no-Rx mostraron una tasa de resistencia mayor a la gentamicina ( $P = 0,03$ ).

#### 4.2.7 Genes de virulencia de las cepas ST131

Las 27 cepas O16:H5 y un grupo representativo de 127 cepas O25b:H4 se analizaron por PCR para la presencia de 32 genes que codifican para factores de virulencia de ExPEC que causan ITUs, sepsis y meningitis (**Tabla 30**).

De los 32 genes investigados, únicamente el gen *kpsM II-K2* se asoció significativamente con las cepas O16:H5 (70% positivas), mientras que 12 genes de virulencia (*papEF*, *papG II*, *papG III*, *afaFM955459*, *cnf1*, *hlyA*, *iucD*, *iroN*, *kpsM II-K5*, *cvaC*, *iss* e *ibeA*) se asociaron significativamente con las cepas O25b:H4-ST131. No obstante, el gen *kpsM II-K2* también se encontró frecuentemente (44%) entre las cepas O25b:H4 del subclón H30-Rx.

Más de la mitad de las cepas O16:H5 (56%) mostraron el estatus ExPEC, presentando dos o más de los siguientes cinco genes de virulencia: *papEF*, *sfa/focDE*, *afa/draBC*, *iucD* y *kpsM II* (Johnson *et al.* 2003). Sin embargo, el estatus ExPEC fue significativamente más prevalente entre las cepas O25b:H4 (81%) ( $P < 0,01$ ) y especialmente entre las cepas del subclón O25b:H4 H30-Rx (97%). Además, las cepas O25b:H4 exhibieron un mayor número de genes de virulencia (media 8,5 vs 6,4) que las cepas O16:H5. Así, 80 (63%) de las 127 cepas O25b:H4 llevaban al menos ocho de los genes de virulencia investigados vs ninguna de las 27 cepas O16:H5 ( $P < 0,001$ ).

#### 4.2.8 Virotipos de las cepas ST131

En la **Tabla 31** figura el nuevo esquema de virotipado propuesto en base a la presencia o ausencia de los siguientes genes de virulencia: *afa/draBC*, *afaFM955459*, *iroN*, *sat*, *ibeA*, *papG II*, *papG III*, *cnf1*, *hlyA*, *cdtB*, *neuC-K1*, *kpsM II-K2* y *kpsM II-K5*. Dicho esquema incluye 13 virotipos y subtipos. Con respecto al estudio de Blanco y colaboradores (2013), en el que se desarrolla un primer esquema basado en los genes *afaFM955459*, *iroN*, *sat* e *ibeA* y con únicamente cuatro virotipos (A, B, C y D), ahora se proponen tres subtipos del virotipo C (C1, C2 y C3) y cinco subtipos del virotipo D (D1, D2, D3, D4 y D5), y se introducen los nuevos virotipos E, F y G.

**Tabla 30** (parte 1)

Genes de virulencia de cepas ST131 de los serotipos O16:H5 y O25b:H4.

<sup>a</sup> Se muestran únicamente los valores de  $P < 0,05$  (Test exacto de Fisher). Las diferencias significativas se destacan en negrilla.

Genes de virulencia	Factores de virulencia	O16:H5 <i>fimH41</i> (n=227)	O25b:H4 H30 (n=99)	O25b:H4 H30-Rx (n=68)	O25b:H4 H30 no- Rx (n=31)	O25b:H4 <i>fimH22</i> (n=20)	Total O25b:H4 (n=127)	Valor P <sup>a</sup> O16:H5 vs O25b:H4	Valor P <sup>a</sup> <i>fimH30</i> vs <i>fimH22</i>	Valor P <sup>a</sup> H30-Rx vs H30 no-rx
<b>Adhesinas</b>										
<i>fimH</i>	Type 1 fimbriae	27 (100%)	98 (99%)	68 (100%)	30 (97%)	20 (100%)	126 (99%)			
<i>fimA/vMT78</i>	FimA variant MT78 of type 1 fimbriae	0	1 (1%)	0	1 (3%)	0	1 (0.8%)			
<i>papEF</i>	Pilus associated with pyelonephritis (Pap)	0	25 (25%)	<b>24 (35%)</b>	1 (3%)	<b>12 (60%)</b>	<b>44 (35%)</b>	<0,001	0,003	<0,001
<i>papG I</i>	Gal(α1-4) Gal-specific pilus tip adhesin molecule type I	0	0	0	0	0	0			
<i>papG II</i>	Gal(α1-4) Gal-specific pilus tip adhesin molecule type II	0	<b>25 (25%)</b>	<b>24 (35%)</b>	1 (3%)	0	<b>25 (20%)</b>	0,005	0,005	<0,001
<i>papG III</i>	Gal(α1-4) Gal-specific pilus tip adhesin molecule type III	0	0	0	0	<b>12 (60%)</b>	<b>19 (15%)</b>	0,020	<0,001	
<i>papG IV</i>	Gal(α1-4) Gal-specific pilus tip adhesin molecule type IV	0	0	0	0	0	0			
<i>sfa/focDE</i>	Central region of <i>sfa</i> and <i>foc</i> operons	0	0	0	0	0	0			
<i>sfaS</i>	S fimbriae	0	0	0	0	0	0			
<i>focG</i>	F1C fimbriae	0	0	0	0	0	0			
<i>afa/draBC</i>	Dr antigen-specific adhesin operons (AFA, Dr, F1845)	4 (15%)	<b>32 (32%)</b>	<b>30 (44%)</b>	2 (6%)	0	32 (25%)		<0,001	<0,001
<i>afa-</i> <i>FM955459</i>	Operon <i>afa</i> specific for clonal group O25b-ST131	0	<b>30 (30%)</b>	<b>30 (44%)</b>	0	0	<b>29 (23%)</b>	0,002	<0,001	<0,001
<i>bmaE</i>	Blood group M-specific adhesin	0	0	0	0	0	0			
<i>garfD</i>	N-acetyl-D-glucosamine-specific (G, F17c) fimbriae adhesin	0	0	0	0	0	0			
<b>Toxinas</b>										
<i>cnf1</i>	Cytotoxic necrotizing factor type 1	0	13 (13%)	<b>13 (19%)</b>	1 (3%)	<b>10 (50%)</b>	<b>30 (24%)</b>	0,001	<0,001	0,03
<i>cdtB</i>	Cytolethal distending toxin	0	0	0	0	<b>6 (30%)</b>	6 (5%)		<0,001	
<i>sat</i>	Secreted autotransporter toxin	22 (81%)	<b>96 (97%)</b>	66 (97%)	30 (97%)	0	95 (75%)		<0,001	
<i>hlyA</i>	α-hemolysin	0	14 (14%)	<b>13 (19%)</b>	1 (3%)	<b>10 (50%)</b>	<b>30 (37%)</b>	0,002	<0,001	0,03

**Tabla 30** (parte 2)  
Genes de virulencia de cepas ST131 de los serotipos O16:H5 y O25b:H4.

<sup>a</sup>Se muestran únicamente los valores de P < 0,05 (Test exacto de Fisher). Las diferencias significativas se destacan en negrilla.

Genes de virulencia	O16:H5 <i>fimH41</i> (n=27)	O25b:H4 H30 (n=99)	O25b:H4 H30-Rx (n=68)	O25b:H4 H30 no-Rx (n=31)	O25b:H4 <i>fimH22</i> (n=20)	total O25b:H4 (n=127)	Valor P <sup>a</sup> O16:H5 vs O25b:H4	Valor P <sup>a</sup> <i>fimH30</i> vs <i>fimH22</i>	Valor P <sup>a</sup> H30-Rx vs H30 no-Rx
<b>Sideróforos</b>									
<i>iucD</i>	21 (78%)	<b>97 (98%)</b>	68 (100%)	29 (94%)	14 (70%)	<b>118 (93%)</b>	0,03	<0,001	
<i>iroN</i>	0	16 (16%)	13 (19%)	3 (10%)	<b>19 (95%)</b>	<b>43 (34%)</b>	<0,001	<0,001	
<b>Cápsula</b>									
<i>kpsM II</i>	20 (74%)	78 (79%)	<b>66 (97%)</b>	12 (39%)	<b>20 (100%)</b>	110 (87%)		0,1	<0,001
<i>kpsM II-K2</i>	<b>19 (70%)</b>	<b>30 (30%)</b>	<b>30 (44%)</b>	0	0	31 (35%)	<0,001	<0,001	<0,001
<i>kpsM II-K5</i>	1 (4%)	48 (48%)	36 (53%)	12 (39%)	<b>15 (75%)</b>	<b>74 (58%)</b>	<0,001	0,03	
<i>neuC-K1</i>	0	0	0	0	<b>5 (25%)</b>	5 (4%)		<0,001	
<i>kpsM III</i>	0	0	0	0	0	0			
<b>Otros</b>									
<i>cvaC</i>	0	3 (3%)	1	2 (6%)	<b>15 (75%)</b>	<b>25 (20%)</b>	0,005	<0,001	
<i>iss</i>	0	17 (17%)	14 (21%)	3 (10%)	<b>18 (90%)</b>	<b>42 (33%)</b>	<0,001	<0,001	
<i>traT</i>	24 (89%)	77 (78%)	49 (72%)	<b>28 (90%)</b>	18 (90%)	103 (81%)			0,03
<i>ibeA</i>	0	0	0	0	<b>20 (100%)</b>	<b>27 (21%)</b>	0,003	<0,001	
<i>malX (PAI)</i>	27 (100%)	98 (99%)	68 (100%)	30 (97%)	20 (100%)	126 (99%)			
<i>usp</i>	27 (100%)	99 (100%)	68 (100%)	31 (100%)	20 (100%)	127 (100%)			
<i>tsh</i>	0	0	0	0	<b>3 (15%)</b>	3 (2%)		0,04	
<b>Estatus ExPEC</b>	15 (56%)	79 (80%)	<b>66 (97%)</b>	13 (42%)	15 (75%)	<b>103 (81%)</b>	0,006	<0,001	<0,001
<b>Cepas con ≥8 genes virulencia</b>	0	55 (56%)	<b>50 (74%)</b>	5 (16%)	<b>20 (100%)</b>	<b>80 (63%)</b>	<0,001	<0,001	<0,001
<b>Media</b>	6.4	7.7	8.3	6.6	11.2	8.5			
<b>Rango</b>	5-8	4-10	6-10	4-10	8-13	4-13			

El virotipo C1 se observó exclusivamente entre las cepas del serotipo O16:H5 mientras que los virotipos B, C2, D1, D2, D3, D4, D5, E, F y G se encontraron exclusivamente entre las cepas del serotipo O25b:H4. Destacar, que 14 (52%) de las 27 cepas O16:H5-ST131 mostraron el virotipo C1 vs ninguna de las cepas O25b:H4-ST131 ( $P < 0,001$ ). En contraste, el segundo virotipo (C3) más frecuentemente detectado entre las cepas O16:H5-ST131 (26%) fue también detectado con una frecuencia significativa entre las cepas O25b:H4-ST131 (12%).

También resaltar, que 30 de las 31 cepas del virotipo A, 14 de las 17 cepas del virotipo B, 13 de las 14 cepas del virotipo E, y las 11 cepas de los virotipos F y G, pertenecían al subclón *H30-Rx*. Los virotipos A, B, E, F y G se detectaron en el 44%, 21%, 19% y 10% de las cepas *H30-Rx*, respectivamente. En contraste, la mayoría de las cepas *H30 no-Rx* eran de los virotipos C2 (39%) y C3 (45%). Las diferencias observadas en la prevalencia de estos virotipos entre los subclones *H30-Rx* y *H30 no-Rx* tenían significación estadística en todos los casos mencionados (**Tabla 31**). Las 20 cepas con el alelo *fimH22* pertenecían a los virotipos D1, D2, D4 y D5. Entre las cepas del ESTUDIO III de esta Tesis Doctoral también se describen dos aislados *fimH22* del virotipo D3. Por lo tanto el alelo *fimH22* se detectó únicamente entre cepas del virotipo D y subtipos del mismo.

#### 4.2.9 Pulsotipos (PFGE) de las cepas ST131

Se observó una notable diversidad genética entre las 27 cepas O16:H5-ST131 del presente estudio, ya que se identificaron 25 perfiles diferentes mediante PFGE. El dendrograma de la **Figura 44** donde se comparan los perfiles de macrorestricción generados por el enzima XbaI de las 27 cepas O16:H5-ST131 muestra una similitud de únicamente un 68,4%. Las cepas O16:H5-ST131 se distribuyen en cuatro grupos (I a IV) con identidades del 94,1%, 79,7%, 82,5% y 81%, respectivamente. Destacar, que seis de las siete cepas O16:H5-ST131 resistentes a la ciprofloxacina del virotipo C3 permanecieron juntas en el grupo IV.

La **Figura 45** muestra los perfiles de macrorestricción de PFGE de las 157 cepas ST131 analizadas. Las cepas de los serotipos O16:H5 y O25b:H4 se distribuyen separadamente. El dendrograma de PFGE- XbaI reveló siete clusters principales (I a VII) agrupándose las cepas que compartían el virotipo, el alelo *fimH* y el estatus *H30-Rx*, lo que sugiere una base clonal para los virotipos. Así, el cluster I agrupa 27 cepas O25b:H4, 25 cepas *fimH22* (o derivados mutacionales del alelo *fimH22*) de los virotipos D1, D2, D4 o D5. El cluster II incluye 11 cepas O25b:H4 *H30-Rx* del virotipo E. El cluster III cinco cepas O25b:H4 *H30-Rx* del virotipo F. El cluster IV 13 cepas O25b:H4 *H30-Rx* del virotipo B. El cluster V 34 cepas O25b:H4 *fimH30* (y el derivado mutacional *fimH381*), 25 cepas de los virotipos C2 y C3 y siete cepas del subclón *H30-Rx*. El cluster VI, 28 cepas O25b:H4 *H30-Rx* del virotipo A. Por último, el cluster VII incluye 27 cepas O16:H5 *fimH41*, 21 de las cuales pertenecen a los virotipos C1 y C3.

**Tabla 31** Nuevo esquema de virotipado de *E. coli* ST131 y distribución de virotipos entre cepas de los serotipos O16:H5 y O25b:H4.

Virotipo	<i>afa/draBC</i>	Operón <i>afa</i> FM955459	<i>iroN</i>	<i>sat</i>	<i>ibeA</i>	<i>papGII</i>	<i>papGIII</i>	<i>cnf1</i>	<i>hlyA</i>	<i>cdtB</i>	<i>neuC-K1</i>	<i>kpsM II-K2</i>	<i>kpsM II-K5</i>	O16:H5 <i>fimH41</i> (n=27)	O25b:H4 <i>fimH30</i> (n=99)	O25b:H4 H30-Rx (n=68)	O25b:H4 H30 No-Rx (n=31)	O25b:H4 <i>fimH22</i> (n=20)	O25b:H4 Total (n=127)	Valor Pc O16:H5 vs O25b:H4	Valor Pc <i>fimH30</i> vs <i>fimH22</i>	Valor Pc H30Rx vs H30 no-Rx
A	+	+	-	+/- <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	1 (4%)	30 (30%)	30 (44%)	0	0	30 (24%)	0,01	0,001	<0,001
B	-	-	+	+/- <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	0	10 (10%)	10 (15%)	3 (10%)	0	13 (10%)			
C1	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	14 (52%)	0	0	0	0	0	<0,001		
C2	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0	15 (15%)	3 (4%)	12 (39%)	0	15 (12%)	0,047		<0,001
C3	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7 (26%)	15 (9%)	1 (1%)	14 (45%)	0	15 (12%)			<0,001
D1	-	-	+/-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	0	0	0	0	3 (15%)	3 (2%)		0,004	
D2	-	-	+/-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	0	0	0	0	2 (10%)	3 (2%)			
D3	+/- <sup>c</sup>	+/- <sup>c</sup>	+/-	+/- <sup>b</sup>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	0	0	0	0	0	0			
D4	-	-	+/-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	0	0	0	0	5 (25%)	5 (4%)		<0,001	
D5	-	-	+/-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	0	0	0	0	10 (50%)	16 (13%)	0,04	<0,001	
E	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	0	14 (14%)	13 (19%)	1 (3%)	0	14 (11%)			0,03
F	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0	7 (7%)	7 (10%)	0	0	7 (6%)			
G	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0	4 (4%)	4 (6%)	0	0	4 (3%)			
NT														5	1	0	1	0	2			

NOTA: Un total de cinco cepas del serotipo O16:H5 y dos del serotipo O25b:H4 no se pudieron clasificar en los 13 virotipos definidos.

Resultados positivos y negativos obtenidos por PCR para los genes *afa/draBC* (*Afa/Dr* adhesins), *afa* operon FM955459, *iroN* (catecholase siderophore receptor), *sat* (secreted autotransporter toxin), *ibeA* (invasion of brain endothelium), *papG III* (allele II of *papG* gene), *papG II* (allele I of *papG* gene), *cnf1* (cytotoxic necrotizing factor type 1), *hlyA* (alpha-hemolysin), *cdtB* (cytolethal distending toxin), *neuC-K1* (K1 variant of group II capsule), *kpsM II K2* (K2 variant of group II capsule) and *kpsM II K5* (K5 variant of group II capsule).

<sup>a</sup> La mayoría de las cepas de los virotipos A (97%) y B (75%) son *sat*-positivas.

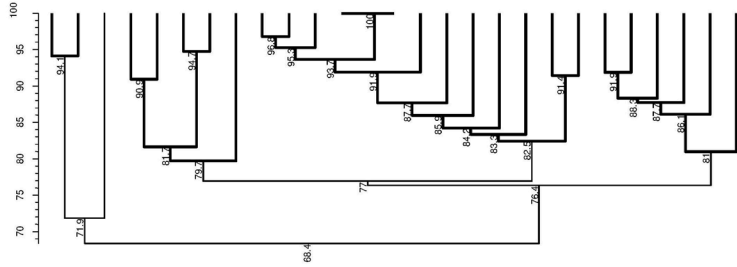
<sup>b</sup> Las cepas del virotipo D3 llevan los genes *sat* y *afa/draBC*, o al menos uno de estos dos genes. Además, algunas cepas *afa/draBC* también amplifican para el alelo *afa* operon FM955459.

<sup>c</sup> Se muestran únicamente los valores de  $P < 0,05$  (test exacto de Fisher). Las diferencias significativas se destacan en negrilla



Dice (1 of 1.0% - 1.0%) (H=0.0% S=0.0%) [0.0% - 100.0%]  
 PFGE-XbaI

PFGE-XbaI

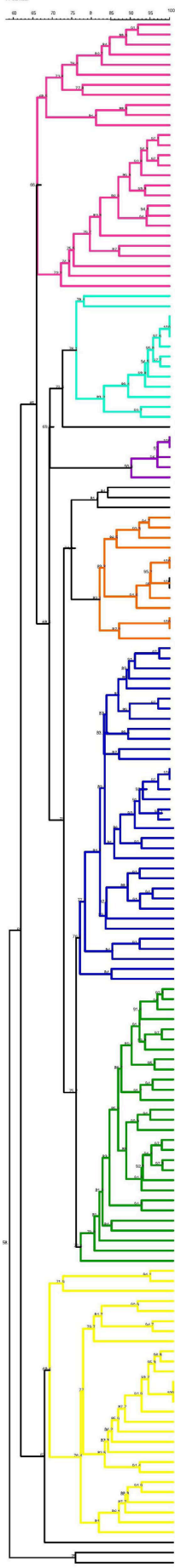


Strain	Year	Location	Genotype	Genotype
100 LU	2009	Lugo	PST506	NAL SXT GEN
H3050	2010	Lugo	PST506	NAL
H1760	2005	Lugo	PST506	AMC
138 LU	2009	Lugo	PST506	NAL GEN
79 BA	2009	Barcelona	PST506	NAL
FV 12953	2009	Madrid	CTX-M-14	NAL SXT GEN TOB
FV 13692	2009	Madrid	CTX-M-14	NAL SXT GEN TOB
92 MA	2009	Madrid	PST506	NAL SXT GEN TOB
FV 12680	2009	Santander	TEM-19	NAL SXT GEN TOB
FV 13695	2009	Madrid	CTX-M-14	NAL SXT GEN
FV 13873	2009	Barcelona	CTX-M-14	NAL SXT GEN
81 BA	2009	Barcelona	PST506	NAL
FV 13998	2009	Lugo	CTX-M-14	NAL FOF
H3028	2010	Lugo	PST506	NAL GEN
18 MA	2009	Madrid	PST506	NAL SXT GEN TOB
H3011	2010	Lugo	PST506	NAL SXT GEN
19 SA	2009	Santander	PST506	NAL
60 SA	2009	Santander	PST506	SXT
FV 13888	2009	Barcelona	CTX-M-14	NAL CIP SXT GEN TOB
FV 13864	2009	Barcelona	CTX-M-14	NAL CIP SXT GEN TOB
FV 17599	2012	Lugo	CTX-M-14	NAL CIP SXT GEN TOB
FV 13152	2009	Lugo	CTX-M-14	NAL CIP SXT GEN TOB
FV 13956	2009	Lugo	CTX-M-14	NAL CIP SXT GEN TOB
FV 13652	2009	Madrid	CTX-M-14	NAL CIP SXT GEN TOB
H2623	2009	Lugo	PST567	NAL CIP
H2942	2010	Lugo	CTX-M-14	NAL CIP GEN TOB
FV 17598	2012	Lugo	CTX-M-14	NAL CIP SXT GEN TOB

**Figura 44**

Dendrograma generado con los perfiles de macrorestricción (pulsotipos) obtenidos por PFGE empleando la enzima XbaI de las 27 cepas O16:H5-ST131. Se indica el código de la cepa, la secuencia tipo del esquema del Instituto Pasteur, el tipo de enzima BLEE, el año de aislamiento, la ciudad, el virotipo, los genes de virulencia, las resistencias, y el grupo/cluster. NAL, ácido nalidixico; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina, FOF, fosfomicina; AMC, amoxicilina-ácido clavulánico. No se indican las resistencias a los antibióticos β-lactámicos con la excepción de la AMC. El dendrograma se obtuvo con el algoritmo UPGMA basado en el coeficiente de similitud DICE y aplicando un nivel de tolerancia del 1% para la posición de la banda

PFGE-hbaI



Strain ID	Accession	Host	Year	Location	Genotype	Notes
19 BA	O25b:H4	D2	2009	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
95 LU	O25b:H4	D1	2009	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
100 LU	O25b:H4	D1	2009	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
92 BA	O25b:H4	D1	2009	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
122 LU	O25b:H4	D1	2009	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
30 SE	O25b:H4	D2	2009	Sevilla	hbaI::p20	hbaI::p20
71 BA	O25b:H4	D1	2009	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
48 SA	O25b:H4	C2	2009	Santander	hbaI::p20	hbaI::p20
100BA	O25b:H4	D4	2009	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
83 BA	O25b:H4	D4	2008	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
81 BA	O25b:H4	D1	2008	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
63 BA	O25b:H4	D5	2008	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
68 BA	O25b:H4	D5	2008	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
36 BA	O25b:H4	D5	2008	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
52 BA	O25b:H4	D5	2008	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
61 BA	O25b:H4	D5	2008	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
62 BA	O25b:H4	D5	2008	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 12073	O25b:H4	D5	2008	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
28 MA	O25b:H4	D5	2009	Madrid	hbaI::p20	hbaI::p20
8 MA	O25b:H4	D5	2009	Madrid	hbaI::p20	hbaI::p20
143 LU	O25b:H4	D5	2009	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
84 MA	O25b:H4	D5	2009	Madrid	hbaI::p20	hbaI::p20
18 SE	O25b:H4	D5	2009	Sevilla	hbaI::p20	hbaI::p20
54 SA	O25b:H4	D5	2009	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
34 BA	O25b:H4	D5	2009	Santander	hbaI::p20	hbaI::p20
26 SE	O25b:H4	D5	2009	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
169 LU	O25b:H4	D5	2009	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
10 BA	O25b:H4	D4	2008	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 17616	O25b:H4	D4	2012	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 17543	O25b:H4	E	2012	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 17563	O25b:H4	E	2012	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 17604	O25b:H4	E	2012	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 17544	O25b:H4	E	2012	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 17548	O25b:H4	E	2012	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 17561	O25b:H4	E	2012	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 17601	O25b:H4	E	2012	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 17590	O25b:H4	E	2012	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 17526	O25b:H4	E	2012	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 17578	O25b:H4	E	2012	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 17621	O25b:H4	E	2012	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
81 MA	O25b:H4	C2	2009	Madrid	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 17568	O25b:H4	F	2012	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 17613	O25b:H4	F	2012	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 17605	O25b:H4	F	2012	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 17628	O25b:H4	F	2012	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 17620	O25b:H4	F	2012	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
132 LU	O25b:H4	G2	2009	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 17588	O25b:H4	E	2012	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
5 MA	O25b:H4	B	2008	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
29 BA	O25b:H4	B	2008	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
82 BA	O25b:H4	B	2008	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
96 BA	O25b:H4	B	2008	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 17555	O25b:H4	B	2012	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
43 BA	O25b:H4	B	2008	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
89 BA	O25b:H4	B	2008	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
36 BA	O25b:H4	B	2008	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
4 BA	O25b:H4	B	2008	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
31 BA	O25b:H4	B	2008	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
96 BA	O25b:H4	B	2008	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
628 MA	O25b:H4	B	2009	Madrid	hbaI::p20	hbaI::p20
77 MA	O25b:H4	B	2009	Madrid	hbaI::p20	hbaI::p20
85 MA	O25b:H4	B	2009	Madrid	hbaI::p20	hbaI::p20
29 MA	O25b:H4	C5	2009	Madrid	hbaI::p20	hbaI::p20
87 MA	O25b:H4	C3	2009	Madrid	hbaI::p20	hbaI::p20
113 LU	O25b:H4	C3	2009	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
42 MA	O25b:H4	C3	2009	Madrid	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 17562	O25b:H4	A	2012	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
69 SE	O25b:H4	VT	2009	Sevilla	hbaI::p20	hbaI::p20
71 SE	O25b:H4	C3	2009	Sevilla	hbaI::p20	hbaI::p20
88 BA	O25b:H4	B	2008	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
18 BA	O25b:H4	C3	2009	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
95 SA	O25b:H4	A	2009	Santander	hbaI::p20	hbaI::p20
32 MA	O25b:H4	C3	2009	Madrid	hbaI::p20	hbaI::p20
49 BA	O25b:H4	C3	2009	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
2 BA	O25b:H4	C3	2009	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
20 SE	O25b:H4	C2	2009	Sevilla	hbaI::p20	hbaI::p20
65 SA	O25b:H4	C2	2009	Santander	hbaI::p20	hbaI::p20
61 BA	O25b:H4	B	2009	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
11 BA	O25b:H4	C2	2009	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
40 SA	O25b:H4	C2	2009	Santander	hbaI::p20	hbaI::p20
66 BA	O25b:H4	C2	2009	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
47 BA	O25b:H4	NT	2008	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 17580	O25b:H4	F	2012	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 17591	O25b:H4	C2	2009	Santander	hbaI::p20	hbaI::p20
16 SA	O25b:H4	C3	2009	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
50 BA	O25b:H4	B	2009	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
43 BA	O25b:H4	B	2009	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
74 SA	O25b:H4	C3	2009	Santander	hbaI::p20	hbaI::p20
78 BA	O25b:H4	C3	2009	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
68 SE	O25b:H4	C3	2009	Sevilla	hbaI::p20	hbaI::p20
15 MA	O25b:H4	C1	2009	Madrid	hbaI::p20	hbaI::p20
57 SA	O25b:H4	C2	2009	Santander	hbaI::p20	hbaI::p20
7 MA	O25b:H4	C2	2009	Madrid	hbaI::p20	hbaI::p20
24 BA	O25b:H4	C2	2009	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
43 SA	O25b:H4	C2	2009	Santander	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 17597	O25b:H4	C2	2012	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
46 SE	O25b:H4	A	2009	Sevilla	hbaI::p20	hbaI::p20
75 BA	O25b:H4	A	2008	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
97 BA	O25b:H4	A	2008	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
45 BA	O25b:H4	A	2008	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
7 BA	O25b:H4	A	2008	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
85 BA	O25b:H4	A	2008	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
57 BA	O25b:H4	A	2008	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 17560	O25b:H4	A	2012	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 17611	O25b:H4	A	2012	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
26 BA	O25b:H4	A	2008	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 17623	O25b:H4	A	2012	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
13 BA	O25b:H4	A	2008	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
167 LU	O25b:H4	A	2009	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 17584	O25b:H4	A	2012	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
32 BA	O25b:H4	A	2008	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 17536	O25b:H4	A	2012	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 17595	O25b:H4	A	2012	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 17567	O25b:H4	A	2012	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 17575	O25b:H4	A	2012	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 17568	O25b:H4	A	2012	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 17607	O25b:H4	A	2012	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 17534	O25b:H4	A	2012	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 17564	O25b:H4	A	2012	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
57 SE	O25b:H4	A	2009	Sevilla	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 17546	O25b:H4	A	2012	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 17592	O25b:H4	A	2012	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
99 SE	O25b:H4	A	2009	Sevilla	hbaI::p20	hbaI::p20
38 BA	O25b:H4	A	2008	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
100 LU	O16:H5	C1	2009	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
H050	O16:H5	NT	2010	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
H170	O16:H5	NT	2008	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
138 LU	O16:H5	NT	2009	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
79 BA	O16:H5	B	2008	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 12663	O16:H5	C1	2009	Madrid	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 13692	O16:H5	C1	2009	Madrid	hbaI::p20	hbaI::p20
92 MA	O16:H5	NT	2008	Madrid	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 13090	O16:H5	C1	2009	Santander	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 13095	O16:H5	C1	2009	Madrid	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 13073	O16:H5	C1	2009	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
81 BA	O16:H5	NT	2008	Madrid	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 13996	O16:H5	C1	2009	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
H028	O16:H5	C1	2010	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
18 MA	O16:H5	C1	2009	Madrid	hbaI::p20	hbaI::p20
H011	O16:H5	C1	2009	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
19 SA	O16:H5	C1	2009	Santander	hbaI::p20	hbaI::p20
60 SA	O16:H5	A	2009	Santander	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 13988	O16:H5	C1	2009	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 13964	O16:H5	VT	2009	Barcelona	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 17539	O16:H5	C3	2012	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 13152	O16:H5	C3	2009	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 13956	O16:H5	C3	2009	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 13652	O16:H5	C3	2009	Madrid	hbaI::p20	hbaI::p20
H023	O16:H5	C3	2009	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
H042	O16:H5	C3	2010	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 17598	O25b:H4	E	2012	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
FV 17573	O25b:H4	E	2012	Lugo	hbaI::p20	hbaI::p20
26 MA	O25b:H4	E	2009	Madrid	hbaI::p20	hbaI::p20
95 SE	O25b:H4	E	2009	Sevilla	hbaI::p20	hbaI::p20

H30-Fix

I

II

III

IV

V

VI

VII

#### Figura 45 (página anterior)

Dendrograma generado con los perfiles de macrorrestricción (pulsotipos) obtenidos por PFGE empleando el enzima XbaI de 154 cepas ST131: 27 del serotipo O16:H5 y 127 del serotipo O25b:H4. Se indica el código de la cepa, el serotipo, el virotipo, el tipo de enzima BLEE, el año de aislamiento, la ciudad, los genes de virulencia, las resistencias, y el subclón H30-Rx. NAL, ácido nalidixico; CIP, ciprofloxacina; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina, FOF, fosfomicina; AMC, amoxicilina-ácido clavulánico. No se indican las resistencias a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos con la excepción la AMC. El dendrograma se obtuvo con el algoritmo UPGMA basado en el coeficiente de similitud DICE y aplicando un nivel de tolerancia del 1% para la posición de la banda.

Figura incluida en la copia de CD para una mejor visualización.

## 4.3 Estudio III

### Virulencia de cepas de *E. coli* ST131 O16:H5 y O25b:H4 pertenecientes a diferentes virotipos y subclones en un modelo de sepsis murino.

*Virulence patterns in a murine sepsis model of ST131 Escherichia coli clinical isolates belonging to serotypes O25b:H4 and O16:H5 are associated to specific virotypes. (2014)*

Mora A, Dahbi G, López C, Mamani R, Marzoa J, Dion S, Picard B, Blanco M, Alonso MP, Denamur E, Blanco J. PLoS One 30;9(1):e87025.

*Molecular epidemiology and virulence of Escherichia coli O16:H5-ST131: Comparison with H30 and H30-Rx subclones of O25b:H4-ST131.(2014)*

Dahbi G, Mora A, Mamani R, López C, Alonso MP, Marzoa J, Blanco M, Herrera A, Viso S, García-Garrote F, Tchesnokova V, Billig M, de la Cruz F, de Toro M, González-López JJ, Prats G, Chaves F, Martínez-Martínez L, López-Cerezo L, Denamur E, Blanco J. Int J Med Microbiol 304(8):1247-57.

#### 4.3.1 Cepas investigadas

Se seleccionaron un total de 36 cepas de *E. coli* del grupo clonal ST131 aisladas de pacientes con infecciones extraintestinales en diferentes hospitales españoles entre los años 2005 y 2012. La selección se realizó entre más de 700 cepas ST131 siguiendo como criterio que estuviesen representados los virotipos A, B, C1, C2, C3, D1, D2, D3, D4, D5, E, F y G, los subclones H22, H30 y H41, y los serotipos O25b:H4 y O16:H5.

Entre las 36 cepas seleccionadas, se incluyeron 26 del serotipo O25b:H4 (14 del subclón H30-Rx, 11 del subclón H22 y una del subclón H27) y 10 del serotipo O16:H5 y del subclón H41. Un total de 24 de las 36 cepas ST131 seleccionadas eran productoras de BLEE (Tabla 32).



### 4.3.2 Análisis realizados

Se investigó la virulencia *in vivo* de las cepas ST131 seleccionadas en un modelo de sepsis murino. Para ello se registró el estado clínico de los animales y se determinó el número total de ratones que murieron durante los siete días del ensayo.

Las cepas fueron clasificadas como:

- Rápidamente letales, si morían  $\geq 50\%$  de los ratones en  $\leq 24$  h.
- Altamente letales, si morían  $\geq 90\%$  de los ratones en los siete días.
- Letales, si al menos morían el 50% de los ratones en los siete días.

### 4.3.3 Virulencia *in vivo*

De las 36 cepas ST131 ensayadas, 7 (19%) fueron rápidamente letales, 21 (58%) altamente letales y 27 (75%) mataron al menos el 50% de los ratones inoculados; no observándose diferencias entre las cepas de los serotipos O25b:H4 y O16:H5 (**Tabla 33**). No obstante, al analizar los subclones se apreció una asociación de la rapidez en la letalidad con las cepas del subclón H30-Rx y especialmente con el virotipo A, y los genes *afaFM955459*, *sat* y *kpsMIII-K2* (**Tabla 34**).

Destacar que las dos cepas que presentaron el mayor número de genes de virulencia (13 genes) únicamente presentaron una letalidad del 50%, mientras que una cepa con únicamente cinco genes de virulencia presentó una letalidad del 100%, dos cepas que tenían seis genes una letalidad del 90% y cuatro cepas que tenían únicamente siete genes de virulencia una letalidad del 100% (**Tabla 32**).

Llama la atención la baja virulencia *in vivo* de las cepas O25b:H4 H30-Rx del virotipo E, especialmente si se compara con la elevada virulencia de las cepas O25b:H4 H30-Rx del virotipo F, ya que las cepas de ambos virotipos comparten ocho de los genes de virulencia y las del virotipo E portan adicionalmente los genes *cnf1* y *hlyA*.

Tabla 32 (página siguiente)

<sup>a</sup> Número de ratones muertos en 24 h postinfección. Las cepas se clasificaron como rápidamente letales si la letalidad era  $\geq 50\%$  en  $\leq 24$  h.

<sup>b</sup> Número de ratones muertos en 25-48 h postinfección.

<sup>c</sup> Número total de ratones que murieron durante los 7 días del experimento.

<sup>d</sup> Número total de ratones que murieron durante los 7 días del experimento (Letalidad final) + número de ratones que sobrevivieron pero con lesiones (inflamación aguda en la región de inoculación).

<sup>e</sup> Estatus ExPEC definido por la presencia de  $\geq 2$  de los siguientes genes: *papEF*, *sfa/focDE*, *afa/draBC*, *iucD* y *kpsM II*.

**TABLA 32** (parte 1)  
Serotipos, genes de virulencia, subclones, enzimas BLEE y resultados de letalidad y lesiones de las 36 cepas ST131 ensayadas en el modelo de sepsis murino.

Cepa código	Serotipo	Virotipo	PST	Letalidad <sup>a</sup> ≤24h	Letalidad <sup>b</sup> 25h-48h	Letalidad Final <sup>c</sup>	Letalidad Final + lesiones <sup>d</sup>	Combinación de genes de virulencia (número de genes)	Estatus ExPEC	Subclón	BLEE
FV 9873	O25b:H4	A	43	10	0	10	10	<i>fimH30, afa/draBC, afaFM955459, sat, iucD, kpsM II-K2, traT, malX, usp (8)</i>	+	H30-Rx	CTX-M-15
FV 7563	O25b:H4	A	43	10	0	10	10	<i>fimH30, afa/draBC, afaFM955459, sat, iucD, kpsM II-K2, traT, malX, usp (8)</i>	+	H30-Rx	CTX-M-15
35 BA	O25b:H4	B	43	2	5	10	10	<i>fimH30, sat, iucD, iron, kpsM II-K5, iss, traT, malX, usp (9)</i>	+	H30-Rx	CTX-M-15
25.27	O25b:H4	B	43	10	0	10	10	<i>fimH30, sat, iucD, iron, kpsM II-K5, iss, malX, usp (8)</i>	+	H30-Rx	CTX-M-15
20.22	O25b:H4	C2	43	10	0	10	10	<i>fimH30, sat, iucD, kpsM II-K5, traT, malX, usp (7)</i>	+	H30-Rx	CTX-M-14
45.09	O25b:H4	C2	43	4	4	10	10	<i>fimH30, sat, iucD, kpsM II-K5, traT, malX, usp (7)</i>	+	H30-Rx	CTX-M-15
28.65	O25b:H4	D1	43	2	8	10	10	<i>fimH22, cdtB, iucD, kpsM II-K5, iss, traT, ibeA, malX, usp (9)</i>	+	H22	CTX-M-14
H1447	O25b:H4	D1	43	3	6	9	9	<i>fimH22, cdtB, iucD, kpsM II-K5, iss, traT, ibeA, malX, usp (9)</i>	+	H22	-
FV 11171	O25b:H4	D2	43	0	0	4	9	<i>fimH22, papEF, papG III, cdtB, iucD, iron, kpsM II-K5, cvaC, iss, traT, ibeA, malX, usp (12)</i>	+	H22	CTX-M-9
H2525	O25b:H4	D2	43	2	8	10	10	<i>fimH22, papEF, papG III, cdtB, iucD, iron, kpsM II-K5, cvaC, iss, traT, ibeA, malX, usp (12)</i>	+	H22	-
H1659	O25b:H4	D3	43	0	3	6	7	<i>fimH22, afa/draBC, afaFM955459, sat, iucD, kpsM II-K5, traT, ibeA, malX, usp (9)</i>	+	H22	-
H2341	O25b:H4	D3	43	0	1	2	4	<i>fimH22, sat, iucD, kpsM II-K5, traT, ibeA, malX, usp (8)</i>	+	H22	-
FV 14025	O25b:H4	D4	9	3	7	10	10	<i>fimH22, iucD, iron, kpsM II-K1, cvaC, iss, traT, ibeA, malX, usp, tsh (11)</i>	+	H22	CTX-M-9
83 BA	O25b:H4	D4	9	0	0	1	8	<i>fimH22, iron, kpsM II-K1, iss, traT, ibeA, malX, usp (8)</i>	-	H22	SHV-12
FV 17616	O25b:H4	D4	527	5	4	9	9	<i>fimH22, iucD, iron, kpsM II-K1, cvaC, iss, traT, ibeA, malX, usp (10)</i>	+	H22	CTX-M-1
61 BA	O25b:H4	D5	9	4	1	5	5	<i>fimH324, papEF, papG III, cnf1, hlyA, iucD, iron, kpsM II-K5, cvaC, iss, traT, ibeA, malX, usp (13)</i>	+	H22	SHV-12
50 BA	O25b:H4	D5	9	0	0	5	5	<i>fimH22, papEF, papG III, cnf1, hlyA, iucD, iron, kpsM II-K5, cvaC, iss, traT, ibeA, malX, usp (13)</i>	+	H22	CTX-M-14



**TABLA 32** (parte 2)  
 Serotipos, genes de virulencia, subclones, enzimas BLEE y resultados de letalidad y lesiones de las 36 cepas ST131 ensayadas en el modelo de sepsis murino.

Cepa código	Serotipo	Virotipo	PST	Letalidad <sup>a</sup> ≤24h	Letalidad <sup>b</sup> 25h-48h	Letalidad Final <sup>c</sup>	Letalidad Final + lesiones <sup>d</sup>	Combinación de genes de virulencia (número de genes)	Estatus ExPEC	Subclón	BLEE
FV17578	O25b:H4	E	621	0	1	4	10	<i>fimH30, papEF, papG II, sat, cnf1, hlyA, iucD, kpsM II-K5</i> , traT, maIX, usp (10)	+	H30-Rx	CTX-M-15
FV17543	O25b:H4	E	621	0	1	1	10	<i>fimH30, papEF, papG II, sat, cnf1, hlyA, iucD, kpsM II-K5</i> , traT, maIX, usp (10)	+	H30-Rx	CTX-M-15
FV17588	O25b:H4	E	43	0	0	0	10	<i>fimH30, papEF, papG II, sat, cnf1, hlyA, iucD, kpsM II-K5</i> , traT, maIX, usp (10)	+	H30-Rx	CTX-M-15
FV17568	O25b:H4	F	43	2	6	8	10	<i>fimH30, papEF, papG II, sat, iucD, kpsM II-K5</i> , traT, maIX, usp (8)	+	H30-Rx	CTX-M-15
FV17620	O25b:H4	F	43	0	9	10	10	<i>fimH30, papEF, papG II, sat, iucD, kpsM II-K5</i> , traT, maIX, usp (8)	+	H30-Rx	CTX-M-15
FV17580	O25b:H4	F	43	10	0	10	10	<i>fimH30, papEF, papG II, sat, iucD, kpsM II-K5</i> , traT, maIX, usp (8)	+	H30-Rx	CTX-M-15
FV17555	O25b:H4	G	43	0	10	10	10	<i>fimH30, papEF, papG II, sat, iucD, iron, kpsM II-K5</i> , iss, traT, maIX, usp (10)	+	H30-Rx	CTX-M-15
82BA	O25b:H4	G	43	0	0	0	7	<i>fimH30, papEF, papG II, sat, iucD, iron, kpsM II-K5</i> , iss, traT, maIX, usp (10)	+	H30-Rx	CTX-M-15
H3300	O25b:H4	NT	43	0	7	10	10	<i>fimH27, papEF, papG II, afa/draBC, afaFM955459, sat, hlyA, iucD, kpsM II-K5</i> , traT, maIX, usp (10)	+	H27	-
60SA	O16:H5	A	506	10	0	10	10	<i>fimH41, afa/draBC, afaFM955459, sat, iucD, kpsM II-K2</i> , traT, maIX, usp (8)	+	H41	-
FV13998	O16:H5	C1	506	3	7	10	10	<i>fimH41, sat, iucD, kpsM II-K2</i> , traT, maIX, usp (7)	+	H41	CTX-M-14
138LU	O16:H5	C1	506	9	1	10	10	<i>fimH41, sat, iucD, kpsM II-K2</i> , traT, maIX, usp (7)	+	H41	-
19SA	O16:H5	C1	506	1	5	7	10	<i>fimH41, afa/draBC, sat, iucD, kpsM II-K2</i> , traT, maIX, usp (8)	+	H41	-
FV17539	O16:H5	C3	625	0	5	9	10	<i>fimH41, sat, iucD</i> , traT, maIX, usp (6)	-	H41	CTX-M-14
FV17598	O16:H5	C3	506	0	5	9	10	<i>fimH41, sat, iucD</i> , traT, maIX, usp (6)	-	H41	CTX-M-14
H2623	O16:H5	C3	567	0	8	8	10	<i>fimH41, sat, iucD</i> , traT, maIX, usp (6)	-	H41	-
H3050	O16:H5	NT	506	0	0	0	10	<i>fimH41, afa/draBC, kpsM II-K2</i> , traT, maIX, usp (6)	+	H41	-
H1760	O16:H5	NT	506	0	0	0	10	<i>fimH41, kpsM II-K5</i> , traT, maIX, usp (5)	-	H41	-
92MA	O16:H5	NT	506	0	9	10	10	<i>fimH41, kpsM II-K2</i> , traT, maIX, usp (5)	-	H41	-

**Tabla 33**

Relación entre la virulencia en el modelo de sepsis murino y los serotipos, subclones, virotipos y genes de virulencia de las cepas ST131

Características	Número de cepas ensayadas	Rápidamente letales ≤24h≥5 muertes	Altamente letales ≥9 muertes	Total letales ≥5 muertes
Total ST131	36	7 (19%)	<b>21 (58%)</b>	27 (75%)
<b>Serotipos</b>				
O25b:H4	26	5 (19%)	<b>15 (58%)</b>	19 (73%)
O16:H5	10	2 (20%)	<b>6 (60%)</b>	8 (80%)
<b>Subclones</b>				
H30-Rx	14	<b>5 (36%)</b>	<b>9 (64%)</b>	10 (71%)
H22	11	0	5 (45%)	8 (73%)
H27	1	0	<b>1 (100%)</b>	1 (100%)
H41	10	<b>2 (20%)</b>	<b>6 (60%)</b>	8 (80%)
<b>Viotipos</b>				
A	3	<b>3 (100%)</b>	<b>3 (100%)</b>	3 (100%)
B	2	<b>1 (50%)</b>	<b>2 (100%)</b>	2 (100%)
C1	3	<b>1 (33%)</b>	<b>2 (67%)</b>	3 (100%)
C2	2	<b>1 (50%)</b>	<b>2 (100%)</b>	2 (100%)
C3	3	0	<b>2 (67%)</b>	3 (100%)
D1	2	0	<b>2 (100%)</b>	2 (100%)
D2	2	0	<b>1 (50%)</b>	1 (50%)
D3	2	0	0	1 (50%)
D4	3	0	<b>2 (67%)</b>	2 (67%)
D5	2	0	0	2 (100%)
E	3	0	0	0
F	3	<b>1 (33%)</b>	<b>2 (67%)</b>	3 (100%)
G	2	0	<b>1 (50%)</b>	1 (50%)
NT	4	0	<b>2 (50%)</b>	2 (50%)
<b>Genes de virulencia</b>				
<i>afa/draBC</i>	7	<b>3 (43%)</b>	<b>4 (57%)</b>	6 (86%)
<i>afaFM955459</i>	5	<b>3 (60%)</b>	<b>4 (80%)</b>	5 (100%)
<i>iron</i>	11	1 (9%)	<b>6 (55%)</b>	8 (73%)
<i>sat</i>	24	<b>7 (29%)</b>	<b>15 (63%)</b>	19 (79%)
<i>ibeA</i>	11	0	5 (45%)	8 (73%)
<i>papGII</i>	9	1 (11%)	4 (44%)	5 (56%)
<i>papGIII</i>	4	0	1 (25%)	3 (75%)
<i>cnf1</i>	5	0	0	2 (40%)
<i>hlyA</i>	5	0	0	2 (40%)
<i>cdtB</i>	4	0	<b>3 (75%)</b>	3 (75%)
<i>neuC-K1</i>	3	0	<b>2 (67%)</b>	2 (67%)
<i>kpsMII-K2</i>	8	<b>4 (50%)</b>	<b>6 (75%)</b>	7 (88%)
<i>kpsMII-K5</i>	22	3 (14%)	<b>11 (50%)</b>	14 (63%)

Las 14 cepas del subclón H30-Rx eran de los virotipos A (2), B (2), C2 (2), E (3), F (3) y G (2).

Las 11 cepas del subclón H22 eran de los virotipos D1 (2), D2 (2), D3 (2), D4 (3) y D5 (2).

Las 10 cepas del subclón H41 eran de los virotipos A (1), C1 (3), C3 (3) y NT (3).

La cepa del subclón H27 presentó un virotipo no tipable (NT).

TABLA 34

Relación entre la virulencia en el modelo de sepsis murino y los serotipos, subclones, virotipos y genes de virulencia de las cepas ST131. Análisis estadístico.

Características	Con letalidad temprana $\leq 24h \geq 5$ muertos (n=)	Sin letalidad temprana $\leq 24h < 5$ muertos (n=29)	Valor P	Altamente letales $\geq 9$ muertos (n=21)	No altamente letales $< 9$ muertes (n=15)	Valor P
<b>Serotipos</b>						
O25b:H4	5 (71%)	21 (72%)		15 (71%)	11 (73%)	
O16:H5	2 (29%)	8 (28%)		6 (29%)	4 (27%)	
<b>Subclones</b>						
H30-Rx	<b>5 (71%)</b>	9 (31%)		<b>9 (43%)</b>	5 (33%)	
H22	0	<b>11 (38%)</b>		5 (24%)	<b>6 (40%)</b>	
H27	0	1 (3%)		1 (5%)	0	
H41	2 (29%)	8 (28%)		6 (29%)	4 (27%)	
<b>Virotipos</b>						
A	<b>3 (43%)</b>	0	0,005	3 (14%)	0	
B	1 (14%)	1 (3%)		2 (10%)	0	
C1	1 (14%)	2 (7%)		2 (10%)	1 (7%)	
C2	1 (14%)	1 (3%)		2 (10%)	0	
C3	0	3 (10%)		2 (10%)	1 (7%)	
D1	0	2 (7%)		2 (10%)	0	
D2	0	2 (7%)		1 (5%)	1 (7%)	
D3	0	2 (7%)		0	2 (13%)	
D4	0	3 (10%)		2 (10%)	1 (7%)	
D5	0	2 (7%)		0	2 (13%)	
E	0	3 (10%)		0	3 (20%)	
F	1 (14%)	2 (7%)		2 (10%)	1 (7%)	
G	0	2 (7%)		1 (5%)	1 (7%)	
NT	0	4 (14%)		2 (10%)	2 (13%)	
A-B-C1-C2	<b>6 (86%)</b>	4 (14%)	0,0007	<b>9 (43%)</b>	1 (7%)	0,02
D1-D2-D3-D4-D5	0	<b>11 (38%)</b>		5 (24%)	6 (40%)	
<b>Genes de virulencia</b>						
<i>afa/draBC</i>	<b>3 (43%)</b>	4 (14%)		4 (19%)	3 (20%)	
<i>afaFM955459</i>	<b>3 (43%)</b>	2 (7%)	0,04	4 (19%)	1 (7%)	
<i>iroN</i>	1 (14%)	10 (34%)		6 (29%)	5 (33%)	
<i>sat</i>	<b>7 (100%)</b>	17 (59%)	0,04	15 (71%)	9 (60%)	
<i>ibeA</i>	0	<b>11 (38%)</b>		5 (24%)	6 (40%)	
<i>papGII</i>	1 (14%)	8 (28%)		4 (19%)	5 (33%)	
<i>papGIII</i>	0	4 (14%)		1 (5%)	3 (20%)	
<i>cnf1</i>	0	5 (17%)		0	<b>5 (33%)</b>	0,008
<i>hlyA</i>	0	5 (17%)		0	<b>5 (33%)</b>	0,008
<i>cdtB</i>	0	4 (14%)		3 (14%)	1 (7%)	
<i>neuC-K1</i>	0	3 (10%)		2 (10%)	1 (7%)	
<i>kpsMII-K2</i>	<b>4 (57%)</b>	4 (14%)	0,03	6 (29%)	2 (13%)	
<i>kpsMII-K5</i>	3 (43%)	19 (66%)		11 (52%)	11 (73%)	

## 5. Discusión

Desde que en el año 1988 se detectasen las primeras cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE en España (Baquero *et al.* 1988) la situación ha cambiado drásticamente con la diseminación de las enzimas CTX-M a partir de finales de la década de los noventa y la emergencia del grupo clonal ST131 asociado con CTX-M-15 especialmente a partir del año 2005.

El grupo GEIH (Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria) realizó un amplio estudio multicéntrico en España en el año 2000 en colaboración con 40 hospitales. Dicho estudio mostró una prevalencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEE (ECBLEE) del 2,7%. Se observó que estas cepas estaban presentes en el 90% de los centros y que el 51% de los aislados de *E. coli* procedían de pacientes extrahospitalarios. Las BLEE más prevalentes en *E. coli* fueron CTX-M-9 (27%), SHV-12 (24%), CTX-M-14 (17%) y CTX-M-10 (5%) (Hernández *et al.* 2003; Cantón *et al.* 2007). En el año 2006 se llevó a cabo el segundo estudio multicéntrico del GEIH. Se recogieron 1.021 cepas de *E. coli* productoras de BLEE en 44 hospitales. El porcentaje de cepas productoras de BLEE fue del 4,0%. Por lo tanto, desde el año 2000 al 2006 el porcentaje de *E. coli* productoras de BLEE en España se ha multiplicado por ocho (Díaz *et al.* 2009). Posteriormente se realizó la determinación del tipo de BLEE producido por 254 cepas representativas, observándose la emergencia de cepas CTX-M-15 (15%) que por primera vez se encuentran entre las enzimas más prevalentes junto con CTX-M-14 (47%), SHV-12 (27%) y CTX-M-9 (8%) (Díaz *et al.* 2010).

En el ESTUDIO I de esta tesis doctoral se investigaron para evaluar la presencia del grupo clonal ST131 un total de 77 cepas ECBLEE aisladas en el año 2012 en el Hospital Universitario Lucus Augusti (HULA). En el período de tiempo en que se aislaron dichas cepas, la tasa de prevalencia de ECBLEE fue del 8,0%. Por lo tanto el doble de la media encontrada en el año 2006 en el segundo estudio multicéntrico del GEIH y algo más de un punto y medio que la encontrada en el HULA entre los años 2006 y 2008 (5,6%) (Blanco *et al.* 2009) y seis puntos menos que la registrada en el año 2010 en Sevilla (López-Cerero *et al.* 2014).

La tasa de prevalencia de ECBLEE observada en el HULA en el año 2012 es superior a la observada en Dinamarca (2,4% en 2008-2009, Olesen *et al.* 2013) y Marruecos (4.1% en 2010-2011, Barguigua *et al.* 2013), similar a la encontrada en Francia (8,0% en 2013, Lafolie *et al.* 2014), Alemania (8,0% en 2010; Kresken *et al.* 2014), USA (7% en 2013; Drawz *et al.* 2015), Australia (6,9% en 2009-2011; Kudinha *et al.* 2013) y Japón (9% en 2010-2012; Matsumura *et al.* 2015), y muy inferior a las registradas en China (23% en 2013 Hong Kong, Ho *et al.* 2015; 63% en 2011-2013 Shanghai, Zhao *et al.* 2015; 30% a 57% en 2010-2011 en 30 hospitales de siete regiones, Zhang *et al.* 2014), la India (21% en 2009-2010, Jadhav *et al.* 2011; 87% en 2007-2011, Roy *et al.* 2015) y la República Africana Central (64% en 2011-2012, Rafai *et al.* 2015).

En el ESTUDIO I de la tesis entre las 77 cepas ECBLEE aisladas en el año 2012 de pacientes con infecciones extraintestinales (69 con UTI) del HULA detectamos 47 (61%) cepas pertenecientes al grupo clonal emergente ST131. Según nuestros datos se trata del primer estudio español (Dahbi *et al.* 2013) y uno de los dos primeros realizados en Europa, junto con el de Olesen *et al.* 2013, en el que se emplea una PCR múltiple específica de SNPs de los genes *gyrB* y *mdh* (Johnson *et al.* 2009) que permite detectar teóricamente todas las variantes conocidas hasta el momento del grupo clonal ST131. La tasa de prevalencia (61%) de cepas ST131 entre cepas ECBLEE del año 2012, es muy superior a las registradas en los estudios previos realizados en el Complejo Hospitalario Xeral-Calde de Lugo en los años 2006 (23%), 2007 (23%) y 2008 (20%) (Blanco *et al.* 2009). Entre ambos estudios se produjo la inauguración del nuevo hospital y el traslado de los pacientes al HULA. No creemos que en la expansión tuviese ninguna influencia la puesta en marcha del nuevo hospital. El aumento tan drástico de prevalencia tampoco se puede atribuir exclusivamente a la mayor sensibilidad de la PCR empleada para detectar las cepas ST131, ya que con la PCR múltiple empleada en el anterior estudio se hubiesen identificado las 38 cepas del serotipo O25b:H4 y la prevalencia seguiría siendo significativamente superior (49%). Por lo tanto las cepas ST131 continuaron expandiéndose entre las ECBLEE de forma muy exitosa en nuestra área sanitaria.

En los estudios realizados en otras partes de España se habían encontrado tasas de prevalencia de cepas ST131 entre las ECBLEE en la mayoría de los hospitales muy inferiores. Así, en un estudio multicéntrico realizado en 11 hospitales durante el año 2004 se detectaron 8 (9%) cepas ST131 entre 92 ECBLEE (Oteo *et al.* 2009). En otro estudio multicéntrico en el que participaron 44 hospitales en el año 2006, se identificaron 195 (19%) cepas ST131 entre las 1.021 cepas ECBLEE examinadas. No obstante, la prevalencia oscilaba entre el 0% y el 52%, y en dos hospitales de Gran Canaria (16/31, 52%, Doctor Negrín) y Madrid (17/35, 49%, 12 de Octubre) aproximadamente la mitad de las cepas eran ST131 (Blanco *et al.* 2013). Más recientemente, en un estudio llevado a cabo en Barcelona en el año 2008 (Coelho *et al.* 2011) y en dos realizados en Sevilla en el año 2010 (López-Cerero *et al.* 2013 y 2014) se encontraron un 32%, un 13% y un 23%, respectivamente de cepas ST131 entre ECBLEE.



En estudios recientes realizados en otros países también se han encontrado tasas muy elevadas de prevalencia de cepas ST131 entre las cepas ECBLEE aisladas de infecciones extraintestinales, aunque las tasas varían ampliamente. A continuación se hace referencia a algunos de los estudios que considero más interesantes ordenándolos de mayor a menor tasa de prevalencia de ST131: 79% en Portugal en los años 2006-2007 (Rodrigues *et al.* 2015), 78% en Canadá (Johnson *et al.* 2009), 65% en 2009-2012 (Cheng *et al.* 2015), 63% y 60% en Rumanía (Hristea *et al.* 2015; Maciucă *et al.* 2015), 62% en Holanda (Overdevest *et al.* 2015), 59% en Canadá en 2000-2010 (Peirano y Pitout, 2014), 54%/45%/39% en Australia en 2009-2011/2011-2012/2009-2011 (Kudinha *et al.* 2013 ; Rogers *et al.* 2015 ; Freeman *et al.* 2014), 51% en Nepal (Sherchan *et al.* 2015), > 47% en Alemania en 2010 (Kresken *et al.* 2014), 64%/56%/49%/47% en USA 2011/2013/2007-2010 (Colpan *et al.* 2013; Drawz *et al.* 2015 ; Banerjee *et al.* 2013 ; Johnson *et al.* 2012a), 43%/41%/37%/26% en Japón de 2001 a 2012 (Matsumura *et al.* 2015 ; Matsumura *et al.* 2012; Matsumura *et al.* 2012a; Matsumura *et al.* 2012b), 38% en Dinamarca en 2008-2009 (Olesen *et al.* 2013), 36% en la República Central Africana en 2011-2012 (Rafai *et al.* 2015), 31% en Corea del Sur en 2011-2012 (Cho *et al.* 2015), 31%/11% en la India en 2009-2010/2007-2010 (Jadhav *et al.* 2011 ; Roy *et al.* 2015), 27% en Camboya en 2007-2010 (Vlieghe *et al.* 2015), 23% en Hong Kong en 2013 (Ho *et al.* 2015), 17% en Francia en 2013 (Lafolie *et al.* 2014) y 13% en China en 2010-2011 (Zhang *et al.* 2014).

Nada menos que el 60% (28 de 47) de las cepas ST131 del ESTUDIO I de la tesis procedían de pacientes ingresados en cinco residencias de la tercera edad en el año 2012. Este dato está en la línea de lo observado en el anterior estudio efectuado en Lugo, ya que en el estudio previo realizado entre los años 2006 y 2008 en el desaparecido hospital el 50% de las cepas ST131 también fueron aisladas de pacientes ingresados en residencias de ancianos con cuidados sanitarios especiales. También se observó en estudios realizados en long-term care facilities de Francia (Brisse *et al.* 2012), Irlanda del Norte (Rooney *et al.* 2009) y USA (Banerjee *et al.* 2013a; Johnson *et al.* 2012a) que estos centros suponen quizás el principal reservorio de cepas del grupo clonal ST131. Hay que tener en cuenta que la población lucense atendida en el HULA tiene una media de edad muy elevada ya que la provincia de Lugo tiene una de las poblaciones más envejecidas de Europa. En un reciente estudio realizado en 2012-2013 en una residencia de Irlanda se aislaron cepas BLEEEC de las muestras fecales del 55% de los residentes y la mayoría continuaban siendo portadores un año después. Todas las cepas aisladas eran del grupo clonal ST131 y pertenecían al subclón H30-Rx siendo productoras de CTX-M del grupo 1 (posiblemente CTX-M-15) y la mayoría eran del mismo *cluster* que la cepa epidémica A del Reino Unido y la internacional PFGE812 (Ludden *et al.* 2015). En USA en el año 2013 se hizo un estudio en dos residencias para evaluar el nivel de individuos colonizados a nivel intestinal por cepas de *E. coli* ST131 resistentes a las quinolonas fluoradas (QF) encontrándose en una un 42% de portadores y en la otra un 16%. Todas las cepas ST131 eran del subclón H30 y el 28% H30-Rx y tenían similares genes de virulencia y perfiles de PFGE a los encontrados en las cepas clínicas. No obstante, únicamente cuatro de las 32 cepas ST131 aisladas en este estudio eran productoras de BLEE (Burgess *et al.* 2015).

En un *nursing home* de Holanda se observó recientemente que el 21% de los residentes eran portadores de Enterobacteriaceae productoras de BLEE y que 21 de las 33 cepas detectadas eran ST131 y CTX-M-15 (Willemsen *et al.* 2015). En USA se evaluó el nivel de portadores de cepas resistentes a quinolonas fluoradas entre pacientes comprobándose que el 12% eran positivos. La prevalencia de cepas ST131 entre las resistentes a quinolonas fluoradas aumento de un 8% en el año 2002 a un 50% en el año 2004, y el nivel de portadores de cepas ST131 fue del 2,7% de media (Han *et al.* 2014).

También se han realizado estudios para evaluar el nivel de personas colonizadas a nivel intestinal por cepas ST131 entre la población en general. El primero de ellos fue realizado por Leflon-Guibout *et al.* (2008) con la participación del LREC-USC. En dicho estudio se analizaron 332 personas sanas que vivían en diferentes áreas de París en el año 2006. Únicamente el 0,6% de las personas eran portadoras de ECBLEE, pero el 15% tenían cepas resistentes al ácido nalidíxico y el 7% de cepas ST131 no productoras de BLEE. En un estudio realizado recientemente (2011) en Holanda el 5% de las personas sanas eran portadoras de ECBLEE, pero únicamente seis de las 51 cepas aisladas eran ST131. Concretamente solamente 6 (0,6%) de las 1.033 personas analizadas eran portadoras de cepas ST131 productoras de BLEE (van Hoek *et al.* 2015). En contraste, en un estudio realizado en China el 51% de las personas tenían ECBLEE en sus heces, siendo todas las cepas aisladas productoras de enzimas CTX-M. Los enzimas más comunes eran CTX-M-14 (48%), CTX-M-15 (28%) y CTX-M-27 (15%). En total 32 (5,7%) de las 563 personas eran portadoras de cepas ST131 y 32 (11%) de las 287 cepas ECBLEE pertenecían al grupo clonal ST131. Curiosamente el 75% de las cepas ST131 eran el serogrupo O16 y el 25% eran O25b. De las 24 cepas O16-ST131, 14 eran CTX-M14, cinco CTX-M-15, tres CTX-M-27, una CTX-M-3 y una CTX-M-24 (Zhang *et al.* 2015).

La gran mayoría de las cepas ST131 aisladas de pacientes con infecciones extraintestinales en el HULA (2012) del ESTUDIO I de esta tesis eran productoras del enzima CTX-M-15 (87%), y únicamente el 9% eran CTX-M-14, el 2% CTX-M-1 y otro 2% CTX-M-27. En el anterior estudio realizado en el Complejo Hospitalario Xeral-Calde de Lugo el 96% de las cepas ST131 eran CTX-M-15 y el 4% CTX-M-14 (Blanco *et al.* 2009). En el estudio de López-Cerero y colaboradores (2014) realizado en el Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla (2010) el 97% de las cepas ST131 eran CTX-M-15 y 3% restante CTX-M-14. Resultados similares han sido obtenidos en el estudio realizado en Dinamarca (2008-2009) por Olesen y colaboradores (2013). Así, el 80% de las cepas ST131 eran CTX-M-15, el 9% CTX-M-27, el 7% CTX-M-14 y el 2% eran CTX-M-2 y otro 2% CTX-M-3. También se observó que la enzima CTX-M-15 tenía una prevalencia superior al 75% entre las cepas ST131 en los estudios realizados en Francia (> 90% CTX-M-15; Lafolie *et al.* 2014), Portugal (94% CTX-M-15; Rodrigues *et al.* 2015), Rumanía (100% CTX-M-15; Hristea *et al.* 2015), USA (> 90% CTX-M-15) (Banerjee *et al.* 2013; Price *et al.* 2013; Banerjee y Johnson 2014) y Canadá (2000-2011) (80% CTX-M-15 y 17% CTX-M14; Peirano *et al.* 2014) y Nepal (90% CTX-M-15) (Sherchan *et al.* 2015), la India (100% CTX-M-15) (Roy *et al.* 2015) y la República Central Africana (100% CTX-M-15) (Rafai *et al.* 2015).

En Australia y Nueva Zelanda aunque predominan las cepas productoras de CTX-M-15 (60%) entre las ST131, también son muy frecuentes las que producen CTX-M-14 (48%) y algunas cepas (8%) producen ambas enzimas (Rogers *et al.* 2015). En Japón (2001-2010) las cepas ST131 CTX-M-15 (16%) son las terceras más prevalentes después de las productoras de CTX-M-14 (47%) y CTX-M-27 (21%), siendo también frecuentes las cepas ST131 productoras de CTX-M-2 (9%) (Matsumura *et al.* 2012a). Entre los años 2001-2007 predominaban las cepas ST131 CTX-M-14 mientras que en el período 2008-2012 predominaban las cepas productoras de CTX-M-27 seguidas por las CTX-M-15 (Matsumura *et al.* 2015). La producción de CTX-M-14 era la predominante entre las cepas ST131 de Camboya (61%, 2007-2010) (Vlieghe *et al.* 2015), Hong Kong (73%, 2013) (Ho *et al.* 2015) y en 11 provincias repartidas por siete regiones de China (67%, 2010-2011) (Zhang *et al.* 2014).

Al analizar los serotipos O:H, las combinaciones de genes de virulencia y los perfiles de PFGE de las 47 cepas ST131 aisladas en el 2012 de pacientes con infecciones extraintestinales en el HULA del ESTUDIO I de esta tesis, observamos cambios muy significativos con respecto al estudio realizado en el Complejo Hospitalario Xeral-Calde (2006-2008) (Blanco *et al.* 2009). En el estudio previo estábamos ante una situación que podemos definir como de brote (outbreak), ya que el 99% (76/77) de las cepas ST131 pertenecían al serotipo O25b:H4, producían CTX-M-15, pertenecían al virotipo A y se englobaban dentro del mismo *cluster* de PFGE ya que tenían > 85% de identidad en sus pulsotipos. La fotografía del año 2012 es notablemente diferente, ya que aunque la mayoría de las cepas ST131 siguen perteneciendo al serotipo O25b:H4 (81%), vemos que únicamente el 45% pertenecen al virotipo A y que un 45% presentan nuevas combinaciones de genes de virulencia. Además, la diversidad genética observada entre las cepas ST131 es muy superior ya que las 47 cepas únicamente presentan un 60,4 de identidad en sus perfiles de PFGE, detectándose seis grupos que en la mayoría de los casos comprenden cepas con combinaciones específicas de genes de virulencia.

Especialmente interesantes son los que hemos denominado grupos II y III ya que incluyen cepas ST131 con nuevos virotipos. Así, en el grupo II se incluyen 12 cepas productoras de CTX-M-15 del virotipo E (11 O25b:H4 y una ONT:H4) que presentan la nueva secuencia tipo del esquema del Instituto Pasteur PST621. En el perfil de virulencia de las cepas del virotipo E destaca la presencia de los genes *papGII*, *cnf1* y *hlyA*, ya que se trata de genes muy raramente identificados anteriormente entre cepas ST131. No obstante, Kudinha y colaboradores (2013a) han observado que aproximadamente el 40% de las cepas ST131 aisladas de cistitis y pielonefritis en Australia en los años 2009-2011 presentaban dichos genes. Las cinco cepas del grupo III O25b:H4 CTX-M-15 también presentan el gen *papGII*, pero carecen de los genes *cnf1* y *hlyA* y por ello fueron incluidas en el nuevo virotipo F. Curiosamente muchas de las cepas del grupo II se aislaron de pacientes de la residencia A, mientras que la mayoría de las cepas del grupo III proceden de pacientes de la residencia B. Pero de pacientes ingresados en la residencia A también procedían muchas de las cepas ST131 del grupo IV del virotipo A.

Es evidente que en el ESTUDIO I de esta tesis hemos detectado la emergencia de nuevas variantes del clon ST131 con nuevas combinaciones de genes de virulencia y hemos observado que los cambios en la epidemiología molecular de este grupo clonal se producen con una notable rapidez difícilmente imaginable.

Como en los estudios previos realizados por nuestro grupo con cepas ECBLEE (Blanco *et al.* 2011; Coelho *et al.* 2011) hemos observado que las cepas ST131 poseen muchos más genes de virulencia que las no ST131. Concretamente en el ESTUDIO I de este tesis 15 de los 32 genes de virulencia fueron significativamente asociados con las cepas ST131 (*fimH*, *F10 papA*, *papGII*, *afa/draBC*, *afaFM955459*, *cnf1*, *sat*, *hlyA*, *iucD*, *chuA*, *kpsMIII*, *kpsMIII-K2*, *kpsMIII-K5*, *malX* y *usp*), ocho de los cuáles se han detectado en > 90% de las cepas ST31(*fimH*, *F10 papA*, *sat*, *iucD*, *chuA*, *kpsMIII*, *malX* y *usp*). Además, el estatus ExPEC entre las cepas del grupo clonal ST131 fue muchísimo más frecuente (96%) que entre las cepas no ST131 (37%) ( $P < 0,001$ ) y las 47 cepas ST131 exhibieron un significativo mayor número de genes de virulencia (media 9,1) que las 30 cepas no ST131 (media 4,3). Similares resultados fueron encontrados por Olesen y colaboradores (2013) en Dinamarca (2008-2009), Kudinha y colaboradores (2013) en Australia (2009-2011), Matsumura y colaboradores (2013) en Japón (2001-2010), y Banerjee y colaboradores (2013) (2007-2010) y Drawz y colaboradores (2015) (2013) en USA.

Terminar la discusión del ESTUDIO I destacando el mayor nivel de resistencias detectado entre las cepas ST131 con respecto a las cepas ECBLEE no pertenecientes al grupo clonal ST131: ciprofloxacina (100% vs 70%), tobramicina (72% vs 33%), trimetoprim/sulfametoxazol (77% vs 57%) y fosfomicina (15% vs 0%). Especialmente preocupante es el caso de la fosfomicina, y puede ser debido al aumento significativo de su utilización a nivel comunitario tal y como ya publicaron Oteo y colaboradores (2010). Se ha comprobado que en el tratamiento empírico de las ITU comunitarias se producen hasta tres veces más fallos si están implicadas cepas ST131 resistentes a las quinolonas (Can *et al.* 2015). Aunque el nivel de resistencias a la fosfomicina detectado entre las cepas ST131 en nuestro estudio es preocupante, coincidimos con Kreskeny colaboradores (2014) en el sentido de que este antibiótico sigue siendo tal vez la mejor opción para realizar una terapia empírica sin conocer el antibiograma ni la secuencia tipo de la cepa implicada en la infección urinaria. Concretamente Kresken y colaboradores (2014) analizaron las resistencias de 499 cepas de *E. coli* causantes de ITU en Alemania (2010) frente a ocho antibióticos que se administran por vía oral encontrando los siguientes niveles de resistencias: amoxicilina (43%), amoxicilina/ácido clavulánico (33%), trimetoprim/sulfametoxazol (31%), ciprofloxacina (20%), cefuroxima (10%), cefpodoxima (9%), cefixima (8%) y fosfomicina (1,2%). En este estudio realizado en Alemania el 8% de las cepas eran productoras de BLEE, siendo el 69% de las mismas CTM-M-15 y el 70% de las productoras de esta enzima O25b-ST131.



También hay que mencionar que ninguna de las cepas ST131 aisladas de pacientes con infecciones extraintestinales en los hospitales de Lugo entre los años 2006 y 2012 resulto ser productora de carbapenemasas. No obstante, si que han sido aisladas este tipo de cepas en otros hospitales españoles y en numerosos países, siendo especialmente prevalentes en Asia (Fernández *et al.* 2014; Oteo *et al.* 2015; Peirano *et al.* 2014b; Zhang *et al.* 2015).

El ESTUDIO II de la tesis según nuestra información es el primero realizado en Europa en el que se investiga la prevalencia y los genotipos de cepas ST131 del serotipo O16:H5 y se comparan con cepas ST131 del serotipo O25b:H4 y sus subclones *H30* y *H30-Rx*.

Como en estudios previos (Blanco *et al.* 2009, 2011) nosotros hemos encontrado que las cepas del grupo clonal ST131 eran más prevalentes entre ECBLEE (30%) que entre cepas de *E. coli* no productoras de enzimas BLEE (8%). Además, las cepas O16:H5-ST131 representaron únicamente un 0,9% frente al 15% de cepas O25b:H4-ST131 del total de 2.995 cepas investigadas de los años 2005-2012. También Olesen y colaboradores (2013) en Dinamarca (36% O25b-ST131 vs 2% O16-ST131 en ECBLEE 2008-2009), Matsumura y colaboradores (2012a) en Japón (32% O25b-ST131 vs 4% O16-ST131 entre ECBLEE 2001-2010), Johnson y colaboradores (2014) en USA, Rogers y colaboradores (2015) en Australia y Nueva Zelanda y Hoy colaboradores (2015) en Hong Kong encontraron que las cepas O25b-ST131 eran mucho más prevalentes que las O16-ST131.

El tipado del gen *fimH* (codifica para el pilus común tipo 1) por secuenciación es una herramienta muy útil para establecer los diferentes sublinajes/subclones dentro de las secuencias tipo/grupos clonales de ExPEC (Weissman *et al.* 2012 ; Paul *et al.* 2013). Johnson y colaboradores (2013) explorando la estructura clonal de 352 cepas ST131 históricas y recientes aisladas entre los años 1967 y 2011 encontraron siete alelos *fimH* (*H15*, *H22*, *H27*, *H30*, *H35*, *H41*, *H94*), siendo el *fimH30* el top 1 (67%), el *fimH22* el top 2 (21%) y los *fimH35* y *fimH41* los top 3 (5% cada uno). Durante el período 1967-1999 únicamente se detectaron cepas susceptibles a las quinolonas fluoradas (QF-S), predominantemente de los subclones *H22* y *H35*. Las cepas resistente a las quinolonas fluoradas (QF-R) aparecieron durante el período 2000-2005 y se asociaron casi exclusivamente con el subclón *H30*. Dieciocho de las 19 cepas que tenían el alelo *fimH41* eran QF-S y todas ellas fueron aisladas en el período 2006-2011. Recientemente, Johnson y colaboradores (2014) establecieron una asociación entre el alelo *fimH41* y el serogrupo O16.

En el ESTUDIO II de esta tesis doctoral todas las 27 cepas del serotipo O16:H5 tenían el alelo *fimH41*, mientras que el 78% y el 16% de las cepas del serotipo O25b:H4 fueron positivas para los alelos *fimH30* y *fimH22*, respectivamente. Y como era de esperar, la mayoría (98%) de las cepas *fimH30* eran QF-R, mientras que la mayoría de las cepas *fimH22* y *fimH41* eran susceptibles a las quinolonas fluoradas. Por lo tanto, el subclón *H30*, que comprende la mayoría de las cepas QF-R se ha expandido en España mucho más frecuentemente que otras variantes del grupo clonal ST131, coincidiendo con lo que ha pasado a nivel mundial.



Recientemente, un importante sublinaje incluido dentro del subclón *H30*, denominado *H30-Rx* ya que se asocia normalmente con un patrón extensivo de resistencias antimicrobianas, fue identificado por Price y colaboradores (2013) usando un análisis filogenético del genoma completo de 105 cepas ST131 procedentes de cinco países y 23 estados y provincias de USA y Canadá. Veinte (91%) de las 22 cepas ST131 que llevaban el gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (aisladas en Australia, Corea del Sur, Portugal, Canadá y USA) formaban un subclón dentro de las cepas *H30* QF-R (*H30-R*). En la región de Chicago entre 2007 y 2010, aproximadamente la mitad de las cepas ECBLEE eran del grupo clonal ST131, y de estas el 98% eran *H30* y el 92% del subclón *H30-Rx* (Banerjee *et al.* 2013b). Un estudio similar realizado en la región de Calgary mostró que 114 (59%) de las cepas ECBLEE FQ-R eran ST131 y que 111 de estas eran *H30* y 85 eran *H30-Rx* (Peirano y Pitout, 2014). Nosotros hemos obtenido resultados similares en España ya que la mayoría (78%) de las cepas ST131 pertenecían al subclón *H30* y también la mayoría (79%) de las cepas *H30* eran *H30-Rx*. Entre las 1.125 cepas ECBLEE españolas, 295 (26%) eran del subclón *H30* y 286 (97%) de ellas eran del sublinaje *H30-Rx*. Además, todas las 286 cepas ECBLEE *H30-Rx* eran CTX-M-15 positivas. Por lo tanto, el ESTUDIO II de la tesis doctoral indica que el subclón *H30-Rx* también está expandido en España siendo el predominante entre las cepas de *E. coli* productoras de la enzima CTX-M-15.

Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Matsumura y colaboradores (2012a) trabajando con cepas O16-ST131 aisladas en Japón (2005-2010) y Johnson y colaboradores (2014) caracterizando cepas O16-ST131 aisladas en USA, Australia y Holanda (2006-2011) en el sentido que la mayoría de las cepas presentan la secuencia tipo del esquema del Instituto Pasteur PST506 y que esta secuencia es específica de las cepas O16:H5-ST131. En contraste, entre las cepas O25b:H4-ST131 predomina la secuencia tipo PTS43. Así, 25 (9%) de las 27 cepas españolas O16:H5-ST131 eran PST506 y las dos restantes presentaron dos variantes (PST567 y PST625) de un único *locus* de la secuencia tipo PST506. Por su parte, 33 (79%) de las 42 cepas O25b:H4-ST131 presentaron la PST43, y ninguna de ellas perteneció a las secuencias encontradas entre las cepas O16:H5-ST131.

Las cepas españolas O16:H5-ST131 exhibieron diferentes tasas de resistencias comparadas con las cepas O25b:H4-ST131, siendo significativamente más alta la tasa de resistencia a la gentamicina y significativamente más baja la tasa de resistencia a la ciprofloxacina. En Japón y USA las cepas O16-ST131 se asociaron con las resistencias a la gentamicina y al trimetoprim-sulfametoxazol. No obstante, la tasa de resistencia a la gentamicina de las cepas españolas resultó ser muy superior (59%) que la registrada entre las cepas O16-ST131 de Japón (12%) y USA (29%) (Matsumura *et al.* 2013 ; Johnson *et al.* 2014).

Entre las 27 cepas O16:H5-ST131 españolas, el 48% eran productoras de CTX-M14, mientras que ninguna era productora de CTX-M-15. También Matsumura y colaboradores (2012a) publicó que CTX-M-14 era la enzima producida más frecuentemente por las cepas O16-ST131 aisladas en Japón.

Al igual que Matsumura y colaboradores (2013) en Japón y Johnson y colaboradores (2014) en USA, nosotros encontramos una alta diversidad genética entre las 27 cepas O16:H5-ST131 españolas ya que presentaron 25 perfiles de PFGE diferentes. Además, observamos que los perfiles de PFGE de las cepas O16:H5-ST131 eran diferentes a los de las cepas O25b:H4-ST131. El dendrograma generado por PFGE-*Xba*I reveló siete grandes *clusters* (I-VII) que se correspondieron muy bien con los virotipos, alelos *fimH*, y el estatus H30-Rx, apoyando una base clonal para los virotipos.

En lo que respecta a los genes de virulencia, nuestros resultados indican claramente que las cepas O16:H5-ST131 tienen una media de genes de virulencia significativamente inferior a la de las cepas O25b:H4-S131, y que presentan además combinaciones de genes de virulencia (virotipos) distintas. Así, el virotipo C1 se observó exclusivamente entre las cepas O16:H5-ST131, mientras que los virotipos B, C2, D1, D2, D3, D4, D5, E, F y G se encontraron exclusivamente entre las cepas O25b:H4-ST131. No obstante, el segundo virotipo (C3) más frecuente (26%) de las cepas O16:H5-ST131 también se ha identificado en el 12% de las cepas O25b:H4-ST131.

En un estudio preliminar realizado por Clermont y colaboradores (2008) analizaron la virulencia *in vivo* de cuatro cepas ST131 en un modelo de sepsis murino muy similar al empleado por nosotros en esta tesis y observaron que las cuatro cepas tenían una letalidad del 100%. Seguidamente Johnson y colaboradores (2012) emplearon un modelo animal similar para comparar la virulencia *in vivo* de 27 cepas ST131 con la de 34 cepas no-ST131 (incluidas cepas del grupo filogenético B2 de cinco grupos clonales ST12/ST599/CC12-ST73-ST81-ST95-ST127, cepas del grupo filogenético D ST59-ST62, ST69, ST598 y del grupo filogenético A) causantes de infecciones extraintestinales. Las cepas ST131 evaluadas conjuntamente tuvieron un comportamiento similar al de las cepas no ST131: 100% de letalidad (33% vs 35%),  $\geq 50\%$  de letalidad (44% vs 50%) y 0% de letalidad (30% vs 29%). Posteriormente, Johnson y colaboradores (2014) empleando el mismo modelo evaluaron seis cepas O16-ST131, comprobando que las cepas tenían una letalidad que oscilaba entre el 60% y el 100%, y que una de ellas era especialmente virulenta ya que mató los 10 ratones inoculados dentro de las 22 horas posteriores a la administración subcutánea de  $2 \times 10^8$  las bacterias. Como veremos a continuación nuestros resultados confirman los encontrados por Johnson y colaboradores (2012 y 2014), aunque observamos entre las 36 cepas ST131 ensayadas un mayor porcentaje de cepas con una letalidad  $\geq 50\%$  (75% vs 44%) y un menor porcentaje de cepas con un 0% de letalidad (11% vs 30%). Las diferencias encontradas podrían ser debidas a las diferentes características de las colecciones de cepas ST131 ensayadas. Así, solamente 5 (19%) de las 27 ST131 de Johnson y colaboradores (2012) eran productoras de BLEE, mientras que en nuestro caso 24 (67%) de las 36 cepas ST131 eran ECBLEE. No obstante, nosotros hemos encontrado el mismo porcentaje de cepas con una letalidad  $\geq 50\%$  entre cepas ST131 productoras de BLEE (75%, 18 de 24) que entre ST131 no productoras de BLEE (75%, 9 de 12).

Los resultados del ESTUDIO III de esta tesis muestran claramente que tanto las cepas O25b:H4-ST131 (75% letales) como las O16:H5-ST131 (80% letales) presentan un nivel elevado de virulencia en el modelo de sepsis murino, no observándose diferencias significativas entre las cepas de ambos serotipos. En principio este era un resultado no esperado, ya que las cepas O16:H5-ST131 poseen un menor número de genes de virulencia y tienen un éxito expansivo muy inferior al de las cepas O25b:H4-ST131. No obstante, al analizar los subclones se ve que la letalidad temprana se asocia con las cepas del subclón *H30-Rx* y especialmente con el virotipo A, y los genes *afa-FM955459*, *sat* y *kpsMII-K2*. El antígeno capsular K2 ya se había asociado claramente con la virulencia *in vivo* de cepas uropatógenas de *E. coli* (Buckles *et al.* 2009 ; Sarkar *et al.* 2014). Hay que tener en cuenta que el antígeno capsular K2 determinado molecularmente se corresponde en la mayoría de los casos con el antígeno K100 por criterios serológicos (Olesen *et al.* 2013, 2014) y que se ha encontrado una diversidad genética muy considerable en el *locus* que codifica para la cápsula de las cepas ST131 *H30-Rx* (Alqasim *et al.* 2014).

También destacar del ESTUDIO III el hecho de que las dos cepas que presentaron el mayor número de genes de virulencia (13 genes) únicamente presentaron una letalidad del 50%, mientras que algunas cepas con muy pocos genes presentaron letalidades del 90% e incluso del 100%. Especialmente interesante es la baja virulencia *in vivo* de las cepas O25b:H4 *H30-Rx* del virotipo E, sobre todo si se compara con la elevada virulencia de las cepas O25b:H4 *H30-Rx* del virotipo F, ya que las cepas de ambos virotipos comparten ocho de los genes de virulencia y las del virotipo E a mayores poseen los genes *cnf1* y *hlyA*. En cualquier caso es evidente que más que la presencia de muchos genes de virulencia debe ser más importante una combinación adecuada de los mismos aunque en conjunto la cepa posea menos genes de virulencia.

También se han empleado otros modelos alternativos que han producido unos resultados en algunos casos difíciles de interpretar. Así, Lavigne *et al.* (2012) evaluaron la virulencia de tres cepas ST131 en dos modelos animales (*Caenorhabditis elegans* y embriones de peces cebra) encontrando que las cepas ST131 eran menos virulentas que cepas ExPEC del serogrupo O6 y del grupo filogenético B2 de las secuencias tipo ST73, ST92 y ST127. En contraste, Hussain y colaboradores (2014) encontraron que las cepas ST131 eran más virulentas en embriones de peces cebra que las cepas no ST131. En el modelo de supervivencia de larvas de *G. mellonella* también se ha observado que las cepas ST131 presentaban una mayor virulencia (Ciesielczuk *et al.* 2015).

En cualquier caso la mayor virulencia de las cepas ST131 observada en los ensayos *in vivo*, no se correlaciona con unas manifestaciones clínicas más acusadas ni con un mayor grado de mortalidad de los pacientes cuando se analizan de forma global sin diferenciar los subclones (Cheng *et al.* 2015; Cho *et al.* 2015; López-Cerero *et al.* 2014; Sherchan *et al.* 2015; Wu *et al.* 2014).

No obstante, el subclón H30-Rx se ha asociado con las sepsis primarias y las UTIs superiores (pielonefritis) resultado de complicaciones de biopsias prostáticas (Peirano y Pitout, 2014), y tanto las cepas O25b-ST131 como las O16-ST131 se han asociado con cistitis y pielonefritis en mujeres con edad reproductora (Kudinha *et al* 2013, 2013a).

Sería muy interesante poder secuenciar en futuros estudios el genoma completo de las 36 cepas ST131 ensayadas para su virulencia *in vivo* en el ESTUDIO III de esta tesis para localizar sus genes de virulencia, islas de patogenicidad y genes reguladores de los mismos para poder interpretar cuáles son las secuencias génicas que influyen más en la virulencia de las cepas. Seguro que también influye de forma decisiva la expresión fenotípica y en este sentido el papel de las secuencias de regulación es esencial. Por último también sería muy interesante determinar el papel desempeñado por los plásmidos ya que muchos genes de virulencia e islas de patogenicidad y mecanismos de resistencia están en plásmidos (Lanza *et al.* 2014 ; Li *et al.* 2015 ; Peigne *et al.* 2009 ; Phan *et al.* 2015). Además, los estudios del genoma completo de las cepas podrían completar los estudios filogenéticos, identificar también nuevos subclones, secuencias relacionadas con la virulencia o la resistencia a antibióticos y establecer claramente si las cepas ST131 de animales pueden ser el origen de algunos de los subclones y virotipos que han emergido recientemente y son causantes de infecciones extraintestinales en seres humanos (Achtman *et al.* 2014 ; De Been *et al.* 2014 ; Kluytmans *et al.* 2013 ; Lazarus *et al.* 2015 ; Manges y Johnson 2012 ; Ruiz del Castillo *et al.* 2013 Singer, 2015; Mora *et al.* 2010). En los últimos años se ha secuenciado el genoma completo de un número significativo de cepas ST131 pero todavía es necesario secuenciar muchas más y sobre todo analizar e interpretar como sus diferentes genes cromosómicos y plásmidicos influyen en la virulencia y en el éxito (fitness) de las cepas ST131 de los diferentes subclones y virotipos (Downing, 2015; Forde *et al.* 2014 ; Schembri *et al.* 2015; Subashchandrabose *et al.* 2013).

## 6. Conclusiones

1. Es evidente que en el aumento de prevalencia de cepas de *E. coli* productoras de  $\beta$ -lactamas de espectro extendido (ECBLEE) registrado en el HULA en los últimos años está implicado el grupo clonal ST131, ya que más del 50% de las cepas productoras de BLEE aisladas en el año 2012 eran ST131. Esto coincide con lo que está sucediendo en otros hospitales españoles y a nivel mundial.
2. Nuestros resultados confirman que las residencias de ancianos son un reservorio importante de cepas ECBLEE ST131.
3. También se confirma que las cepas ST131 productoras de BLEE poseen muchos más genes de virulencia que las productoras de BLEE que no pertenecen a dicho grupo clonal.
4. La diversidad genética de las cepas del grupo clonal ST131 es extraordinaria y están emergiendo nuevas cepas con diferentes combinaciones de genes de virulencia a una velocidad difícilmente imaginable.
5. El subclón *H30* está ampliamente expandido en España siendo el predominante entre las cepas O25b:H4. Por su parte el sublinaje *H30-Rx* del mismo, es el predominante entre las cepas productoras de CTX-M-15.
6. Las cepas *H30-Rx* poseen más genes de virulencia que las cepas *H30* que no pertenecen al sublinaje *H30-Rx*. Por lo tanto las cepas ST131 que están más ampliamente expandidas en España y a nivel mundial son las que poseen más genes de virulencia y más resistencias.
7. Como pasa en otros países el subclón O16:H5-ST131-*H41* está mucho menos expandido también en España y al igual que en otros países la mayoría de las cepas españolas pertenecen a la secuencia tipo del Instituto Pasteur PST506 y producen CTX-M-14.



8. Las cepas del subclón O16:H5-ST131-H41 poseen muchos menos genes de virulencia que las cepas O25b:H4-ST131 y presentan distintos virotipos.

9. Las cepas del subclón O16:H5-ST131-H41 presentan una notable diversidad genética y poseen perfiles de PFGE-*Xba*I distintos de las cepas O25b:H4-ST131.

10. El análisis de los perfiles de PFGE-*Xba*I se traduce en dendrogramas con *clusters* específicos de cepas pertenecientes a los diferentes subclones (*H30*, *H30-Rx*, *H22*, *H41*) y virotipos, lo que apoya un claro componente filogenético en el origen de los virotipos.

11. Tanto las cepas O25b:H4-ST131 como las O16:H5-ST131 presentan un alto nivel de virulencia *in vivo* en el modelo de sepsis murino.

12. Si consideramos que las cepas más virulentas son las que matan más rápidamente los ratones, se concluye que las cepas O25b:H4-ST131 del subclón *H30-Rx* y especialmente las del virotipo A serían las más virulentas, estando dicha virulencia temprana asociada con significación estadística a los genes de virulencia *afaFM955459*, *sat* y *kpsMII-K2*.



## 7. Bibliografía

**Aarestrup F.M., Hasan H., et al. (2006).** “First description of blaCTX-M-1-carrying *Escherichia coli* isolates in Danish primary food production.” *J Antimicrob Chemother* 57: 1258-1259.

**Achtman M. and Zhou Z. (2014).** “Distinct genealogies for plasmids and chromosome.” *PloS Genet* 10(12):e1004874.

**Adams-Sapper S., Diep B.A., et al. (2013).** “Clonal composition and community clustering of drug-susceptible and resistant *Escherichia coli* isolates from bloodstream infections.” *Antimicrob Agents Chemother* 57: 490-497.

**Aidar-Ugrinovich L., Blanco J., et al. (2007).** “Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in Sao Paulo, Brazil.” *Int J Food Microbiol* 115: 297-306.

**Alqasim A., Scheultz F., Zong Z., et al. (2014).** “Comparative genome analysis identifies few traits unique to the *Escherichia coli* ST131 H30Rx clade and extensive mosaicism at the capsule locus.” *BCM Genomics* 15:830.

**Alpuche Aranda C.M and Daza Timaná C.A. (2002).** “Infecciones nosocomiales por bacterias Gram negativas resistentes a cefalosporinas de espectro extendido: asociación de dos peligrosos enemigos.” *Enfermedades Infecciosas y Microbiología* 22, núm 4.

**Alouache S., Kada M., et al. (2012).** “Antibiotic resistance and extended-spectrum beta-lactamases in isolated bacteria from seawater of Algiers beaches (Algeria).” *Microbes Environ* 27: 80-86.

**Apperloo-Renkema., H.Z., et al. (1990).** “Determination of colonization resistance of the digestive tract by biotyping of Enterobacteriaceae. *Epidemiol Infect* 105: 355-61.

**Arvand M., Moser V., et al. (2013).** “Prevalence of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and spread of the epidemic clonal lineage ST131 in nursing homes in Hesse, Germany.” *J Antimicrob Chemother* 68(11): 2686-2688.

**Ballmer K., Korczak B.M., et al. (2007).** “Fast DNA serotyping of *Escherichia coli* by use of an oligonucleotide microarray.” *J Clin Microbiol* **45**: 370-379.

**Banerjee R., Johnston B., et al. (2013).** “*Escherichia coli* sequence type 131 is a dominant, antimicrobial-resistant clonal group associated with healthcare and elderly hosts.” *Infect Control Hosp Epidemiol* **34**: 361-369.

**Banerjee R., Johnston B., et al. (2013a).** “The clonal distribution and diversity of extraintestinal *Escherichia coli* isolates vary according to patient characteristics.” *Antimicrob Agents Chemother* **57**: 5912-5917.

**Banerjee R., Robicsek A., et al. (2013b).** “Molecular epidemiology of *Escherichia coli* sequence type 131 and its H30 and H30-Rx subclones among extended-spectrum-beta-lactamase-positive and negative *E. coli* clinical isolates from the Chicago region, 2007 to 2010.” *Antimicrob Agents Chemother* **57**: 6385-6388.

**Banerjee R. and Johnson J.R. (2014).** “A new clone sweeps clean: The enigmatic emergence of *Escherichia coli* sequence type 131.” *Antimicrob Agents Chemother* **58**: 4997-5004.

**Baquero F., Reguera J.A., et al. (1988).** “*Escherichia coli* con resistencia a cefalosporinas de 3ra generación codificada por  $\beta$ -lactamasas de tipo plasmidico: primer brote en España.” *Rev Esp Microbiol Clin* **3**: 581-582.

**Baraniak A., Fiett J., et al. (2002).** “Countrywide spread of CTX-M-3 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing microorganisms of the family *Enterobacteriaceae* in Poland.” *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 151-159.

**Barguigua A., El Otmani F., et al. (2013).** “Prevalence and type of extended spectrum  $\beta$ -lactamasas among urinary *Escherichia coli* isolates in Moroccan community.” *Microb Pathog* **61-62**: 16-22.

**Bartoloni A., Pallecchi L., et al. (2012).** “Relentless increase of resistance to fluoroquinolones and expanded spectrum cephalosporins in *Escherichia coli*: 20 years of surveillance in resource-limited settings from Latin America.” *Clin Microbiol Infect* **19**: 356-361.

**Bauer R.J., Zhang L., et al. (2002).** “Molecular epidemiology of 3 putative virulence genes for *Escherichia coli* urinary tract infection-*usp*, *iha*, and *iroN* (*E. coli*).” *J Infect Dis* **185**: 1521-1524.

**Bélangier L., Garénaux A., et al. (2011).** “*Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*”. *FEMS Immuno Med Microbiol* **62**: 1-10.

**Ben Sallem R., Ben Slama K., et al. (2012).** “Prevalence and characterisation of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolates in healthy volunteers in Tunisia.” *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **31**: 1511-1516.

**Bergthorsson U. and Ochman H. (1998).** “Distribution of chromosome length variation in natural isolates of *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol* **15**:6-16.

**Bettelheim K.A. (2007).** “The non-O157 shiga-toxigenic (verocytotoxigenic) *Escherichia coli*; un-

der-rated pathogens.” *Crit Rev Microbiol* **33**: 67-87.

**Beutin L. (2006).** “Emerging enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, causes and effects of the rise of a human pathogen.” *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **53**: 299-305.

**Bidet P., Mahjoub-Messai F., et al. (2007).** “Combined multilocus sequence typing and O serotyping distinguishes *Escherichia coli* subtypes associated with infant urosepsis and /or meningitis.” *J Infect Dis* **196**: 297-303.

**Blaak H., van Hoek A.H., et al. (2015).** “Distribution, numbers, and diversity of ESBL-producing *E. coli* in the poultry farm environment.” *PloS One* **10**: e0135402.

**Blanc V., Mesa R., et al. (2006).** “ESBL-and plasmidic class C  $\beta$ -lactamase-producing *E. coli* strains isolated from poultry, pig and rabbit farms.” *Vet Microbiol* **118**: 299-304.

**Blanc V., Mesa R., et al. (2006).** “ESBL-and plasmidic class C  $\beta$ -lactamase-producing *E. coli* strains isolated from poultry, pig and rabbit farms.” *Vet Microbiol* **118**: 299-304.

**Blanc V., Leflon-Guibout V., et al. (2014).** “Prevalence of day-care centre children (France with faecal CTX-M-producing *Escherichia coli* comprising O25b:H4 and O16:H5 ST131 strains”. *J Antimicrob Chemother* **69**, 1231-1237.

**Blanco J., Alonso M.P., et al. (1990).** “Virulence factors of bacteraemic *Escherichia coli* with particular reference to production of cytotoxic necrotizing factor (CNF) by P-fimbriate strains.” *J Med Microbiol* **31**: 175-83.

**Blanco J., Alonso M.P., et al. (1991).** “Pathogenetic mechanisms of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections.” *Enferm Infecc Microbiol Clín* **9**: 640-651.

**Blanco J., Alonso MP., et al. (1992).** “Establishment of three categories of P-fimbriated *Escherichia coli* strains that show different toxic phenotypes and belong to particular O serogroups.” *FEMS Microbiol Lett* **78**: 131-136.

**Blanco J., Blanco M., et al. (1992a).** Factores de virulencia de los *Escherichia coli* causantes de infecciones extraintestinales. Lugo, Monografía nº 170, Universidade de Santiago de Compostela.

**Blanco J., Blanco M., et al. (1993).** “*Escherichia coli* enterotoxigénicos, necrotoxigénicos y verotoxigénicos de origen humano y bovino. Patogénesis, epidemiología y diagnóstico microbiológico.” Servicio de Publicaciones de la Diputación Provincial de Lugo: pp. 361.

**Blanco M., Blanco JE., et al (1994).** “Virulence factors and O groups of *Escherichia coli* strains isolated from cultures of blood specimens from urosepsis and non-urosepsis patients.” *Microbiología*. **10(3)**: 249-256.

**Blanco M., Blanco JE., et al. (1996).** “Virulence factors and O groups of *Escherichia coli* isolates from patients with acute pyelonephritis, cystitis and asymptomatic bacteriuria.” *Eur J Epidemiol* **12**: 191-198.

**Blanco M., Blanco J.E., et al. (1997).** “Detection of pap, sfa and afa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with expression of adhesins and production of toxins.” *Res Microbiol* **148**: 745-755.

**Blanco J.E., Blanco M., et al. (1997a).** “Production of toxins (enterotoxins, verotoxins, and necrotoxins) and colicins by *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens: relationship with in vivo pathogenicity.” *J Clin Microbiol* **35**: 2953-2957.

**Blanco J.E., Blanco M., et al. (1998).** “Serotypes of *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens in Galicia (northwest Spain).” *Vet Microbiol* **61**: 229-235.

**Blanco J., Blanco M., et al. (2002).** “Enterobacterias: características generales. Género *Escherichia*.” En: *Manual de Microbiología Veterinaria*. Eds. Vadillo S., Píriz S & Mateos E. McGraw-Hill Interamericana, Madrid. pp.301-325.

**Blanco J.E., Blanco M., et al. (2004a).** “Serotypes, virulence genes and intimin types of shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from human patients: prevalence in Lugo (Spain) from 1992 through 1999.” *J Clin Microbiol* **42**: 311-319.

**Blanco M., Blanco J.E., et al. (2004b).** “Serotypes, virulence genes and intimin types of shiga toxin (Verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain: identification of a new intimin variant gene (eae-ξ).” *Clin Microbiol* **42**: 645-651.

**Blanco M., Blanco J.E., et al. (2004c).** “Typing of intimin (eae) genes in attaching and effacing *Escherichia coli* strains from monkeys.” *J Clin Microbiol* **2**: 1382-1383.

**Blanco M., Alonso M.P., et al. (2009).** “Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in Lugo (Spain): dissemination of clone O25b:H4-ST131 producing CTX-M-15.” *J Antimicrob Chemother* **63**: 1135-1141.

**Blanco J., Mora A., et al. (2011).** “National survey of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections reveals the spread of drug-resistant clonal groups O25b:H4-B2-ST131, O15:H1-D-ST393 and CGA-D-ST69 with high virulence gene content in Spain.” *J Antimicrob Chemother* **66**: 2011-2021.

**Blanco J., Mora A., et al. (2013).** “Four main virotypes among extended-spectrum-beta-lactamase-producing isolates of *Escherichia coli* O25b:H4-B2-ST131: bacterial, epidemiological, and clinical characteristics.” *J Clin Microbiol* **51**: 3358-3367.

**Bonnedahl J., Drobni M., et al. (2009).** “Dissemination of *Escherichia coli* with CTX-M type ESBL between humans and yellow-legged gulls in the south of France.” *PloS One* **4**, e5958.

**Bonnedahl J., Drobni P., et al. (2010).** “Characterization, and comparison, of human clinical and black-headed gull (*Larus ridibundus*) extended-spectrum beta-lactamase-producing bacterial isolates from Kalmar, on the south-east coast of Sweden.” *J Antimicrob Chemother* **65**, 1939-1944.

**Bonnet R., Dutour C., et al. (2001).** “Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240Gly.” *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 2269-2275.



- Bonnet R. (2004).** “Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: the CTX-M enzymes.” *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 1-14.
- Bonnin R.A., Poirel L., et al. (2012).** “Characterization of an IncFII plasmid encoding NDM-1 from *Escherichia coli* ST131.” *PloS One* **7**: e34752.
- Boyd E.F., Hill C.W., et al. (1996).** “Mosaic structure of plasmids from natural populations of *Escherichia coli*.” *Genetics* **143**: 1091-1100.
- Briñas L., Moreno M.A., et al. (2003).** “Detection of CMY-2, CTX-M-14, and SHV-12  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* fecal-sample isolates from healthy chickens.” *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 2056-2058.
- Briñas L., Moreno M.A., et al. (2005).** “Monitoring and characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* strains healthy and sick animals in Spain in 2003.” *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 1262-1264.
- Brisse S., Dancourt L., et al. (2012).** “Phylogenetic distribution of CTX-M and Non-extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates: group B2 isolates, except clone ST131, rarely produce CTX-M Enzymes.” *J Clin Microbiol* **50**: 2974-2981.
- Buckles E.L., Wang X., (2009).** “Role of the K2 capsule in *Escherichia coli* urinary tract infection and serum resistance. *J Infect Dis* **199**, 1689-1697.
- Burgess MJ., Johnson JR., (2015).** “Long-Term care facilities are reservoirs for antimicrobial-resistant sequence type 131 *Escherichia coli*. *Open Forum Infect Dis* **2**: ofv011. Doi: 10.1093/ofid/ofv011.
- Bush K., Jacoby G.A., et al. (1995).** “A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**: 1211-1233.
- Cagnacci S., Gualco L., et al. (2008).** “European emergence of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* clonal groups O25:H4-ST131 and O15:K52:H1 causing community-acquired uncomplicated cystitis.” *J Clin Microbiol* **46**: 2605-2612.
- Calvo J. and Martínez-Martínez. (2009).** “Mecanismos de acción de los antimicrobianos.” *Enferm Infecc Microbiol Clin* **27**: 44-52.
- Can F., Azaó OK., (2015).** “Emerging *Escherichia coli* O25b/ST131 clone predicts treatment failure in urinary tract infections. *Clin Infect Dis* **60**: 523-7.
- Cantón R. and Coque T.M. (2006).** “The CTX-M beta-lactamase pandemic.” *Curr Opin Microbiol* **9**: 466-475.
- Cantón R., Valverde A., et al. (2007).** «Evolución y panorama actual de las BLEE.» *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2**: 2-10.
- Cantón R., Akóva M., et al. (2012).** “Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe.” *Clin Microbiol Infect* **18**: 413-431.

**Cao X., Cavaco L.M., et al. (2011).** “Molecular characterization and antimicrobial susceptibility testing of *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections in 20 Chinese hospitals.” J Clin Microbiol **49**: 2496-2501.

**Carattoli A., Lovari S., et al. (2005).** “Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Rome, Italy, from 2001 to 2003.” Antimicrob Agents Chemother **49**: 833-835.

**Carattoli A., Lovari S., et al. (2005).** “Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Rome, Italy, from 2001 to 2003. » Antimicrob Agents Chemother **49**: 833-835.

**Chanawong A., M’Zali F.H., et al. (2002).** “Three cefotaximases, CTX-M-9, CTX-M-13, and CTX-M-14, among *Enterobacteriaceae* in the People’s Republic of China.” Antimicrob Agents Chemother **46**, 630-637.

**Chaudhuri R.R. and Henderson I.R. (2012).** “The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny.” Infect, Genet and Evol **12**, 214-226.

**Chen H., Shu W., et al. (2010).** “The profile of antibiotics resistance and integrons of extended-spectrum beta-lactamase producing thermotolerant coliforms isolated from the Yangtze River basin in Chongqing.” Environ Pollut **158**: 2459-2464.

**Cheng MF., Chen WL., et al. (2015).** “Emergence of extended spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* O25b-ST131: A major community-acquired uropathogen in infants”. Pediatr Infect Dis J **34**: 469-75.

**Cho SY., Kang Cl., et al. (2015).** “Clinical features and treatment outcomes of bloodstream infections caused by extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* sequence type 131”. Microb Drug Resist.

**Cid D., Blanco M., et al. (1996).** “Serogroups, toxins and antibiotic resistance of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic kids in Spain.” Vet Microbiol. **53**: 349-354.

**Ciesielczuk H., Betts J., et al. (2015).** “Comparative virulence of urinary and bloodstream isolates of extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* in a *Galleria mellonella* model”. Virulence. **6**: 145-51.

**Clark G., Paszkiewicz K., et al. (2012).** “Genomic analysis uncovers a phenotypically diverse but genetically homogeneous *Escherichia coli* ST131 clone circulating in unrelated urinary tract infections.” J Antimicrob Chemother **67**: 868-77.

**Clermont O., Bonacorsi S., et al. (2000).** “Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group.” Appl Environ Microbiol **66**: 4555-4558.

**Clermont O., Johnson J.R., et al. (2007).** “Determination of *Escherichia coli* O types by alleles-specific polymerase chain reaction: application to the O types involved in human septicemia.” Diagn Microbiol Infect Dis **57**: 129-136.

**Clermont O., Lavollay M., et al. (2008).** “The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup”. J Antimicrob Chemother **61**(Pt 5): 980-8.

**Clermont O., Dhanji H., et al. (2009).** “Rapid detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* encompassing the CTX-M-15-producing strains.” J Antimicrob Chemother **64**: 274-277.

**Clermont O., Gordon D., et al. (2015).** “Guide to the various phylogenetic classification schemes for *Escherichia coli* and the correspondence among schemes”. Microbiology **161**(Pt): 980-8.

**Clinical and Laboratory Standards Institute, (2010).** “Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational supplement M100-S19”. CLSI, Wayne, PA 19087, USA.

**Coelho A., Mora A., et al. (2011).** “Spread of *Escherichia coli* O25B:H4-B2-ST131 producing CTX-M-15 and SHV-12 with high virulence gene content in Barcelona (Spain).” J Antimicrob Chemother **66**: 517-526.

**Coira A. 2008.** “B-lactamasas de espectro ampliado: Estudio comparativo del período 1989-1993 con la situación actual.” Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.

**Colomer-Lluch M., Mora A., et al. (2013).** “Detection of quinolone-resistant *Escherichia coli* isolates belonging to clonal groups O25b:H4-B2-ST131 and O25b:H4-D-ST69 in raw sewage and river water in Barcelona, Spain.” J Antimicrob Chemother **68**: 758-765.

**Colpan A., Johnson B., et al. (2013).** “*Escherichia coli* sequence type 131 (ST131) subclone H30 as an emergent multidrug-resistant pathogen among US veterans.” Clin Infect Dis **57**: 1256-1265.

**Coque T.M., Novais A., et al. (2008).** “Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15.” Emerg Infect Dis **14**: 195-200.

**Cortés P., Blanc V., et al. (2010).** “Isolation and characterization of potentially pathogenic antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains from chicken and pig farms in Spain.” Appl Environ Microbiol **76**: 2799-2805.

**Costa D., Poeta P., et al. (2004).** “Detection of CTX-M-1 and TEM-52  $\beta$ -lactamasas in *Escherichia coli* strains from healthy pets in Portugal.” J Antimicrob Chemother **54**:960-1.

**Costa D., Poeta P., et al. (2006).** “Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum  $\beta$ -lactamasas of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal.” J Antimicrob Chemother **58**: 1311-2.

**Croxall G., Hale J., et al. (2011).** “Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates from a regional cohort of elderly patients highlights the prevalence of ST131 strains with increased antimicrobial resistance in both community and hospital care settings.” J Antimicrob Chemother **66**: 2501-2508.

**Dahbi G., Mora A., et al. (2013).** “Emergence of new variants of ST131 clonal group among extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamasas”. Int J Antimicrob Agents **42**: 347-351.

**Dahbi G., Mora A., et al. (2014).** “Molecular epidemiology and virulence of *Escherichia coli* O16:H5-

ST131: Comparison with H30 and H30-Rx subclones of O25b:H4-ST131". *Int J Med Microbiol* **304**, 1247-1257.

**Dan L., Liu B., et al. (2010).** "A multiplex PCR method to detect 14 *Escherichia coli* serogroups associated with urinary tract infections." *J Microbiol Methods* **82**: 71-77.

**D'Andrea M.M., Arena F., et al. (2013).** "CTX-M-type-lactamases: A successful story of antibiotic resistance". *International Journal of Medical Microbiology* **303**:305-317.

**Dawson KG., Emerson JC., et al. (1999).** Fifteen years of experience with bacterial meningitis". *Pediatr Infect Dis J* **18**: 816-22.

**Daza Pérez R.M. (1998).** "Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria." *Inf Ter Sist Nac Salud* **22**: 57-67.

**De Been M., Lanza V.F., et al. (2014).** "Dissemination of cephalosporin resistance genes between *Escherichia coli* strains from farm animals and humans by specific plasmid lineage." *PLoS Genet* **10**: e1004776.

**DebRoy M., Fratamico P.M., et al. (2005).** "Development of PCR assays targeting genes in O-antigen gene clusters for detection and identification of *Escherichia coli* O45 and O55 serogroups." *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 4919-4924.

**DebRoy C., Roberts E., et al. (2011).** "Detection of O antigens in *Escherichia coli*." *Anim Health Res Rev* **12**: 169-85.

**De Champs C., Sirot D., et al. (2000).** "A 1998 survey of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Enterobacteriaceae* in France. The French Study Group." *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 3177-3179.

**De Rycke J., González E.A., et al. (1990).** "Evidence for two types of cytotoxic necrotozing factor in human and animal clinical isolates of *Escherichia coli*." *J Clin Microbiol* **28**: 694-699.

**Dhanji H., Murphy N.M., et al. (2011).** "Isolation of fluoroquinolone-resistant O25b:H4-ST131 *Escherichia coli* with CTX-M-14 extended-spectrum beta-lactamase from UK river water." *J Antimicrob Chemother* **66**: 512-516.

**Dhanji H., Doumith M., et al. (2011a).** "Molecular epidemiology of fluoroquinolone-resistant ST131 *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in nursing homes in Belfast, UK." *J Antimicrob Chemother* **66**: 297-303.

**Dho-Moulin M and Fairbrother JM. (1999).** "Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC)". *Vet Res* **30**: 299-316.

**Díaz M.A., Hernández R.J., et al. (2009).** "Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Spanish hospitals: 2nd multicenter study (GEIH-BLEE project, 2006)." *Enferm Infecc Microbiol Clin* **27**: 503-510.



**Díaz M.A., Hernández-Bello J.R., et al. (2010).** “Diversity of *Escherichia coli* strain producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain: second nationwide study.” *J Clin Microbiol* **48**: 2840-2845.

**Diestra K., Coque T.M., et al. (2008).** “Characterization and molecular epidemiology of ESBL in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in 11 Spanish hospitals (2004).” *Enferm Infecc Microbiol Clin* **26**: 404-410.

**Dijkshoorn L., Ursing B.M., et al. (2000).** “Strain, clone and species: comments on three basic concepts of bacteriology.” *J Med Microbiol* **49**, 397-401.

**Directiva 2010/63/UE del parlamento europeo y del consejo de 22 de septiembre de 2010** relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:es:PDF>

**Diwan V., Chandran S.P., et al. (2012).** “Identification of extended-spectrum beta-lactamase and quinolone resistance genes in *Escherichia coli* isolated from hospital wastewater from central India.” *J Antimicrob Chemother* **67**: 857-859.

**Dobrindt U., Chowdary M.G., et al. (2010).** “Genome dynamics and its impact on evolution of *Escherichia coli*”. *Med Microbiol Immunol*.

**Doh M. and Fairbrother J. (1999).** “Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC).” *Vet Res* **30**: 299-316.

**Dolejska M., Biersova B., et al. (2009).** “Antibiotic-resistant *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates with integrons and extended-spectrum beta-lactamases in Surface water and sympatric black-headed gulls.” *J Appl Microbiol* **106**, 1941-1950.

**Dolejska M., Frolkova P., et al. (2011).** “CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone B2-O25b-ST131 and *Klebsiella* SPP. Isolates in municipal wastewater treatment plant effluents.” *J Antimicrob Chemother* **66**: 2784-2790.

**Downing T. (2015).** “Tacking drug resistant infection outbreaks of global pandemic *Escherichia coli* ST131 using evolutionary and epidemiological genomics.” *Microorganisms* **3**: 236-267.

**Dozois C.M., Dho-Moulin M., et al. (2000).** “Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region.” *Infect Immun* **68**: 4145-4154.

**Drawz S.M., Porter S., et al. (2015).** “Variation in resistance traits, phylogenetic backgrounds, and virulence genotypes among *Escherichia coli* clinical isolates from adjacent hospital campuses serving distinct patient populations.” *Antimicrob Agents Chemother* **59**: 5331-9.

**Duan R.S., Sit T.H.C., et al. (2006).** “*Escherichia coli* producing CTX-M beta-lactamases in food animals in Hong Kong.” *Microb Drug Res* **12**: 145-148.

**Dubois D., Delmas J., et al. (2010).** “Cyclomodulins in urosepsis strains of *Escherichia coli*.” *J Clin*



Microbiol **48**: 2122-2129.

**Dutour C., Bonnet R., et al. (2002).** “CTX-M-1, CTX-M-3, and CTX-M-14  $\beta$ -lactamases from *Enterobacteriaceae* isolated in France.” *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 534-537.

**Escherich T. (1885).** “Die darmbakterien des neugeborenen und säuglings.” *Fortschritte der Medizin* **3**: 515-522.

**Escobar-Páramo P., Clermont O., et al. (2004).** “A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*”. *Mol Biol Evol* **21**: 1085-94.

**European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). (2013).** Surveillance Report. Antimicrobial resistance surveillance in Europe. European Centre for Disease Prevention and Control.

**Ewers C., Grobbel M., et al. (2010).** “Emergence of human pandemic O25:H4-ST131 CTX-M-15 extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* among companion animals.” *J Antimicrob Chemother* **65**: 651-660.

**Ewers C., Bethe A., et al. (2012).** “Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective.” *Clin Microbiol Infect* **18**: 646-655.

**Ewing W.H. (1986).** The genus *Escherichia*. Edwards and Ewing’s identification of Enterobacteriaceae, 4 ed. Capítulo 6. Elsevier, Nueva York.: 93-134

**Fang J., Nowicki B.J., et al. (2004).** “Epithelial invasion by *Escherichia coli* bearing Dr fimbriae is controlled by nitric oxide-regulated expression of CD55.” *Infect Immun.* **72**, 2907-2914.

**Fernández J., Montero I., et al. (2014).** “Cluster of *Escherichia coli* isolates producing a plasmid-mediated OXA-48  $\beta$ -lactamase in a Spanish hospital in 2012.” *J Clin Microbiol* **52**: 3414-3417.

**Forde BM., Ben Zakour NL., et al. (2014).** “The complete genome sequence of *Escherichia coli* EC958: a high quality reference sequence for the globally disseminated resistant *E. coli* O25b:H4-ST131 clone”. *PloS One* **9**: e104400.

**Freeman J.T., McBride S.J., et al. (2008).** “Community-onset genitourinary tract infection due to CTX-M-15-producing *Escherichia coli* among travelers to the Indian subcontinent in New Zealand.” *Clin Infect Diseases* **47**: 689-92.

**Freeman JT., Rubin J., et al. (2014).** “Differences in risk-factor profiles between patients with ES-BL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: a multicentre case-case comparison study”. *Antimicrob resist Infect Control* **1**;3:27.

**Galvin S., Boyle F., et al. (2010).** “Enumeration and characterization of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* bacteria in effluent from municipal, hospital, and secondary treatment facility sources.” *Appl Environ Microbiol* **76**: 4772-4779.

- García C.S., de la Gándara M.P., et al. (2010).** “Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*.” *Enfer Infecc Microbiol Clin* **28**: 12-18.
- García Sánchez J.E., Fresnadillo M.J., et al. (1997).** “Resistencia a los antimicrobianos que no inhiben la síntesis de la pared celular.” En: *tratamiento Antimicrobiano*. Madrid. Emisa 1997; 35-50.
- Garénaux A., Caza M., et al. (2011).** “The ins and outs of siderophore mediated iron uptake by extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*.” *Veterinary Microbiology* **153**: 89-98.
- Garmyn A., Haesebrouck F., et al. (2011).** “Presence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in wild geese.” *J Antimicrob Chemother* **66**, 1643-1644.
- Germon P., Chen YH., et al. (2005).** “ibeA, a virulence factor of avian pathogenic *Escherichia coli*.” *Microbiology* **151(Pt4)**: 1179-1186.
- Geser N., Stephan R., et al., (2012).** “Molecular identification of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase genes from *Enterobacteriaceae* isolated from healthy human carriers in Switzerland.” *American Society for Microbiol* **56**, 1609-1612.
- Geser N., Stephan R., et al. (2011).** “Fecal carriage of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in swine and cattle at slaughter in Switzerland.” *J Food Prot* **74**:446-449.
- Gibreel T.M., Dodgson A.R., et al. (2012).** “Population structure, virulence potential and antibiotic susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* fom Northwest.” *J Antimicrob Chemother* **67**: 346-356.
- Girlich D., Poirel L., et al. (2007).** “Extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-1 in *Escherichia coli* isolates from healthy poultry in France.” *Appl Environ Microbiol* **73(14)**: 4681-4685.
- Gniadkowski M., Schneider I., et al. (1998).** “Cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from a hospital in Warsaw, Poland: identification of a new CTX-M-3 cefotaxime-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase that is closely related to the CTX-M-1/MEN-1 enzyme.” *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 827-832.
- Gonçalves A., Torres C., et al. (2010).** “Genetic characterization of extended-spectrum beta-lactamasas in *Escherichia coli* isolates of pigs from a Portuguese intensive swine farm.” *Foodborne Pathog Dis* **7**: 1569-1573.
- Gordon D.M. and Cowling A. (2003).** “The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects.” *Microbiology*. **146**: 3575-3586.
- Greenacre M. (1992).** “Correspondence analysis in medical research.” *Stat Methods Med Res* **1**: 97-117.
- Guenther S., Grobbel M., et al. (2010).** “Detection of pandemic B2-O25-ST131 *Escherichia coli* harbouring the CTX-M-9 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase type in a feral urban brown rat (*Rattus norvegicus*).” *J Antimicrob Chemother* **65**: 582-584.

- Guenther S., Grobbel M., et al. (2010a).** “CTX-M-15-type extended-spectrum beta-lactamases-producing *Escherichia coli* from wild birds in Germany.” *Environ Microbiol Rep* **2**, 641-645.
- Guenther S., Ewers C., et al. (2011).** “Extended-spectrum beta-lactamases producing *E. coli* in wild life, yet another form of environmental pollution?.” *Front Microbio* **2**:246.
- Guinée P.A.M., Agterberg C.M., et al. (1981).** “*Escherichia coli* associated with neonatal diarrhoea in piglets and calves. En: laboratory diagnosis in neonatal calf and pig diarrhea: Current Topic in veterinary and animal Science.” Eds. Leeww P.W., & Guinée P.A.M. Martinus Nijhoff Publishers. Holanda. **13**: 126-162.
- Gurnee EA., Ndao IM., et al. (2015).** “Gut colonization of healthy children and their mothers with pathogenic ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli*.” *J Infect Dis*.
- Guyer D., Radulovic S., et al. (2002).** “Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells.” *Infect Immun* **70**: 4539-4546.
- Hacker J. and Carniel E. (2001).** “Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes.” *EMBO Rep* **2**: 376-81.
- Han JH., Johnston B., et al. (2014).** “Clinical and molecular epidemiology of *Escherichia coli* sequence type 131 among hospitalized patients colonized intestinally with fluoroquinolone-resistant *E. coli*.” *Antimicrob Agents Chemother* **58**: 7003-6.
- Harada K., Nakai Y., et al. (2012).** “Mechanisms of resistance to cephalosporin and emergence of O25b-ST131 clone harboring CTX-M-27  $\beta$ -lactamase in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from dogs and cats in Japan.” *Microbiol Immunol* **56**: 480-485.
- Hartl D.L. and Dykhuizen D.E. (1984).** “The population genetics of *Escherichia coli*.” *Annu Rev Genet* **18**: 31-68.
- Hernández J.R., Pascual A., et al. (2003).** «Grupo de estudio de infección hospitalaria (GEIH) *E. coli* y *K pneumoniae* productores de betalactamasas de espectro extendido en Hospitales Españoles (proyecto GEIH-BLEE 2000).» *Enferm Infecc Microbiol Clin* **21**: 77-82.
- Hernández J.R., Martínez-Martínez L., et al. (2005).** “Nationawide study of *E. coli* and *K. pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain.” *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 2122-2125.
- Hernandez J., Bonnedah J., et al. (2010).** “Globally disseminated human pathogenic *Escherichia coli* of O25b-ST131 clone, harbouring *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, found in Glaucous-winged gull at remote Commander Islands, Russia.” *Environmental Microb Reports* **2**, 329-332.
- Hernández J., Stedt J., et al. (2012).** “Human-associated extended-spectrum beta-lactamase in the Antarctic.” *Appl Environ Microbiol* **78**: 2056-2058.
- Ho P.L., Chow K.H., et al. (2011).** “Extensive dissemination of CTX-M-producing *Escherichia coli*

with multidrug resistance to “critically important” antibiotics among food animals in Hong Kong, 2008-10.” *J Antimicrob Chemother* **66**, 765-768.

**Ho P.L., Chu YP., et al. (2015).** “High prevalence of *Escherichia coli* sequence type 131 among antimicrobial-resistant *E. coli* isolates from geriatric patients. *J Med Microbiol* **64(Pt)**: 243-7.

**Holland R.E. (1990).** “Some infectious causes of diarrhea in young farm animals.” *Clin Microbiol Rev* **3**: 345-375.

**Hopkins K., Liebana E., et al. (2006).** “Replicon typing of plasmids carrying CTX-M or CMY  $\beta$ -lactamases circulating among *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates.” *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 3203-3206.

**Horcajo J.P and Cantón R. (2014).** “Ceftarolina, un Nuevo antimicrobiano de amplio espectro en la era de las multirresistencias.” *Enfer Infecc Microbiol Clin* **32**: 1-7.

**Horner C., Fawley W., et al. (2014).** “*Escherichia coli* bacteraemia: 2 years of prospective regional surveillance (2010-2012).” *J Antimicrob Chemother* **69**: 91-100.

**Hristea A., Olaru ID., et al. (2015).** “Characterization of ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from bloodstream infections in three hospitals in Bucharest, Romania: a preliminary study.” *Infct Dis (Lond)* **47**: 46-51.

**Hussain A., Ranjan A., et al. (2014).** “Genotypic and phenotypic profiles of *Escherichia coli* isolates belonging to clinical sequence type 131 (ST131), clinical non-ST131, and fecal non-ST131 lineages from India”. *Antimicrob Agents Chemother* **58**: 7240-9.

**Izdebski R., Baranlak A., et al. (2013).** “Clonal structure, extended-spectrum beta-lactamases, and acquired AmpC-type cephalosporinases of *Escherichia coli* populations colonizing patients in rehabilitation centers in four countries.” *Antimicrob Agents Chemother* **57**: 309-316.

**Jadhav S., Hussain A., et al. (2011).** “Virulence characteristics and genetic affinities of multiple drug resistant uropathogenic *Escherichia coli* from a semi urban locality in India.” *PLoS One* **6**: e18063.

**Jarlier V., Nicolas M.H., et al. (1988).** “Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns.” *Rev Infect Dis* **10**: 867-878.

**Jauréguy F. (2009).** “Host and bacterial determinants of *Escherichia coli* extra intestinal infections. *Med Sci (Paris)* **25**: 221-223.

**Jensen L.B., Hasman H., et al. (2006).** “First description of an oxyminio-cephalosporin-resistant, ESBL-carrying *Escherichia coli* isolated from meat sold in Denmark.” *J Antimicrob Chemother* **57**: 793-794.

**Johnson J.R. (1991).** “Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection.” *Clin Microbiol Rev* **4**: 80-128.



**Johnson J.R., Stapleton A.E., et al. (1997)** “Characteristics and prevalence within serogroup O4 of a J96-like clonal group of uropathogenic *Escherichia coli* O4:H5 containing the class III alleles of papG.” *Infect Immun* **65**: 2153-2159.

**Johnson JR and Stell AL. (2000).** “Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise.” *J Infect Dis* **181**:261-272. Erratum in: *J Infect Dis* 181:2122.

**Johnson JR., Russo TA., et al. (2000a).** “Molecular epidemiological and phylogenetic associations of two novel putative virulence genes, *iha* and *iroN*(*E. coli*), among *Escherichia coli* isolates from patients with urosepsis.” *Infect Immun* **68**:3040-7.

**Johnson JR, Stell AL., et al., (2000b).** “Analysis of the F antigen-specific papA alleles of extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* using a novel multiplex PCR-based assay”. *Infect Immun* **68(3)**:1587-99. Erratum in: *Infect Immun* 68(12):7215.

**Johnson J.R. and Russo T.A. (2002).** “Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: “the other bad *E. coli*”. *J Lab Clin Med* **139**: 155-62.

**Johnson J.R. (2003).** “Microbial virulence determinants and the pathogenesis of urinary tract infection.” *Infect Dis Clin North Am* **17**: 261-278.

**Johnson J.R., Murray A.C., et al. (2003).** “Isolation and molecular characterization of nalidixic acid-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from retail chicken products”. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 2161-2168.

**Johnson J.R., Gajewski A., et al. (2003a).** “Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as a cause of invasive nonurinary infections.” *J Clin Microbiol* **41**: 5798-5802.

**Johnson J.R., and O’Bryan T.T. (2004).** “Detection of the *Escherichia coli* group 2 polysaccharide capsule synthesis Gene *kpsM* by a rapid and specific PCR-based assay”. *J Clin Microbiol* **42**:1773-1776.

**Johnson J.R., Clermont O., et al. (2006).** Experimental mouse lethality of *Escherichia coli* isolates, in relation to accessory traits, phylogenetic group, and ecological source. *J Infect Dis* **294**: 1141-1150.

**Johnson J.R., Menard M., et al. (2009).** “Epidemic clonal groups of *Escherichia coli* as a cause of antimicrobial-resistant urinary tract infections in Canada, 2002 to 2004.” *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 2733-2739.

**Johnson J.R., Johnston B., et al. (2010).** “*Escherichia coli* sequence type ST131 as the mayor cause of serious multidrug-resistant *E. coli* infections in the United States.” *Clin Infect Dis* **51**: 286-294.

**Johnson J.R., Menard M., et al. (2011).** “Global distribution and epidemiologic Associations of *Escherichia coli* clonal Group A, 1998-2007.” *Emerg Infect Dis* **17**: 2001-2009.



**Johnson J.R., Porter S.B., et al. (2012).** “Virulence of *Escherichia coli* clinical isolates in a murine sepsis model in relation to sequence type ST131 status, fluoroquinolone resistance, and virulence genotype”. *Infect Immun* **80**: 1554-62.

**Johnson J.R., Urban C., et al. (2012a).** “Molecular epidemiological analysis of *Escherichia coli* sequence type ST131 (O25:H4) and *bla*<sub>CTX-M-15</sub> among extended-spectrum-beta-lactamase-producing *E. coli* from the United States, 2000 to 2009.” *Antimicrob Agents Chemother* **56**: 2364-2370.

**Johnson J.R., Nicolas-Chanoine M.H., et al. (2012b).** “Comparison of *Escherichia coli* ST131 pulsed types, by epidemiologic traits, 1967-2009.” *Emerg Infect Dis* **18**: 598-607.

**Johnson J.R., Tchesnokova V., et al. (2013).** “Abrupt emergence of a single dominant multidrug-resistant strain of *Escherichia coli*.” *J Infect Dis* **207**: 919-928.

**Johnson J.R., Clermont O., et al. (2014).** “Rapid and specific detection, molecular epidemiology, and experimental virulence of the O16 subgroup within *Escherichia coli* sequence type 131.” *J Clin Microbiol* **52**: 1358-1365.

**Johnson J.R., Johnston B., et al. (2015).** “Intensity and mechanisms of fluoroquinolone resistance within the H30 and H30Rx subclones of *Escherichia coli* sequence type 131 vs. other fluoroquinolone-resistant *E. coli*.” *Antimicrob Agents Chemother* **59**: 4471-4480.

**Johnson T.J., Hargreaves M., et al. (2015).** “Complete genome sequence of a carbapenem-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strain belonging to the sequence type 131 H30R subclade.” *Genome Announc* 3(2). pii: e00272-15.

**Jones G.LI., Warren R.E. et al. (2008).** “Prevalence and distribution of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of *Escherichia coli* lacking extended-spectrum  $\beta$ -lactamases.” *J Antimicrob Chemother* **62**, 1245-1251.

**Kaper J.B., Nataro J.P., et al. (2004).** “Pathogenic *Escherichia coli*.” *Nat Rev Microbiol* **2**: 123-40.

**Karim A., Poirel L., et al. (2001).** “Plasmid-mediated extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence ISEcp1.” *FEMS Microbiol Lett* **201**, 237-241.

**Karisik E., Ellington M.J., et al. (2008).** “Virulence factors in *Escherichia coli* with CTX-M-15 and other extended-spectrum beta-lactamases in the UK.” *J Antimicrob Chemother* **61**: 54-8.

**Kauffmann F. (1947).** “The serology of the Coli group.” *J. Immunol.* **57**: 71-100.

**Kim J., Kang H.Y., et al. (2008).** “The identification of CTX-M-14, TEM-52, and CMY-1 enzymes in *Escherichia coli* isolated from the Han River in Korea.” *J Microbiol* **46**: 478-481.

**Kim K.S. (2002).** “Strategy of *Escherichia coli* for crossing the blood-brain barrier.” *J Infect Dis* **186 Suppl 2**:S220-4.

**Kim K.S. (2003).** “Pathogenesis of bacterial meningitis: from bacteraemia to neuronal injury.” *Nat*

Rev Neurosci **4**: 376-85.

**Kim K.S. (2008).** “Mechanisms of microbial traversal of the blood-brain barrier.” *Nat Rev Microbiol* **6**: 625-34.

**Kojima A., Ishii Y., et al. (2005).** “Extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from farm animals from 1999 to 2002: report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program.” *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 3533-3537.

**Kostakioti M. and Stathopoulos C. (2004).** “Functional analysis of the Tsh autotransporter from an avian pathogenic *Escherichia coli*.” *Infect Immun* **72**: 5548-5554.

**Kluytmans J.A., Overdevest I.T., et al. (2013).** “Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* from retail chicken meat and humans: comparison of strains, plasmids, resistance genes, and virulence factors.” *Clin Infect Dis* **56**: 478-487.

**Kresken M., Pfeifer Y., et al. (2014).** “Occurrence of multidrug resistance to oral antibiotics among *Escherichia coli* urine isolates from outpatient departments in Germany: extended-spectrum  $\beta$ -lactamases.” *Int J Antimicrob Agents* **44**:295-300.

**Kruis W., Fric P., et al. (2004).** “Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine.” *Gut* **53**:1617-23.

**Kudinha T., Johnson J.R., (2013).** “*Escherichia coli* sequence type 131 as a prominent cause of antibiotic resistance among urinary *Escherichia coli* isolates from reproductive-age women.” *J Clin Microbiol* **51**, 3270-3276.

**Kudinha T., Johnson J.R., et al. (2013a).** “Distribution of phylogenetic groups, sequence type ST131, and virulence-associated traits among *Escherichia coli* isolates from men with pyelonephritis or cystitis and healthy controls”. *Clin Microbiol Infect* **19**, E173-180.

**Lafolie J., Nicolas-Chanoine M.H., et al. (2014).** “Prevalence of *Escherichia coli* sequence type 131 and its *H30* subclone among *E. coli* isolates in a French hospital.” *Int J Antimicrob Agents* **44**: 466-468.

**Lahlaoui H., Ben Haj Khalifa A., et al. (2014).** “Epidemiology of enterobacteriaceae producing CTX-M type extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL).” *Med Mal Infect* **44**:400-4.

**Lanza VF., de Toro M., et al. (2014).** “Plasmid flux in *Escherichia coli* ST131 sublineages, analyzed by plasmid constellation network (PLACNET), a new method for plasmid reconstruction from whole genome sequences.” *PloS Genet* **10(12)**:e1004766.

**Lau S.H., Kaufmann M.E., et al. (2008).** “UK epidemic *Escherichia coli* strains A-E, with CTX-M-15 beta-lactamase, all belong to the international O25:H4-ST131 clone.” *J Antimicrob Chemother* **62**: 1241-1244.

**Laupland K.B., Gregson D.B., et al. (2008).** “Incidence, risk factors and outcomes of *Escherichia coli* bloodstream infections in a large Canadian region.” *Clin Microbiol Infect* **14**: 1041-1047.

**Lavigne J.P., Vergunst A.C., et al. (2012).** “Virulence potential and genomic mapping of the world-wide clone *Escherichia coli* ST131.” *PloS One* **7(3)**:e34294.

**Lavollay M., Mamlouk K., et al. (2006).** “Clonal dissemination of a CTX-M-15 beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strain in the Paris area, Tunis, and Bangui.” *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 2433-2438.

**Lazarus B., Paterson D.L., et al. (2015).** “Do human extraintestinal *Escherichia coli* infections resistant to expanded-spectrum cephalosporins originate from food-producing animals? A systematic review.” *Clin Infect Dis* **60**: 439-52.

**Le Bouguenec C., Archambaud M., et al. (1992).** “Rapid and specific detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction.” *J Clin Microbiol* **30**:1189-1193.

**Leflon-Guibout V., Jurand C., et al. (2004).** “Emergence and spread of three clonally related virulent isolates of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* with variable resistance to aminoglycosides and tetracycline in a French geriatric hospital.” *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 3736-3742.

**Leflon-Guibout V., Blanco J., et al. (2008).** “Absence of CTX-M enzymes but high prevalence of clones, including clone ST131, among fecal *Escherichia coli* isolates from healthy subjects living in the area of Paris, France.” *J Clin Microbiol* **46**: 3900-3905.

**Le Gall T., Clermont O., et al. (2007).** “Extraintestinal virulence is a coincidental by-product of commensalism in B2 phylogenetic group *Escherichia coli* strains.” *Mol Biol Evol* **24**: 2373-84.

**Liébana E., Batchelor M., et al. (2006).** “Longitudinal farm study of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-mediated resistance.” *J Clin Microb* **44**: 1630-1634.

**Li B., Sun J.Y., et al. (2011).** “High prevalence of CTX-M  $\beta$ -lactamases in faecal *Escherichia coli* strains from healthy humans in Fuzhou, China.” *Scand J Infect Dis* **43**: 170-174.

**Li J.J., Spychala C.N., et al. (2015).** “Complete nucleotide sequences of  $bla_{\text{CTX-M}}$ -harboring IncF plasmids from communitary-associated *Escherichia coli* strains in the United States.” *Antimicrob Agents Chemother* **59**: 3002-7.

**Lindberg S., Xia Y., et al. (2008).** “Regulatory interactions among adhesin gene systems of uropathogenic *Escherichia coli*.” *Infect Immun* **76**: 771-780.

**Literack I., Dolejska M., et al. (2009).** “Reservoirs of antibiotic-resistant *Enterobacteriaceae* among animals sympatric to human in Senegal: extended-spectrum beta-lactamases in bacteria in a black rat (*Rattus rattus*).” *Afr J Microbiol Res* **3**, 751-754.

**Literacka E., Bedenic B., et al. (2009a).** “ $bla_{\text{CTX-M}}$  genes in *Escherichia coli* strains from Croatian Hospitals are located in new( $bla_{\text{CTX-M-3a}}$ ) and widely spread ( $bla_{\text{CTX-M-3a}}$  and  $bla_{\text{CTX-M-15}}$ ) genetic structures.” *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 1630-1635.

**Literack I., Dolejska M., et al. (2009b).** “Antimicrobial-resistant faecal *Escherichia coli* in wild mam-

mals in central Europe: multiresistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in wildboards". *J Appl Microbiol* **108**, 1702-1711.

**Literack I., Dolejska M., et al. (2010).** "Antibiotic-resistant *Escherichia coli* bacteria, including strains with genes encoding the extended-spectrum beta-lactamase and QnrS, in waterbirds on the Baltic Sea Coast of Poland." *Appl Environ Microbiol* **76**, 8126-8134.

**Liu J.H., Wei S.Y., et al. (2007).** "Detection and characterization of CTX-M and CMY-2  $\beta$ -lactamases among *Escherichia coli* isolates from farm animals in Guangdong province of China." *Intern J Antimicrob Agents* **29**: 576-581.

**Livermore D.M and Hawkey P.M. (2005).** "CTX-M: changing the face of ESBLs in the UK." *J Antimicrob Chemother* **56**, 451-454.

**Livermore D.M., Cantón R., et al. (2007).** "CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe." *J of Antimicrob Chemother* **59**, 165-174.

**López-Cerero L., Egea P., et al. (2011).** "Characterisation of clinical and food animal *Escherichia coli* isolates producing CTX-M-15 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase belonging to ST410 phylogroup A." *Int J Antimicrob Agents* **37**: 365-367.

**López-Cerero L., Bellido M.D., et al. (2013).** "*Escherichia coli* O25b:H4-B2-ST131 are prevalent in Spain and are often not associated with ESBL or quinolone resistance." *Enfer Infecc Microbiol Clin* **31**: 385-8.

**López-Cerero L., Navarro M.D., et al. (2014).** "*Escherichia coli* belonging to the worldwide emerging epidemic clonal group O25b/ST131: risk factors and clinical implications." *J Antimicrob Chemother* **69**: 809-814.

**Ludden C., Cormican M., et al. (2015).** "Colonisation with ESBL-producing and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, vancomycin-resistant enterococci, and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a long-term care facility over one year." *BMC Infect Dis* **15**:168.

**Ma I., Ishii Y., et al. (2002).** "CTX-M-14, a plasmid-mediated CTX-M type extended-spectrum  $\beta$ -lactamase isolated from *Escherichia coli*." *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 1985-1988.

**Maciuca I.E., Williams N.J., et al. (2015).** "High prevalence of *Escherichia coli* producing CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamases in poultry and human clinical isolates in Romania." *Microb Drug Resist.*

**Mamani R. (2014).** "Caracterización molecular de cepas de *Escherichia coli* del grupo clonal O25b:H4-B2-ST131 y de otros clones causantes de infecciones extraintestinales en seres humanos. Genes de virulencia y de resistencia." Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.

**Mangers A.R., Tabor H., et al. (2008).** "Endemic and epidemic lineages of *Escherichia coli* that cause urinary tract infections." *Emerg Infect Dis* **14**: 1575-1583.

**Manges A.R. and Johnson J.R. (2012).** "Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintes-



tinal infections.” *Clin Infect Dis* **55**: 712-9.

**Manges A.R., Harel J., et al. (2015).** “Multilocus sequence typing and virulence gene profiles associated with *Escherichia coli* from human and animal sources.” *Foodborne Pathog Dis* **12**: 302-10.

**Marc D. and Dho-Moulin M. (1996).** “Analysis of the fim cluster of an avian O2 strain of *Escherichia coli*: serogroup-specific sites within *fimA* and nucleotide sequence of *fimI*.” *J Med Microbiol* **4**:444-452.

**Martinez-Medina M., Aldeguer X., et al. (2009).** “Molecular diversity of *Escherichia coli* in the human gut: new ecological evidence supporting the role of adherent-invasive *E. coli* (AIEC) in Crohn’s disease.” *Inflamm Bowel Dis* **15**: 872-882.

**Mathers A.J., Peirano G., et al. (2015).** “The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*.” *Clin Microbiol Rev* **28**: 565-591.

**Mathers A.J., Peirano G., et al. (2015a).** “*Escherichia coli* ST131: the quintessential example of an international multiresistant high-risk clone.” *Adv Appl Microbiol* **90**: 109-54.

**Matsumura Y., Yamamoto M., et al. (2012).** “Prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and spread of the ST131 clone among extended-spectrum beta-lactamase-producing *E. coli* in Japan.” *Int J Antimicrob Agents* **40**: 158-162.

**Matsumura Y., Yamamoto M., et al. (2012a).** “Emergence and spread of B2-ST131-O25b, B2-ST131-O16 and D-ST405 clonal group among extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan.” *J Antimicrob Chemother* **67**: 2612-2620.

**Matsumura Y., Yamamoto M., et al. (2012b).** “Cefotaxime for the detection of extended-spectrum beta-lactamase and clinical characteristics of cefotaxime-non-susceptible *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bacteremia.” *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **31**: 1931-1939.

**Matsumura Y., Nagao M., et al. (2013).** “Molecular and clinical characterization of plasmid-mediated AmpC-lactamase-producing *Escherichia coli* bacteraemia: a comparison with extended-spectrum beta-lactamase-producing and non-resistant *E. coli* bacteraemia.” *Clin Microbiol Infect* **19**: 161-168.

**Matsumura Y., Johnson J.R., et al. (2014).** “CTX-M-27 and CTX-M-14-producing, ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* of the H30 subclonal group within sequence type 131 drive the Japanese epidemic of extended-spectrum beta-lactamase-producing *E. coli*.” *J Antimicrob Chemother* **70**: 1639-49.

**Matsumura Y., Johnson J.R., et al. (2015).** “CTX-M-27 and CTX-M-14-producing, ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* on the H30 subclonal group within ST131 drive a Japanese regional ESBL epidemic.” *J Antimicrob Chemother* **70**: 1639-1649.

**Meunier D., Jouy E., et al. (2006).** “CTX-M-1 and CTX-M-15-type beta-lactamases in clinical *Esch-*



*erichia coli* isolates recovered from food-producing animals in France.” J Antimicrob Agents **28**: 402-407.

**Milkman R. (1973).** “Electrophoretic variation in *Escherichia coli* from natural sources.” Science **182**, 1024-1026.

**Mirelis B., Navarro F., et al. (2003).** “Community transmission of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase.” Emerging Infectious Diseases **9(8)**.

**Miró E., Agüero J., et al. (2013).** “Prevalence and molecular epidemiology of acquired AmpC  $\beta$ -lactamases and carbapenemases in *Enterobacteriaceae* isolates from 35 hospitals in Spain.” Eur J Clin Microbiol Infect Dis **32**: 253-259.

**Mora A. (2002).** “*Escherichia coli* verotoxigénicos (ECVT) O157 :H7 y no O157. Prevalencia, serotipos, fagotipos, genes de virulencia, tipos de intiminas, perfiles de PFGE y resistencia a antibióticos de ECVT de origen humano y animal.” Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.

**Mora A., Lopez C., et al. (2009).** “Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O1:K1:H7/NM from human and avian origin: detection of clonal group B2 ST95 and ST 59 with different host distribution.” BMC Microbiol **9**: 132.

**Mora A., Herrera A., et al. (2010).** “Recent emergence of clonal group O25b:K1:H4-B2-ST131 *ibeA* strains among *Escherichia coli* poultry isolates, including CTX-M-9-producing strains, and comparison with clinical human isolates.” Appl Environ Microbiol **76**: 6991-6997.

**Mora A., Blanco M., et al. (2011).** “Emergence of clonal group O1:HNM-D-ST59, O15:H1-D-ST393, O20:H34/HNM-D-ST354, O25b:H4-B2-ST131 and ONT:H21, 42-B1-ST101 among CTX-M-14-producing *Escherichia coli* clinical isolates in Galicia, northwest Spain.” Int J Antimicrob Agents **37**: 16-21.

**Mora A., López C., et al. (2012).** “Emerging avian pathogenic *Escherichia coli* strains belonging to clonal groups O111 :H4-D-ST2085 and O111 :H4-D-ST117 with high virulence-gene content and zoonotic potential.” Vet Microbiol **156(3-4)**: 374.352.

**Mora A., Viso S., et al. (2013).** “Poultry as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O45:K1:H7-B2-ST95 in humans.” Vet Microbiol **167(3-4)**: 506-512.

**Mora A., Dahbi G., et al. (2014).** “Virulence patterns in a murine sepsis model of ST131 *Escherichia coli* clinical isolates belonging to serotypes O25b:H4 and O16:H5 are associated to specific virotypes.” PloS One **9(1)**:e87025.

**Moreno E., Planells I., et al. (2005).** “Comparative study of *Escherichia coli* virulence determinants in strains causing urinary tract bacteremia versus strains causing pyelonephritis and other sources of bacteremia.” Diagn Microbiol Infect Dis **53**: 93-99.

**Moreno E., Prats G., et al. (2006).** «Caracterización de *Escherichia coli* de los grupos filogenéticos A y B1 causantes de infección extraintestinal.» Enferm Infecc Microbiol Clín **24**: 483-489.

**Moulin-Schouleur M., Schouler C., et al. (2006).** “Common virulence factors and genetic relationships between O18 :K1 :H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin.” J Clin Microbiol **44**: 3484-3492.

**Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. (2006).** “Microbiología Médica.” Capítulo 20: Antibióticos (pp. 203-212). Versión española de la 5ª edición de la obra en inglés: Medical Microbiology. Elsevier Mosby SA, Madrid.

**Nataro J.P and Kaper J.B. (1998).** “Diarrheagenic *Escherichia coli*.” Clin Microbiol Rev **11**: 142-201.

**Naseer U., Haldorsen B., et al. (2009).** “Sporadic occurrence of CMY-2-producing multidrug-resistant *Escherichia coli* of ST-complexes 38 and 448, and ST131 in Norway.” Clin Microbiol Infect **16**: 171-178.

**Naseer U., Olsson-Liljequist B., et al. (2012).** “Multi-Locus Variable Number of Tandem repeat Analysis for rapid and Accurate Typing of Virulent Multidrug Resistant *Escherichia coli* clones.” PloS One **7**: 1-6.

**Nicolas-Chanoine M.H., Blanco J., et al. (2008).** “Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15.” J Antimicrob Chemother **61**: 273-281.

**Nicolas-Chanoine M.H., Jarlier V., et al. (2012).** “Patient’s origin and lifestyle associated with CTX-M-producing *Escherichia coli*: a case-control-control study.” PloS One **7**: e30498.

**Nicolas-Chanoine M.H., Robert J., et al. (2013).** “Different factors associated with CTX-M-producing ST131 and non-ST131 *Escherichia coli* clinical isolates.” PloS One **8**: e72191.

**Nicolas-Chanoine M.H., Bertrand X., et al. (2014).** “*Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group.” Clin Microbiol Rev **27**: 543-574.

**Nissle A. (1918).** “Die antagonistische Behandlung chronischer Darmstorungen mit Colibakterian.” Med Klin (Munich) **2**: 29-30.

**Nordmann P. and Poirel L. (2014).** “The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide.” Clin Microbiol Infect **20**: 821-830.

**Nowrouzian F., Hesselmar B., et al. (2003).** “*Escherichia coli* in infants’ intestinal microflora: colonization rate, strain turnover, and virulence gene carriage.” Pediatr Rev **54**: 8-14.

**O’Hara J.A., Hu F., et al. (2014).** “Molecular epidemiology of KPC-producing *Escherichia coli*: occurrence of ST131-*fimH30* subclone harboring pKpQIL-like IncFIIk plasmid.” Antimicrob Agents chemother **58**: 4234-4237.

**Ochman J and Selander R.K. (1984).** “Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural population.” J. Bacteriol **157**, 690-693.

**Olesen B., Hansen D.S., et al. (2013).** “Prevalence and characteristics of the epidemic multiresis-

tant *Escherichia coli* ST131 clonal group among extended-spectrum beta-lactamase-producing *E. coli* isolates in Copenhagen, Denmark.” J Clin Microbiol **51**: 1779-1785.

**Olesen B., Frimodt-Moller J., et al. (2014).** “Temporal trends in antimicrobial resistance and virulence-associated traits within the *Escherichia coli* sequence type 131 clonal group and its H30 and H3a-Rx subclones, 1968 to 2012.” Antimicrob Agents Chemother **58**: 6886-6895.

**Orden J.A., Domínguez-Bernal G., et al. (2007).** “Necrotoxigenic *Escherichia coli* from sheep and goats produce a new type of cytotoxic necrotizing factor (CNF3) associated with the *eae* and *ehxA* genes.” Int Microbiol **10**: 47-55.

**Orskov F and Orskov I. (1984).** “Serotyping of *Escherichia coli*”. Methods in Microbiology. En Bergan T. Ed. Academic Press, Nueva York. 41: 43-112.

**Oteo J., Navarro C., et al. (2006).** “Spread of *Escherichia coli* strains with high-level cefotaxime and ceftazidime resistance between the community, long-term care facilities, and hospital institutions.” J Clin Microbiol **44**: 2359-2366.

**Oteo J., Diestra K., et al. (2009).** “Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Spain belong to a large variety of multilocus sequence typing types, including ST10 complex/A, ST23 complex/A and ST131/B2.” Int J Antimicrob Agents **34**: 173-176.

**Oteo L., Bautista V., et al. (2010).** “Parallel increase in community use of fosfomicin and resistance to fosfomicin in extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli*.” J Antimicrob Chemother **65(11)**: 2459-63.

**Oteo J., Saez D., et al. (2013).** “Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Spain in 2012.” Antimicrob Agents Chemother **57**: 6344-6347.

**Oteo J., Ortega A., et al. (2015).** “Prospective multicenter study of carbapenemase-producing enterobacteriaceae from 83 hospitals in Spain reveals high in vitro susceptibility to colistin and meropenem.” Antimicrob Agents Chemother **59**: 3406-12.

**Overdeest I.T., Bergmans A.M., et al. (2015).** “Prevalence of phylogroups and O25/ST131 in susceptible and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates, the Netherlands.” Clin Microbiol Infect **21**: 570.e1-4.

**Pai H., Choi E.H., et al. (2001).** “Identification of CTX-M-14 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in clinical isolates of *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, and *Klebsiella pneumoniae* in Korea.” J Clin Microbiol **39**, 3747-3749.

**Parret A.H. and De Mot R. (2002).** “*Escherichia coli*’s uropathogenic-specific protein: a bacteriocin promoting infectivity.” Microbiology **148**: 1604-1606.

**Paul S., Linardopoulou E.V., et al. (2013).** “Role of homologous recombination in adaptive diversification of extraintestinal *Escherichia coli*.” J Bacteriol **195**: 231-242.

**Peigne C., Bidet P., et al. (2009).** “The plasmid of *Escherichia coli* strain S88 (O45:K1 :H7) that

causes neonatal meningitis is closely related to avian pathogenic *E. coli* plasmids and is associated with high-level bacteremia in a neonatal rat meningitis model.” *Infect Immun* **77**: 2272-2284.

**Peirano G. and Pitout J. (2010).** “Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M beta-lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4.” *Int J Antimicrob Agents* **35**: 316-321.

**Peirano G., Richardson D., et al. (2010a).** “High prevalence of ST131 isolates producing CTX-M-15 and CTX-M-14 among extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from Canada.” *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 1327-1330.

**Peirano G., Costello M., et al. (2010b).** “molecular characteristics of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from the Chicago area: high prevalence of ST131 producing CTX-M-15 in community hospitals.” *Int J Antimicrob Agents* **36(1)**: 19-23.

**Peirano G., Schreckenberger P.C., et al. (2011).** “Characteristics of NDM-1-producing *Escherichia coli* isolates that belong to the successful and virulent clone ST131.” *Antimicrob Agents Chemother* **55**: 2986-2988.

**Peirano G., Asensi M.D., et al. (2011a).** “Molecular characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* from Rio de Janeiro, Brazil.” *Clin Microb and Infec* **17**, 1032-1052.

**Peirano G., Bij A., et al. (2012).** “Molecular epidemiology over an 11-year period (2000 to 2010) of Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* causing bacteremia in a centralized Canadian region.” *J Clin Microbiol* **50**: 294-299.

**Peirano G. and Pitout J. (2014).** “Fluoroquinolone-Resistant *Escherichia coli* sequence type 131 isolates causing bloodstream infection in a Canadian region with a centralized laboratory system: rapid emergence of the H30-Rx sublineage.” *Antimicrob Agents Chemother* **58**: 2699-2703.

**Peirano G., van der Bij A., et al. (2014a).** “Characteristics of *Escherichia coli* sequence type 131 isolates that produce extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: Global distribution of the H30-Rx sublineage.” *Antimicrob Agents Chemother* **58**: 3762-3766.

**Peirano G., Bradford P.A., et al. (2014b).** “Global Incidence of Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* ST131.” *Emerg Infect Dis* **20**: 1928-1931.

**Pérez F., Endimiani A., et al. (2007).** “The continuing challenge of ESBLs.” *Curr Opin Pharmacol* **7**: 459-469.

**Petty N., Ben Zakour N., et al. (2014).** “Global dissemination of a multidrug resistant *Escherichia coli* clone.” *PNAS Microbiology* **111**: 5694-5699.

**Phan M.D., Forde B.M., et al. (2015).** “Molecular characterization of a multidrug resistance IncF plasmid from the globally disseminated *Escherichia coli* ST131 clone.” *PloS One* **10**: e0122369.

**Picard B., García J.S., et al. (1999).** “The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection.” *Infect Immun* **67**, 546-553.



**Pinto L., Radhouani H., et al. (2010).** “Genetic detection of extended-spectrum beta-lactamase-containing *Escherichia coli* isolates from birds of prey from Serra da Estrela Natural reserve in Portugal.” *Appl Environ Microbiol* **76**, 4118-4120.

**Pitout J.D.D., Laupland K.B., et al. (2005).** “Virulence factors of *Escherichia coli* isolates that produce CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases.” *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 4667-4670.

**Pitout J.D., Gregson D.B., et al. (2009).** “Molecular characteristics of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates causing bacteremia in the Calgary Health Region from 2000 to 2007: emergence of clone ST131 as a cause of community-acquired infections.” *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 2846-2851.

**Pitout J.D. (2012).** “Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: an update on antimicrobial resistance, laboratory diagnosis and treatment.” *Expert Rev Anti Infect Ther* **10(10)**: 1165-1176.

**Platell J.L., Johnson J.R., et al. (2011).** “Multidrug-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* of sequence type ST131 in animals and foods.” *Veterinary Microbiology* **153**: 99-108.

**Platell J.L., Cobbold R., et al. (2011a).** “Commonality among fluoroquinolone-resistant sequence type ST131 extraintestinal *Escherichia coli* isolates from humans and companion animals in Australia.” *Antimicrob Agents Chemother* **55**: 3782-3787.

**Poeta P., Radhouani H., et al. (2008).** “Seagulls of Berlengas Natural Reserve of Portugal as carriers of faecal *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum beta-lactamases of the CTX-M and TEM classes.” *Appl Environ Microbiol* **74**, 7439-7441.

**Poeta P., Radhouani H., et al. (2009).** “Wild boars as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* of different phylogenetic groups.” *J Basic Microbiol* **49**, 584-588.

**Poirel L., Naas T., et al. (2008).** “Genetic support of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases.” *Clin Microbiol Infect* **14**: 75-81.

**Pomba C., da Fonseca J.D., et al. (2009).** “Detection of the pandemic O25-ST131 human virulent *Escherichia coli* CTX-M-15-producing clone harboring the *qnrB2* and *aac(6')-Ib-cr* genes in a dog.” *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 327-328.

**Pomba C., López-Cerero L., et al. (2014).** “Within-lineage variability of ST131 *Escherichia coli* isolates from humans and companion animals in the south of Europe.” *J Antimicrob Chemother* **69**: 271-273.

**Price L.B., Johnson J.R., et al. (2013).** “The epidemic of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 is driven by a single highly pathogenic subclone, H30-Rx.” *mBio* **4**: 1-10.

**Radhouani H., Pinto L., et al. (2010).** “Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum beta-lactamases of the CTX-M classes in faecal samples of common buzzards (*Buteo buteo*).” *J*



Antimicrob chemother **65**, 171-173.

**Rafai C., Frank T., et al. (2015).** “Dissemination of IncF-type plasmids in multiresistant CTX-M-15-producing enterobacteriaceae isolates from surgical-site injections in Bangui, Central African Republic.” *BMC Microbiol* **15(1)**:15.

**Ranjan A., Shaik S., et al. (2015).** “Genomic and functional portrait of a highly virulent, CTX-M-15-producing H30-Rx subclone of *Escherichia coli* sequence type (ST) 131.” *Antimicrob Agents Chemother* pii: AAC.01447-15.

**Rasheed JK., Jay C., et al. (1997).** “Evolution of extended-spectrum beta-lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia.” *Antimicrob Agents Chemother* **41**:647-653.

**Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero**, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. [http://www.uco.es/sae/v2/files/RD\\_53de2013.pdf](http://www.uco.es/sae/v2/files/RD_53de2013.pdf)

**Riley L.W. (2014).** “Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*.” *Clin Microbiol Infect* **20**: 380-390.

**Rode C.K., Melkerson-Watson L.J., et al. (1999).** “Type-specific contributions to chromosome size differences in *Escherichia coli*.” *Infect Immun* **67**: 230-6.

**Rodriguez-Siek KE., Giddings CW., et al. (2005).** “Characterizing the APEC pathotype.” *Vet Res* **36**:241-256.

**Rodrigues C., Machado E., et al. (2015).** “Increase of widespread A, B1 and D *Escherichia coli* clones producing a high diversity of CTX-M-types in a Portuguese hospital.” *Future Microbiol* **10**:1125-31.

**Rogers B.A., Sidjabat H.E., et al. (2011).** “*Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain.” *J Antimicrob Chemother* **66**: 1-14.

**Rogers B.A., Ingram P.R., et al. (2015).** “Sequence type 131 fimH30 and fimH41 subclones amongst *Escherichia coli* isolates in Australia and New Zealand.” *Int J Antimicrob Agents* **45(5)**:351-8.

**Ron E.Z. (2006).** “Host specificity of septicemic *Escherichia coli*: human and avian pathogens.” *Curr Opin Microbiol* **9**: 28-32.

**Roy S., Datta S., et al. (2015).** “Insight into neonatal septicaemic *Escherichia coli* from India with respect to phylogroup, serotypes, virulence, extended-spectrum- $\beta$ -lactamases and association of ST131 clonal group.” *Epidemiol Infect* **10**:1-11.

**Rooney P.J., O’Leary M.C., et al. (2009).** “Nursing homes as a reservoir of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli*.” *J Antimicrob Chemother* **64**: 635-41.

- Ruiz del Castillo B., Vinué L., et al. (2013).** “Molecular characterization of multiresistant *Escherichia coli* or not extended-spectrum  $\beta$ -lactamases.” *BMC Microbiol* **16**:13:84.
- Ruppe E., Woerther PL., et al. (2009).** “Carriage of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* isolates among children living in a remote village in Senegal.” *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 3135-3137.
- Russo T.A. and Johnson J.R. (2000).** “Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC.” *J Infect Dis* **181**: 1753-4.
- Russo T.A. and Johnson J.R. (2003).** “Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem.” *Microbes Infect* **5**: 449-56.
- Sabaté M., Tarragó R., et al. (2000).** “Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase (CTX-M-9) from *Escherichia coli* in Spain.” *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 1970-1973.
- Sabaté M., Miró E., et al. (2002).** “ $\beta$ -lactamases involved in resistance to broad-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. Clinical isolates collected between 1994 and 1996, in Barcelona (Spain).” *J Antimicrob Chemother* **49**, 989-997.
- Saladin M., Cao V.T., et al. (2002).** “Diversity of CTX-M beta-lactamases and their promoter regions from *Enterobacteriaceae* isolated in three Parisian hospitals.” *FEMS Microbiol Lett* **209**, 161-168.
- Salipante S.J., Roach D.J., et al. (2015).** “Large-scale genomic sequencing of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains.” *Genome Res* **25(1)**: 119-28.
- Sandner L., Eguiarte L.E., et al. (2001).** “The elements of the locus of enterocyte effacement in human and wild mammal isolates of *Escherichia coli*: evolution by assemblage or disruption?.” *Microbiology* **147**: 3149-3158.
- Sannes M.R., Kuskowski M., et al. (2004).** “Virulence factor profiles and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from veterans with bacteremia and uninfected control subjects.” *J Infect Dis* **190**: 2121-2128.
- Sarkar S., Ulett G., et al. (2014).** “Role of capsule and O antigen in the virulence of Uropathogenic *Escherichia coli*.” *PloS One* **9**: 1-11.
- Schembri M.A. and Ben Zakour N.L. (2015).** “Molecular characterization of the multidrug resistant *Escherichia coli* ST131 clone.” *Pathogens* **4(3)**: 422-30.
- Schink AK, Kadlec.K., et al. (2013).** “Analysis of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates collected in the GERM-Vet monitoring programme.” *J Antimicrob Chemother* **68**: 1741-1749.
- Schouler C., Schaeffer B., et al. (2012).** “Diagnostic strategy for identifying avian pathogenic *Escherichia coli* based on four patterns of virulence genes.” *J Clin Microbiol* **50**: 1673-1678.

- Schulze J., Schiemann M., et al. (2006).** “120 years of *E. coli*. Its importance in research and medicine.” Hagen, Germany: Alfred-Nissle-Gesellschaft.
- Seiffert S.N., Hilty M., et al. (2013).** “Extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in community, specialized outpatient clinic and hospital settings in Switzerland.” *J Antimicrob Chemother* **68**: 2249-2254.
- Sherchan J.B., Hayakawa K., et al. (2015).** “Clinical epidemiology and molecular analysis of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in Nepal: characteristics of sequence type 131 and 648.” *Antimicrob Agents Chemother* **59**: 3424-32.
- Shiraki Y., Shibata N., et al. (2004).** “*Escherichia coli* producing CTX-M-2  $\beta$ -lactamase in cattle, Japan.” *Emerg Infect* **10**: 69-75.
- Shpigel N.Y., Elazar S., et al. (2008).** “Mammary pathogenic *Escherichia coli*.” *Curr Opin Microbiol* **11**: 60-5.
- Sidjabat H.E., Paterson D.L., et al. (2009).** “Molecular epidemiology of CTX-M-producing *Escherichia coli* isolates at a tertiary medical center in Western Pennsylvania.” *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 4733-4739.
- Silva N., Igrejas G., et al. (2011).** “Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci and extended-spectrum beta-lactamase-containing *Escherichia coli* isolates in wild birds from the Azores Archipelago.” *Avian Pathol* **40**, 473-479.
- Simarro E., Navarro F., et al. (2000).** “*Salmonella enterica* serovar virchow with CTX-M-like beta-lactamase in Spain.” *J Clin Microbiol* **38**:4676-8.
- Simoes R.R., Poirel L., et al. (2010).** “Seagulls and beaches as reservoirs for multidrug-resistant *Escherichia coli*.” *Emerging Infectious Diseases* 16-1.
- Singer R.S. (2015).** “Urinary tract infections attributed to diverse ExPEC strains in food animals: evidence and data gaps.” *Front Microbiol* 6:28.
- Skaar E.P. (2010).** “The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts.” *PloS Pathog* **6**.
- Smith J.L., Fratamico P.M., et al. (2007).** “Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*.” *Foodborne Pathog Dis* **4**: 134-63.
- Spurbeck R.R., Stapleton A.E., et al. (2011).** “Fimbrial profiles predict virulence of uropathogenic *Escherichia coli* strains: contribution of *ygi* and *yad* fimbriae.” *Infect Immun* **79**: 4753-4763.
- Spurbeck R.R., Dinh P.C., et al. (2012).** “*Escherichia coli* isolates that carry *vat*, *fyuA*, *chuA*, and *yfcV* efficiently colonize the urinary tract.” *Infect Immun* **80**: 4115-4122.
- Subashchandrabose S., Smith S.N., et al. (2013).** “Genome-wide detection of fitness genes in uropathogenic *Escherichia coli* during systemic infection.” *PloS Pathog* **9**: e1003788.

- Sukupolvi S. and O'Connor D. (1990).** "TraT lipoproteina, a plasmid-specified mediator of interactions between gram-negative bacteria and their environment." *Microbiol Rev* **54**: 331-341.
- Suzuki S., Shibata N., et al. (2009).** "Change in the prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan by clonal spread." *Antimicrob Chemother* **63**: 72-79.
- Tacao M., Correira A., et al. (2012).** "Resistance to broad-spectrum antibiotics in aquatic systems: anthropogenic activities modulate the dissemination of *bla*CTX-M-like genes." *Appl Environ Microbiol* **78**: 4134-4140.
- Tartof S.Y., Solberg O., et al. (2007).** "Genotypic analyses of uropathogenic *Escherichia coli* based on *fimH* single nucleotide polymorphisms (SNPs)." *J Med Microbiol* **56**: 1363-1369.
- Tchesnokova V., Billing M., et al. (2013).** "Predictive diagnostics for *Escherichia coli* infections based on the clonal association of antimicrobial resistance and clinical outcome." *J Clin Microbiol* **51**, 2991-2999.
- Teale C.J., Barker L., et al. (2005).** "Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase detected in *E. coli* recovered from calves in Wales." *Veterinary Record* **156**: 186-187.
- Tenaillon O., Skurnik D., et al. (2010).** "The population genetics of commensal *Escherichia coli*." *Nat Rev Microbiol* **8**:207-17.
- Tenover F.C., Arbeit R.D., et al. (1995).** "Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: criteria for bacterial strain typing." *J Clin Microbiol* **33**: 2233-2239.
- Teshager T., Dominguez L., et al. (2000).** "Isolation of an SHV-12- $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* strain from a dog with recurrent urinary tract infections." *Antimicrob Agents and Chemother* **44**: 3483-3484.
- Tóth I., Héroult F., et al. (2003).** "Production of cytolethal distending toxins by pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from human and animal sources: establishment of the existence of a new *cdt* variant (Type IV)." *J Clin Microbiol* **41**:4285-91.
- Tórtola M.T., Lavilla S., et al. (2005).** "First detection of a carbapenem-hydrolyzing metalloenzyme in two enterobacteriaceae isolates in Spain." *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 3492-3494.
- Torres C and Zarazaga M. (2007).** "BLEE en animales y su importancia en la transmisión a humanos." *Enferm Infecc Microbiol Clin* **25**: 29-37.
- Unhanand M., Mustafa M.M., et al. (1993).** "Gram-negative enteric bacillary meningitis: a twenty-one-year experience." *J Pediatr* **122**: 15-21.
- Usein C.R., Condei M., et al. (2014).** "*Escherichia coli* ST131 causing invasive infections in Romanian patients a threat we can no longer ignore." *Roum Arch Microbiol Immunol* **73**: 5-8.
- Valverde A., Coque T., et al. (2004).** "Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extend-



ed-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Enterobacteriaceae* during nonoutbreak situation in Spain.” American Society for Microbiol **42**: 4769-4775.

**Valverde A., Turrientes M.C., et al. (2015).** “CTX-M-15 non-ST131 *Escherichia coli* isolates are mainly responsible of fecal carriage with ESBL-producing enterobacteriaceae in travelers, immigrants and those visiting friends and relatives.” Clin Microbiol Infect **21**: 252.e1-4.

**Van der Bij A.K. and Pitout J.D.D. (2012).** “The role of internacional travel in the worldwide spread of multiresistant *Enterobacteriaceae*.” J Antimicrob Chemother **67**:2090-2100.

**Van Hoek A.H., Schouls L., et al. (2015).** “Molecular characteristics of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae* from humans in the community.” PloS One **10(6)**: e0129085.

**Vigil P.D., Alteri C.J., et al. (2011a).** “Identification of in vivo-induced antigens including an RTX family exoprotein required for uropathogenic *Escherichia coli* virulence.” Infect Immun **76**, 2335-2344.

**Vigil P.D., Stapleton A.E., et al. (2011b).** “Presence of putative repeat-in-toxin gene *tosA* in *Escherichia coli* predicts successful colonization of the urinary tract.” MBio **2**, e00066-e00011.

**Vigil P.D., Wiles T.J., et al. (2012).** “The repeat-in toxin family member *TosA* mediates adherence of uropathogenic *Escherichia coli* and survival during bacteremia.” Infect Immun **80**: 493-505.

**Vincent C., Boerlin P., et al. (2010).** “Food reservoir for *Escherichia coli* causing urinary tract infections.” Emerg Infect Dis **16**: 88-95.

**Vinue L., Sáenz Y., et al. (2009).** “Prevalence and diversity of extended-spectrum beta-lactamases in faecal *Escherichia coli* isolates from healthy humans in Spain.” Clin Microbiol Infect **15**: 954-957.

**Vlieghe E.R., Huang T.D., et al. (2015).** “Prevalence and distribution of beta-lactamase coding genes in third-generation cephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae* from bloodstream infections in Cambodia.” Eur J Clin Microbiol Infect Dis **34**: 1223-9.

**Vodovar D., Marcade G., et al. (2013).** “Enterobacteries productrices de beta-lactamases a spectre elargi: epidemiologie, risk factors, and prevention.” La revue de Medecine Interne **34**, 687-693.

**Vredenburg J., Varela A.R., et al. (2013).** “Quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from birds of prey in Portugal are genetically distinct from those isolated from water environments and gulls in Portugal, Spain and Sweden.” Environ Microbiol **16**: 995-1004.

**Wallensten A., Hernandez J., et al. (2011).** “Extended spectrum beta-lactamases detected in *Escherichia coli* from gulls in Stockholm, Sweden.” Infect Ecol Epidemiol **1**, 7030.

**Wang S., Niu C., et al. (2011).** “Effects of *ibeA* deletion on virulence and Biofilm formation of Avian Pathogenic *Escherichia coli*.” Infect Immun **79**: 279-287.

**Wang X. and Quinn P.J. (2010).** “Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification.” Progress in Lipid Research **49**: 97-107.



- Wang X., Cao C., et al. (2015).** "Isolation, identification, and pathogenicity of O142 avian pathogenic *Escherichia coli* causing black proventriculus and septicemia in broiler breeders." *Infect genet Evol* **32**: 23-9.
- Waters V.L. and Crosa J.H. (1991).** "Colicin V Virulence plasmids." *Microbiol Rev* **55**: 437-450.
- Weissman S., Johnson J.R., et al. (2012).** "High-Resolution two-locus clonal typing of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*." *Appl Environ Microbiol* **78**: 1353-1360.
- Whitfield C. (2006).** "Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*." *Annu Rev Biochem* **75**: 39-68.
- Wiles T.J., Kulesus R.R., et al. (2008).** "Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*." *Exp Health Dis* **7**: 91-97.
- Willems R.J.L., Hanage W.P., et al. (2011).** "Population biology of Gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance." *FEMS Microbiol Rev* **35**, 872-900-
- Willemsen I., Nelson J., et al. (2015).** "Extensive dissemination of extended spectrum  $\beta$ -lactamase-producing enterobacteriaceae in a Dutch nursing home." *Infect Control Hosp Epidemiol* **36**: 394-400.
- Woerther P.L., Angebault C., et al. (2010).** "Emergence and dissemination of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in the community: lessons from the study of a remote and controlled population." *J Infect Dis* **202**: 515-523.
- Woerther P.L., burdet C., et al. (2013).** "Trends in human fecal carriage of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the community: toward the globalization of CTX-M." *Clinical Microbiol Reviews* **26**: 744-758.
- Woodford N., Ward M.E., et al. (2004).** "Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in the UK." *J Antimicrob Chemother* **54**: 735-743.
- Woodford N., Carratoli A., et al. (2009).** "Complete nucleotide sequences of plasmids pEK204, pEK499, and pEK516, encoding CTX-M enzymes in three major *Escherichia coli* lineage from the United Kingdom, all belonging to the international O25:H4-ST131 clone." *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 4472-4482.
- Woodford N., Turton J., et al. (2011).** "Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance." *FEMS Microbiol Rev* **35**: 736-755.
- Wu Y.H., Cheng M.F., et al. (2014).** "The role of sequence type (ST) 131 in adult community-onset non-ESBL-producing *Escherichia coli* bacteraemia." *BMC Infect Dis* **14**: 579.
- Yamamoto S., Terai A., et al. (1995).** "Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction." *FEMS Immunol Med Microbiol* **12**:85-90.
- Yan J., Ko W.C., et al. (2000).** "Dissemination of CTX-M-3 and CMY-2  $\beta$ -lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* in southern Taiwan." *J Clin Microbiol* **38**: 4320-4325.

- Yumuk Z., Afacan G., et al. (2008).** “Turkey: a further country concerned by community-acquired *Escherichia coli* clone O25-ST131 producing CTX-M-15.” *J Antimicrob Chemother* **62**: 284-288.
- Zhang Y., Laing C., et al. (2007).** “Genome evolution in major *Escherichia coli* O157:H7 lineages.” *BMC Genomics* **8**: 121.
- Zhang J., Zheng B., et al. (2014).** “Nationwide high prevalence of CTX-M and an increase of CTX-M-55 in *Escherichia coli* isolated from patients with community-onset infections in Chinese county hospitals.” *BMC Infect Dis* **14**: 659.
- Zhang F., Zhu D., et al. (2015).** “Molecular epidemiology of carbapenemase-producing *Escherichia coli* and the prevalence of ST131 subclone H30 in Shanghai, China.” *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. **34**: 1263-9.
- Zhao L., Zhang J., et al. (2015).** “Molecular epidemiology and genetic diversity of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* isolates from patients with community-onset infections in 30 Chinese county hospitals.” *J Clin Microbiol* **53**: 766-70.
- Zhao S.Y., Wang Y.C., et al. (2015).** “Drug susceptibility and molecular epidemiology of *Escherichia coli* in bloodstream infections in Shanghai, China, 2011-2013.” *Infect Dis* **47**: 310-8.
- Zhong Y.M., Liu W.E., et al. (2015).** “Emergence and spread of O16-ST131 and O25b-ST131 clones among faecal CTX-M-producing *Escherichia coli* in healthy individuals in Hunan Province, China.” *J Antimicrob Chemother* **70**: 2223-2227.
- Zurfluh K., Hachler H., et al. (2013).** “Characteristics of extended-spectrum beta-lactamase and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* isolates from rivers and lakes in Switzerland.” *Appl Environ Microbiol* **79**:3021-3026.

