



FACULTADE DE CIENCIAS

GRAO EN BIOQUÍMICA

D.^a Andrea Galán Saiz

**Caracterización molecular de
Escherichia coli bacteriémicos
pertencientes a los serogrupos
O4, O6, O18 y O75**

Caracterización molecular de *Escherichia coli* bacteriémicos
pertencientes aos serogrupos O4, O6, O18 e O75

Molecular characterization of *Escherichia coli* bacteriemics belonging to
serogroups O4, O6, O18 and O75

Traballo Fin de Grao
06/2024

*A mis padres,
por apoyarme siempre
incondicionalmente*

Índice de contenidos

Resumen.....	I
1. Introducción	1
1.1. Características generales de <i>Escherichia coli</i>	1
1.2. Clasificación de las cepas de <i>E. coli</i>	1
1.2.1. Clasificación serológica	1
1.2.2. Clasificación filogenética	2
1.3. Perfil patogénico de <i>E. coli</i>	2
1.3.1. <i>E. coli</i> patógeno intestinal (InPEC)	4
1.3.2. <i>E. coli</i> patógeno extraintestinal (ExPEC)	4
1.4. Perfil de virulencia de <i>ExPEC</i>	5
1.4.1. Adhesinas.....	6
1.4.1.1. Adhesinas fimbriales	6
1.4.1.2. Adhesinas no fimbriales.....	7
1.4.2. Toxinas	7
1.4.3. Sideróforos	7
1.4.4. Evasión del sistema inmune del hospedador.....	7
1.5. Perfil de resistencia de <i>E. coli</i>	8
1.5.1. Antibióticos y su uso	8
1.5.2. Resistencia bacteriana a los antibióticos	8
1.5.2.1. Resistencia a quinolonas	9
1.5.3. Clones de alto riesgo con resistencia múltiple.....	9
1.5.3.1. Clones ExPEC	10
1.5.3.2. Clon ST1193	10
1.6. Diseño de vacunas	11
2. Hipótesis y objetivos	12
3. Materiales y métodos	13
3.2. Caracterización fenotípica de las cepas clínicas de <i>E. coli</i>	13
3.2.1. Biotipado y antibiograma	13
3.2.2. Serotipado: determinación de serogrupos O	14
3.3. Caracterización molecular de las cepas clínicas de <i>E. coli</i>	14
3.3.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	14
3.3.1.1. Protocolo de PCR.....	14
3.3.1.2. Detección de genes de virulencia de ExPEC	16

3.3.1.3. Determinación de grupos filogenéticos.....	18
3.3.2. Detección del clon ST1193	19
3.3.3. MLST y secuenciación Sanger	20
3.3.3.1. Obtención de amplicones mediante una PCR convencional.....	20
3.3.3.2. Secuenciación de las cadenas complementarias	21
3.3.3.3. Análisis de las secuencias.....	21
3.4. Análisis estadístico.....	21
4. Resultados y discusión.....	22
4.1. Caracterización fenotípica	22
4.1.1. Prevalencia de serogrupos O	22
4.1.2. Resistencia antimicrobiana	24
4.2. Caracterización molecular	27
4.2.1. Grupos filogenéticos	27
4.2.2. Genes de virulencia	27
4.3. Detección del clon ST1193.....	31
5. Conclusiones.....	37
6. Anexos.....	38
7. Referencias bibliográficas	40

Índice de acrónimos

APEC	Del inglés “ <i>Avian Pathogenic Escherichia coli</i> ”
BLAST	Del inglés “ <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> ”
CC	Complejo clonal
CGE	Del inglés “ <i>Center for Genomic Epidemiology</i> ”
CH	Clonotipo
DAEC	Del inglés “ <i>Diffusely adherent Escherichia coli</i> ”
DEC	Del inglés “ <i>Diarrheagenic Escherichia coli</i> ”
EAEC	Del inglés “ <i>Enteraggregative Escherichia coli</i> ”
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Del inglés “ <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> ”
EHEC	Del inglés “ <i>Enterohemorrhagic Escherichia coli</i> ”
EIEC	Del inglés “ <i>Enteroinvasive Escherichia coli</i> ”
EIs	Del inglés “ <i>Extraintestinal infections</i> ”
EPEC	Del inglés “ <i>Enteropathogenic Escherichia coli</i> ”
ETEC	Del inglés “ <i>Enterotoxigenic Escherichia coli</i> ”
EUCAST	Del inglés “ <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i> ”
ExPEC	Del inglés “ <i>Extra-intestinal pathogenic Escherichia coli</i> ”
FQ	Fluoroquinolonas
FQ-R	Resistencia a las fluoroquinolonas
FV	Factor de virulencia
HULA	Hospital Universitario Lucus Augusti
InPEC	Del inglés “ <i>Intestinal Pathogenic Escherichia coli</i> ”
ITUs	Infecciones del tracto urinario
LPS	Lipopolisacáridos
LREC	Laboratorio de Referencia de <i>Escherichia coli</i>
LREC-USC	Laboratorio de Referencia de <i>Escherichia coli</i> -Universidade de Santiago de Compostela
MDR	Del inglés “ <i>Multidrug-resistant</i> ”
MLST	Del inglés “ <i>multilocus sequence typing</i> ”
NCBI	Del inglés “ <i>National Center for Biotechnology Information</i> ”
NIH	Del inglés “ <i>National Institutes of Health</i> ”
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAI	Del inglés “ <i>Pathogenicity Island</i> ”
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RAM	Resistencia antimicrobiana
SEC	Del inglés “ <i>Septicemic Escherichia coli</i> ”
ST	Secuencias tipo
TSA	Del inglés “ <i>Tryptic Soy Agar</i> ”
Tsh	Del inglés “ <i>Temperature-sensitive hemagglutinin</i> ”
UPEC	Del inglés “ <i>Uropathogenic Escherichia coli</i> ”
UPEC	Del inglés “ <i>Uropathogenic Escherichia coli</i> ”
UV	Ultravioleta

Resumen

E. coli es el principal agente causante de bacteriemias en seres humanos, las cuales están aumentando de forma significativa a nivel mundial en las últimas décadas. Además, a esta preocupación clínica se le suma la emergencia de clones de alto riesgo que presentan resistencia múltiple a los antimicrobianos y complican el tratamiento clínico de los pacientes.

En este trabajo se ha llevado a cabo la caracterización fenotípica (serotipado y antibiograma) y molecular (PCR convencional y secuenciación Sanger) de 53 cepas bacteriémicas aisladas en el HULA entre los años 2020 y 2022.

Los resultados indican que las cepas de los serogrupos O4, O6, O18 y O75 tienen una prevalencia significativa entre los *E.coli* bacteriémicos en nuestra área sanitaria en el periodo 2020-2022, siendo las cepas del serogrupo O6 las más numerosas. Al comparar estos datos con el estudio previo realizado en el LREC-USC entre los años 1989 y 2011, no observamos diferencias significativas en cuanto a la prevalencia de estos cuatro serogrupos.

El nivel de resistencia a antimicrobianos detectado en las cepas de los serogrupos O4, O6 y O18 es relativamente bajo, y únicamente las cepas O75 destacan por su significativa resistencia a las quinolonas. En contraste, la gran mayoría de las cepas de estos cuatro serogrupos poseen un elevado número de genes de virulencia típicos del patotipo ExPEC, lo que refleja un importante potencial de patogenicidad responsable sin duda de su éxito como patógenos. Además, la presencia del clon emergente ST1193 entre las cepas pertenecientes al serogrupo O75 estudiadas en este trabajo, respalda otros estudios previos, pero no parece tener una significativa prevalencia en nuestra área sanitaria.

La alta incidencia de las cepas de los serogrupos O4, O6, O18 y O75, junto con su elevado número de genes de virulencia, justifica plenamente su inclusión en las vacunas preventivas contra ExPEC.

Palabras clave: *E. coli*, bacteriemia, ExPEC, genes de virulencia, resistencia antimicrobiana, clon ST1193, PCR, prevalencia.

Resumo

E. coli é o principal axente causante de bacteriemias en seres humanos, as cales están a aumentar de forma significativa a nivel mundial nas últimas décadas. Ademais, a esta preocupación clínica súmaselle a emerxencia de clons de alto risco que presentan resistencia múltiple aos antimicrobianos e complican o tratamento clínico dos pacientes.

Neste traballo levouse a cabo a caracterización fenotípica (serotipado e antibiograma) e molecular (PCR convencional e secuenciación Sanger) de 53 cepas bacteriémicas illadas no HULA entre os anos 2020 e 2022.

Os resultados indican que as cepas dos serogrupos O4, O6, O18 e O75 teñen unha prevalencia significativa entre os *E.coli* bacteriémicos na nosa área sanitaria entre os anos 2020 e 2022, sendo as cepas do serogrupo O6 as máis numerosas. Ao comparar estes datos co estudo previo realizado no LREC-USC entre os anos 1989 e 2011, non observamos diferenzas significativas en canto á prevalencia destes catro serogrupos.

O nivel de resistencia a antimicrobianos detectado nas cepas dos serogrupos O4, O6 e O18 é relativamente baixo, e unicamente as cepas O75 destacan pola súa significativa resistencia ás quinolonas. En contraste, a gran maioría das cepas destes catro serogrupos posúen un elevado número de xenes de virulencia típicos do patotipo ExPEC, o que reflicte un importante potencial de patoxenicidade responsable sen dúbida do seu éxito como patóxenos. Ademais, a presenza do clon emerxente ST1193 entre as cepas pertencentes ao serogrupo O75 estudadas neste traballo, apoia outros estudos previos, pero non parece ter unha significativa prevalencia na nosa área sanitaria.

A alta incidencia das cepas dos serogrupos O4, O6, O18 e O75, xunto co seu elevado número de xenes de virulencia, xustifica plenamente a súa inclusión nas vacinas preventivas contra ExPEC.

Palabras clave: *E. coli*, bacteriemia, ExPEC, xenes de virulencia, resistencia antimicrobiana, clon ST1193, prevalencia, PCR.

Summary

E. coli is the main causative agent of bacteremia in humans, which has been increasing significantly worldwide in recent decades. In addition, this clinical concern is compounded by the emergence of high-risk clones that present multiple antimicrobial resistance and complicate the clinical treatment of patients.

In this work, phenotypic (serotyping and antibiogram) and molecular (conventional PCR and Sanger sequencing) characterization of 53 bacteremic strains isolated in the HULA between 2020 and 2022 has been carried out.

The results indicate that serogroups O4, O6, O18 and O75 strains have a significant prevalence among bacteremic *E. coli* in our healthcare area in the period 2020-2022, with serogroup O6 strains being the most numerous. Comparing these data with the previous study conducted at the LREC-USC between 1989 and 2011, we observed no significant differences in terms of the prevalence of these four serogroups.

The level of antimicrobial resistance detected in serogroups O4, O6 and O18 strains is relatively low, and only O75 strains stand out for their significant resistance to quinolones. In contrast, the vast majority of the strains of these four serogroups possess a high number of virulence genes typical of the ExPEC pathotype, reflecting a significant pathogenicity potential undoubtedly responsible for their success as pathogens. In addition, the presence of the emerging clone ST1193 among the strains belonging to serogroup O75 studied in this work supports other previous studies, but it does not seem to have a significant prevalence in our health area.

The high incidence of serogroups O4, O6, O18 and O75 strains, together with their high number of virulence genes, fully justifies their inclusion in preventive vaccines against ExPEC.

Key words: *E. coli*, bacteremia, ExPEC, virulence genes, antimicrobial resistance, clone ST1193, prevalence, PCR.

1. Introducción

1.1. Características generales de *Escherichia coli*

Escherichia coli es una bacteria, más concretamente un bacilo gramnegativo, cuyo nombre se le atribuye a su descubridor Theodor Von Escherich (Escherich, 1885). Se trata de una bacteria anaerobia facultativa perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* de gran importancia clínica y con una enorme diversidad genética.

Esta bacteria forma parte de la microbiota intestinal normal en humanos y animales debido a la transmisión vertical en el momento del parto y la exposición al medio ambiente durante los primeros días de vida. En una persona adulta, *E. coli* representa el anaerobio facultativo más abundante de la microbiota intestinal (Schulze *et al.*, 2006).

Como comensal, *E. coli* coexiste de forma pacífica con el hospedador y no causa enfermedades en el tracto intestinal (Herzer *et al.*, 1990; Whitfam, 1988). De hecho, es necesaria para el correcto funcionamiento del proceso digestivo, además de aportar numerosos beneficios al hospedador tales como facilitar la absorción de nutrientes, su papel en la síntesis de las vitaminas K y B, promueve la respuesta inmune en el hospedador, el procesamiento de residuos alimenticios y la inhibición competitiva frente a otros enteropatógenos (Kruis *et al.*, 2004). Sin embargo, existen también cepas de *E. coli* patógenas y ha sido un reto para la comunidad investigadora discriminarlas dentro de la especie, así como estudiar sus características genéticas.

1.2. Clasificación de las cepas de *E. coli*

1.2.1. Clasificación serológica

Para diferenciar y clasificar las distintas cepas de *E. coli* se llevó a cabo la técnica de serotipado (Tenailon *et al.*, 2010). Fue Kauffman en 1947 (Kauffman, 1947) quien desarrolló este método basado en la diferenciación de cepas de *E. coli* a partir de sus principales antígenos de superficie (antígenos somáticos O, capsulares K y flagelares H). Inicialmente incluía 20 antígenos O, 20 antígenos H y 55 antígenos K. A lo largo de los años, este esquema se ha ido actualizando y, aún a día de hoy, sigue en constante evolución.

La identificación de antígenos O y H se lleva a cabo mediante técnicas clásicas de aglutinación, y la combinación de ambos antígenos (O:H) expresa el serotipo. No obstante, el serotipo no tiene en cuenta al antígeno K, dada su compleja determinación

por contraelectroforesis. Por otro lado, es la determinación del antígeno “O” la que responde al serogrupo (Qrskov y Orskov, 1984).

1.2.2. Clasificación filogenética

E. coli es una especie bacteriana con una subestructura filogenética extensa y variada que comprende ocho grupos filogenéticos: A, B1, B2, C, D, E, F y G. Estos grupos se identifican en función de las características genéticas de las diferentes cepas de *E. coli* y desempeñan un importante papel en la comprensión del potencial patógeno (Milkman 1973; Selander *et al.*, 1987; Escobar-Páramo *et al.*, 2004a; Clermont *et al.*, 2019).

La mayoría de las cepas comensales se clasifican dentro de los grupos A y B1. Las cepas patógenas intestinales mayoritariamente pertenecen a los grupos A, B1 y D, mientras que las cepas patógenas extraintestinales pertenecen generalmente a los grupos B2 y D (Chaudhuri & Henderson, 2012). Las cepas pertenecientes al grupo filogenético B2 tienen mayor capacidad de virulencia en humanos, lo que muestra una relación entre el grupo filogenético B2 y la virulencia de *E. coli* en infecciones extraintestinales (Touchon *et al.*, 2009; Tourret y Denamur, 2016; Clermont *et al.*, 2019).

La tipificación de secuencias de múltiples locus (del inglés, MLST) es una técnica que permite determinar las distancias taxonómicas entre cepas de *E. coli* y clasificarlas en diferentes secuencias tipo (ST) (Maiden *et al.*, 1998) y en complejos clonales (CC) (Maiden *et al.*, 2013), mediante la comparación de genes altamente conservados (Chaudhuri & Henderson, 2012). Esta técnica utiliza los esquemas de la Universidad de Warwick (Wirth *et al.*, 2006) o del Pasteur Institute (Jaureguy *et al.*, 2008) que implican la secuenciación de diferentes conjuntos de genes altamente conservados.

En el caso del esquema del clonotipado (CH), este permite predecir el perfil genotípico de una cepa bacteriana basado en MLST con una precisión de hasta el 95% mediante la determinación de dos alelos particulares: *fumC* y *fimH* (Dale & Woodford, 2015; Weissman *et al.*, 2012).

1.3. Perfil patogénico de *E. coli*

Las cepas de *E. coli* pueden clasificarse en tres grupos atendiendo a su patogenicidad: *E. coli* comensales, *E. coli* patógenas intestinales y *E. coli* patógenas extraintestinales (Russo & Johnson, 2000).

Como ya hemos comentado anteriormente, las cepas comensales de *E. coli* rara vez causan enfermedades en hospedadores sanos debido a que, normalmente, carecen de rasgos de virulencia. No obstante, puede actuar como patógeno oportunista en un hospedador debilitado o inmunodeprimido, o cuando se traspasan las barreras gastrointestinales, dando como resultado una infección extraintestinal (Herzer *et al.*, 1990; Nataro & Kaper, 1998; Escobar-Páramo *et al.*, 2004b).

Sin embargo, existen cepas de *E. coli* han evolucionado hasta convertirse en patógenas tras adquirir atributos de virulencia específicos, los cuales les proporcionan la capacidad de adaptarse a nuevos nichos y causar un amplio espectro de enfermedades intestinales y extraintestinales (Nataro & Kaper, 1998; Le Gall *et al.*, 2007; Tenaillon *et al.*, 2010).

Estos atributos de virulencia habitualmente se encuentran codificados en elementos genéticos capaces de movilizarse (p. ej., transposones, plásmidos o bacteriófagos) o agrupados en grandes bloques de ADN denominados islas de patogenicidad (del inglés, PAI). La presencia de elementos móviles en cualquiera de los dos casos facilita la movilización de atributos de virulencia entre diferentes cepas con el fin de crear nuevas combinaciones específicas de factores de virulencia (Nataro & Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004).

Las combinaciones que persisten con el tiempo, es decir, que se mantienen y se transmiten a lo largo de generaciones bacterianas son lo que ahora conocemos como “patotipos” de *E. coli* propicios para causar diferentes tipos de enfermedades, incluso en individuos sanos (Nataro & Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004).

Las infecciones debidas a cepas patógenas de *E. coli* pueden limitarse a las superficies mucosas o diseminarse por todo el organismo al superar la barrera de la microbiota comensal gracias a su capacidad para competir por nutrientes esenciales (p. ej., fuentes de energía, carbono y hierro), la producción de bacteriocinas y su habilidad para multiplicarse rápidamente. Muchas de estas competencias tienen lugar bajo condiciones de anaerobiosis, las cuales son comunes en ciertas partes del tracto gastrointestinal (Nataro & Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004).

Existen tres cuadros clínicos generales como resultado de una infección por uno de estos patotipos: enfermedad entérica/ diarreica, infección del tracto urinario (ITU) y sepsis/meningitis (Nataro & Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004).

1.3.1. *E. coli* patógeno intestinal (InPEC)

Las cepas de *E. coli* patógenos intestinales (del inglés, InPEC) normalmente no se encuentran en la flora intestinal de hospedadores sanos y son las responsables de causar infecciones entéricas como gastroenteritis, diarrea o colitis hemorrágica. Las cepas diarreagénicas de *E. coli* (del inglés, DEC) se pueden dividir en al menos seis categorías o patotipos diferentes en función de las características patogénicas: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) (Nataro & Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004).

Los patotipos de DEC pueden compartir ciertas características de virulencia; sin embargo, cada patotipo posee una combinación de rasgos de virulencia específicos que resulta en un mecanismo patogénico distintivo (Reid *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2013).

Existe un patotipo InPEC no diarreico denominado *E. coli* adherente-invasivo (AIEC) relacionado con las infecciones inflamatorias del intestino como la enfermedad de Crohn. Generalmente pertenece al grupo filogenético B2 y comparte algunos rasgos de virulencia con los ExPEC (Darfeuille- Michaud *et al.*, 2004).

1.3.2. *E. coli* patógeno extraintestinal (ExPEC)

En el año 2000, Russo & Johnson proponen el patotipo de *E. coli* patógeno extraintestinal (ExPEC) que incluye a todas las cepas patógenas extraintestinales de *E. coli*. Las cepas ExPEC tienen la capacidad de colonizar y causar infecciones en tejidos y órganos fuera del intestino. Dentro de los *E. coli* patógenos extraintestinales (ExPEC) se incluyen: 1) las cepas causantes de infecciones del tracto urinario incluidas también dentro de los *E. coli* uropatogénicos (UPEC); 2) las cepas causantes de septicemias o bacteriemias incluidas dentro de los *E. coli* septicémicos (SEC); y 3) las cepas causantes de meningitis principalmente en recién nacidos incluidas también dentro de los *E. coli* causantes de meningitis (NMEC). Por otro lado, en animales destacan los *E. coli* patógenos aviáres (APEC) que causan infecciones respiratorias y septicemias en aves con una potencial preocupación zoonótica.

Todas estas infecciones extraintestinales (del inglés, EIs) son comunes a todos los grupos de edad y, en algunos casos, pueden ir acompañadas de bacteriemias o septicemias, es decir, de la presencia de bacterias (en este caso *E. coli*) en sangre, una vez invaden el torrente sanguíneo como resultado de la infección (Gransden *et al.*, 1990).

Las infecciones del tracto urinario (del inglés, ITUs) son infecciones muy recurrentes en los seres humanos, afectan en mayor medida a las mujeres. Los UPEC son el principal causante de las ITUs, concretamente, son responsables aproximadamente del 80% de las ITUs en pacientes ambulatorios y del 50% de las ITU asociadas a la atención sanitaria. Las NMEC son la causa del 30% de las meningitis en recién nacidos (Gransden *et al.*, 1990; Johnson, 1991; Russo y Johnson, 2000; Foxman, 2003; Nielubowicz y Mobley, 2010).

Las ITUs comienzan cuando una cepa ExPEC tras salir normalmente del tracto digestivo coloniza el epitelio de la vejiga y causa una cistitis. La infección por cistitis puede ascender hasta los riñones a través de los uréteres y causar una pielonefritis. Finalmente, si alcanza el torrente sanguíneo puede derivar en una bacteriemia o incluso septicemia. De hecho, la mayoría de las bacteriemias causadas por *E. coli* en seres humanos son de origen urinario (Kaper *et al.*, 2004; Wiles *et al.*, 2008).

Sin embargo, las cepas ExPEC parecen ser incapaces de causar enfermedades entéricas, aunque pueden colonizar el tracto intestinal del hospedador de manera estable y llegar a convertirse en la cepa predominante de algunos humanos sanos. De modo que, para que se produzca una infección, se requiere que las cepas ExPEC accedan a un lugar extraintestinal del organismo como el tracto urinario, el torrente sanguíneo o los tejidos blandos (Johnson, 1991).

1.4. Perfil de virulencia de ExPEC

Las cepas patógenas de *E. coli* presentan un amplio espectro de factores de virulencia (FV), los cuales forman parte de un fenómeno multifactorial que potencia la patogenicidad de dichas cepas, facilitando así el proceso de infección (Johnson *et al.*, 1988).

Hoy en día, existe una propuesta emergente, denominada “hipótesis de la evolución coincidente”, de la evolución de ExPEC a partir de cepas comensales de *E. coli* a través de la selección de roles de FV, que están relacionados con la interacción de las bacterias con el entorno más que con su contribución directa a la patogénesis (Grozdanov *et al.*, 2004; Dobrindt, 2005; Tenaillon *et al.*, 2010; Denamur *et al.*, 2020). Ciertos estudios apoyan dicha teoría, pues revelan que una fracción considerable de los genes asociados a la virulencia en ExPEC también están presentes en muchas cepas comensales de *E. coli*, aumentando así su adaptabilidad y competitividad (Nowrouzian *et al.*, 2001, 2003; Le Gall *et al.*, 2007; Duprilot *et al.*, 2019).

Así pues, las cepas ExPEC exhiben una amplia gama de FV, que de manera general se encuentran codificados y agrupados en PAI, tales como la presencia de varias combinaciones de adhesinas, toxinas, sideróforos, invasinas y proteínas de resistencia al suero y a la fagocitosis (Lüthje y Brauner, 2014).

La presencia de estos FV permite a las cepas ExPEC colonizar la mucosa del hospedador, evadir sus mecanismos de defensa, captar nutrientes esenciales como el hierro, dañar e invadir las células, y estimular una respuesta inflamatoria en el hospedador. No obstante, no es posible establecer una conexión directa entre ciertos FV extraintestinales y una patología específica (Lüthje y Brauner, 2014).

1.4.1. Adhesinas

Las adhesinas confieren a las cepas de *E. coli* la capacidad de adherirse a las células epiteliales del hospedador, el cuál es un proceso fundamental para la colonización del hospedador y, a su vez, el inicio del proceso infeccioso. Estas adhesinas de naturaleza proteica reconocen receptores celulares de manera específica. Pueden encontrarse expuestas a la superficie de la bacteria o estar contenidas en estructuras filamentosas llamadas “fimbrias”. (Beachey, 1981; Kline *et al.*, 2009).

1.4.1.1. Adhesinas fimbriales

Se trata de filamentos proteicos que se extienden a lo largo de la superficie de las bacterias. Las cepas ExPEC a menudo poseen más de un tipo de adhesina, como las fimbrias de tipo 1, las fimbrias P, las fimbrias S y las fimbrias Dr/Afa (Busch and Waksman, 2012; Holden and Gally, 2004).

- Fimbrias de tipo 1: codificadas en el cromosoma bacteriano por el operón *fim*, que contiene los genes *FimA*, *FimC*, *FimD*, *FimE*, *FimH* y *FimG*. Se encuentran en la gran mayoría de las cepas tanto ExPEC como comensales. (Thankavel *et al.*, 1997).
- Fimbrias P: codificadas por el operón *pap*, que contiene los genes *PapA*, *PapC*, *PapE*, *PapF*, *PapG* y *PapK*. Muy frecuentes especialmente en las cepas causantes de pielonefritis (Mulvey, 2002; Kline *et al.*, 2009; Busch and Waksman, 2012).
- Fimbrias de la familia Dr/Afa: codificadas por los operones *afa*, *dra* y *daa*. Típicas de algunas cepas ExPEC (Servin, 2005, 2014).
- Fimbrias S/FIC: las fimbrias S están codificadas por el operón *sfa*, que contienen los genes *SfaA*, *SfaG*, *SfaH* y *SfaS*. La fimbria FIC (análogo de la fimbria S) está codificada por los genes *foc*. Frecuentes tanto en cepas uropatógenicas como septicémicas, y muy especialmente en las asociadas con meningitis neonatal (Mulvey, 2002).

1.4.1.2. Adhesinas no fimbriales

Son proteínas que cumplen funciones similares a las fimbrias como lo es *Tsh* (*Temperature Sensitive Hemagglutinin*), la cual participa en la adhesión durante las primeras fases de la infección (Kostakioti y Stathopoulos, 2004).

1.4.2. Toxinas

Las toxinas son moléculas que pueden causar daños a las células del hospedador alterando su función y forma, deteniendo el ciclo celular e incluso desencadenando la lisis celular. En ExPEC, se ha documentado la producción de diversas toxinas como la alfa-hemolisina (Hly) y la citotoxina vacuolizante autotransportadora (Vat) (Wiles *et al.*, 2008; Denamur *et al.*, 2020).

1.4.3. Sideróforos

Los sideróforos son moléculas que tienen la capacidad de captar y transportar el hierro, que es un compuesto esencial para el crecimiento y supervivencia de bacterias, como *E. coli*, en ambientes donde el hierro es limitado o de difícil acceso. En vista de ello, las cepas ExPEC contienen genes específicos que regulan la producción de sideróforos (p. ej., enterobactina, salmoquelina, aerobactina e yersiniabactina) y, por tanto, la captura y transporte de hierro (Robinson *et al.*, 2018).

- Salmoquelina: fue identificada originalmente en *Salmonella* y está codificada por los genes *iroN* e *iroD*.
- Aerobactina: fue identificada originalmente en *Aerobacter aerogenes*, y está codificada por genes como *iucD* y *iutA*.
- Yersiniabactina: fue identificada originalmente en *Yersinia pestis* y está codificada por los genes *fyuA* y *ybtPQ*.

1.4.4. Evasión del sistema inmune del hospedador

Una de las propiedades de las cepas ExPEC es la capacidad de evadir el sistema inmune del hospedador aumentando su capacidad para causar enfermedades. Algunas de las estrategias utilizadas incluyen la producción de proteínas protectoras como la proteína de exclusión de transferencia conjugada (TraT), la proteína de membrana externa A (OmpA) y la de supervivencia aumentada en suero (Iss) (Johnson *et al.*, 2000)

Además, las moléculas de superficie como las cápsulas bacterianas y los lipopolisacáridos (LPS) también son considerados FV de evasión del sistema inmune (Phan *et al.*, 2013).

1.5. Perfil de resistencia de E. coli

1.5.1. Antibióticos y su uso

Los antibióticos son sustancias antimicrobianas, es decir, interfieren con el crecimiento y reproducción bacteriana al actuar sobre estructuras o procesos biológicos específicos (efecto bacteriostático) o causar la muerte de la bacteria (efecto bactericida) (Pal *et al.*, 2017).

La introducción de los antibióticos en la medicina fue gracias a Alexander Fleming, descubridor de la penicilina en 1928. Este increíble hallazgo revolucionó la manera de tratar las enfermedades bacterianas contribuyendo así a salvar millones de vidas y aumentar la esperanza de vida de la población (Laxminarayan *et al.*, 2016; Durand *et al.*, 2019).

Hoy en día, los antibióticos se utilizan en una amplia variedad de aplicaciones en la sociedad humana (medicina humana, medicina veterinaria, acuicultura y agricultura) (Cabello, 2006; Van Boeckel *et al.*, 2014; Meek *et al.*, 2015). En el caso de la medicina, los antibióticos se utilizan para tratar y prevenir infecciones (profilaxis) (Holmes *et al.*, 2016; Laxminarayan *et al.*, 2016). Sin embargo, el empleo generalizado e indiscriminado de antibióticos ha acelerado por presión selectiva la aparición, selección y diseminación de bacterias resistentes a dichos compuestos (Ventola, 2015).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) augura una nueva era en la que infecciones comunes, las cuales han sido tratables durante décadas, volverán a ser potencialmente mortales debido a la creciente resistencia bacteriana a los antibióticos existentes (OMS, 2014).

1.5.2. Resistencia bacteriana a los antibióticos

La resistencia a antimicrobianos (RAM) se refiere a la capacidad de un microorganismo para multiplicarse en presencia de un compuesto tóxico, como los son los antibióticos (bacteriostáticos y bactericidas) (Baquero, 2021; Lewis, 2007, 2008).

Las bacterias pueden presentar una resistencia natural o intrínseca, por ejemplo, cuando carecen de la diana de acción frente a un antibiótico. Sin embargo, también son capaces de desarrollar resistencia adquirida contra los antibióticos como consecuencia de la mutación de genes, la adquisición de genes de resistencia a través de elementos móviles, y la transferencia horizontal de genes entre diferentes cepas o especies bacterianas. Esta capacidad de transmisión es lo que la hace una verdadera amenaza para la salud humana (Daza, 1998).

Existen seis mecanismos principales de resistencia bacteriana: (1) alteración enzimática del antibiótico, (2) alteración o protección del sitio de acción del antibiótico, (3) bloqueo del acceso al sitio de acción, (4) sobreproducción del sitio de acción, (5) reducción de la permeabilidad y (6) eflujo activo (Martínez, 2014; Munita y Aria, 2016).

1.5.2.1. Resistencia a quinolonas

Las quinolonas, junto con los β -lactámicos, se encuentran entre los antimicrobianos más utilizados en clínica. Actualmente existen cuatro generaciones de quinolonas, entre las cuales destacan el ácido nalidíxico, ciprofloxacino, levofloxacino, ofloxacino y moxifloxacino.

Estos compuestos sintéticos son obtenidos a partir de la cloroquina y ejercen su acción inhibiendo las enzimas bacterianas ADN girasa (codificada por los genes *gyrA* y *gyrB*) y topoisomerasa IV (codificada por *parC* y *parE*), esenciales para la replicación, recombinación y transcripción del ADN bacteriano (Álvarez-Hernández *et al.*, 2015).

La resistencia a las quinolonas ha aumentado significativamente en las últimas décadas. Los mecanismos de resistencia incluyen mutaciones en los genes que codifican las enzimas diana, disminución de la permeabilidad de la membrana bacteriana a los antimicrobianos, y la expresión de bombas de eflujo que expulsan activamente la quinolona fuera de la célula bacteriana (Aldred *et al.*, 2014).

1.5.3. Clones de alto riesgo con resistencia múltiple

En los últimos años, como consecuencia presumiblemente del abuso de antibióticos, han emergido clones de alto riesgo que presentan resistencia a múltiples antimicrobianos (clones con multi-droga-resistencia, MDR). La MDR se define como la falta de susceptibilidad adquirida a al menos un agente en tres o más categorías de antimicrobianos (Magiorakos *et al.*, 2012).

Los clones de alto riesgo, además de tener resistencia múltiple, suelen poseer un elevado número de genes de virulencia y estar expandidos a nivel mundial causando un elevado número de infecciones extraintestinales.

Para poder clasificar una cepa como clon global de alto riesgo MDR, este deben cumplir una serie de características (Mathers *et al.*, 2015): (i) obtenerse de varias ubicaciones geográficas en todo el mundo, (ii) poseer varios determinantes de resistencia a los antimicrobianos, (iii) ser capaz de colonizar y persistir en los huéspedes durante intervalos de largo tiempo (al menos 6 meses), (iv) transferirse de forma

efectiva entre diferentes hospedadores, (v) mostrar aumentos de patogenicidad y (vi) causar infecciones graves y/o recurrentes.

Estos clones MDR son cepas que presentan una mayor capacidad de virulencia y resistencia a los antibióticos, por lo que son impulsores de un aumento significativo de la RAM *per se*. Además, son propagadores de genes RAM a través de transmisión horizontal y vertical (Baker *et al.*, 2018).

1.5.3.1. Clones ExPEC

ExPEC incluye varios clones MDR de gran importancia clínica debido al difícil tratamiento de las infecciones que causan. Algunos de estos clones MDR más destacados de ExPEC incluyen las secuencias tipo: ST131, ST404, ST38, ST648, ST410, ST167 y ST1193 (Cummins *et al.*, 2021; Peirano *et al.*, 2022).

ST131 es el clon más reconocido y extendido de ExPEC. Las cepas ST131 generalmente poseen una amplia gama de genes de virulencia extraintestinal y presentan resistencia a múltiples agentes antimicrobianos, incluidas las fluoroquinolonas y los beta-lactámicos (p. ej., cefalosporinas) (Rogers *et al.*, 2011).

Actualmente, el clon *E. coli* ST1193 está emergiendo rápidamente en todo el mundo, imitando al exitoso clon ST131 (Pitout *et al.*, 2022).

1.5.3.2. Clon ST1193

La secuencia tipo 1193 de *E. coli* representa un clon de alto riesgo emergente resistente a múltiples fármacos (MDR) expandido a nivel global. Concretamente, las cepas de este clon muestran resistencia a las fluoroquinolonas (FQ) (FQ-R), una clase de antibióticos ampliamente utilizados para el tratamiento de infecciones graves causadas por *E. coli* (Pitout *et al.*, 2022; Platell *et al.*, 2012).

Las cepas de *E. coli* ST1193 se caracterizan por ser en muchos casos del serogrupo O75 (Platell *et al.*, 2012), el cual está altamente asociado con infecciones del tracto urinario (ITU) y sepsis en humanos (Devine DA *et al.*, 1989; Peddie BA *et al.*, 1978). Además, se agrupan filogenéticamente dentro del complejo clonal ST14 (STc14 o CC14) que, a su vez, pertenece al grupo filogenético B2 asociado a la virulencia. Como ya se comentó anteriormente, este grupo filogenético representa la mayor parte de aislados clínicos de *E. coli* (Platell *et al.*, 2012).

La resistencia a las fluoroquinonas (FQ-R) puede estar asociada a mutaciones en genes como *gyrA*, *parC* y *parE*, que codifican proteínas implicadas en la replicación y

reparación del ADN bacteriano y que son el blanco de acción de estos antimicrobianos (Platell *et al.*, 2012).

Otros rasgos documentados de las cepas de este clon incluyen: (1) la no fermentación de lactosa debido a la eliminación de una timina en el operón lac, (2) la presencia de un alelo característico: *fimH64*, (3) la presencia de la cápsula bacteriana K1 o K5 y (4) la presencia de plásmidos IncI1 capaces de transferir estos fenotipos de resistencia a los antibióticos a receptores de *E. coli* susceptibles (Tchesnokova *et al.*, 2019; Xia *et al.*, 2017).

Este clon emergente ha captado la atención de la comunidad médica y científica debido a su creciente prevalencia y su impacto en la salud pública.

1.6. Diseño de vacunas

Se están desarrollando vacunas que se dirigen contra cepas ExPEC causantes de bacteriemias. Estas son las vacunas ExPEC 4V (para los serogrupos O1, O2, O6 y O25) y ExPEC 10V (para los serogrupos O1, O2, O4, O6, O8, O15, O16, O18, O25 y O75) (Lipworth *et al.*, 2021). Es interesante destacar que la prevalencia de los distintos serogrupos O entre las cepas ExPEC aisladas de bacteriemias en los diferentes países analizados varía significativamente con respecto algunos serogrupos, aunque en todos los estudios realizados, entre los cinco serogrupos más prevalentes siempre figuran el O1, O2, O6 y el O25. Gracias a estos estudios podemos predecir la cobertura teórica que podrían tener las vacunas ExPEC4V y ExPEC10V y otras vacunas que se desarrollen en el futuro en las distintas regiones geográficas (Rosalia Mamani 2015; Royer *et al.* 2021; Kallonen *et al.* 2017; Matsumoto *et al.* 2022; Weerdenburg *et al.* 2022).

El aumento de cepas de *E. coli* MDR es una consecuencia natural derivada del uso de antibióticos en medicina humana y veterinaria, así como en la agricultura, aunque el abuso en el consumo de este tipo de fármacos contribuye significativamente a acelerar el proceso de adaptación evolutiva de las distintas poblaciones bacterianas, incluida *E. coli*. Todo ello, supone un limitante a la hora de considerar opciones terapéuticas disponibles y un desafío significativo en el diseño de vacunas para controlar y prevenir infecciones causadas por *E. coli* patógenas.

2. Hipótesis y objetivos

Las bacteriemias causadas por *E. coli* tienen cada vez una incidencia mayor en todo el mundo. Esto se debe, entre otros factores, a la adquisición de resistencia a múltiples antimicrobianos por parte de las cepas de *E. coli*. Como consecuencia a estas resistencias, están emergiendo clones de alto riesgo que presentan resistencia múltiple a los antimicrobianos, lo que los convierte en una amenaza significativa para la salud pública haciendo que el tratamiento clínico sea más complejo y poniendo en riesgo la vida de los pacientes.

Para hacer frente a estas infecciones de tal importancia clínica, se están desarrollando vacunas preventivas basadas en los antígenos O más prevalentes dentro de las cepas ExPEC. Por este motivo, es necesario realizar estudios de vigilancia periódicos para conocer la prevalencia de los diferentes serogrupos en las distintas zonas geográficas y detectar la emergencia de nuevos clones de alto riesgo.

La finalidad de este estudio es caracterizar las cepas de cuatro (O4, O6, O18 y O75) de los serogrupos más prevalentes entre las cepas de *E. coli* causantes de bacteriemias en pacientes del Hospital Universitario Lucus Augusti (HULA) durante los años 2020, 2021 y 2022. A su vez, este objetivo puede subdividirse en varios objetivos más específicos:

1. Estudiar la prevalencia de los serogrupos O4, O6, O18 y O75 para analizar la cobertura teórica de las nuevas vacunas diseñadas para cepas ExPEC.
2. Analizar la prevalencia de dichos serogrupos en la actualidad con respecto a estudios previos realizados también en el LREC-USC en décadas anteriores, y con respecto a otras zonas geográficas.
3. Determinar el nivel de resistencias de las cepas pertenecientes a cada uno de los serogrupos estudiados.
4. Identificar los genes de virulencia de las cepas pertenecientes a cada uno de los serogrupos estudiados.
5. Estudiar la emergencia del clon ST1193 en nuestra área sanitaria.

3. Materiales y métodos

3.1. Obtención de las cepas clínicas de *E. coli*

Derivado de una colaboración entre el Hospital Universitario Lucus Augusti (HULA) y el Laboratorio de Referencia de *Escherichia coli* (LREC) de la Universidad de Santiago de Compostela (USC), contamos para la realización de este trabajo de un total de 348 cepas aisladas de pacientes con bacteriemia durante los años 2020, 2021 y 2022. La colección completa 348 cepas del LREC-USC incluyó: 13 cepas pertenecientes al serogrupo O4, 27 del serogrupo O6, 7 del serogrupo O18 y 11 del serogrupo O75. Para este trabajo, se seleccionaron 53 de las 58 cepas aleatoriamente.

Las 58 cepas clínicas de *E. coli* utilizadas como material de estudio en este Trabajo de Fin de Grado representan por tanto una colección diversa de aislamientos obtenidos de hemocultivos, es decir, de pacientes con infecciones bacterianas en sangre o bacteriemias. El protocolo del HULA incluye la identificación bioquímica de la especie bacteriana causante de la infección, así como la realización del antibiograma, y son datos de los que hemos podido disponer para la realización del trabajo.

3.2. Caracterización fenotípica de las cepas clínicas de *E. coli*

3.2.1. Biotipado y antibiograma

Tanto el biotipado (identificación bioquímica) de las cepas de *E. coli* como el antibiograma se llevó a cabo en el HULA utilizando el sistema MicroScan. Los resultados obtenidos del MicroScan fueron interpretados siguiendo los criterios establecidos por el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST). De esta manera, las cepas se clasifican como sensibles, intermedias o resistentes a los distintos antimicrobianos. Las cepas intermedias no fueron consideradas como resistentes.

Con los datos proporcionados por el antibiograma, analizamos las cepas MDR según el criterio de Magiorakos *et al.* (2012). Según dicho criterio, una cepa es considerada MDR cuando presenta resistencia a uno o más antibióticos pertenecientes a al menos tres clases distintas de antimicrobianos.

En este trabajo se analizaron 10 clases de antimicrobianos: penicilinas (ampicilina y piperacilina), penicilinas con inhibidores de β -lactamasas (piperacina-tazobactam y amoxicilina-ácido clavulánico), cefalosporinas de espectro no extendido (cefuroxima) y cefalosporinas de espectro extendido de 3ª y 4ª generación (cefotaxima,

ceftazidima y cefepima), cefamicinas (cefotaxima), monobactámicos (aztreonam), carbapenemes (imipenem, meropenem y ertapenem), aminoglucósidos (gentamicina, tobramicina, amikacina), quinolonas (ácido nalidíxico, levofloxacina y ciprofloxacina), inhibidores de la vía del folato (trimetoprim-sulfametoxazol) y tigeciclina.

3.2.2. Serotipado: determinación de serogrupos O

La designación de los serogrupos de las cepas de *E. coli* estudiadas se llevó a cabo utilizando el procedimiento del Laboratorio de Referencia de *Escherichia coli* de la Universidad de Santiago de Compostela (LREC-USC), que incluye 176 antisueros O específicos (Blanco *et al.*, 1996).

Este método determina los antígenos O mediante la aglutinación positiva con los antisueros O (O1 a O181) monoespecíficos que se encuentran disponibles. La especificidad se controló mediante ensayos de aglutinación con cepas de referencia conocidas.

Dado al elevado número de antígenos O existentes, inicialmente para determinar el antígeno O se enfrenta la suspensión bacteriana de la cepa problema con los distintos antisueros polivalentes (antisuero constituido por una mezcla de antisueros monovalentes conocidos).

Tras un periodo de incubación, se observa si hay aglutinación, la cual representa una reacción positiva. La suspensión bacteriana que haya revelado una reacción positiva con para uno o más antisueros polivalentes, se debe enfrentar a cada uno de los antisueros monovalentes contenidos en el polivalente correspondiente. De igual manera, si se produce una aglutinación en el enfrentamiento con el antisuero monovalente consideramos la presencia del antígeno O correspondiente al antisuero utilizado.

3.3. Caracterización molecular de las cepas clínicas de *E. coli*

3.3.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

3.3.1.1. Protocolo de PCR

Se empleó la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) convencional para llevar a cabo una caracterización molecular de 53 de las 58 cepas ExPEC de la colección de cepas disponibles en el LREC-USC. Esta técnica se utilizó tanto para la detección de genes de virulencia presentes en las cepas como para determinar el grupo filogenético al que pertenece cada una de ellas, además

de para la detección y estudio del clon emergente ST1193. Los siguientes procedimientos son comunes a todas las PCR realizadas en este trabajo:

Extracción de ADN

Todas las PCR realizadas en la parte experimental de este Trabajo de Fin de Grado se realizaron a partir de cultivos puros de las cepas problema. Sembramos las cepas problema en placas de Petri con medio TSA (*Tryptic Soy Agar*) y se incuban a una temperatura adecuada a las condiciones de crecimiento visible de colonias de *E. coli* (37°C).

Para cada muestra, añadimos en un microtubo de 1,5mL 600µL de agua MiliQ estéril que inoculamos con el crecimiento bacteriano del cultivo puro de cada cepa problema utilizando un asa de siembra estéril. Tras esto, llevamos a hervir los microtubos de 1,5mL inoculados durante 5 minutos a 100°C. De esta manera, las células se rompen y el ADN queda en suspensión. Después, centrifugamos las suspensiones bacterianas durante 2 minutos a 11000 rpm para obtener un sobrenadante en donde se haya el ADN de la muestra. De dicho sobrenadante se toma 5µL para cada reacción de PCR.

Preparación de la mezcla de reacción de la PCR

Trabajamos con un volumen final de 25µL para la mezcla de reacción de la PCR, donde se incluyen los siguientes componentes (**Tabla 1**):

- *Primers*: se debe tener en cuenta siempre el número de *primers* a utilizar y la concentración particular de cada uno. Los *primers* usados en cada una de las PCR, sus secuencias nucleotídicas, el tamaño del producto amplificado de pares de bases (pb) y las condiciones de trabajo (T^a de hibridación) se indican en las **Tablas 2, 3 y 4**. El proceso de preparación de los *primers* se encuentra en el **Anexo I**.
- Master Mix coloreado (12,5µL): trabajaremos con el reactivo NZYtechTaq 2x Green Master Mix, el cual deberá estar almacenado a -20°C, empleando para ello los congeladores y los termobloques disponibles. Es importante para el adecuado funcionamiento de este reactivo someterlo a los menos ciclos de congelación y descongelación posibles.
- Agua MiliQ estéril: utilizada para ajustar el volumen total de la mezcla en función del volumen de *primers* empleados y proporcionar el medio acuoso necesario para la reacción.
- ADN extraído de la cepa problema (5µL).

Además, en todos los procedimientos se incluyen cepas control positivas del LREC (**Anexo II**) y controles negativos. Así, al observar los resultados confirmamos su validez.

Tabla 1. Componentes de la mezcla de reacción para el reactivo NZYtechTaq 2x Green Master Mix.

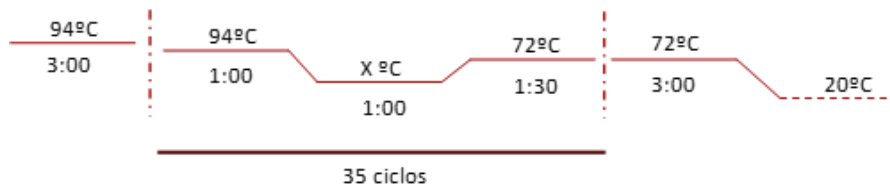
NZYTaq 2x Green Master Mix	Primer F* (20 µM)	Primer R* (20 µM)	Agua MiliQ estéril	ADN
12.5 µl	1 µl	1 µl	5.5 µl	5 µl

*La concentración de los *primers* de trabajo fue de 20 µM en todos los casos mientras que el volumen de *primer* empleado en cada reacción de PCR es variable dependiendo de sus características (tablas 2, 3 y 5).

Proceso de amplificación

La amplificación se lleva a cabo en un termociclador, donde las mezclas son sometidas a distintos ciclos de temperaturas necesarias en la técnica de PCR. Los pasos en un termociclador son: (1) un ciclo inicial de desnaturalización, donde la temperatura se eleva a 94°C durante 3 minutos; (2) 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a la temperatura específica de los *primers* durante 1 minuto durante 1 minuto y extensión a 72°C durante 1 minuto y medio; (3) un ciclo final de extensión a 72°C durante 3 minutos. Finalmente, los amplicones se mantienen a 20°C. Podemos observar estas condiciones de forma más esquemática en la **Figura 1**.

Figura 1. Condiciones generales del termociclador para el reactivo NZYTaq 2x Green Master Mix.



Electroforesis en gel de agarosa

La lectura de los productos amplificados se realiza mediante electroforesis en gel de agarosa convencional bajo luz UV. La preparación del gel de agarosa es al 1,5%, exceptuando la puesta de PCR a punto (al 2%), en tampón TAE 1x (1,6M Tris; 0,8M acetato sódico; 0,025M EDTA) con la adición de 3µL de *Green Safe Premium* (Nzytech) por cada 100mL de TAE.

3.3.1.2. Detección de genes de virulencia de ExPEC

Los genes que codifican FV de ExPEC fueron examinados por PCR. Las condiciones de trabajo (T^a de hibridación) y los *primers* utilizados para la amplificación por PCR de

estos genes, así como sus respectivos volúmenes, sus secuencias nucleotídicas, el tamaño del producto amplificado de pares de bases se indican en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Primers utilizados para la detección de los genes de virulencia de ExPEC.

Secuencia nucleotídica (5' - 3')	Primers	Gen Diana	Concen. de trabajo (μ) [alícuotas 20 μ M]	Tª de hibridación (°C)	Tamaño (pb)	Referencia
GTGGCAGTATGAGTAATGACCGTTA	Forward	<i>papC</i>	0.5	60	205	Johnson et al. (2015)
ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	Reverse					
TCAGGACACGTTTCAGGCATTCAGT	vat-F	<i>vat</i>	0.5	66	1100	Spurbeck et al. (2012)
GGCCAGAACATTTGCTCCCTTGTT	vat-R					
GTAACAATCTTCCCGCTCGGCAT	fyuA-F	<i>fyuA</i>	0.5		850	Spurbeck et al. (2012)
TGACGATTAACGAACCGGAAGGGA	fyuA-R					
ACATGGAGACCACGTTCCACC	yfcV-F	<i>yfcV</i>	0.5		292	Spurbeck et al. (2012)
GTAATCTGGAATGTGGTCAGG	YfcV-R					
ATCTAGCCGAAGAAGGAGGC	Forward	<i>ompT</i>	1	60	559	Johnson et al. (2015)
CCCGGGTCATAGTGTTCATC	Reverse					
TCGTTTAGGGTGCTTACCTTCAAC	Forward	<i>hlyF</i>	0.5		444	Morales et al. (2004)
TTTGGCGTTTAGGCATTCC	Reverse					
GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT	PapEF F	<i>papEF</i>	0.5	62	336	Yamamoto et al. (1995)
AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA	PapEF R					
GGTGGTGCACTGGAGTGG	tsh03	<i>tsh</i>	0.5		640	Dozois et al. (2000)
AGTCCAGCGTGATAGTGG	tsh15					
TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT	Aer f	<i>iucD</i>	0.5	64	602	Yamamoto et al. (1995)
AATATCTTCTCCAGTCCGGAGAAG	Aer r					
GGCTGGACATCATGGGAAGTGG	aer-851f	<i>iutA</i>	0.5		301	Johnson et al. (1997)
CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	aer-1152r					
CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC	sfa 1	<i>sfa/focDE</i>	0.5		410	Le Bouguenec et al. (1992)
CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	sfa 2					
AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG	Ironec-f	<i>iroN</i>	0.3	66	665	Johnson et al. (2000)
GACGCCGACATTAAGACGCAG	Ironec-r					
CAGCAACCCGAACCACTTGATG	is-f	<i>iss</i>	0.3		323	Johnson et al. (2008a)
AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA	is-r					
AGGTGAAAAGCCTGGTAGTGTG	neu1	<i>neuc-k1</i>	0.5	64	676	Moulin-Schouleur et al. (2006)
GGTGGTACATCCCGGGATGTC	neu2					
GCGCATTTGCTGATACTGTTG	KpsII f	<i>kpsM II</i>	0.5		272	Johnson and Stell, (2000)
CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	KpsII r					
GCTGGGAGCAAACTGATAACTCTC	afa1	<i>afa/draBC</i>	0.5	64	750	Le Bouguenec et al. (1992)
CATCAAGCTGTTTGTTCGTCGCCCG	afa2					
AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	hly f	<i>hlyA</i>	0.3	64	1177	Yamamoto et al. (1995)
ACCATATAAGCGGTCATCCCGTCA	hly r					

Criterio estatus ExPEC, UPEC y APEC

En la actualidad, para que una cepa posea el estatus ExPEC debe tener al menos dos de estos 5 marcadores de virulencia: *PapAH* y/o *PapC*, *sfa/foc*, *afa/dra*, *iutA* y *kpsMT II* (Johnson *et al.*, 2015). En el caso designarse UPEC debe presentar al menos 3 de los 4 marcadores siguientes: *chuA*, *fyuA*, *vat* y *yfcV* (Spurbeck *et al.*, 2012). En el caso de APEC, lo marcadores que deberá presentar son 4 de los 5 siguientes: *hlyF*, *iutA*, *iron*, *iss* y *ompT* (Johnson *et al.*, 2008b).

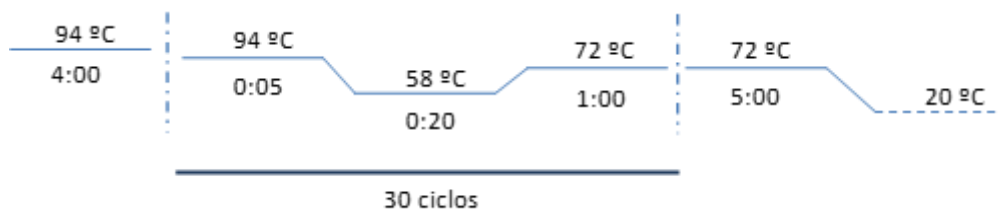
3.3.1.3. Determinación de grupos filogenéticos

La asignación de los grupos filogenéticos a los que pertenece cada cepa se basó en el protocolo de Clermont *et al.*, (2013). La **Tabla 3** incluye las condiciones de trabajo (Tª de hibridación) y los *primers* utilizados para la amplificación por PCR de los genes implicados en la caracterizar las cepas ExPEC, así como sus respectivos volúmenes, sus secuencias nucleotídicas y el tamaño del producto amplificado. En la **Figura 2** se ven representadas las condiciones del termociclador.

Tabla 3. *Primers* utilizados en la identificación de los grupos filogenéticos.

Gen diana	<i>Primers</i>	[50 µM]	Tª de hibridación	Secuencia nucleotídica (5´- 3´)	Tamaño (pb)	Referencia
<i>chuA</i>	chuA.1b	0.5 µl	58 °C	ATGGTACCGGACGAACCAAC	288	Clermont <i>et al.</i> (2013)
	chuA.2			TGCCGCCAGTACCAAAGACA		Clermont <i>et al.</i> (2000)
<i>yjaA</i>	yjaA.1b	0.5 µl		CAAACGTGAAGTGTGTCAGGAG	211	Clermont <i>et al.</i> (2013)
	yjaA.2b			AATGCGTTCCTCAACCTGTG		
<i>TspE4C2</i>	TspE4C2.1b	1 µl		CACTATTTCGTAAGGTCATCC	152	
	TspE4C2.2b			AGTTTATCGCTGCGGGTCGC		
<i>arpA</i>	AceK.f	1 µl		AACGCTATTTCGCCAGCTTGC	400	
	ArpA1.r			TCTCCCCATACCGTACGCTA		

Figura 2. Condiciones del termociclador para la PCR de los grupos filogenéticos.



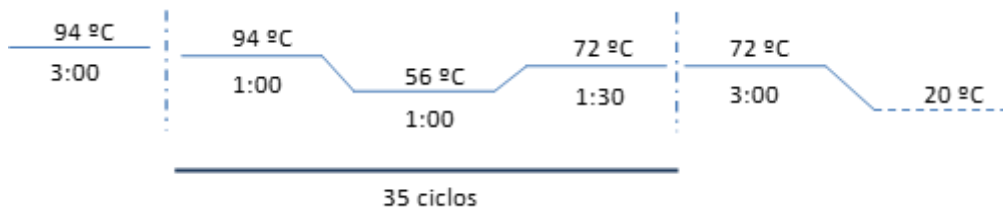
Para la identificación del grupo filogenético A/C y D/E, es necesario realizar la detección de dos genes complementarios específicos de cada linaje y otras condiciones de trabajo. En el caso de la PCR del grupo filogenético A/C dichas condiciones se ven

reflejadas en la **Tabla 4**. En la **Figura 3** se ven representadas las condiciones del termociclador.

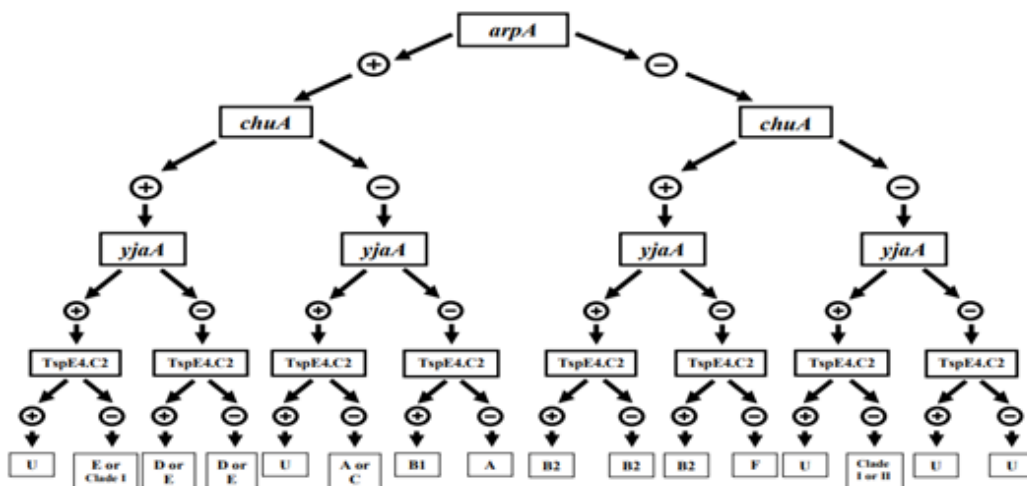
Tabla 4. *Primers* utilizados en la determinación del grupo filogenético C.

Gen Diana	<i>Primers</i>	[50µM]	Tª de hibridación	Secuencia nucleotídica (5' - 3')	Tamaño (pb)	Referencia
<i>trpAgpC</i>	trpAgpC.1	0.5 µl	56 °C	AGTTTTATGCCAGTGCGAG	219	Lescat <i>et al.</i> (2012)
	trpAgpC.2			TCTGCGCCGGTCACGCC		
<i>trpA</i>	trpBA.f	0.1 µl		CGGCGATAAAGACATCTTCAC	489	Clermont <i>et al.</i> (2008)
	trpBA.r			GCAACGCGGCTGGCGGAAG		

Figura 3. Condiciones del termociclador para la PCR del grupo filogenético A/C.



Los resultados para la identificación de los grupos filogenéticos se analizan siguiendo el diagrama de la **Figura 4**.



3.3.2. Detección del clon ST1193

En este trabajo realizamos la puesta a punto de una PCR múltiple para la detección del clon emergente de ST1193-H64 basándonos en el protocolo del ensayo de PCR múltiples ST1193-H64 propuesto por Johnson *et al.*, (2019).

En este ensayo, se amplifican simultáneamente tres genes: *icd-200*, *fimH64* y *fumC*, que permiten la identificación específica del clon. Tanto *fumC* como *icd-200* son fundamentales en el esquema MLST, mientras que *fimH64* es un alelo característico de ST1193 que complementa la identificación y que es habitualmente determinado para la asignación de clonotipos (CH). Más concretamente, *icd-200* es un control que distingue ST1193 de otros miembros del complejo clonal STc14 (Clermont *et al.*, 2014; V. Tchesnokova *et al.*, 2019; Wirth *et al.*, 2006).

Para encontrar las condiciones óptimas para llevar a cabo el ciclo de PCR, se realizó un gradiente de temperaturas de hibridación con cada uno de los *primers* a diferentes concentraciones (0,2/0,5/1 µl). Al realizar la lectura en el gel de agarosa, se determinó una concentración óptima para cada primer (**Tabla 5**) y se realizó un ensayo de PCR con las siguientes condiciones para lograr una amplificación eficiente, las cuales coinciden con establecidas por Johnson *et al.*, (2019):

- Desnaturalización inicial a 95°C durante 2 minutos.
- 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 66°C durante 1 minuto y extensión a 72°C durante 1 minuto y medio.
- Extensión final a 72°C durante 2 minutos.
- Mantenimiento a 12°C.

Tabla 5. *Primers* utilizados en la determinación del clon ST1193-H64.

Gen Diana	<i>Primers</i>	[20µM]	Tª de hibridación	Secuencia nucleotídica (5´- 3´)	Tamaño (pb)	Referencia
Icd-200	1193icdF.21	1 µl	66 °C	ATTCCTGCGTGAAGAGATGGA	600	(Clermont <i>et al.</i> , 2014)
	icdgpVII.r			CAATTAAATCAGCCGCTTCG		
fimH64	fimH64F.18	1 µl		TGTAAACCTTGCGCCCGT	266	(Johnson <i>et al.</i> , 2019)
	fimH64R			TCAAATAAAGCGCCACCA		
fumC	fumC for	0.5 µl		TACAGGTGCGCCAGCGCTTC	802	(Wirth <i>et al.</i> , 2006)
	fumC rev			GTACGCGCGAAAAAGATTC		

3.3.3. MLST y secuenciación Sanger

Realizamos la secuenciación del alelo *fimH* de las 2 cepas ST1193 identificadas en este trabajo.

3.3.3.1. Obtención de amplicones mediante una PCR convencional

La PCR se lleva a cabo en un volumen total de 50 µl. La mezcla de reacción incluye: 1 µl de ADN extraído, 10 µl del 5x *My Taq™ Reaction Buffer* (Bioline), que contiene 5 mM dNTPs, 15 mM MgCl₂, 0,2 µl de *MyTaq™ DNA polymerase* (Bioline) y 1 µl de cada uno de los *primers* (a una concentración de 20 µM) (**Tabla 6**).

La reacción se realiza bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 57°C durante 1 minuto, extensión a 72°C durante 1 minuto. Finalmente, la extensión final tiene lugar a 72°C durante 3 minutos (Weissman et al., 2012).

Tabla 6. *Primers* utilizados para la designación de los clonotipos y del tipo de secuencia Achtman.

Gen	Primer	Secuencia nucleotídica (5´- 3´)	Tamaño amplicón (pb)	Temperatura de hibridación	Referencia
<i>fimH</i> (tamaño locus 469)	fimH-wf	CACTCAGGGAACCATTCAGGCA	975	57 °C	Weissman <i>et al.</i> (2012)
	fimH-wf	CACTCAGGGAACCATTCAGGCA			

3.3.3.2. Secuenciación de las cadenas complementarias

Las hebras complementarias (forward y reverse) obtenidas de la PCR se envían a la instalación de secuenciación de la Universidad de Santiago de Compostela (Lugo). Allí, utilizan el protocolo “*BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing*”.

3.3.3.3. Análisis de las secuencias

Las secuencias obtenidas se analizan utilizando el software del *Center for Genomic Epidemiology* (CGE), BLAST y la base de datos GenBank, ambos proporcionados por la *National Library of Medicine* (NIH) y el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Además, para analizar los alineamientos de las hebras complementarias utilizamos el software Clustal-Omega del *European Bioinformatics Institute*.

3.4. Análisis estadístico

A la hora de interpretar los resultados, se utilizó el software estadístico SPSS, que permite manejar grandes conjuntos de datos y aplicar diversas pruebas estadísticas de manera eficiente, como, por ejemplo, la prueba exacta de Fisher. También se ha utilizado el test Chi cuadrado con la corrección de Yates en los casos en los que el tamaño de la muestra era muy elevado (<http://vassarstats.net/tab2x2.html>).

El criterio para determinar la significancia se basó en el P-valor. Se consideró una asociación estadísticamente significativa y, por tanto, una relación real entre las variables analizadas, cuando el P-valor era menor a 0,05. Si se cumple esta condición, estamos hablando de que existe menos de un 5% de probabilidad de que la dicha asociación sea debida al azar.

4. Resultados y discusión

4.1. Caracterización fenotípica

4.1.1. Prevalencia de serogrupos O

En el LREC-USC se realizó la determinación de los serogrupos de 348 cepas aisladas en el HULA en el periodo 2020-2022. En este trabajo analizamos la prevalencia de los serogrupos O4, O6, O18 y O75 (**Tabla 7**).

Tabla 7. Prevalencia de los serogrupos O4, O6, O18 y O75 entre las 348 cepas de *E. coli* bacteriémicos y distribución entre los años 2020, 2021 y 2022.

Serogrupos	Número (%) de cepas de <i>E. coli</i>			
	Total n = 348	2020 n = 119	2021 n = 177	2022 n = 52
O4	13 (3,7)	6 (5,0)^a	7 (4,0)^a	0
O6	27 (7,8)	5 (4,2)	16 (9,0)^b	6 (11,5)^b
O18	7 (2,0)	3 (2,5)	2 (1,1)	2 (3,8)
O75	11 (3,2)	5 (4,2)	3 (1,7)	3 (5,8)

^aNo hay diferencias estadísticamente significativas ($P = 0,229$ /Fisher two-tailed). Los valores P se calcularon acumulando los datos de los años 2020 y 2021 y enfrentándolos con los del año 2022. Tampoco hay diferencias al comparar individualmente el año 2022 con el 2021 y el 2022 con el 2020.

^bNo hay diferencias estadísticamente significativas ($P = 0,091$ /Fisher two-tailed; $P = 0,114$ /Chi-Square/Yates). Los valores P se calcularon acumulando los datos de los años 2021 y 2022 y enfrentándolos con los del año 2020. Tampoco hay diferencias al comparar individualmente el año 2022 con el 2020 y el 2021 con el 2020.

En 2020, es O4 el serogrupo con mayor prevalencia (5%) seguido de O6 y O75 (4,2%). En 2021 y 2022, O6 lidera con un 9% y 11,5% de prevalencia. Observamos un aumento progresivo del serogrupo O6 (4,2% en 2020, 9% en 2021 y 11,5% en 2022) y un descenso progresivo del serogrupo O4 (5% en 2020, 4% en 2021 y 0% en 2022). Cabe destacar también el aumento de la prevalencia de O75 en 2022 con respecto al 2021. No obstante, las diferencias observadas en la distribución de los serogrupos entre los 3 años no son estadísticamente significativas (**Tabla 7**).

Tampoco se observan diferencias estadísticamente significativas al comparar la prevalencia de los cuatro serogrupos en nuestro estudio con cepas aisladas entre los años 2020-2022 con las encontradas en la tesis doctoral de Rosalia S. Mamani (2015). En dicha tesis se serotiparon en el LREC-USC 3.260 cepas bacteriémicas aisladas de pacientes del HULA entre los años 1989 y 2011. Las cepas de los cuatro serogrupos suponen el 16,7% en el período más reciente frente al 17,9% en décadas pasadas (**Tabla 8**).

Tabla 8. Serogrupos O más frecuentes entre cepas de *E. coli* bacteriémicas aisladas de pacientes en el hospital Universitario Lucus Augusti (HULA). Comparación entre los períodos 2020-2022 (estudio actual) y 1989-2011 (Tesis doctoral Rosalia S. Mamani, USC, 2015).

Serogrupos	Estudio 2020-2022 (n = 348)	Estudio 1989-2011 (n = 3.260)	Test Chi-Cuadrado con la corrección de Yates Valor P
O4	13 (3,7)	117 (3,6)	1,0 (DNS)
O6	27 (7,8)	278 (8,5)	0,698 (DNS)
O18	7 (2,0)	129 (4,0)	0,096 (DNS)
O75	11 (3,2)	58 (1,8)	0.113 (DNS)
O4, O6, O18, O75	58 (16,7)	582 (17,9)	0,631 (DNS)

Diferencias no significativas (DNS).

Si analizamos la prevalencia de los serogrupos O4, O6, O18 y O75 en diferentes países (**Tabla 9**), podemos observar algunas variaciones. El O4 tiene una mayor prevalencia en Inglaterra (4,3%) en cepas aisladas en 2001-2011, París (3,8%) en las cepas aisladas en 2005, 2026-2017, seguido de Lugo (3,6% para 1989-2011 y 3,7% para 2020-2022). El O6 es el de mayor prevalencia en Lugo y en todos los estudios realizados a nivel mundial, siendo especialmente prevalente en Inglaterra con un 14,7%. La prevalencia del serogrupo O18 oscila entre un 2,0% en Lugo 2020-2022 y un 4,3% en Inglaterra 2001-2011. Por último, la mayor prevalencia de O75 está en Japón (4,7%) y la menor en Lugo en el periodo 2020-2022 (1,8%) (Rosalia Mamani, 2015; Royer *et al.* 2022; Kallonen *et al.* 2017; Matsumoto *et al.* 2022; Weerdenburg *et al.* 2022). Evidentemente este tipo de información es esencial para el desarrollo de vacunas y predecir la posible protección de estas mismas en las diferentes zonas geográficas.

Tabla 9. Comparación de los serogrupos O más prevalentes entre cepas de *E. coli* bacteriémicas aisladas en diferentes países.

Serogrupos	Lugo 2020-2022	Lugo 1989-2011	París 2005, 2016-2017	Inglaterra 2001-2011	Japón 2015-2017	Global 2011-2017
	n=348	n=3260	n= 912	n= 1509	n= 401	n= 3217
O4	13 (3,7)	117 (3,6)	35 (3,8)	65 (4,3)	6 (1,5)	96 (3,0)
O6	27 (7,8)	278 (8,5)	97 (10,6)	222 (14,7)	22 (5,5)	261 (8,1)
O18	7 (2,0)	129 (4,0)	29 (3,2)	65 (4,3)	17 (4,2)	91 (2,8)
O75	11 (3,2)	58 (1,8)	31 (3,4)	55 (3,6)	19 (4,7)	145 (4,5)
O4, O6, O18, O75	58 (16,7)	582 (17,9)	192 (21,1)	407 (27,0)	64 (16,0)	593 (18,4)

Lugo 2020-2022 (datos de este estudio), Lugo 1989-2011 (Tesis doctoral Rosalia Mamani, 2015), París (Royer *et al.*, 2022), Inglaterra (Kallonen *et al.*, 2017), Japón (Matsumoto *et al.*, 2022) y estudio global (Europa, Norte y Sur de América, and Asia-Pacífico (Weerdenburg *et al.*, 2022).

4.1.2. Resistencia antimicrobiana

En este trabajo realizamos un análisis de los antibiogramas realizados en el HULA para las 58 cepas pertenecientes a los serogrupos de interés en la colección completa del LREC-USC (348 cepas) y los relacionamos con los serogrupos de las cepas (**Tabla 10**).

Tabla 10. Resistencia antimicrobiana de 53 cepas bacteriémicas de *E. coli* pertenecientes a los serogrupos O4, O6, O18 y O75 y del total de 348 cepas (2020 y 2022, HULA, Lugo).

Antimicrobianos ^a		Número (%) de cepas resistentes					P-valor O4 vs O75	P-valor O6 vs O75	P-valor O18 vs O75
		Total n=348	O4 n=13	O6 n=27	O18 n=7	O75 n=11			
Betalactámicos (Penicilinas, Cefamicinas, Cefalosporinas, Monobactámicos, Carbapenemes)									
Ampicilina	(AMP)	197 (56,6) ^b	8 (61,5)	15 (55,6)	2 (28,6)	9 (81,8)			0,049
Piperacilina	(PIP)	183 (52,6)	7 (53,8)	14 (51,9)	0	9 (81,8)			0,002
Cefoxitina	(FOX)	7 (2,0)	0	0	0	0			
Cefuroxima	(CXM)	39 (11,2)	0	1 (3,7)	0	0			
Cefotaxima	(CTX)	24 (6,9)	0	0	0	0			
Ceftazidima	(CAZ)	17 (4,9)	0	0	0	0			
Cefepima	(FEP)	26 (7,5)	0	0	0	0			
Aztreonam	(AZM)	27 (7,8)	0	1 (3,7)	0	0			
Betalactámicos con inhibidores de β-lactamasas									
Amoxicilina- Ácido clavulánico	(AMC)	63 (18,1)	3 (23,1)	4 (14,8)	0	1 (9,1)			
Piperacilina- Tazobactam	(TZP)	13 (3,7)	0	2 (7,4)	0	0			
Aminoglucósidos									
Gentamicina	(GEN)	47 (13,5)	0	0	0	2 (18,2)			
Tobramicina	(TOB)	47 (13,5)	0	0	0	2 (18,2)			
Quinolonas									
Ácido nalidíxico	(NAL)	115 (33,0)	2 (15,4)	1 (3,7)	0	6 (54,5)		0,001	0,038
Ciprofloxacino	(CIP)	92 (26,4)	1 (7,7)	0	0	6 (54,5)	0,023	<0,001	0,038
Levofloxacina	(LVX)	87 (25,0)	1 (7,7)	0	0	6 (54,5)	0,023	<0,001	0,038

Continuación de la **Tabla 10**.

Antimicrobianos ^a		Número (%) de cepas resistentes					P-valor O4 vs O75	P-valor O6 vs O75	P-valor O18 vs O75
		Total n=348	O4 n=13	O6 n=27	O18 n=7	O75 n=11			
Inhibidores de la vía del folato									
Trimetoprim- Sulfametoxazol	(SXT)	121 (34,8)	3 (23,1)	1 (3,7)	1 (14,3)	4 (36,7)		0,014	
Resistencia múltiple (MDR)		105 (30,2)	2 (15,4)	1 (3,7)	0	6 (54,5)		0,001	0,037
Productoras de ESBL		24 (6,9)	0	0	0	0			

^aNinguna de las 348 cepas analizadas fue resistente a los siguientes antimicrobianos: Imipenem, meropenem, ertapenem, amikacina y tigeciclina.

^bCuando los porcentajes son mayores del 20% figuran en negrilla.

Se observó que un elevado número de cepas de los serogrupos O4, O6 y O75 expresaban resistencia a las penicilinas (ampicilina y piperacilina). Sin embargo, la mayoría cepas del serogrupo O18 no manifestaron dichas resistencias observándose diferencias significativas con O75 ($P=0,049$ y $0,002$ respectivamente). Cabe destacar que no se observan prácticamente resistencias al resto de antibióticos pertenecientes al grupo de los betalactámicos. Así, vemos como las cepas pertenecientes a los serogrupos estudiados no presentan resistencias a cefamicinas, ni cefalosporinas, ni carbanemes, y solamente una única cepa del serogrupo O6 fue resistente al monobactámico aztreonam. Estos datos coinciden con los resultados del trabajo de Rosalía Mamani en 2014 de 2,427 cepas de *E. coli* bacteriémicas aisladas entre 2010 y 2011, las cuales no presentaron resistencia a dichas clases de antimicrobianos (Rosalía Mamani, 2015).

En cuanto al grupo de β -lactámicos con inhibidores de β -lactamasas, hallamos resistencia entre las cepas aisladas en el periodo 2020-2022 de los serogrupos O4 (23,1%), O6 (14,8%) y O75 (9,1%) a la combinación amoxicilina-ácido clavulánico. Al comparar estos resultados con los del periodo 2010-2011 para dichos serogrupos: O4 (26,3%), O6 (3,8%) y O75 (10%); vemos un aumento significativo de la resistencia de cepas pertenecientes al serogrupo O6. Sin embargo, en ninguno de los dos periodos se observó resistencia a estos antimicrobianos por parte de cepas O18.

Con respecto a los aminoglucósidos, citar que el 18,2% de las cepas del serogrupo O75 resultaron ser resistentes, frente al 0% de las cepas de los serogrupos O4, O6 y O18. Este es un dato a destacar, puesto que el periodo de 2010-2011 no se describieron

resistencias a los aminoglucósidos por parte de las cepas O75 estudiadas (Rosalia Mamani, 2015).

Todos los serogrupos de nuestro estudio, presentaron resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol (SXT). En las cepas O4, el perfil de resistencia se mantuvo prácticamente estable si comparamos las cepas aisladas en el periodo 2020-2022 (23,1%) con a las cepas aislada en 2010-2011 (21,1%). Sin embargo, hubo variaciones en la resistencia de las cepas O6, O18 y O75. En O6 y O75 estas variaciones fueron leves, ya que para O6 disminuyó del 5,7% al 3,7% y para O75 aumento del 20% al 36,7%. La gran diferencia se observa en las cepas O18, las cuales pasaron de un 26,6% a 1,4%, lo que podría indicar la pérdida de genes de resistencia específicos a ese antimicrobiano.

Otro punto importante es la alta expresión de resistencia a las quinolonas en las cepas pertenecientes al serogrupo O75 (más del 50%). Además, observamos diferencias estadísticamente significativas entre las cepas O75 y aquellas pertenecientes a los serogrupos O4 ($p=0,023$), O6 ($p<0,001$) y O18 ($p=0,038$) con respecto a las quinolonas fluoradas (ciprofloxacina y levofloxacina).

Las cepas pertenecientes al serogrupo O75 presentaron el porcentaje más elevado (5,7%) de cepas con resistencia múltiple (MDR) entre los serogrupos estudiados (**Tabla 11**). El aumento detectado de resistencias en las cepas O75 podrían explicar el aumento de la prevalencia de O75 en los últimos años (2020-2022) por adquisición de genes de resistencia.

También se observó un aumento en el número de cepas MDR en todos los serogrupos con respecto al periodo 2010-2011, a excepción de O18, el cual se mantuvo estable con 0 cepas MDR (Rosalia Mamani, 2015).

Tabla 11. Prevalencia de los serogrupos O4, O6, O18 y O75 entre las 348 cepas de *E. coli* bacteriémicos y distribución de cepas con resistencia múltiple.

Serogrupos	Número (%) de cepas de <i>E. coli</i>			P-valor MDR vs no-MDR
	Total n = 348	MDR n = 105	No-MDR n = 243	
O4	13 (3,7)	2 (1,9)	11 (4,5)	
O6	27 (7,8)	1 (1,0)	26 (10,7)	0,001 (Fisher/two-tailed) 0,003 (Chi-Square/Yates)
O18	7 (2,0)	0	7 (2,9)	
O75	11 (3,2)	6 (5,7)	5 (2,1)	

4.2. Caracterización molecular

De las 58 cepas de *E. coli* aisladas y estudiadas en este trabajo pertenecientes a los serogrupos O4, O6, O18 y O75, se seleccionaron 53 cepas para realizar la caracterización molecular (se eliminaron 5 cepas aleatoriamente).

4.2.1. Grupos filogenéticos

Al realizar la asignación del grupo filogenético correspondiente a cada cepa, se detectó que de las 53 cepas de *E. coli* bacteriémicas estudiadas, 52 (98,1%) pertenecieron al grupo filogenético B2, mientras que solo una cepa pertenece al grupo filogenético C. Siendo por tanto el grupo filogenético B2 el que integra la inmensa mayoría de las cepas pertenecientes a las cepas pertenecientes a los serogrupos objeto de estudio en este trabajo.

En el estudio previo realizado en Lugo por Rosalia S. Mamari (2015) para más de 3.000 cepas de *E. coli* bacteriémicas aisladas durante los años 1989 y 2011, el grupo filogenético más prevalente fue también B2, tanto en el periodo 1989-1999 (41%) como en el de 2000-2011 (40%), manteniendo su distribución estable en ambos. La prevalencia de B2 supuso una gran diferencia frente a los grupos A, B1 y D, cuyos porcentajes no superan el 25% (Rosalia Mamani, 2015).

La alta prevalencia del grupo B2 en ambos estudios indica una mayor virulencia y capacidad de causar infecciones extraintestinales, especialmente bacteriemias. Además, la alta prevalencia de cepas B2 aisladas de infecciones extraintestinales sugiere que este grupo filogenético cuenta con ventajas adaptativas, como diversos FV, que hagan frente a las barreras y sistema inmune del hospedador y el medio ambiente (Touchon *et al.*, 2009; Tourret y Denamur, 2016; Clermont *et al.*, 2019).

Con esta información, reconocemos a B2 como una diana de gran relevancia para el desarrollo de vacunas y otras estrategias de tratamiento y prevención de infecciones extraintestinales causadas por *E. coli*.

4.2.2. Genes de virulencia

Las 53 cepas de *E. coli* bacteriémicas fueron analizadas por PCR para detectar la presencia de 17 genes de virulencia asociados con cepas de ExPEC (**Tabla 12**). Destacamos que 46 cepas de las 53 cepas estudiadas (86,8%) cumplen el criterio de estatus ExPEC y 52 cepas (98,1%) el criterio de estatus UPEC, confirmando su papel como *E. coli* patógenos extraintestinales y presentando un elevadísimo número de genes de virulencia que justifica su elevado potencial de patogenicidad.

En relación a los genes de virulencia asociados con la adherencia y colonización, observamos que los genes *papC*, *papEF* y *sfa/focDE* están mayormente ligados a las cepas pertenecientes a los serogrupos O4, O6 y O18, siendo su detección significativamente inferior en las cepas pertenecientes al serogrupo O75 y las diferencias estadísticamente significativas.

En lo que respecta al gen que codifica para la alfa-hemolisina HlyA, vemos que también es mucho más frecuente entre las cepas de los serogrupos O4, O6 y O18, siendo también las diferencias estadísticamente significativas con respecto al O75.

En cuanto a los genes de virulencia involucrados en la captación y transporte de hierro, también observamos diferencias claras, pues observamos que los genes *iucD* y *iutA* son mucho más frecuentes entre las cepas O6, O18 y O75, mientras que el gen *iroN* predomina entre las cepas O4, O6 y O18 (**Tabla 12**).

Tabla 12. Genes codificantes de factores de virulencia estudiados en las 53 cepas bacteriémicas de *E. coli* pertenecientes a los serogrupos O4, O6, O18 y O75.

Genes FV	Número (%) de cepas					P- valor O4 vs O6	P- valor O4 vs O18	P- valor O4 vs O75	P- valor O6 vs O75	P- valor O18 vs O75
	Total n=53	O4 n=12	O6 n=24	O18 n=7	O75 n=10					
Adherencia y colonización										
<i>papC</i>	35 (66)	10 (83,3)	20 (83,3)	4 (57,1)	1 (10)			0,002	<0,001	
<i>papEF</i>	35 (66)	10 (83,3)	20 (83,3)	4 (57,1)	1 (10)			0,002	<0,001	
<i>sfa/focDE</i>	39 (73,6)	9 (75)	22 (91,7)	6 (85,7)	2 (20)			0,03	<0,001	0,015
<i>afa/draBC</i>	1 (1,9)	0	0	0	1 (10)					
<i>YfcV</i>	52 (98,1)	11 (91,7)	24 (100)	7 (100)	10 (100)					
Toxicidad										
<i>hlyA</i>	37 (69,8)	11 (91,7)	21 (87,5)	4 (57,1)	1 (10)			<0,001	<0,001	
<i>hlyF</i>	3 (5,7)	1 (8,3)	0	2 (28,6)	0					
<i>tsh</i>	1 (1,9)	0	0	1 (14,3)	0					
<i>vat</i>	51 (96,2)	10 (83,3)	24 (100)	7 (100)	10 (100)					
Captación y transporte de hierro										
<i>iucD</i>	30 (56,6)	2 (16,7)	13 (54,2)	6 (85,7)	9 (90)	0,04	0,006	0,002		
<i>iutA</i>	30 (56,6)	2 (16,7)	13 (54,2)	6 (85,7)	9 (90)	0,04	0,006	0,002		
<i>iroN</i>	40 (75,5)	10 (83,3)	22 (91,7)	6 (85,7)	2 (20)			0,008	<0,001	0,012

Continuación de la **Tabla 12**.

Genes FV	Número (%) de cepas					P- valor O4 vs O6	P- valor O4 vs O18	P- valor O4 vs O75	P- valor O6 vs O75	P- valor O18 vs O75
	Total n=53	O4 n=12	O6 n=24	O18 n=7	O75 n=10					
Captación y transporte de hierro										
<i>fyuA</i>	52 (98,1)	11 (91,7)	24 (100)	7 (100)	10 (100)					
<i>chuA</i>	52 (98,1)	11 (91,7)	24 (100)	7 (100)	10 (100)					
Cápsula										
<i>kpsM II</i>	50 (94,3)	9 (75)	24 (100)	7 (100)	10 (100)	0,031				
Evasión del sistema inmune de hospedador										
<i>OmpT</i>	52 (98,1)	11 (91,7)	24 (100)	7 (100)	10 (100)					
<i>iss</i>	15 (28,3)	6 (50)	7 (29,2)	1 (14,3)	1 (10)					
Estatus ExPEC	46 (86,8)	10 (83,3)	20 (83,3)	6 (85,7)	10 (100)					
Estatus UPEC	52 (98,1)	11 (91,7)	24 (100)	7 (100)	10 (100)					
Media¹	33,8 (63,8)	7,3 (60,8)	16,6 (69,1)	4,8 (20,1)	5,1 (51,2)					

¹ La media de factores de virulencia se calculó haciendo un promedio de los genes positivos entre el número de cepas.

Las cepas del serogrupo O4 vehiculan un gran arsenal de FV, siendo predominantes muchos de los genes estudiados (**Tabla 12**). Este arsenal juega un papel muy importante en la patogénesis de estas cepas. Además, el 83,3% de las cepas cumplen los criterios para ser designadas como ExPEC y el 91,7% UPEC. En los resultados obtenidos en el estudio de Rosalia Mamani (2015) con 64 cepas O4 de *E. coli* bacteriémicos durante el periodo 1989-2011 se observó una mayor predominancia de los genes de virulencia estudiados en este trabajo habiéndose categorizado prácticamente al 100% de las cepas como ExPEC (Rosalia Mamani, 2015).

Entre las cepas del serogrupo O6 de nuestro trabajo, también fueron predominantes muchos de los genes estudiados. El número de cepas ExPEC fue el mismo para aquellas pertenecientes a los serogrupos O4 y O6, habiéndose detectado que el 83,3% de cepas que cumplían el criterio del estatus ExPEC y el 100% de las cepas se identificaron como UPEC. En el periodo de 1989-2011 casi el 100% de cepas cumplieron el criterio de ExPEC (Rosalia Mamani, 2015).

Para las cepas O18, también fueron predominantes muchos de los genes. De los serogrupos de este estudio, O18 fue el que obtuvo el porcentaje ExPEC más bajo (85,7%), siendo similar al obtenido en el estudio de Mamani (2015) del periodo 1989-2011 (88%).

Todas las cepas O75 de nuestro estudio cumplieron los criterios ExPEC y UPEC. Similares resultados se obtuvieron en el periodo 1989-2011, en donde el 95% resultaron ser ExPEC (Rosalia Mamani, 2015).

La consistencia de estos datos a lo largo de los diferentes periodos parece indicar que la presencia de FV específicos en las cepas de estos serogrupos es lo que las hace adecuadas para causar infecciones extraintestinales. Por lo tanto, su éxito como patógenos parece que radica especialmente en su elevado número de genes de virulencia.

4.3. Detección del clon ST1193

Del total de cepas estudiadas, únicamente 2 (3,8%) pertenecientes al serogrupo O75 resultaron ser del clon ST1193 (**Tabla 13**).

Tabla 13. Distribución del clon ST1193 entre 53 cepas de *E. coli* bacteriemias estudiadas.

Serogrupo	Numero (%) de cepas	
	Total n=53	ST1193 n=2
O4	12 (22,6)	0
O6	24 (45,3)	0
O18	7 (13,2)	1 (50)
O75	10 (18,9)	1 (50)

En el estudio de Johnson *et al* en 2019, se reporta una creciente prevalencia del clon ST1193, además de sugerir que este clon podría ser un sustituto de ST131. El clon ST131 mostró, en cepas aisladas durante 2010-2018 en Minnesota (EE. UU.), una disminución general estadísticamente significativa tanto para el subconjunto FQ-R como para su principal variante (ST131-H30R). Por el contrario, ST1193 aumentó rápidamente su prevalencia hasta alcanzar su punto máximo en 2016. A partir de ahí, se habla de un estado estable de la prevalencia de ST1193. Este patrón de distribución sugiere una posible fluctuación en la aparición de ST1193, lo que podría estar relacionado con cambios en el uso de antibióticos (Johnson *et al.*, 2019).

Además, en dicho estudio, realizaron un ensayo de PCR para ST1193-H64 donde los resultados fueron 10 cepas positivas para ST1193 entre una colección de 160 cepas de *E. coli* aisladas (6,3%). Por otro lado, en nuestro estudio, se realizó el mismo método de detección de cepas ST1193 y entre los resultados hallamos la presencia de 2 cepas de ST1193 entre nuestra colección de 53 cepas estudiadas (3,8%). Este dato, pese a no parecer muy significativo coinciden con los hallados en el estudio de Johnson y colaboradores (2019), ya que evidencia la presencia de dicho clon en la actualidad (Johnson *et al.*, 2019).

Como hemos comentado ya, en nuestro estudio, el 100% de las cepas ST1193 pertenecen al serogrupo O75 (**Tabla 13**). La prevalencia del serogrupo O75 es particularmente notable entre las cepas ST1193 en el estudio de Johnson *et al.* (2019). Este serogrupo ha sido asociado frecuentemente con cepas de alta virulencia y resistentes a múltiples fármacos, lo que puede explicar su prevalencia en nuestro estudio. Por tanto, ambos estudios refuerzan la importancia de dicho serogrupo en la epidemiología de *E. coli* ST1193 (Johnson *et al.*, 2019).

Las 2 cepas de *E. coli* pertenecientes al grupo clonal ST1193 se analizaron para estudiar su perfil de resistencia frente a los distintos agentes antimicrobianos estudiados mediante un antibiograma (**Tabla 14**). Ambas mostraron resistencia a las

quinolonas, lo cual es característico de los clones FQ-R emergentes como el estudiado. De hecho, se observa una asociación positiva entre la resistencia a estos antimicrobianos y las cepas ST1193 ($P=0,033$ y $P=0,020$). En el estudio Johnson *et al.* (2019), también se documentó una resistencia notable a las quinolonas en cepas ST1193. Esta resistencia resalta la preocupación clínica a cerca de la aparición de este clon en tratamientos contra infecciones extraintestinales (Johnson *et al.*, 2019).

Además, se observó una asociación significativa ($P=0,026$) entre las cepas ST1193 y la MDR (Tabla 15).

Tabla 14. Resistencia antimicrobiana de cepas bacteriémicas de *E. coli* del clon emergente ST1193. Estudio 2020 y 2022 (HULA, Lugo).

Familia	Agentes antimicrobianos ^a		Número (%) de cepas resistentes		p-valor ST1193 vs No- ST1193
			ST1193 n=2	No-ST1193 n=51	
Betalactámicos (Penicilinas, Cefamicinas, Cefalosporinas, Carbapenems)	Ampicilina	(AMP)	2 (100)	31 (58,5)	
	Piperacilina	(PIP)	0	31 (58,5)	
	Cefoxitina	(FOX)	0	0	
	Cefuroxima	(CXM)	0	1 (2,0)	
	Cefotaxima	(CTX)	0	0	
	Ceftazidima	(CAZ)	0	0	
	Cefepima	(FEP)	0	1 (2,0)	
Betalactámicos con inhibidores de β-lactamasas	Amoxicilina-Ácido clavulánico	(AMC)	0	8 (15,7)	
	Piperacilina-Tazobactam	(TZP)	0	4 (7,8)	
Macrólidos	Aztreonam	(AZM)	0	2 (3,9)	
Aminoglucósidos	Gentamicina	(GEN)	1 (50)	2 (3,9)	
	Tobramicina	(TOB)	1 (50)	3 (5,9)	
Quinolonas	Ácido nalidíxico	(NAL)	2 (100)	8 (15,7)	0,033
	Ciprofloxacino	(CIP)	2 (100)	6 (11,8)	0,020
	Levofloxacina	(LVX)	2 (100)	6 (11,8)	0,020
Inhibidores de la vía del folato	Trimetoprim-Sulfametoxazol	(SXT)	0	8 (11,8)	

^aNinguna de las 53 cepas analizadas fue resistente a los siguientes antimicrobianos: Imipenem, meropenem, ertapenem, amikacina y tigeciclina.

^bCuando los porcentajes son mayores del 20% figuran en negrilla.

Tabla 15. Prevalencia del clon emergente ST1193 entre las 53 de *E. coli* bacteriémicos y distribución de cepas con resistencia múltiple.

Secuencia tipo	Número (%) de cepas			p-valor MDR vs No-MDR
	Total n=53	MDR n=9	No-MDR n=44	
ST1193	2 (3,8)	2 (22,2)	0	0,026
No-ST1193	51 (9,6)	7 (77,8)	44 (100)	

Las 2 cepas de *E. coli* pertenecientes al grupo clonal ST1193 fueron analizadas por PCR para detectar la presencia de genes de virulencia de cepas ExPEC (**Tabla 16**). Las 2 cepas cumplen el criterio de estatus ExPEC y UPEC.

Observamos que los genes *vat*, *fyuA*, *iutA*, *kpsM II* y *ompT* estaban presentes en las 2 cepas identificadas como ST1193. Esto coincide con los resultados de Platell *et al.* (2012), que destacaron la presencia de estos genes como parte del perfil de virulencia típico de ST1193.

Tabla 16. Genes codificantes de factores de virulencia estudiados en las cepas bacteriémicas de *E. coli* del clon emergente ST1193.

Genes FV	Número (%) de cepas		
	Total n=53	ST-1193 n=2	No-ST1193 ¹ n=51
Adherencia y colonización			
<i>PapC</i>	35 (66)	0	34 (66,7)
<i>PapEF</i>	35 (66)	0	34 (66,7)
<i>sfa/focDE</i>	39 (73,6)	0	38 (74,5)
<i>afa/draBC</i>	1 (1,9)	0	1 (2,0)
<i>YfcV</i>	52 (98,1)	2 (100)	50 (98)
Toxicidad			
<i>hlyA</i>	37 (69,8)		36 (70,6)
<i>hlyF</i>	3 (5,7)	0	3 (5,9)
<i>tsh</i>	1 (1,9)	0	0
<i>vat</i>	51 (96,2)	2 (100)	49 (96,1)
Captación y transporte de hierro			
<i>iucD</i>	30 (56,6)	2 (100)	28 (55)
<i>iutA</i>	30 (56,6)	2 (100)	28 (55)

Continuación de la **Tabla 16**.

Genes FV	Número (%) de cepas		
	Total n=53	ST-1193 n=2	No-ST1193 ¹ n=51
Captación y transporte de hierro			
<i>iroN</i>	40 (75,5)	0	39 (76,5)
<i>fyuA</i>	52 (98,1)	2 (100)	50 (98)
<i>chuA</i>	52 (98,1)	2 (100)	50 (98)
Cápsula			
<i>kpsM II</i>	50 (94,3)	2 (100)	48 (94,1)
Evasión del sistema inmune de hospedador			
<i>OmpT</i>	52 (98,1)	2 (100)	50 (98)
<i>iss</i>	15 (28,3)	0	15 (29,4)
Estatus ExPEC	46 (86,8)	2 (100)	44 (86,7)
Estatus UPEC	52 (98,1)	2 (100)	50 (98)

¹ EL grupo no-ST1193 incluye todas las cepas negativas en el protocolo de detección de ST1193 realizado por PCR pertenecientes a los serogrupos O4, O6, O18 y O75.

Secuenciación del alelo *fimH* de las cepas del clon ST1193

Tras la secuenciación Sanger del *fimH*, se identificó la variante alélica *fimH64* para las dos cepas de *E. coli* ST1193 (**Figura 5**).

Figura 5. Gen *fimH64* y fragmento amplificado por los *primers* específicos de *fimH* para identificar el alelo específico *fimH64*.

```

TTCGCCTGTA AAAACCGCCAATGGTACCGCTATCCCTATTGGCGGTGGCAGCGCCAATGTTTA TGTAAACC
TTGCGCCCGTCGTGAATGTGGGGCAAACCTGGTCGTGGATCTTTCGACGCAAATCTTTTGCCATAACGA
TTATCCGGAAACCAATTACAGACTATGTCACACTGCAACGAGGCTCGGCTTATGGCGGCGTGTATCTAAT
TTTTCCGGGACCGTAAAATATAGTGGCAGTAGCTATCCATTTCCCTACCACCAGCGAAACGCCGCGCGTTG
TTTATAATTTCGAGAACGGATAAGCCGTGGC TGGTGGCGCTTTATTGACGCCTGTGAGCAGTGC GGGCGG
GGTGGCGATTAAAGCTGGCTCATTAATTGCCGTGCTTATTTGCGACAGACCAACA ACTATAACAGCGAT
GATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGCCTACTGGCGGCTGCGATGTT

```

Las zonas marcadas en rosa se corresponden con los *primers* forward y reverse específicos de *fimH* y la zona marcada en gris es el fragmento amplificado por ambos *primers*.

En el estudio de Johnson *et al.* (2019) todos los aislados ST1193 fueron identificados como ST1193-H64, de forma que presentan el alelo *fimH64* característico de este clon emergente.

Biotipado - Fermentación de lactosa en agar MacConkey

En este estudio analizamos que nuestras dos cepas positivas para el clon ST1193 fueran o no fermentadoras de lactosa en el medio de cultivo agar MacConkey lactosa

(Figura 6), un medio selectivo y diferencial de cepas Gram negativas como *E. coli*. Observamos como ambas cepas ST1193-H64 fueron incapaces de fermentar lactosa (amarillo) frente a otras cepas de nuestra colección que sí fueron capaces de fermentar este nutriente (rosa).

Figura 6. Siembra de las 2 cepas de *E. coli* ST1193-H64 en agar MacConkey.



Se indica el número de cepa y el código de trabajo de ambas cepas positivas para ST1193.

Este dato, concuerda con el estudio de Johnson y otros colaboradores en 2019, quienes asociaron este rasgo distintivo con las cepas ST1193-H64 (Johnson *et al.*, 2019).

5. Conclusiones

1. Se confirma que las cepas de los serogrupos O4, O6, O18 y O75 tienen una prevalencia significativa entre los *E.coli* bacteriémicos en nuestra área sanitaria entre los años 2020 y 2022, siendo las cepas pertenecientes al serogrupo O6 las más numerosas.
2. Con respecto al estudio previo realizado en el LREC-USC entre los años 1989 y 2011, no observamos diferencias significativas en cuanto a la prevalencia de estos cuatro serogrupos. Tampoco se observan en relación con los estudios realizados en otros países.
3. El nivel de resistencias a antimicrobianos detectado en el serogrupo O75 es especialmente significativo en el caso de las quinolonas. Sin embargo, el perfil de resistencia de las cepas de los serogrupos O4, O6 y O18 es relativamente bajo.
4. En contraste la gran mayoría de las cepas de estos cuatro serogrupos poseen un elevado número de genes de virulencia típicos del patotipo ExPEC, lo que indica que tienen un importante potencial de patogenicidad responsable sin duda de su éxito como patógenos.
5. El clon emergente ST1193 no parece tener una significativa prevalencia en nuestra área sanitaria, pese a estar presente en 2 de las 348 cepas de nuestra colección.

Con todo esto, podemos concluir que está totalmente justificada la inclusión de los serogrupos O4, O6, O18 y O75 en la cobertura de vacunas preventivas contra ExPEC dada su significativa prevalencia y el elevado número de genes de virulencia que poseen.

6. Anexos

Anexo I: Preparación del stock A y B de los *primers*

Preparación de los *primers* a concentración de almacenamiento (Stock A 200 μ M)

Trabajamos con un stock a 200 μ M para el almacenamiento de los *primers*. Para su preparación, se consideran los nmoles indicados por la casa comercial en el “Certificado de análisis” o en la etiqueta del tubo de cada primer recibido. Realizamos el siguiente cálculo para conocer el volumen de tampón de reconstitución 1mM Tris-HCl/0,01 mM EDTA (pH8) que se debe añadir para hidratar los *primers* a la concentración deseada:

$$200 \mu\text{M} = \frac{\text{nmoles}}{\text{mL}}$$
$$\mu\text{L de tampón a añadir} = \frac{\text{nmoles}}{200 \mu\text{M}} \times 1000$$

Se debe tener en cuenta que, previo a la hidratación, se centrifuga los *primers* recibidos a 2000 rpm durante 1 minuto. Una vez reconstituidos, se homogeneiza bien el preparado haciendo uso del vortex.

Preparación de los *primers* a concentración de trabajo (Stock B 20 μ M)

A partir de la solución Stock A (200 μ M), preparamos un volumen final de 300 μ L a concentración 20 μ M utilizando para diluir tampón de reconstitución. Esta será la solución Stock B de trabajo. Realizamos el siguiente cálculo para conocer el volumen de Stock A que se necesita:

$$20 \mu\text{M} \times 300 \mu\text{L} = 200 \mu\text{M} \times V_1$$
$$V_1 = 30 \mu\text{L del Stock A} + 270 \mu\text{L tampón}$$

Anexo II. Cepas de referencia para las PCRs

	Código de la cepa
Cepas de referencia para la PCR de detección de genes de virulencia ExPEC	FV17090 (CV15A)
	CV15D
	FV17132
	FV17133
	FV17134
	FV17159

Continuación de Anexo II.

	Código de la cepa
Cepas de referencia para la PCR para la identificación de grupos filogenéticos	V14067 FV14087 O157.807 O157.1103
Cepas de referencia para la PCR para la identificación del grupo filogenético C	FV19459 FV19460
Cepas de referencia para la PCR a punto para la detección de ST1193	C80 A22 Perteneientes al clon B2-CH14-64-ST-1193

7. Referencias bibliográficas

- Aldred, K. J., Kerns, R. J., & Osheroff, N. (2014). Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry*, 53(10), 1565–1574. <https://doi.org/10.1021/bi5000564>
- Álvarez-Hernández, D. A., Garza-Mayén, G. S., & Vázquez-López, R. (2015). Quinolonas. Perspectivas actuales y mecanismos de resistencia. *Revista chilena de infectología : órgano oficial de la Sociedad Chilena de Infectología*, 32(5), 499–504. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182015000600002>
- Baker, S., Thomson, N., Weill, F. X., & Holt, K. E. (2018). Genomic insights into the emergence and spread of antimicrobial-resistant bacterial pathogens. *Science (New York, N.Y.)*, 360(6390), 733–738. <https://doi.org/10.1126/science.aar3777>
- Baquero, F. (2021). Threats of antibiotic resistance: an obliged reappraisal. *International Microbiology*, 24(4), 499–506. <https://doi.org/10.1007/s10123-021-00184-y>
- Beachey, E. H. (1981). Bacterial Adherence: Adhesin-Receptor Interactions Mediating the Attachment of Bacteria to Mucosal Surfaces. *The Journal Of Infectious Diseases (Online. University Of Chicago Press)/The Journal Of Infectious Diseases*, 143(3), 325–345. <https://doi.org/10.1093/infdis/143.3.325>
- Blanco, J., Blanco, J. E., Alonso, M. P., and Blanco, M. (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.
- Busch, A., & Waksman, G. (2012). Chaperone–usher pathways: diversity and pilus assembly mechanism. *Philosophical Transactions - Royal Society. Biological Sciences*, 367(1592), 1112–1122. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0206>
- Cabello, F. C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental microbiology*, 8(7), 1137–1144. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x>
- Chaudhuri, R. R., & Henderson, I. R. (2012). The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. *Infection, Genetics And Evolution*, 12(2), 214–226. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.01.005>
- Clermont, O., Bonacorsi, S., & Bingen, E. (2000). Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Applied And Environmental Microbiology*, 66(10), 4555–4558. <https://doi.org/10.1128/aem.66.10.4555-4558.2000>
- Clermont, O., Christenson, J. K., Daubié, A. S., Gordon, D. M., & Denamur, E. (2014). Development of an allele-specific PCR for *Escherichia coli* B2 subtyping, a rapid and easy to perform substitute of multilocus sequence typing. *Journal of Microbiological Methods*, 101(1), 24–27. <https://doi.org/10.1016/j.jmimet.2014.03.008>
- Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., & Gordon, D. M. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1), 58–65. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12019>
- Clermont, O., Dixit, O. V. A., Vangchhia, B., Condamine, B., Dion, S., Bridier-Nahmias, A., Denamur, E., & Gordon, D. (2019). Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. *Environmental microbiology*, 21(8), 3107–3117. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14713>
- Clermont, O., Lavollay, M., Vimont, S., Deschamps, C., Forestier, C., Branger, C., Denamur, E., & Arlet, G. (2008). The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup. *The Journal Of Antimicrobial Chemotherapy/Journal Of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(5), 1024–1028. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn084>
- Cummins, E. A., Snaith, A. E., McNally, A., & Hall, R. J. (2021). The role of potentiating mutations in the evolution of pandemic *Escherichia coli* clones. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/S10096-021-04359-3>

- Dale, A. P., & Woodford, N. (2015). Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): Disease, carriage and clones. *Journal Of Infection/The Journal Of Infection*, 71(6), 615-626. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.09.009>
- Darfeuille-Michaud, A., Boudeau, J., Bulois, P., Neut, C., Glasser, A. L., Barnich, N., Bringer, M. A., Swidsinski, A., Beaugerie, L., & Colombel, J. F. (2004). High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology*, 127(2), 412-421. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.04.061>
- Daza, R. M. (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos. Su importancia en la toma de decisiones en la práctica clínica. *Inf. Ter. Nac. Salud*. 22(3), 57-67.
- Denamur, E., Clermont, O., Bonacorsi, S., & Gordon, D. (2020). The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews. Microbiology*, 19(1), 37-54. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0416-x>
- Devine, D. A., Robinson, L., & Roberts, A. P. (1989). Occurrence of K1, K5 and O antigens in *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections or bacteraemia. *Journal Of Medical Microbiology/Journal Of Medical Microbiology*, 30(4), 295-299. <https://doi.org/10.1099/00222615-30-4-295>
- Dobrindt U. (2005). (Patho-)Genomics of *Escherichia coli*. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 295(6-7), 357-371. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2005.07.009>
- Dozois, C. M., Dho-Moulin, M., Brée, A., Fairbrother, J. M., Desautels, C., & Curtiss, R. (2000). Relationship between the Tsh Autotransporter and Pathogenicity of Avian *Escherichia coli* and Localization and Analysis of the tsh Genetic Region. *Infection and Immunity*, 68(7), 4145-4154. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.7.4145-4154.2000>
- Duprilot, M., Baron, A., Blanquart, F., Dion, S., Lettéron, P., Flament-Simon, S., Clermont, O., Denamur, E., & Nicolas-Chanoine, M. (2019). Success of *Escherichia coli* O25b:H4 ST131 clade C associated with a decrease in virulence. bioRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory). <https://doi.org/10.1101/786350>
- Durand, G. A., Raoult, D., & Dubourg, G. (2019). Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. *International Journal Of Antimicrobial Agents*, 53(4), 371-382. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.11.010>
- Escherich T. (1885). Die darmbakterien des neugeborenen und säuglings. *Fortschritte der Medizin* 3: 515-522.
- Escobar-Páramo, P., Clermont, O., Blanc-Potard, A. B., Bui, H., Le Bouguéneq, C., & Denamur, E. (2004a). A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Molecular biology and evolution*, 21(6), 1085-1094. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh118>
- Escobar-Páramo, P., Grenet, K., Le Menac'h, A., Rode, L., Salgado, E., Amorin, C., Gouriou, S., Picard, B., Rahimy, M. C., Andremont, A., Denamur, E., & Ruimy, R. (2004b). Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates. *Applied and environmental microbiology*, 70(9), 5698-5700. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.9.5698-5700.2004>
- Foxman B. (2003). Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Disease-a-month: DM*, 49(2), 53-70. <https://doi.org/10.1067/mda.2003.7>
- Gransden, W. R., Eykyn, S. J., Phillips, I., & Rowe, B. (1990). Bacteremia Due to *Escherichia coli*: A Study of 861 Episodes. *Reviews of Infectious Diseases*, 12(6), 1008-1018. <https://doi.org/10.1093/CLINIDS/12.6.1008>
- Grozdanov, L., Raasch, C., Schulze, J., Sonnenborn, U., Gottschalk, G., Hacker, J., & Dobrindt, U. (2004). Analysis of the Genome Structure of the Nonpathogenic Probiotic *Escherichia coli* Strain Nissle 1917. *Journal Of Bacteriology*, 186(16), 5432-5441. <https://doi.org/10.1128/jb.186.16.5432-5441.2004>
- Herzer, P. J., Inouye, S., Inouye, M., & Whittam, T. S. (1990). Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 172(11), 6175-6181. <https://doi.org/10.1128/jb.172.11.6175-6181.1990>
- Holden, N. J., & Gally, D. L. (2004). Switches, cross-talk and memory in *Escherichia coli* adherence. *Journal Of Medical Microbiology/Journal Of Medical*

- Microbiology*, 53(7), 585-593.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.05491-0>
- Jaureguy, F., Landraud, L., Passet, V., Diancourt, L., Frapy, E., Guigon, G., Carbonnelle, E., Lortholary, O., Clermont, O., Denamur, E., Picard, B., Nassif, X., & Brisse, S. (2008). Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics*, 9(1).
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-560>
- Johnson J. R. (1991). Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clinical microbiology reviews*, 4(1), 80-128.
<https://doi.org/10.1128/CMR.4.1.80>
- Johnson, J R, Stapleton, A. E., Russo, T. A., Scheutz, F., Brown, J. J., & Maslow, J. N. (1997). Characteristics and prevalence within serogroup O4 of a J96-like clonal group of uropathogenic *Escherichia coli* O4:H5 containing the class I and class III alleles of papG. *Infection and Immunity*, 65(6), 2153-2159.
<https://doi.org/10.1128/IAI.65.6.2153-2159.1997>
- Johnson, J. R., Johnston, B. D., Porter, S. B., Clabots, C., Bender, T. L., Thuras, P., Trott, D. J., Cobbold, R., Mollinger, J., Ferrieri, P., Drawz, S., & Banerjee, R. (2019). Rapid Emergence, Subsidence, and Molecular Detection of *Escherichia coli* Sequence Type 1193- fimH64 , a New Disseminated Multidrug-Resistant Commensal and Extraintestinal Pathogen. *Journal of Clinical Microbiology*, 57(5).
<https://doi.org/10.1128/JCM.01664-18>
- Johnson, J. R., Moseley, S. L., Roberts, P. L., & Stamm, W. E. (1988). Aerobactin and other virulence factor genes among strains of *Escherichia coli* causing urosepsis: association with patient characteristics. *Infection And Immunity*, 56(2), 405-412. <https://doi.org/10.1128/iai.56.2.405-412.1988>
- Johnson, James R., & Stell, A. L. (2000a). Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(1), 261-272.
<https://doi.org/10.1086/315217>
- Johnson, James R., Porter, S., Johnston, B., Kuskowski, M. A., Spurbeck, R. R., Mobley, H. L. T., & Williamson, D. A. (2015). Host Characteristics and Bacterial Traits Predict Experimental Virulence for *Escherichia coli* Bloodstream Isolates From Patients With Urosepsis. *Open Forum Infectious Diseases*, 2(3).
<https://doi.org/10.1093/ofid/ofv083>
- Johnson, James R., Russo, T. A., Tarr, P. I., Carlino, U., Bilge, S. S., Vary, J. C., & Stell, A. L. (2000b). Molecular Epidemiological and Phylogenetic Associations of Two Novel Putative Virulence Genes, *iha* and *iron* *E. coli*, among *Escherichia coli* Isolates from Patients with Urosepsis. *Infection and Immunity*, 68(5), 3040-3047.
<https://doi.org/10.1128/IAI.68.5.3040-3047.2000>
- Johnson, T. J., Wannemuehler, Y. M., & Nolan, L. K. (2008a). Evolution of the *iss* Gene in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), 2360-2369.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02634-07>
- Johnson, T. J., Wannemuehler, Y., Doetkott, C., Johnson, S. J., Rosenberger, S. C., & Nolan, L. K. (2008b). Identification of Minimal Predictors of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Virulence for Use as a Rapid Diagnostic Tool. *Journal Of Clinical Microbiology*, 46(12), 3987-3996.
<https://doi.org/10.1128/jcm.00816-08>
- Kallonen, T., Brodrick, H. J., Harris, S. R., Corander, J., Brown, N. M., Martin, V., Peacock, S. J., & Parkhill, J. (2017). Systematic longitudinal survey of invasive *Escherichia coli* in England demonstrates a stable population structure only transiently disturbed by the emergence of ST131. *Genome Research*, 27(8), 1437-1449.
<https://doi.org/10.1101/gr.216606.116>
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews. Microbiology*, 2(2), 123-140.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- KAUFFMANN F. (1947). The serology of the coli group. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 57(1), 71-100.
- Kline, K. A., Fälker, S., Dahlberg, S., Normark, S., & Henriques-Normark, B. (2009). Bacterial Adhesins in Host-Microbe Interactions. *Cell Host & Microbe*, 5(6), 580-592.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.05.011>
- Kostakioti, M., & Stathopoulos, C. (2004). Functional Analysis of the Tsh Autotransporter from an Avian Pathogenic *Escherichia coli* Strain. *Infection And Immunity*, 72(10), 5548-5554.
<https://doi.org/10.1128/iai.72.10.5548-5554.2004>

- Kruis, W., Fric, P., Pokrotnieks, J., Lukás, M., Fixa, B., Kascák, M., Kamm, M. A., Weismueller, J., Beglinger, C., Stolte, M., Wolff, C., & Schulze, J. (2004). Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut*, 53(11), 1617–1623. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.037747>
- Laxminarayan, R., Mouton, R. P., Archer, G. F., & Davies, S. (2016). Access to effective antimicrobials: a worldwide challenge. *Lancet (London, England)*, 387(10014), 168–175. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00474-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00474-2)
- Le Bouguenec, C., Archambaud, M., & Labigne, A. (1992). Rapid and specific detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(5), 1189–1193. <https://doi.org/10.1128/JCM.30.5.1189-1193.1992>
- Le Gall, T., Clermont, O., Gouriou, S., Picard, B., Nassif, X., Denamur, E., & Tenaillon, O. (2007). Extraintestinal virulence is a coincidental by-product of commensalism in B2 phylogenetic group *Escherichia coli* strains. *Molecular biology and evolution*, 24(11), 2373–2384. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm172>
- Lewis, K. (2007). Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature Reviews. Microbiology*, 5(1), 48–56. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1557>
- Lewis, K. (2008). "Multidrug Tolerance of Biofilms and Persister Cells," *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 322(1), 107-131. https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3_6
- Lipworth, S., Vihta, K., Chau, K. K., Kavanagh, J., Davies, T., George, S., Barker, L., Vaughan, A., Andersson, M., Jeffery, K., Oakley, S., Morgan, M., Peto, T. E. A., Crook, D. W., Walker, A. S., & Stoesser, N. (2021). Ten Years of Population-Level Genomic *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Serotype Surveillance Informs Vaccine Development for Invasive Infections. *Clinical Infectious Diseases/Clinical Infectious Diseases (Online. University Of Chicago. Press)*, 73(12), 2276-2282. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab006>
- Lüthje, P., & Brauner, A. (2014). Virulence factors of uropathogenic *E. coli* and their interaction with the host. *Advances in microbial physiology*, 65, 337–372. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2014.08.006>
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Maiden, M. C. J., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D. A., Feavers, I. M., Achtman, M., & Spratt, B. G. (1998). Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 95(6), 3140-3145. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.3140>
- Maiden, M. C. J., Van Rensburg, M. J. J., Bray, J. E., Earle, S. G., Ford, S. A., Jolley, K. A., & McCarthy, N. D. (2013). MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nature Reviews. Microbiology*, 11(10), 728-736. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3093>
- Mamani Huarani, Rosalia S. (2015). 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.
- Martinez J. L. (2014). General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug discovery today. Technologies*, 11, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2014.02.001>
- Mathers, A. J., Peirano, G., & Pitout, J. D. D. (2015). The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 565–591. <https://doi.org/10.1128/CMR.00116-14>
- Matsumoto, T., Mikamo, H., Ohge, H., Yanagihara, K., Weerdenburg, E., Go, O., Spiessens, B., Van Geet, G., Van Den Hoven, T., Momose, A.,

- Hagiwara, Y., Nakayama, Y., Poolman, J., Geurtsen, J., & Kaku, M. (2022). Distribution of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O-serotypes and antibiotic resistance in blood isolates collected from patients in a surveillance study in Japan. *Journal Of Infection And Chemotherapy*, 28(11), 1445-1451. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2022.07.001>
- Meek, R. W., Vyas, H., & Piddock, L. J. V. (2015). Nonmedical Uses of Antibiotics: Time to Restrict Their Use? *PLoS Biology*, 13(10), e1002266. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002266>
- Morales, C., Lee, M. D., Hofacre, C., & Maurer, J. J. (2004). Detection of a Novel Virulence Gene and a Salmonella Virulence Homologue Among *Escherichia coli* Isolated from Broiler Chickens. *Foodborne Pathogens and Disease*, 1(3), 160–165. <https://doi.org/10.1089/fpd.2004.1.160>
- Moulin-Schouleur, M., Schouler, C., Taillez, P., Kao, M.-R., Bree, A., Germon, P., Oswald, E., Mainil, J., Blanco, M., & Blanco, J. (2006). Common Virulence Factors and Genetic Relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* Isolates of Human and Avian Origin. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(10), 3484–3492. <https://doi.org/10.1128/JCM.00548-06>
- Mulvey M. A. (2002). Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular microbiology*, 4(5), 257–271. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2002.00193.x>
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology spectrum*, 4(2), 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
- Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, 11(1), 142-201. <https://doi.org/10.1128/cmr.11.1.142>
- Nielubowicz, G. R., & Mobley, H. L. (2010). Host-pathogen interactions in urinary tract infection. *Nature reviews. Urology*, 7(8), 430–441. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2010.101>
- Nowrouzian, F., Adlerberth, I., & Wold, A. E. (2001). P fimbriae, capsule and aerobactin characterize colonic resident *Escherichia coli*. *Epidemiology And Infection*, 126(1), 11-18. <https://doi.org/10.1017/s0950268801005118>
- Nowrouzian, F., Hesselmar, B., Saalman, R., Strannegard, I. L., Aberg, N., Wold, A. E., & Adlerberth, I. (2003). *Escherichia coli* in infants' intestinal microflora: colonization rate, strain turnover, and virulence gene carriage. *Pediatric research*, 54(1), 8–14. <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000069843.20655.EE>
- Pal, C., Asiani, K., Arya, S., Rensing, C., Stekel, D. J., Larsson, D. G. J., & Hobman, J. L. (2017). Metal Resistance and Its Association With Antibiotic Resistance. *Advances in microbial physiology*, 70, 261–313. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2017.02.001>
- Peddie BA, Little PJ. (1978). Serogroups of *Escherichia coli* in symptomatic and asymptomatic urinary tract infections in Christchurch. *Zentralbl. Bakteriol. Orig. A* 240(3), 320 –325.
- Peirano, G., Chen, L., Nobrega, D., Finn, T. J., Kreiswirth, B. N., DeVinney, R., & Pitout, J. D. D. (2022). Genomic Epidemiology of Global Carbapenemase-Producing *Escherichia coli*, 2015–2017. *Emerging Infectious Diseases*, 28(5), 924–931. <https://doi.org/10.3201/EID2805.212535>
- Phan, M. D., Peters, K. M., Sarkar, S., Lukowski, S. W., Allsopp, L. P., Gomes Moriel, D., Achard, M. E., Totsika, M., Marshall, V. M., Upton, M., Beatson, S. A., & Schembri, M. A. (2013). The serum resistome of a globally disseminated multidrug resistant uropathogenic *Escherichia coli* clone. *PLoS genetics*, 9(10), e1003834. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003834>
- Pitout, J. D. D., Peirano, G., Chen, L., DeVinney, R., & Matsumura, Y. (2022). *Escherichia coli* ST1193: Following in the Footsteps of *E. coli* ST131. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 66(7), e0051122. <https://doi.org/10.1128/aac.00511-22>
- Platell, J. L., Trott, D. J., Johnson, J. R., Heisig, P., Heisig, A., Clabots, C. R., Johnston, B., & Cobbold, R. N. (2012). Prominence of an O75 clonal group (clonal complex 14) among non-st131 fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* causing extraintestinal infections in humans and dogs in Australia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(7), 3898–3904. <https://doi.org/10.1128/AAC.06120-11>
- Qrskov, F. and Orskov, I. (1984). Serotyping of *Escherichia coli*. *Methods in Microbiology*, 14, 43-112.

- Reid, S. D., Herbelin, C. J., Bumbaugh, A. C., Selander, R. K., & Whittam, T. S. (2000). Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. *Nature*, *406*(6791), 64–67. <https://doi.org/10.1038/35017546>
- Robinson, A. E., Heffernan, J. R., & Henderson, J. P. (2018). The iron hand of uropathogenic *Escherichia coli*: the role of transition metal control in virulence. *Future microbiology*, *13*(7), 745–756. <https://doi.org/10.2217/fmb-2017-0295>
- Rogers, B. A., Sidjabat, H. E., & Paterson, D. L. (2011). *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *66*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKQ415>
- Royer, G., Clermont, O., Condamine, B., Mercier-Darty, M., Laouénan, C., Lefort, A., Denamur, E., De Lastours, V., Colibafi, & Groups, S. (2021). O-Antigen Targeted Vaccines Against *Escherichia coli* May Be Useful in Reducing Morbidity, Mortality, and Antimicrobial Resistance. *Clinical Infectious Diseases/Clinical Infectious Diseases (Online. University Of Chicago. Press)*, *74*(2), 364–366. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab458>
- Russo, T. A., & Johnson, J. R. (2000). Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *The Journal of infectious diseases*, *181*(5), 1753–1754. <https://doi.org/10.1086/315418>
- Schulze J., Schiemann M., and Sonnenborn, U. (2006). “120 years of *E. coli*. Its importance in research and medicine.” Hagen, Germany: Alfred-Nissle-Gesellschaft.
- Selander, R. K., Musser, J. M., Caugant, D. A., Gilmour, M. N., & Whittam, T. S. (1987). Population genetics of pathogenic bacteria. *Microbial pathogenesis*, *3*(1), 1–7. [https://doi.org/10.1016/0882-4010\(87\)90032-5](https://doi.org/10.1016/0882-4010(87)90032-5)
- Servin A. L. (2005). Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, *18*(2), 264–292. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.2.264-292.2005>
- Servin A. L. (2014). Pathogenesis of human diffusely adhering *Escherichia coli* expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): current insights and future challenges. *Clinical microbiology reviews*, *27*(4), 823–869. <https://doi.org/10.1128/CMR.00036-14>
- Spurbeck, R. R., Dinh, P. C., Walk, S. T., Stapleton, A. E., Hooton, T. M., Nolan, L. K., Kim, K. S., Johnson, J. R., & Mobley, H. L. T. T. (2012). *Escherichia coli* Isolates That Carry *vat*, *fyuA*, *chuA* and *yfcV* Efficiently Colonize the Urinary Tract. *Infection and Immunity*, *80*(12), 4115–4122. <https://doi.org/10.1128/IAI.00752-12>
- Tchesnokova, V. L., Rechkina, E., Larson, L., Ferrier, K., Weaver, J. L., Schroeder, D. W., She, R., Butler-Wu, S. M., Aguero-Rosenfeld, M. E., Zerr, D., Fang, F. C., Ralston, J., Riddell, K., Scholes, D., Weissman, S., Parker, K., Spellberg, B., Johnson, J. R., & Sokurenko, E. V. (2019). Rapid and Extensive Expansion in the United States of a New Multidrug-resistant *Escherichia coli* Clonal Group, Sequence Type 1193. *Clinical Infectious Diseases*, *68*(2), 334–337. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy525>
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., & Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature reviews. Microbiology*, *8*(3), 207–217. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2298>
- Thankavel, K., Madison, B., Ikeda, T., Malaviya, R., Shah, A. H., Arumugam, P. M., & Abraham, S. N. (1997). Localization of a domain in the FimH adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae capable of receptor recognition and use of a domain-specific antibody to confer protection against experimental urinary tract infection. *The Journal of clinical investigation*, *100*(5), 1123–1136. <https://doi.org/10.1172/JCI119623>
- Touchon, M., Hoede, C., Tenaillon, O., Barbe, V., Baeriswyl, S., Bidet, P., Bingen, E., Bonacorsi, S., Bouchier, C., Bouvet, O., Calteau, A., Chiappello, H., Clermont, O., Cruveiller, S., Danchin, A., Diard, M., Dossat, C., Karoui, M. E., Frapy, E., Garry, L., ... Denamur, E. (2009). Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS genetics*, *5*(1), e1000344. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000344>
- Touret, J., & Denamur, E. (2016). Population Phylogenomics of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology spectrum*, *4*(1), 10.1128/microbiolspec.UTI-0010-2012. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.UTI-0010-2012>
- Van Boeckel, T. P., Gandra, S., Ashok, A., Caudron, Q., Grenfell, B. T., Levin, S. A., & Laxminarayan, R. (2014). Global antibiotic consumption 2000 to

- 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *The Lancet. Infectious diseases*, 14(8), 742–750. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70780-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70780-7)
- Ventola C. L. (2015).** The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management*, 40(4), 277–283.
- Wang, L., Wakushima, M., Aota, T., Yoshida, Y., Kita, T., Maehara, T., Ogasawara, J., Choi, C., Kamata, Y., Hara-Kudo, Y., & Nishikawa, Y. (2013).** Specific properties of enteropathogenic *Escherichia coli* isolates from diarrheal patients and comparison to strains from foods and fecal specimens from cattle, swine, and healthy carriers in Osaka City, Japan. *Applied and environmental microbiology*, 79(4), 1232–1240. <https://doi.org/10.1128/AEM.03380-12>
- Weerdenburg, E., Davies, T., Morrow, B., Zomer, A. L., Hermans, P., Go, O., Spiessens, B., Van Den Hoven, T., Van Geet, G., Aitabi, M., DebRoy, C., Dudley, E. G., Bonten, M., Poolman, J., & Geurtsen, J. (2022).** Global Distribution of O Serotypes and Antibiotic Resistance in Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Collected From the Blood of Patients With Bacteremia Across Multiple Surveillance Studies. *Clinical Infectious Diseases/Clinical Infectious Diseases (Online. University Of Chicago. Press)*, 76(3), e1236-e1243. <https://doi.org/10.1093/cid/ciac421>
- Weissman, S. J., Johnson, J. R., Tchesnokova, V., Billig, M., Dykhuizen, D., Riddell, K., Rogers, P., Qin, X., Butler-Wu, S., Cookson, B. T., Fang, F. C., Scholes, D., Chattopadhyay, S., & Sokurenko, E. (2012).** High-Resolution Two-Locus Clonal Typing of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. *Applied And Environmental Microbiology*, 78(5), 1353-1360. <https://doi.org/10.1128/aem.06663-11>
- WHO. 2014.** Antimicrobial resistance: Global report on surveillance 2014.
- Wiles, T. J., Kulesus, R. R., & Mulvey, M. A. (2008).** Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Experimental and Molecular Pathology*, 85(1), 11–19. <https://doi.org/10.1016/J.YEXMP.2008.03.007>
- Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L. H., Karch, H., Reeves, P. R., Maiden, M. C. J., Ochman, H., & Achtman, M. (2006).** Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Molecular Microbiology*, 60(5), 1136–1151. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2006.05172.X>
- Yamamoto, S., Terai, A., Yuri, K., Kurazono, H., Takeda, Y., & Yoshida, O. (1995).** Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 12(2), 85–90. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1995.tb00179.x>