



FACULTADE DE CIENCIAS

GRAO EN BIOQUÍMICA

D./ D.^a Paula Martínez López

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE
ESCHERICHIA COLI BACTERIÉMICOS
PERTENECIENTES A LOS SEROGRUPOS O1 Y O2.**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE
ESCHERICHIA COLI BACTERIÉMICOS
PERTENECIENTES AOS SEROGRUPOS O1 E O2.**

**MOLECULAR CHARACTERISATION OF
BACTERIAEMIC *ESCHERICHIA COLI*
BELONGING TO SEROGROUPS O1 AND O2.**

Traballo Fin de Grao

Xuño 2024

CONTENIDO

1.	ÍNDICE DE FIGURAS.....	4
2.	ÍNDICE DE TABLAS.....	4
3.	RESUMEN, RESUMO, ABSTRACT.....	5
3.1	RESUMEN.....	5
3.2	RESUMO.....	5
3.3	ABSTRACT.....	6
4.	ABREVIATURAS.....	7
5.	INTRODUCCIÓN.....	9
5.1	HISTORIA.....	9
5.2	CARACTERÍSTICAS Y DIVERSIDAD DE <i>E. COLI</i>	9
5.2.1	<i>E. COLI</i> PATÓGENO.....	9
5.3	TIPADO.....	10
5.3.1	SEROTIPADO.....	10
5.3.2	FILOTIPADO.....	11
5.3.3	SECUENCIA TIPO.....	12
5.3.3.1	ST95.....	12
5.4	GENOMA CENTRAL Y ACCESORIO.....	13
5.4.1	TEORÍAS.....	13
5.4.2	FACTORES DE VIRULENCIA Y SUPERVIVENCIA.....	14
5.4.2.1	ADHESINAS.....	14
5.4.2.2	TOXINAS.....	15
5.4.2.3	SIDERÓFOROS.....	15
5.4.2.4	CÁPSULA.....	16
5.4.2.5	ANTÍGENO O.....	16
6.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	18
7.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
7.1	CEPAS CONTROL Y CONSERVACIÓN DE CEPAS.....	19
7.2	OBNTENCIÓN DE LAS CEPAS CLÍNICAS DE <i>E. COLI</i>	19
7.3	ESTUDIO FENOTÍPICO.....	19
7.3.1	SEROTIPADO.....	19
7.3.1.1	PREPARACIÓN DE LAS SUSPENSIONES BACTERIANAS.....	20
7.3.1.2	DETERMINACIÓN DEL SEROGRUPO O.....	20
7.3.1.3	TITULACIÓN SEROGRUPO O.....	20

7.3.2 ANTIBIOGRAMA	20
7.4 ESTUDIO GENOTÍPICO.....	21
7.4.1 EXTRACCIÓN DE ADN	21
7.4.1.1 MEZCLA DE REACCIÓN	21
7.4.1.2 AMPLIFICACIÓN	21
7.4.1.3 REVELADO DE RESULTADOS	21
7.4.2 GRUPO FILOGENÉTICO.....	21
7.4.2.1 MEZCLA DE REACCIÓN	22
7.4.2.2 AMPLIFICACIÓN	22
7.4.2.3 CEBADORES.....	22
7.4.3 GENES EXPEC	23
7.4.3.1 CEBADORES.....	24
7.5 ESTUDIO CEPAS PERTENECIENTES A ST95	25
7.5.1 PREPARACIÓN DE LA MEZCLA DE REACCIÓN.....	25
7.5.2 AMPLIFICACIÓN	25
7.5.3 CEBADORES.....	26
7.6 SECUENCIACIÓN SANGER	26
7.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	27
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
8.1 DETERMINACIÓN DE LOS SEROGRUPOS DE LOS AISLADOS CLÍNICOS.....	28
8.1.3 PERFIL DE RESISTENCIA.....	29
8.1.1 PERFIL DE VIRULENCIA.....	30
8.1.3 GRUPOS FILOGENÉTICOS	32
8.2 GRUPO CLONAL ST95.....	32
9. CONCLUSIONES.....	39
10. BIBLIOGRAFÍA	40
11. ANEXO: CONTROLES POSITIVOS	55
MÚLTIPLEX GRUPO FILOGENÉTICO	55
PCR GRUPO FILOGENÉTICO E	55
PCR GRUPO FILOGENÉTICO C	55
PCRS GENES DE VIRULENCIA	55
PCR ST95	55

1. ÍNDICE DE FIGURAS

Ilustración 1. Esquema grupos filogenéticos <i>E. coli</i>	23
Ilustración 2. Distribución de los alelos <i>fimH</i> de 23 cepas ST95. Este árbol fue realizado en MEGA 11. Método estadístico UPGMA (método Bootstrap).	37

2. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Serogrupos O más frecuentes entre cepas de <i>E. coli</i> bacteriémicas aisladas de pacientes en el hospital Universitario Lucus Augusti (HULA). Comparación entre los períodos 2020-2022 (datos no publicados del LREC-USC) y 1989-2011 (período 1989-2011, Tesis doctoral Rosalia S. Mamani, USC, 2015).	17
Tabla 2. Cebadores utilizados en la Multiplex de grupos filogenéticos.....	22
Tabla 3. Cebadores utilizados en la clasificación del grupo filogenético E.....	23
Tabla 4. Cebadores utilizados en la clasificación del grupo filogenético C.....	23
Tabla 5. Cebadores utilizados en la detección de genes de virulencia de los aislados ExPEC.....	24
Tabla 6. Cebadores empleados para la identificación del ST95 y sus subgrupos.	26
Tabla 7. Cebadores utilizados en la secuenciación del del alelo <i>fimHtr</i>	26
Tabla 8. Distribución de los serogrupos por años (Lugo, 2020-2022).	28
Tabla 9. Resistencia de las cepas <i>E. coli</i> de los serogrupos O1 y O2 (Lugo, 2020-2022).	29
Tabla 10. Genes de virulencia de las cepas pertenecientes a los serogrupos O1 y O2 (Lugo, 2020-2022).	31
Tabla 11. Pertenencia a los grupos filogenéticos de las cepas de los serogrupos O1 y O2 (Lugo, 2020-2022). ...	32
Tabla 12. Distribución de las cepas ST95 por serogrupos (Lugo, 2020-2022).	32
Tabla 13. Resistencias de las cepas ST95 y de otras secuencias tipo (Lugo, 2020-2022).	34
Tabla 14. Genes virulencia y estatus de las cepas ST95 y de otras secuencias tipo (Lugo, 2020-2022).	35
Tabla 15. Análisis filogenético de las cepas pertenecientes a ST95 (Lugo, 2020-2022).	36
Tabla 16. Distribución de las cepas de ST95 en los distintos subgrupos	37

3. RESUMEN, RESUMO, ABSTRACT

3.1 RESUMEN

En los últimos años se ha observado un aumento de bacteriemias causadas por *E. coli* patógenos extraintestinales (ExPEC), *E. coli* uropatogénicos (UPEC) y *E. coli* patógenos aviarios (APEC). Entre los serogrupos más prevalentes a nivel global se encuentran los serogrupos O1 y O2. Nuestro objetivo es caracterizar las cepas pertenecientes a estos serogrupos, buscando entender las razones de su éxito. Determinar las características de estas cepas es vital para diseñar vacunas adaptadas a la epidemiología actual de nuestra área sanitaria.

Para el estudio y caracterización de las 53 cepas de *E. coli* causantes de bacteriemias en un hospital lucense (HULA) durante los años 2020 a 2022 utilizamos métodos fenotípicos (serotipado, determinación de CMIs) y moleculares. Determinamos serotipos, grupos filogenéticos y genes de virulencia para establecer los estatus ExPEC, UPEC y APEC.

La colección incluye 20 cepas O1, 33 O2, de las cuales solo 6 resultaron ser multirresistentes (MDR). La caracterización molecular muestra que el grupo filogenético más abundante es el B2 (42 cepas). Las cepas del presente estudio mostraron una amplia colección de factores de virulencia. En base a sus genes de virulencia, 46 cepas se calificaron como ExPEC, 48 UPEC y 31 APEC. Además, se detectaron 24 aislados pertenecientes a la secuencia tipo 95.

Los resultados confirman que un porcentaje significativo de cepas causantes de septicemias en la población lucense son positivas para ExPEC, UPEC y APEC. Asimismo, se reafirma la idea de que el éxito de los serogrupos O1 y O2 no se debe a su resistencia a los antibióticos si no al elevado número de factores de virulencia.

Palabras clave: *Escherichia coli*, *E.coli*, ExPEC, APEC, UPEC, ST95, factores de virulencia, serogrupo.

3.2 RESUMO

Nos últimos anos observouse un aumento de bacteriemias causadas por *E. coli* patóxenos extraintestinaes (ExPEC), *E. coli* uropatóxenos (UPEC) e *E. coli* patóxenos aviarios (APEC). Entre os serogrupos máis prevalentes a nivel global atópanse os serogrupos O1 e O2. O noso obxectivo é caracterizar as cepas pertencentes a estes serogrupos, buscando entender as razóns do seu éxito. Determinar as características destas cepas é vital para deseñar vacinas adaptadas á epidemioloxía actual da nosa área sanitaria.

Para o estudo e caracterización das 53 cepas de *E. coli* causantes de bacteriemias nun hospital lucense (HULA) durante os anos 2020 a 2022 utilizamos métodos fenotípicos (serotipado, determinación de CMIs) e moleculares. Determinamos serotipos, grupos filogenéticos e xenes de virulencia para establecer os status ExPEC, UPEC e APEC.

A colección inclúe 20 cepas O1, 33 O2, das cales só 6 resultaron ser multirresistentes (MDR). A caracterización molecular mostra que o grupo filogenético máis abundante é o B2 (42 cepas). As cepas do presente estudo mostraron unha ampla colección de factores de virulencia. En base aos seus xenes de virulencia, 46 cepas cualificáronse como ExPEC, 48 UPEC e 31 APEC. Ademais, detectáronse 24 illados pertencentes á secuencia tipo 95.

Os resultados confirman que unha porcentaxe significativa de cepas causantes de septicemias na poboación lucense son positivas para ExPEC, UPEC e APEC. Así mesmo, reafirmase a idea de que o éxito dos serogrupos O1 e O2 non se debe á súa resistencia aos antibióticos se non ao elevado número de factores de virulencia.

Palabras clave: *Escherichia coli*, *E.coli*, ExPEC, APEC, UPEC, ST95, factores de virulencia, serogrupo.

3.3 ABSTRACT

Recent years have seen an increase in bacteraemias caused by extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC), uropathogenic *E. coli* (UPEC) and avian pathogenic *E. coli* (APEC). Among the most prevalent serogroups globally are serogroups O1 and O2. Our objective is to characterise strains belonging to these serogroups, seeking to understand the reasons for their success. Determining the characteristics of these strains is vital to design vaccines adapted to the current epidemiology of our health area.

For the study and characterisation of the 53 *E. coli* strains causing bacteraemia in a hospital in Lugo (HULA) during the years 2020 to 2022, we used phenotypic (serotyping, determination of MICs) and molecular methods. We determine serotypes, phylogenetic groups and virulence genes to establish ExPEC, UPEC and APEC status.

The collection includes 20 O1, 33 O2 strains, of which only 6 were found to be multidrug resistant (MDR). Molecular characterisation shows that the most abundant phylogenetic group is B2 (42 strains). The strains in the present study showed a broad collection of virulence factors. Based on their virulence genes, 46 strains were qualified as ExPEC, 48 UPEC and 31 APEC. In addition, 24 isolates belonging to sequence type 95 were detected.

The results confirm that a significant percentage of strains causing septicaemia in the population of Lugo are positive for ExPEC, UPEC and APEC. Likewise, it reaffirms the idea that the success of serogroups O1 and O2 is not due to their resistance to antibiotics but to the high number of virulence factors .

Key words: : *Escherichia coli*, *E.coli*, ExPEC, APEC, UPEC, ST95, virulence factors, serogroup.

4. ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIEC	Del inglés “ <i>Adherent Invasive Escherichia coli</i> ”
APEC	Del inglés “ <i>Avian pathogenic Escherichia coli</i> ”
BLEE	β-lactamasas de espectro extendido
BSI	Del inglés “ <i>blood stream infection</i> ”
CC	Complejo clonal
CGE	Del inglés “ <i>Center for Genomic Epidemiology</i> ”
CIM	Concentración mínima inhibitoria
DAEC	Del inglés “ <i>Diffusely Adherent Escherichia coli</i> ”
EAEC	Del inglés “ <i>Enteraggregative Escherichia coli</i> ”
EHEC	Del inglés “ <i>Enterohemorrhagic Escherichia coli</i> ”
EIEC	Del inglés “ <i>Enteroinvasive Escherichia coli</i> ”
EPEC	Del inglés “ <i>Enteropathogenic Escherichia coli</i> ”
ETEC	Del inglés “ <i>Enterotoxigenic Escherichia coli</i> ”
EUCAST	Del inglés “ <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i> ”
ExPEC	Del inglés “ <i>Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli</i> ”
<i>fimH</i>	Gen que codifica la adhesina FimH
FV	Factor de virulencia
<i>hlyF</i>	gen hemolisina F
HULA	Hospital Universitario Lucus Augusti
InPEC	Del inglés “ <i>Intestinal Pathogenic Escherichia coli</i> ”
<i>Iss</i>	Del inglés “ <i>Increased serum survival gene</i> ”
ITU	Infección del tracto urinario
LPS	Lipopolisacárido
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> "
NMEC	Del inglés " <i>Neonatal meningitis Escherichia coli</i> "
Pb	Pares de bases
PCR	Del inglés " <i>Polymerase chain reaction</i> "
SEPEC o SEC	Del inglés " <i>Septicemic E. coli</i> o <i>Sepsis-causing E. coli</i> "
ST	Secuencia tipo
TFG	Trabajo fin de grado
TSA	Agar triptona soja
<i>tsh</i>	Del inglés " <i>Temperature-sensitive hemagglutinin gene</i> "
UPEC	Del inglés " <i>Uropathogenic Escherichia coli</i> "
WGS	Del inglés " <i>Whole-genome sequencing</i> "

5. INTRODUCCIÓN

5.1 HISTORIA

En 1884 tras su aislamiento e identificación como el agente causante de la diarrea infantil (Friedmann 2014) de neonatos lactantes, Theodor Escherich denominó a esta bacteria *Bacterium coli commune*. Originalmente era considerada *Bacillus*, no fue rebautizada hasta 1919 como *Escherichia coli* en honor a su descubridor. Ya en 1958 fue reconocida oficialmente, estableciendo así *Escherichia* como género y *E. coli* como primera especie (“Etymología: *Escherichia coli*,” 2015). Irónicamente, la secuenciación del genoma de la cepa original del laboratorio del Dr. Escherich reveló que la bacteria aislada se trataba de un miembro de la microbiota intestinal normal (Méric et al., 2016)

Desde su descubrimiento *E. coli* ha sido estudiada exhaustivamente desde el punto de vista molecular, serológico y bioquímico. A día de hoy es considerado uno de los sistemas modelos fundamentales en microbiología siendo la especie tipo mejor caracterizada y representativa del género *Escherichia* (Yu et al., 2021)

5.2. CARACTERÍSTICAS Y DIVERSIDAD DE *E. COLI*

Escherichia coli, es una bacteria anaerobia facultativa Gram negativa no esporulante que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*.

E. coli forma parte de la microbiota normal de mamíferos, aves y reptiles sanos (Gordon & Cowling, 2003). En el intestino, es necesaria, junto con otras bacterias, para el correcto funcionamiento del proceso digestivo. Participa en diferentes funciones fisiológicas beneficiosas para su hospedador, tales como la absorción de nutrientes, la síntesis de las vitaminas K y B, el procesamiento de los residuos alimenticios y la estimulación de la respuesta inmune en el hospedador. Además, ejerce una inhibición competitiva sobre el crecimiento de enteropatógenos (Kruis et al., 2004).

E. coli es la especie predominante de la microbiota aerobia y anaerobia facultativa del tubo digestivo de la mayoría de los animales de sangre caliente y está presente en más del 90% de todos los seres humanos (Tenaillon et al., 2010). Asimismo, se utilizan aislados particulares de *E. coli* como tratamiento probiótico para ciertos desequilibrios intestinales.

Además de su inofensiva y beneficiosa existencia como comensal intestinal, *E. coli* es responsable de un número importante de enfermedades que afectan a todos los grupos de edad en humanos y animales (Martinez-Medina et al., 2009). Entre las bacterias resistentes, *E. coli* es el patógeno bacteriano Gram negativo más común. Por ello, poder distinguir los diferentes tipos de cepas más allá de la especie es esencial y útil en múltiples circunstancias (Flament Simon, 2021).

5.2.1 *E. COLI* PATÓGENO

Los diversos linajes patógenos se clasifican en dos grandes categorías: *E. coli* patógenas intestinales (InPEC) y *E. coli* patógenas extraintestinales (ExPEC).

Las cepas InPEC son el agente causante de infecciones intestinales como la diarrea infantil y la diarrea del viajero, síndrome urémico hemolítico, colitis hemorrágica e incluso la enfermedad inflamatoria intestinal Crohn (Barnich & Darfeuille-Michaud, 2007; Gómez-Duarte, 2014; Scaletsky et al., 2002).

Por su parte, las cepas ExPEC son de los principales agentes etiológicos responsables de infecciones extraintestinales como septicemias, bacteriemias, meningitis neonatal, infecciones del tracto urinario y

colibacilosis también en aves. Existen cuatro patotipos extensamente estudiados: *E. coli* uropatógeno (UPEC), *E. coli* septicémico o bacteriémico (SEPEC o SEC), *E. coli* asociado con meningitis neonatal (NMEC) y *E. coli* patógeno aviar (APEC) (Bidet et al., 2007; Dale & Woodford, 2015; J. R. Johnson, Gajewski, et al., 2003; Smith et al., 2007).

Las infecciones urinarias son causadas por una amplia gama de patógenos, incluidas bacterias Gram negativas y Gram positivas, así como hongos. Según la epidemiología de las ITU (Flores-Mireles et al., 2015; Hannan et al., 2012a) la *E. coli* uropatógena (UPEC) es el principal agente etiológico de las ITU y representa aproximadamente el 75% de los casos de ITU no complicadas (Flores-Mireles et al., 2015).

Se estima que cada año en el mundo tienen lugar unos 130-175 millones de infecciones del tracto urinario (ITUs) en seres humanos y, un 80% de las mismas son causadas por cepas UPEC (Russo & Johnson, 2003). Desafortunadamente, las ITU pueden y a menudo resultan en patologías más complicadas que incluyen recurrencia frecuente y progresión a pielonefritis y bacteriemia (Kaper et al., 2004; Wiles et al., 2008). *E. coli* también es la causa más frecuente de sepsis y responsable del 30% de los casos de meningitis neonatal, una enfermedad con una tasa de mortalidad del 20 % al 60 % (Bundy et al., 2023; Ku et al., 2015). Además, las infecciones causadas por ExPEC han aumentado notablemente en las últimas dos décadas (Poolman & Anderson, 2018; Rhee et al., 2020).

5.3 TIPADO

Aparte de la clasificación en distintos patotipos, las cepas individuales de *E. coli* pueden clasificarse mediante diversas técnicas moleculares y no moleculares (Flament Simon, 2021). La aplicación de metodologías moleculares ha permitido un análisis más detallado de los linajes (Beghain et al., 2018; Clermont et al., 2011).

En un inicio, se clasificaba *E. coli* por el conjunto de características bioquímicas y fisiológicas, lo que se conoce como biotipo. El biotipado consiste en un conjunto de pruebas bioquímicas como la capacidad de fermentar o no ciertos carbohidratos. Desgraciadamente este método no permite diferenciar las cepas patógenas de las inocuas por su bajo nivel discriminatorio (Dahbi Zbiti, 2015).

5.3.1 SEROTIPADO

El serotipado fue el primer método de tipificación disponible para delinear las variantes dentro de *E. coli* (Orskov et al., 1977) ya que estos biomarcadores suelen asociarse con patotipos específicos (Kaper et al., 2004).

Los serotipos se determinan mediante la identificación de tres tipos de antígenos: somáticos (O), capsulares (K) y flagelares (H). La especificación de los antígenos O y H se llevan a cabo mediante técnicas de aglutinación mientras que, la determinación del antígeno K se realiza por contrainmuno-electroforesis, técnica considerablemente más complicada. Por su complejidad, la determinación del antígeno K no suele hacerse de forma rutinaria, convirtiéndose así en un *gold standar* la determinación de los serogrupos O y H (F. Orskov & Orskov, 2011a). Hasta la fecha se han descrito miles de combinaciones diferentes (O:H).

El antígeno O es un polisacárido termoestable que forma parte del lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa de la pared celular. La cadena lateral de este lipopolisacárido contiene un gran número de unidades repetitivas cuya combinación determina la diversidad del antígeno O. La biosíntesis del antígeno O está codificada por un clúster denominado clúster de genes del antígeno O (O-AGC) (Fratamico et al., 2016; Stenutz et al., 2006). Estos genes están bastante conservados entre las cepas *E. coli* y son muy específicos de cada antígeno.

El antígeno K es el polisacárido capsular que envuelve la pared celular y su presencia puede enmascarar y bloquear el reconocimiento del antígeno O impidiendo su aglutinación. Por lo que las muestras requieren ser tratadas para dejar al descubierto el antígeno O.

Ambos antígenos son considerados potentes factores de virulencia de los cuales hablaremos en mayor profundidad en dicho apartado.

Los flagelos son unos filamentos proteicos que confieren a *E. coli* la habilidad de moverse. La diversidad del antígeno H viene dada por los distintos tipos de flagelina que componen la estructura del flagelo. El antígeno H, en la gran mayoría de casos, está codificado por el gen *fliC* (Fratamico et al., 2016; Machado et al., 2000; L. Wang et al., 2003).

Actualmente, el serotipado puede realizarse mediante métodos fenotípicos convencionales, así como mediante métodos moleculares. Entre las técnicas genotípicas tenemos la determinación basada en PCR o *in silico* mediante WGS (Joensen et al., 2015).

La determinación fenotípica de los antígenos de *E. coli* presenta varios inconvenientes. Por una parte, existen cepas no tipables bien porque sus antígenos O/H no se expresan *in vitro* o porque se autoaglutinan durante el proceso. Por otro lado, este método requiere un gran número de antisueros específicos disponibles en un reducido grupo de laboratorios nacionales de referencia y cuya calidad puede variar, mostrando reactividad cruzada con diferentes serogrupos. Además, el serotipado tradicional es una técnica relativamente costosa y laboriosa. Por estas razones, es probable que el serotipado *in silico* sustituya al serotipado tradicional en un futuro (Fratamico et al., 2016)

No obstante, para el desarrollo de vacunas es necesario comprobar por técnicas fenotípicas que las cepas vacunales expresan bien los antígenos y comprobar también que inducen una buena respuesta inmune provocando la formación de anticuerpos capaces de reaccionar y aglutinar las bacterias, y neutralizar su acción patogénica (Moriel et al., 2016). En este sentido, la determinación fenotípica de antígenos de *E. coli* proporciona información relevante que no puede ser obtenida mediante métodos genotípicos.

El serotipado, junto con la determinación de los factores de virulencia, ha permitido identificar los principales seropatotipos responsables de las infecciones en seres humanos y animales (Dahbi Zbiti, 2015).

5.3.2 FILOTIPADO

Escherichia coli presenta una amplia subestructura filogenética. Gracias a los avances técnicos, a lo largo de los años se ha ido perfeccionando nuestra comprensión de este fenómeno. En la actualidad hay ocho filogrupos reconocidos de *E. coli*, con siete pertenecientes a *E. coli sensu stricto* (A, B1, B2, C, D, E, F) y uno correspondiente al clado I de *Escherichia* (Clermont et al., 2013a)

Los filogrupos B2, F y D, que divergieron más antiguamente, abarcan la mayoría de las cepas patógenas extraintestinales, mientras que las cepas responsables de patologías intestinales pertenecen en su mayoría a los filogrupos que divergieron más recientemente (Escobar-Páramo et al., 2004; Picard et al., 1999). Esto apunta al papel del fondo genético en la virulencia y justifica la necesidad de disponer de un método fiable y sencillo para asignar los aislados a un filogrupo (Clermont et al., 2019).

Clermont et al. (2013b) desarrollaron una PCR por la cual se determina un genotipo cuádruplex correspondiente a la presencia/ausencia de cuatro marcadores de ADN (*arpA*, *chuA*, *yjaA*, *TspE4.C2*). A continuación, basándose en el genotipo cuádruplex obtenido, se asigna inmediatamente un aislado a un filogrupo o si se requiere, se lleva a cabo amplificaciones específicas de alelos para ciertos aislados. Este método permite la rápida identificación de los siete filogrupos de *E. coli* y ha aportado más pruebas de que las cepas de los distintos filogrupos difieren en sus características fenotípicas y genotípicas, su nicho ecológico, sus rasgos vitales y su capacidad para causar distintos tipos de infecciones (Clermont et al., 2000a).

A pesar de sus ventajas sobre el anterior método usado, la PCR triplex, el método cuádruplex aún no logra asignar correctamente una pequeña fracción de cepas a un filogrupo. Estas cepas no asignables son simplemente extremadamente raras o, más probablemente, son el resultado de eventos de recombinación a gran escala en los que el donante y el receptor se originaron a partir de dos filogrupos diferentes. Otra prueba más de que el contenido genético de *E. coli* es altamente variable, principalmente por la frecuente ganancia y pérdida de genes (Nogueira et al., 2009)

5.3.3 SECUENCIA TIPO

El serotipado de las cepas puede considerarse como la primera técnica de comparación de cepas asociadas con brotes que permitió realizar una primera aproximación al estudio de la clonalidad. No obstante, el serotipado no siempre se correlaciona con un origen evolutivo común o vinculado, ya que cepas genéticamente separadas pueden presentar el mismo serotipo mientras que otras genéticamente próximas pueden tener serotipos diferentes (Dahbi Zbiti, 2015).

Gracias al desarrollo de las modernas técnicas de biología molecular, como la tipificación de secuencias multilocus MLST y a la naturaleza conservada del núcleo del genoma en *E. coli*, es posible establecer distancias taxonómicas entre cepas basándose en la comparación de genes cromosómicos altamente conservados denominados genes *housekeeping* (Chaudhuri & Henderson, 2012). La secuencia tipo (ST) describe la variabilidad de la cepa basándose en la información de la secuencia de un grupo de genes constitutivos, utilizando los esquemas de la Universidad de Warwick (Wirth et al., 2006) o del Instituto Pasteur (Jauregui et al., 2008).

En los esquemas MLST, se asigna un número arbitrario a cada secuencia de loci única (siete loci en el esquema de la Universidad de Warwick y ocho loci en el esquema de los Institutos Pasteur). Permite clasificar a las cepas en distintas secuencias tipo (STs) que se definen como aislados con perfiles alélicos idénticos (Maiden et al., 1998).

Recientemente se ha incorporado el esquema CH que permite predecir el perfil basado en MLST con una precisión de hasta el 95% (Weissman et al., 2012) mediante la determinación de las secuencias nucleotídicas de los alelos *fumC* y *fimH*. La asignación de clonotipos funciona como una prueba de detección rápida no pudiendo desplazar al MLST tradicional para estudios filogenéticos más detallados (Dale & Woodford, 2015).

5.3.3.1 ST95

Aunque los aislados ExPEC en humanos incluyen diversas cepas pertenecientes a cientos de secuencias tipo diferentes, predominan especialmente las cepas de los siguientes cuatro STs: ST69, ST73, ST95 y ST131 (Riley, 2014a; Ben Zakour et al., 2016; Stoesser et al., 2016).

El linaje ExPEC ST95 es una de las principales causas de ITUs y septicemias en todo el mundo (Bonacorsi et al., 2003). Además, es una causa importante de meningitis bacteriana, particularmente en recién nacidos (Bonacorsi et al., 2003; Peigne et al., 2009). Pese a ser uno de los linajes más comunes y extendidos globalmente rara vez muestra resistencias a los antimicrobianos de mayor importancia clínica. Por lo tanto, sus rasgos de resistencia no son la explicación de su dominio mundial (Stephens et al., 2017). Diversos estudios atribuyen a este linaje cosmopolita un promedio del 17% de las infecciones extraintestinales en humanos causadas por *E. coli* (Dias et al., 2009; S. Wang et al., 2016).

ST95 posee los medios suficientes para propagarse a través de alimentos y/o agua ya que a menudo se encuentra como comensal en heces en diversos huéspedes (Massella et al., 2020; Moran & Hall, 2018). Cada vez son más los estudios sobre la posible asociación de linajes ST95 avícolas con cepas humanas. (Jørgensen et al., 2019).

El complejo clonal ST95 incluye una gran diversidad genética entre sus integrantes, por lo que la comunidad científica ha subdividido a las cepas pertenecientes a este complejo en cinco subgrupos (A, B, C, D y E) atendiendo a sus características genéticas (Gordon et al., 2017a). En concreto, se observa una distribución de las cepas en base a sus serogrupos y secuencias del alelo *fimH*, este gen está presente en la gran mayoría de cepas de *E. coli* y su determinación forma parte de la determinación de los clonotipos de *E. coli* junto con el alelo *fumC*. La distribución de estos cinco subgrupos dentro del complejo clonal ST95 se ha visto que varía geográficamente, temporalmente, con la fuente de aislamiento de la cepa (por ejemplo, fecal versus extraintestinal) y el sexo del huésped (para aislados humanos) (Gordon et al., 2017a).

5.4 GENOMA CENTRAL Y ACCESORIO

El genoma de *E. coli* puede dividirse en dos partes. Por un lado, el genoma central o *core genome* con genes comunes que provienen de un mismo ancestro y que principalmente codifican para proteínas esenciales en las funciones fisiológicas y metabólicas de la bacteria (Leimbach et al., 2013; Rasko et al., 2008). Por otro lado, el genoma accesorio o *flexible genome* contiene genes presentes en algunos, pero no todos los miembros de la especie (Dahbi Zbiti, 2015). Debido a la gran capacidad para aceptar nuevo material genético (en forma de plásmidos, integrones, transposones, fagos y otros elementos móviles), al gran tamaño de la población global de *E. coli*, a su amplia gama de nichos ecológicos (Juhás et al., 2009) y a su necesidad de competir con otras especies bacterianas (Geurtsen et al., 2022) este componente accesorio es muy extenso y se caracteriza por ser infinitamente abierto. El número y familias de genes que conforman el genoma accesorio de *E. coli* sigue aumentando a medida que se secuencian más aislados (Rouli et al., 2015).

El genoma accesorio abierto infinito de *E. coli* contiene una gran proporción de los determinantes de sus capacidades patógenas. Entre ellos se encuentran genes que confieren resistencia a los antibióticos, factores de virulencia y probablemente la mayoría de los elementos genéticos que pueden determinar las preferencias del huésped de la bacteria (Geurtsen et al., 2022). Además, se ha demostrado que las regiones reguladoras de los genes centrales están influenciadas por el contenido de genes accesorios lo que permiten el mantenimiento de rasgos adquiridos como la resistencia a los antimicrobianos (McNally et al., 2016).

5.4.1 TEORÍAS

El arsenal de factores de virulencia de la bacteria es clave para su patogenicidad y supervivencia en el huésped. Sin embargo, clones cercanos de aislados patógenos muy infecciosos pueden vivir como comensales intestinales inofensivos, incluso el sistema digestivo puede actuar como reservorio de ciertas cepas patógenas, siendo en él inocuas. Hoy en día aún no se comprende del todo qué dictamina que un aislado de la especie bacteriana más investigada del planeta sea patógeno (Dobrindt, 2005; Grozdanov et al., 2004; Tenaillon et al., 2010b).

Existen tres teorías de causalidad de la enfermedad para los aislados de ExPEC. En primer lugar, *la teoría de la prevalencia* sugiere que la mayoría de las infecciones del tracto urinario (ITU) son infecciones oportunistas causadas por bacterias que predominan en la flora intestinal normal. En segundo lugar, *la hipótesis de especial patogenicidad* propuso que una cepa para ser patógena requiere de ciertos rasgos virulentos y representar un subconjunto distintivo de la población fecal de *E. coli* (J. R. Johnson, Kaster, et al., 2003; J. R. Johnson, Scheutz, et al., 2005b, 2005a; Nielsen et al., 2014; Thompson et al., 2011; Whittam et al., 1989). Ninguna de las dos es mutuamente excluyente y tampoco ninguna es realmente adecuada (Manges et al., 2019). En tercer lugar, *la hipótesis de la evolución coincidente* pone sobre la mesa que una *E. coli* comensal se puede convertir en patógena a través de la selección de funciones de factores de virulencia (FV) que están más relacionadas con la supervivencia de la bacteria que con su contribución directa a la patogénesis (Dobrindt, 2005; Grozdanov et al., 2004; Tenaillon et al., 2010b). Paradójicamente, ciertos datos sugieren que la virulencia puede ser un producto del comensalismo, ya que se ha demostrado que una fracción considerable de los genes asociados a la virulencia

en ExPEC también están presentes en muchos aislados de *E. coli* comensales, que aumentan su adaptabilidad y competitividad (Duprilot et al., 2019; Le Gall et al., 2007; Nowrouzian et al., 2001, 2003).

5.4.2 FACTORES DE VIRULENCIA Y SUPERVIVENCIA

En ExPEC se ha descrito una amplia variedad de factores de virulencia (FV) que contribuyen conjuntamente a potenciar su patogenicidad. La cantidad y el tipo de factores de virulencia se correlacionan poco con la patología. Algunos factores de virulencia se encuentran en varios o todos los patotipos capaces de causar infecciones extraintestinales, mientras que otros parecen específicos de solo uno de estos patotipos (Dale & Woodford, 2015). La virulencia de *E. coli* es multifactorial ya que ningún factor de virulencia es suficiente por sí solo para causar la enfermedad (Conover et al., 2016; Hannan et al., 2012b; Lane et al., 2007; Sarkar et al., 2014). Además, parece haber un vínculo genético entre ciertos FV ya que suelen aparecer juntos entre los aislados clínicos (Dahbi Zbiti, 2015; J. R. Johnson, Stell, et al., 2000; Kanamaru et al., 2003)

Actualmente se acepta que una cepa posee el estatus ExPEC cuando al menos posee dos de los siguientes genes asociados con infecciones extraintestinales: *pap*, *sfa/foc*, *afa/dra*, *iutA* y *KpsMTII* (J. R. Johnson, Gajewski, et al., 2003). No obstante, en muchos estudios se engloban dentro del patotipo ExPEC a cualquier tipo de cepa de *E. coli* aislada de una infección extraintestinal (Dahbi Zbiti, 2015).

Así pues, aunque no se puede establecer una relación entre algún factor de virulencia extraintestinal concreto y una patología específica, son marcadores útiles y potenciales predictores clínicos.

Los FV pueden agruparse por categorías funcionales, incluidas las relacionadas con la adherencia y la colonización, la flexibilidad nutricional y metabólica, la producción de toxinas y la evasión del sistema inmunitario del huésped y la persistencia.

5.4.2.1 ADHESINAS

Las fimbrias son apéndices filamentosos formados por subunidades de proteínas que están anclados en la membrana externa de las bacterias gramnegativas. Sirven como soporte de las adhesinas, encargadas de reconocer a su receptor en la célula hospedadora. Las adhesinas generalmente son proteínas con afinidad por los azúcares de las membranas facilitando así la unión a estas. Las cepas ExPEC poseen genes que codifican para varias clases de adhesinas, como las fimbrias tipo 1, tipo P, S y Afa/Dr (Schilling et al., 2001; Smithson Amat et al., 2009).

La fimbria tipo 1 se encuentra en el 99% de las cepas ExPEC (Vigil, Alteri, et al., 2011) y está implicada en la adherencia e invasión de las células de la vejiga (Martinez et al., 2000; Schilling et al., 2001). No obstante, esta adhesina también está presente en la gran mayoría de las cepas comensales.

La fimbria tipo P (fimbria Pap) está presente en la mayor parte de cepas aisladas de pielonefritis y urosepsis (septicemias de origen urinario). Permite a la bacteria fijarse a los receptores celulares y colonizar el epitelio urinario evitando ser arrastradas por la orina (Vigil, Stapleton, et al., 2011).

La fimbria tipo S es morfológicamente semejante a las fimbrias tipo 1 y fimbrias P, también participa en el proceso de adhesión bacteriana a las superficies epiteliales y, al igual que las anteriores, está asociada a cepas causantes de septicemias y meningitis. Muchas cepas uropatogénicas y septicémicas expresan las fimbrias P y S al mismo tiempo (M. Blanco et al., 1997; Spurbeck et al., 2011).

Las adhesinas afa/ Dra se asocian a cepas causantes de ITUs y septicemias, participan en la evasión del sistema inmune facilitando la invasión de las células epiteliales (Fang et al., 2004). Estudios epidemiológicos indican que

una parte significativa de ITUs son causadas por cepas UPEC que expresan la adhesina Dr. También se ha relacionado a esta adhesina Dr con la persistencia bacteriana dentro del tracto urinario (Goluszko et al., 1997; Mulvey, 2002; Nowicki et al., 2001).

La adhesina FimH se localiza en la punta de la fimbria tipo 1. Media la internalización de las bacterias *E. coli* en las células hospedadoras. La integrina, proteína de membrana, actúa como receptor para esta adhesina. La manipulación de estas integrinas, y la posterior cascada de señalizaciones, es un mecanismo común por el cual los patógenos consiguen entrar en las células hospedadoras (Lodish et al., n.d.; Wiles et al., 2008).

Existe una jerarquía de expresión de estas fimbrias durante el proceso de invasión. Este tipo de regulación jerárquica puede ser esencial para la eficacia del patógeno ya que asegura que solo las fimbrias necesarias se expresen en el momento dado y así limitar la exposición de los antígenos al sistema inmune, eludiendo de forma más eficaz la respuesta de los anticuerpos del hospedador (Lindberg et al., 2008).

Existen más adhesinas en el genoma de las cepas ExPEC. Asimismo, proteínas como la *tsh* (del inglés “*temperature sensitive hemagglutinin*”) desempeñan funciones similares participando en la adhesión de las primeras fases de infección (Dahbi Zbiti, 2015).

Además del importante papel de estas adhesinas, los flagelos juegan un papel muy importante en la colonización del tracto urinario. Sin movilidad, las bacterias tienen menos acceso a los tejidos diana para iniciar la adherencia y dar así comienzo a la infección (Dahbi Zbiti, 2015).

Una vez internalizada, UPEC (del inglés “*Uropathogenic Escherichia coli*”) puede permanecer inactiva dentro de unos compartimentos similares al endosoma tardío. Esto permite a los microorganismos sobrevivir en condiciones ambientales adversas como los efectos del sistema inmune y los antibióticos. La liberación posterior de UPEC dentro del citosol de la célula hospedadora estimula el rápido crecimiento de la bacteria y la formación de comunidades intracelulares lo que les permite causar infecciones recurrentes del tracto urinario (Mulvey, 2002; Wiles et al., 2008).

5.4.2.2 TOXINAS

Las toxinas son factores de patogenicidad muy importantes en las infecciones tanto intestinales como extraintestinales. Gracias a su acción de destrucción de células del hospedador, la bacteria puede progresar en su diseminación por los tejidos y adquirir nutrientes y otros factores necesarios durante la infección (Flament Simon, 2021).

La α -hemolisina (*hly*) es un citotoxina presente en muchas cepas causantes de infecciones del tracto urinario, sepsis y otras infecciones extraintestinales. Esta proteína ejerce una actividad citolítica sobre distintos linajes celulares. Provoca la aparición de poros hidrofílicos en las células del hospedador contribuyendo en el suministro de hierro a la bacteria (Wiles et al., 2008). Las proteínas responsables de la síntesis y secreción de la α -hemolisina están codificadas por el operón *hly*, que está formado por 4 genes (*hlyA*, *hlyB*, *hlyC* y *hlyD*) (J. Blanco et al., 1992; Pons Ximénez et al., 2006).

5.4.2.3 SIDERÓFOROS

Dentro de los sideróforos se engloban a distintas moléculas con una alta afinidad por el hierro. El hierro es un compuesto esencial para el crecimiento y supervivencia de las bacterias convirtiéndose en uno de los factores que limitan su crecimiento en los tejidos corporales. Dentro del hospedador casi todo el hierro está secuestrado en hemoproteínas o proteínas quelantes implicadas en su transporte. Por tanto, los diferentes patógenos bacterianos entre los que se encuentra *E. coli* han desarrollado sistemas para su captación que representan

importantes factores de virulencia. La elevada afinidad de los sideróforos por este metal les permite competir no solo por el hierro libre sino también arrebatarlo de fuentes de reserva del hospedador tales como la ferritina. Tras captar el hierro del medio externo la bacteria debe internalizarlo (Balado Dacosta, 2009).

Las cepas ExPEC pueden sintetizar hasta cuatro sistemas de captación de hierro: enterobactinas, salmoquelina, aerobactina y yersiniabactina. La adquisición de hierro mediante estos sistemas se componen de varias etapas como la síntesis del sideróforo en el citoplasma, su secreción, la recepción del complejo hierro-sideróforo por receptores bacterianos como *iutA*, e internalización del complejo y finalmente liberación de hierro en el citoplasma (Garénaux et al., 2011).

5.4.2.4 CÁPSULA

La cápsula a menudo constituye la capa más externa de las cepas de *E. coli* por lo que suele intervenir en las interacciones entre la bacteria y su entorno inmediato. Entre las funciones de los polisacáridos que constituyen las capsulas bacterianas se encuentran la prevención de la desecación, la adherencia y la resistencia al sistema inmune tanto innato como adquirido. Los polisacáridos capsulares son increíblemente diversos ya que no solo existen diferentes unidades de monosacáridos, sino también difieren en su forma de unión. En el caso de *E. coli* se han descrito casi 80 variedades del antígeno K de acuerdo a sus propiedades serológicas, de los cuales una pequeña fracción están asociados con infecciones invasivas (Roberts, 1996; Whitfield, 2006).

Los antígenos K de *E. coli* se dividen en 4 grupos (IA, IB, II y III). Los grupos IA y IB se encuentran en aislados de *E. coli* que causan infecciones intestinales (EPEC, ETEC y EHEC) y las cápsulas de los grupos II y III se encuentran en cepas que causan infecciones extraintestinales. Estas cápsulas contribuyen en la protección contra la fagocitosis y la actividad bactericida del suero (Whitfield, 2006). Los genes que codifican para la cápsula de los grupos II y III son denominados *kps* (Mamani Huarani, 2015).

Otros componentes de la membrana externa también se han relacionado con la resistencia al suero en *E. coli* incluyendo ciertas proteínas como *Iss* (del inglés “increased serum survival”) y *TraT*. La resistencia al suero parece ser una característica de virulencia de *E. coli* ampliamente propagada, se cree que la proteína *Iss* puede ser un factor de virulencia importante y útil en la discriminación entre cepas virulentas y avirulentas (Nolan et al., 2003).

5.4.2.5 ANTÍGENO O

La membrana externa de las bacterias gramnegativas está formada por una bicapa lipídica asimétrica en la cual la cara interna está compuesta por fosfolípidos mientras que la cara externa está compuesta en su mayor parte por moléculas de lipopolisacáridos (LPS) (Funahara & Nikaido, 1980; Kita & Nikaido, 1973; Llompарт Vázquez, 2009).

Los LPS juegan un papel muy importante en la patogénesis de las infecciones bacterianas, así como en la interacción con el hospedador y su sistema de defensa. Básicamente el LPS se compone de 3 partes: el lípido A, el núcleo y la cadena O. La cadena O, es la región del LPS más expuesta al medio externo, por lo que sus características son esenciales para la supervivencia de la bacteria en los diferentes ambientes. Presenta gran variabilidad en cuanto a longitud y tipos de azúcar presentes, y contiene los determinantes antigénicos responsables de la especificidad serológica del microorganismo (Llompарт Vázquez, 2009). Desde su descubrimiento, el LPS fue reconocido como una molécula con una potente acción endotóxica, en la actualidad, se le atribuye otras funciones entre las que se incluyen: mantenimiento y organización de la membrana externa, inhibición de anticuerpos, variaciones antigénicas, activador del sistema inmune y mediación en la adherencia a las células y tejidos del hospedador (Harvill et al., 2000; Raetz & Whitfield, 2002; Romero et al., 2010).

Las cepas de *E. coli* patógenas extraintestinales (ExPEC) son responsables de la mayoría de las infecciones extraintestinales a nivel mundial y aunque comprenden una gran variedad de linajes, tan solo un pequeño grupo de clones son responsables de la mayoría de las infecciones. Estos clones de alto riesgo están a su vez representados por un número limitado de serogrupos. La mayor parte de las cepas de *E. coli* causantes de ITU y bacteriemias a nivel global pertenecen a los serogrupos O1, O2, O4, O6, O7, O16, O18 y O75 *E. coli* (Mamani Huarani, 2015). Pese a que los mismos serogrupos O parece que predominan en todo el mundo, existen diferencias entre las distintas regiones geográficas (J. Blanco et al., 1992). El hecho de que existan numerosos serogrupos representados en las cepas de *E. coli* extraintestinales dificulta el diseño de una vacuna eficaz a nivel mundial (Blum-Oehler et al., 1997; J. R. Johnson et al., 2009; Korhonen et al., 1985; Ørskov & Ørskov, 1985; Prats et al., 2000; Van Den Bosch et al., 1982).

Con el fin de comprender con mayor profundidad la epidemiología local de *E. coli*, el LREC ha realizado un seguimiento epidemiológico de los serogrupos causantes de bacteriemias a lo largo de los años en el HULA en una importantísima colección de cepas, en un primer estudio se analizaron un total de 3.260 cepas aisladas en el periodo 1989-2011 y en un segundo estudio aún en desarrollo se busca contrastar cambios epidemiológicos transcurridos 9 años. Actualmente el LREC-USC cuenta con 348 cepas procedentes del periodo 2020-2022. En el presente trabajo se han caracterizado 53 cepas pertenecientes a los serogrupos O1 (20 cepas) y O2 (33 cepas), aisladas durante los años 2020, 2021 y 2022 a partir de hemocultivos de pacientes del HULA de Lugo (Tabla 1).

Tabla 1. Serogrupos O más frecuentes entre cepas de *E. coli* bacteriémicas aisladas de pacientes en el hospital Universitario Lucus Augusti (HULA). Comparación entre los periodos 2020-2022 (datos no publicados del LREC-USC) y 1989-2011 (período 1989-2011, Tesis doctoral Rosalia S. Mamani, USC, 2015).

Serogrupos*	Número (%) de cepas <i>E. coli</i>		
	Estudio 2020-2022 (n = 348)	Estudio 1989-2011 (n = 3.260)	p-valor
O1	20 (5,7)	214 (6,6)	
O2	34 (9,8)	270 (8,3)	
O4	13 (3,7)	117 (3,6)	
O6	27 (7,8)	278 (8,5)	
O7	4 (1,1)	37 (1,1)	
O8	34 (9,8)	243 (7,5)	
O9	11 (3,1)	120 (3,7)	
O15	14 (4,0)	137 (4,2)	
O18	7 (2,0)	129 (4,0)	
O25	34 (9,7)	220 (6,7)	0,047151
O75	11 (3,2)	58 (1,8)	
O83	5 (1,4)	37 (1,1)	
O101	14 (4,0)	70 (2,1)	0.043394
O153	6 (1,7)	37 (1,1)	

*Aparecen únicamente los serogrupos O encontrados en ambos periodos con una prevalencia superior al 1,0 %

6. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En los últimos años se ha observado un aumento de bacteriemias causadas por *E. coli* patógenos extraintestinales (ExPEC), *E. coli* uropatogénicos (UPEC) y *E. coli* patógenos aviarios (APEC). Entre los serogrupos más prevalentes a nivel global se encuentran los serogrupos O1 y O2. Nuestro objetivo es caracterizar las cepas pertenecientes a estos serogrupos, buscando entender las razones de su éxito. Determinar las características de estas cepas es vital para diseñar vacunas adaptadas a la epidemiología actual de nuestra área sanitaria.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 CEPAS CONTROL Y CONSERVACIÓN DE CEPAS

En todos los ensayos tanto fenotípicos como genotípicos empleamos cepas procedentes de hemocultivos de la colección del Laboratorio de Referencia de *Escherichia coli* de la Universidad de Santiago de Compostela (LREC-USC).

Todos los aislados se conservaron en las mismas condiciones siguiendo el protocolo LREC-USC, en agar nutritivo con 0,75% (p/v) de agar a temperatura ambiente en tubos Vacutainer™. Gracias a este medio conseguimos que las cepas mantengan su viabilidad durante al menos 10 años. Para preparar este medio mezclamos agar nutritivo 11,5 (g/l) (Applichem Panreac) y caldo nutritivo 4 (g/l) (Applichem-Panreac). Se distribuyen aproximadamente 3 ml del medio en los tubos estériles.

7.2 OBTENCIÓN DE LAS CEPAS CLÍNICAS DE *E. COLI*

Las cepas seleccionadas para la realización de este Trabajo Fin de Grado (TFG) proceden de una selección realizada sobre 348 cepas obtenidas a través de un estudio en colaboración realizado entre el HULA y el LREC-USC. Se trata de cepas procedentes de infecciones extraintestinales causadas por *E. coli*, concretamente cepas aisladas de hemocultivos (bacteriemias), donde un total de 54 cepas fueron identificadas como pertenecientes a los serogrupos O1 y O2 (Tabla 1). Para el desarrollo de este TFG se seleccionaron aleatoriamente 53 de estas cepas. Las 53 cepas analizadas fueron obtenidas en los años 2020 (n=14), 2021 (n=31) y 2022 (n=8). En el HULA se llevó a cabo el aislamiento, identificación y antibiograma de las cepas.

7.3 ESTUDIO FENOTÍPICO

7.3.1 SEROTIPADO

El método empleado para la determinación del antígeno O de los aislados está basado en procedimiento originalmente descrito por Van Den Bosch et al., (1982) y posteriormente modificado por Blanco et al., (1996).

Los antisueros se obtienen en el LREC-USC mediante la inmunización de conejos con cepas seleccionadas del patógeno y posteriormente adsorbidos para eliminar reacciones cruzadas, siendo capaces de reconocer las variedades de la O1 a la O185 con gran fiabilidad. Este método determina los antígenos O de *E. coli* mediante aglutinación positiva con los antisueros O (O1 a O181) disponibles. Los antisueros de diagnóstico utilizados se produjeron y se dotaron monoespecíficos en el LREC-USC. La especificidad se controló mediante ensayos de aglutinación con cepas de referencia conocidas. Los tipos de antígenos O31, O47, O67, O72, O93, O94 y O122 se excluyeron de esta clasificación, ya que se demostró que no son antígenos somáticos. El procedimiento de serotipado LREC-USC incluye 174 antisueros O monovalentes agrupados en 25 antisueros polivalente para simplificar el proceso.

Los antisueros se emplean en dos diluciones de ensayo 1/80, en su gran mayoría, o 1/40. Dicha dilución se determina al ensayar cada antisuero una vez se ha completado el proceso de adsorción, frente a su cepa O homóloga de referencia. Si el título es $\geq 1/640$ con la cepa control, la dilución de ensayo será 1/80, mientras que si es $< 1/640$, la dilución de ensayo es 1/40. Todas las diluciones se preparan con una solución salina estéril (NaCl 0,85%).

7.3.1.1 PREPARACIÓN DE LAS SUSPENSIONES BACTERIANAS

Sembramos las cepas en medio agar Triptona-Soja (TSA) e incubamos (37°C/ 24h). Rotulamos los números de referencia de las cepas en tubos de ensayo donde suspendemos las colonias obtenidas en 2 ml de solución salina (0,85% NaCl). Llevamos a hervir los tubos con las soluciones (100°C/ 1h), de esta forma conseguimos destruir el antígeno K desenmascarando así el antígeno O. Tras enfriar, se añaden 2 ml de solución salina formalinizada (0,5%, v/v) con violeta de genciana (0,005%, p/v) en cada suspensión. Las suspensiones permanecen viables durante meses si se conservan bien cerradas a 4°C.

7.3.1.2 DETERMINACIÓN DEL SEROGRUPO O

Para enfrentar los aislados a los antisueros empleamos placas de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos (16 placas en total), facilitando la lectura de los resultados y necesitando la cantidad mínima de antisuero. Rotulamos en la parte superior de las placas de microtitulación las letras de la A-Y correspondientes a los antisueros polivalentes (combinación conocida de antisueros específicos frente a un antígeno O) y numeramos las filas de la 1 a la 53 correspondiendo a cada una de nuestras cepas. Repartimos cantidades equivalentes del antisuero y la bacteriana problema obteniendo un volumen final de 100 µl. Dejamos incubar las muestras 37°C durante 24h.

La interpretación de los resultados se realiza estudiando las reacciones de aglutinación. Si los anticuerpos presentan en el antisuero reaccionan con los antígenos de la muestra se forma una red que evita que las bacterias sedimenten (resultado positivo). Por el contrario, si ningún anticuerpo presente en el antisuero reacciona con la muestra, las bacterias teñidas con el cristal violeta sedimentan dando lugar a un punto visible en el fondo del pocillo (resultado negativo). Tras obtenerse las reacciones positivas con los antisueros polivalentes, la suspensión de antígeno O de la cepa deberá enfrentarse con todos los antisueros monovalentes incluidos en el polivalente correspondiente.

7.3.1.3 TITULACIÓN SEROGRUPO O

La determinación del antígeno O se completa con el proceso de confirmación de titulación. El título representa la dilución máxima del suero capaz de aglutinar a la cepa problema. Para lo cual enfrentaremos la cepa problema a una dilución seriada del monovalente específico y dejamos a incubar la placa de microtitulación a 37°C/24h. Transcurrido el tiempo, realizamos la lectura de los resultados por aglutinación y determinamos los títulos.

7.3.2 ANTIBIOGRAMA

La determinación de las concentraciones mínimas inhibitoria (CMI) y susceptibilidad a los antimicrobianos fue determinada en el Hospital Lucus Augusti (HULA) mediante el sistema MicroScan. Los resultados se interpretaron siguiendo los estándares EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) que establece 3 categorías en función del grado de sensibilidad a un antibiótico para un microorganismo: Resistente (R), Sensible (S) e Intermedia (I).

Se analizaron 10 clases de agentes antimicrobianos de gran interés clínico y epidemiológico: penicilinas (ampicilina, piperacilina), cefamicinas (cefoxitina), cefalosporinas de 3^o y 4^o generación (cefotaxima, ceftazidima y cefepima), carbapenems (imipenem, meropenem, ertapenem) y monobactámicos (aztreonam), betalactámicos con inhibidores de β-lactamasas (amoxicilina-ácido clavulánico y piperacilina-tazobactam), aminoglucósidos (gentamicina, tobramicina y amikacina), inhibidores de la vía del folato (trimetoprima-sulfametoxazol), quinolonas (ácido nalidíxico, levofloxacin y ciprofloxacina) y tigeciclina. La designación de MDR (del inglés "*Multidrug Resistant*") se definió como la resistencia a más de tres clases de fármacos antimicrobianos probados (Magiorakos et al., 2012). La producción de ESBL (del inglés "*Extended-spectrum beta-lactamase*") se llevó a cabo mediante el test de sinergia (Jarlier et al., 1988).

7.4 ESTUDIO GENOTÍPICO

7.4.1 EXTRACCIÓN DE ADN

Para la extracción del ADN, primero sembramos todas las cepas en medio agar TSA e incubamos (37°C/ 24h). Añadimos en tubos eppendorf con 600 µl de agua destilada autoclavada aproximadamente 10 µM (utilizando asas de inoculación estériles de 10 µ M) de cada cultivo puro. Llevamos a hervir las suspensiones a 100°C durante 5 minutos. Luego, centrifugamos 2 min a 11.000 rpm. Por último, retiramos el sobrenadante y trasparamos a nuevos tubos eppendorf que congelamos para poder usar en las PCRs siguientes.

En todos los procedimientos se incluyen sistemáticamente controles negativos y positivos (cepas de referencia procedentes del LREC-USC, (ANEXO: CONTROLES POSITIVOS).

Con el fin de estandarizar nuestro protocolo de trabajo, se trabajaron con las siguientes condiciones:

7.4.1.1 MEZCLA DE REACCIÓN

La mezcla de reacción se prepara para un volumen final de 25 µl por cada muestra y contiene:

- El ADN extraído de la cepa problema (5 µl)
- Cebadores (0,3- 1 µl)
- Master Mix coloreado (NZYtaq 2x Green Master Mix) (12,5 µl)
- Agua miliQ y autoclavada hasta completar el volumen final de 25 µl.

7.4.1.2 AMPLIFICACIÓN

Las mezclas fueron sometidas a:

- Un ciclo de desnaturalización inicial (94°C/ 3 min)
- Seguido de 35 ciclos de 94°C/ 1min (desnaturalización), T^o de hibridación del cebador 1 min y 72°C/ 90 seg (polimerización)
- Un ciclo de polimerización final de 72°C/ 3 min.

7.4.1.3 REVELADO DE RESULTADOS

La lectura de los fragmentos de ADN amplificados se realizó mediante electroforesis convencional en gel de agarosa bajo luz UV [agarosa Seakem® LE al 1.5% en tampón TAE 1X (Tris 1,6 M, acetato sódico 0,8 M, EDTA 0,025 M) con 6µl de marcador Green Safe Premium (Nzytech) por 200 ml.

Cargando en cada pocillo 7 µl de muestra. En todas las PCRs se incluyeron cepas para el control positivo y un blanco. Las electroforesis se realizaron con fuentes y cubetas de Bio-Rad. El voltaje aplicado a los geles grandes (200ml tampón TAE, 3 g agarosa, 6 µl Green safe) fue de 140V durante 20-30 min dependiendo del tamaño del amplificado. Los geles se leyeron en un transiluminador y analizados con el software Image Lab.

A continuación, se muestran solo aquellas reacciones donde las condiciones de trabajo sean distintas.

7.4.2 GRUPO FILOGENÉTICO

La detección de los genes se realizó mediante PCR convencional con un protocolo adaptado de (Clermont et al., 2013a)

7.4.2.1 MEZCLA DE REACCIÓN

Las mezclas de reacción se preparan para un volumen final de 25 μ l que contienen:

- ADN extraído del aislado correspondiente (5 μ l)
- Master mix (NZYTaQ 2x Green Master Mix) (12,5 μ l)
- Cebadores (0,5- 1 μ l)
- Agua destilada autoclavada hasta completar el volumen final de 25 μ l.

7.4.2.2 AMPLIFICACIÓN

Las mezclas de reacción para la PCR multiplex fueron sometidas a:

- Un ciclo de desnaturalización inicial (94°C/ 4 min)
- Seguido de 30 ciclos de 94°C/ 5 seg (desnaturalización), fase de hibridación a 58°C 20 seg y 72°C/ 1min (polimerización)
- Un paso de extensión final de 72°C/ 5 min.

Las mezclas de reacción para las PCR de los grupos E y C fueron sometidas a:

- Un ciclo de desnaturalización inicial (94°C/ 3 min)
- Seguido de 35 ciclos de 94°C/ 1 min (desnaturalización), fase de hibridación T^o de anillamiento de los cebadores 1min y 72°C/ 1min 30 seg (polimerización)
- Un paso de extensión final de 72°C/ 3 min.

7.4.2.3 CEBADORES

Los cebadores usados en las pruebas de PCR, sus secuencias nucleotídicas y el tamaño del producto amplificado de pares de bases se indican en las

Tabla 2, Tabla 3 y Tabla 4.

Tabla 2. Cebadores utilizados en la Multiplex de grupos filogenéticos

Nombre del gen	Primers	[50 μ l]	T ^a de annealing	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Tamaño (pb)	Referencia
<i>chuA</i>	chuA.1b	0.5 μ l	58 °C	ATGGTACCGGACGAACCAAC	288	(Clermont et al., 2013a)
	chuA.2			TGCCGCCAGTACCAAAGACA		(Clermont et al., 2000b)
<i>yjaA</i>	yjaA.1b	0.5 μ l		CAAACGTGAAGTGTCAGGAG	211	(Clermont et al., 2013b)
	yjaA.2b			AATGCGTTCCTCAACCTGTG		
<i>TspE4C2</i>	TspE4C2.1b	1 μ l		CACTATTCGTAAGGTCATCC	152	
	TspE4C2.2b			AGTTTATCGCTGCGGGTCGC		
<i>arpA</i>	AceK.f	1 μ l		AACGCTATTCGCCAGCTTGC	400	
	ArpA1.r			TCTCCCCATACCGTACGCTA		

Tabla 3. Cebadores utilizados en la clasificación del grupo filogenético E.

Nombre del gen	Primers	[50µM]	Tª de aneling	Secuencia nucleotídica (5´ - 3´)	Tamaño (pb)	Referencia
arpA	ArpAgpE.f	0.5 µl	57 °C	GATTCATCTTGTCAAATATGC C	301	(Lescat et al., 2013)
	ArpAgpE.r			GAAAAGAAAAAGAATTCCAAG AG		
trpA	trpBA.f	0.3 µl		CGGCGATAAAGACATCTTCAC	489	(Clermont et al., 2008)
	trpBA.r			GCAACGCGGCCTGGCGGAAG		

Tabla 4. Cebadores utilizados en la clasificación del grupo filogenético C.

Diana	Primers	[50µM]	Tª de aneling	Secuencia nucleotídica (5´ - 3´)	Tamaño (pb)	Referencia
trpAgpC	trpAgpC.1	0.5 µl	56 °C	AGTTTTATGCCAGTGCAG	219	(Lescat et al., 2013)
	trpAgpC.2			TCTGCGCCGGTCACGCC		
trpA	trpBA.f	0.1 µl		CGGCGATAAAGACATCTTCAC	489	(Clermont et al., 2008)
	trpBA.r			GCAACGCGGCCTGGCGGAAG		

La identificación de los distintos grupos filogenéticos de *E. coli* se realizó por PCR siguiendo el método descrito por Clermont et al., (2013a) (Ilustración 1).

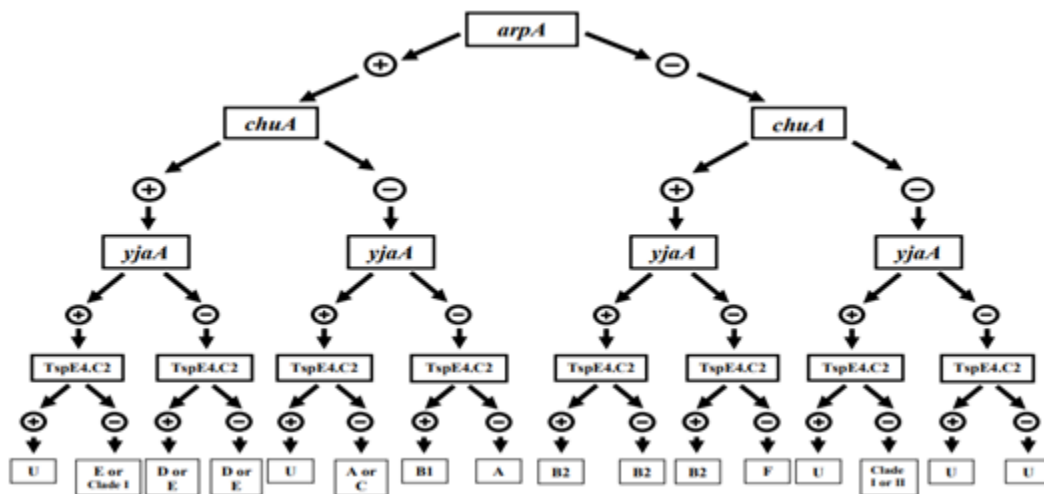


Ilustración 1. Esquema grupos filogenéticos *E. coli*.

7.4.3 GENES EXPEC

La detección de los genes de virulencia se realizó mediante PCR convencional y múltiple, agrupando cebadores con la misma temperatura de anillamiento.

7.4.3.1 CEBADORES

Los cebadores usados en las pruebas de PCR, sus secuencias nucleotídicas, el tamaño de producto amplificado, así como su temperatura de anillamiento se indican en la Tabla 5.

Tabla 5. Cebadores utilizados en la detección de genes de virulencia de los aislados ExPEC.

Diana	Primer	Secuencia nucleotídica (5'-3')	[20 μ M]	Tamaño (pb)	T°	Referencia		
<i>papC</i>	Forward	GTGGCAGTATGAGTAATGACCGTTA	0,5	205	60	(J. R. Johnson et al., 2015)		
	Reverse	ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA						
<i>hlyF</i>	Forward	TCGTTTAGGGTGCTTACCTTCAAC	0,5	444		66	(Morales et al., 2004)	
	Reverse	TTTGGCGGTTTAGGCATTCC						
<i>ompT</i>	Forward	ATCTAGCCGAAGAAGGAGGC	1	559			66	(J. R. Johnson et al., 2015)
	Reverse	CCCGGGTCATAGTGTTCATC						
<i>yfcV</i>	yfcV-F	ACATGGAGACCAGTTCACC	0.5	292	66			(Spurbeck et al., 2012)
	yfcV-R	GTAATCTGGAATGTGGTCAGG						
<i>fyuA</i>	fyuA-F	GTAACAATCTTCCCCTCGGCAT	0.5	850		66		(Spurbeck et al., 2012)
	fyuA-R	TGACGATTAACGAACCGGAAGGGA						
<i>vat</i>	vat-F	TCAGGACACGTTTCAGGCATTTCAGT	0.5	1100			64	(Spurbeck et al., 2012)
	vat-R	GGCCAGAACATTTGCTCCCTTGTT						
<i>iron</i>	Ironec-f	AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG	0.3	665	64			(J. R. Johnson, Russo, et al., 2000)
	Ironec-r	GACGCCGACATTAAGACGCAG						
<i>iss</i>	is-f	CAGCAACCCGAACCACTTGATG	0.3	323		64		(T.J.Johnson, Wannemuehler, & Nolan, 2008)
	is-r	AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA						
<i>papEF</i>	PapEF F	GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT	0.5	336			64	(Yamamoto A-B et al., 1995)
	PapEF R	AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA						
<i>tsh</i>	tsh03	GGTGGTGCCTGGAGTGG	0.5	640	64			(Dozois et al., 2000)
	tsh15	AGTCCAGCGTGATAGTGG						
<i>iucD</i>	Aer f	TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT	0.5	602		64		Yamamoto et al. (1995)
	Aer r	AATATCTTCTCCAGTCCGGAGAAG						
<i>iutA</i>	aer-851f	GGCTGGACATCATGGGAACTGG	0.5	301			64	(J. R. Johnson et al., 1997)
	aer- 1152r	CGTCGGGAACGGGTAGAATCG						
<i>sfa/foc DE</i>	sfa 1	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC	0.5	410	64			Le Bouguenec et al. (1992)
	sfa 2	CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA						
<i>afa/dra BC</i>	afa1	GCTGGGCAGCAAAGTATAACTCTC	0.5	750		64		(Le Bouguenec et al., 1992)
	afa2	CATCAAGCTGTTTGTTCGTCGCCCG						
<i>neuc-k1</i>	neu1	AGGTGAAAAGCCTGGTAGTGTG	0.5	676			64	(Moulin-Schouleur et al., 2006)
	neu2	GGTGGTACATCCCGGATGTC						
<i>kps M II</i>	KpsII f	GCGCATTTGCTGATACTGTTG	0.5	272	64			(J. R. Johnson & Stell, 2000)
	KpsII r	CATCCAGACGATAAGCATGAGCA						
<i>hlyA</i>	hly f	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	0.3	1177		64		(Yamamoto A-B et al., 1995)
	hly r	ACCATATAAGCGGTCATTCCCCTCA						

7.5 ESTUDIO CEPAS PERTENECIENTES A ST95

Para determinar que cepas de nuestra colección pertenecen a la secuencia tipo ST95 adaptamos la PCR descrita por Gordon et al. (2017a). Para la puesta a punto probamos distintas temperaturas de anillamiento y concentraciones para cada cebador. Una vez determinadas las mejores condiciones de trabajo se pudo realizar: 1) la detección de las cepas pertenecientes al complejo clonal 95 (positivas a *svg*) y 2) determinar a qué subgrupo pertenece cada cepa dentro de este (subgrupos A-E) en base a la detección de genes específicos de cada cluster (subgrupo A, *gpA*; subgrupo B, *gpB*; subgrupo C, *gpC*; subgrupo D, *gpD* y subgrupo E, *gpE*).

7.5.1 PREPARACIÓN DE LA MEZCLA DE REACCIÓN

Primero hacemos una PCR para conocer que cepas pertenecen al ST95. Para ello preparamos una mezcla de reacción para un volumen final de 25 μ l por muestra que contiene:

- El ADN de nuestras 53 cepas (5 μ l)
- Master Mix para multiplex (NZYTaQ 2x Green Master Mix) (12.5 μ l)
- Cebador *svg* (0.5 μ l)
- Agua MilliQ hasta completar el volumen final de 25 μ l

Una vez obtenidos los resultados, con las cepas positivas y que por tanto pertenecen al ST95, realizamos otra PCR para identificar el subgrupo. Debemos preparar dos mezclas ya que no conseguimos amplificar *gpE* por multiplex.

Mezcla 1 (PCR múltiple para *gpA*, *gpB*, *gpC*, *gpD*.)

- ADN de las muestras positivas para *svg* (5 μ l)
- Cebadores *gpA* (0.2 μ l), *gpB* (0.5 μ l), *gpC* (0.5 μ l), *gpD* (0.5 μ l)
- Master Mix para multiplex (Multiplex PCR NZYTaQ 2x Colourless Master Mix) (12.5 μ l)
- Agua MilliQ hasta completar el volumen final de 25 μ l

Mezcla 2 (detección de *gpE*)

- ADN de las muestras positivas para *svg* (5 μ l)
- Cebadores *gpE* (0.5 μ l)
- Master Mix coloreadas (marca) (12.5 μ l)
- Agua MilliQ hasta completar el volumen final de 25 μ l

7.5.2 AMPLIFICACIÓN

Las mezclas fueron sometidas a:

- Un ciclo de desnaturalización inicial (94°C/ 4 min)
- Seguido de 30 ciclos de 94°C/ 5 seg de desnaturalización, temperatura (Tabla 6) de hibridación del cebador de 20 seg y 72°C/ 5 min de polimerización.
- Un ciclo de polimerización final de 72°C/ 3 min.

7.5.3 CEBADORES

Tabla 6. Cebadores empleados para la identificación del ST95 y sus subgrupos.

Diana	Primer	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Tamaño (pb)	Tº	Referencia
svg	svg.1	TCCGGCTGATTACAAACCAAC	450	62	(Gordon et al., 2017b)
	svg.2	CTGCACGAGGTTGTAGTCCTG			
gpA	gpB F	CAACAAGATCCTCAGCGGTG	565	59	
	gpA R	GCGATTTTCAGATAGCTCGCA			
gpB	gpB F	CACTAACTCCCGATGCCATA	315		
	gpB R	ATCGAATCTTCGCCTTGTC			
gpC	gpC F	AGACGCCTTACAATACTGA	137		
	gpC R	GAAGGGTACATTCACACTCG			
gpD	gpD F	AGTGCCTGGTTGAGGTATTA	226		
	gpD R	CCTGACATCACGGTACTCAT			
gpE	gpE F	TGGAAGTGGAGCAGGATAAC	786	62	
	gpE R	CTTCCACAATCAGTTGCAGG			

7.6 SECUENCIACIÓN SANGER

Los amplicones se obtuvieron por PCR convencional, llevada a cabo en un volumen de 50 µl que contenía 1 µl de ADN extraído más 10 µl del tampón de reacción 5x My Taq™ (Bioline) que incluye 5mM de dNTPs, 15 mM de MgCl₂ más 0,2 µl de MyTaq™ ADN polimerasa (Bioline), y 1 µl de los cebadores apropiados a una concentración de 20 µM. Con las siguientes condiciones: desnaturalización 3 min a 94°C, 35 ciclos de 1 min a 94°C y 1 min a 57°C y 1 min a 72°C. La extensión final duró 3 min a 72°C. Para la PCR del alelo *fimHtr* se usaron los cebadores de la Tabla 7.

En todos los procedimientos se incluyeron sistemáticamente controles negativos y positivos. Posteriormente, se secuenciaron las cadenas complementarias directa e inversa en el Centro de Secuenciación de la Universidad de Santiago de Compostela (Lugo). Para ello se utilizó el protocolo "BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing". Además, analizamos las secuencias utilizando el software de secuenciación CLUSTLw y BLAST, Genbank [marca registrada de la National Library of Medicine (NIH) y el National Center for Biotechnology Information (NCBI)] y CGE (servicios del Centro de Epidemiología Genómica).

Tabla 7. Cebadores utilizados en la secuenciación del del alelo *fimHtr*.

Gen	Primer	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Tamaño amplicón (pb)	Tº anillamiento	Referencia
fimH (tamaño locus 469)	fimH-wf	CACTCAGGGAACCATTCAGGCA	975	57°C	(Weissman et al., 2012)
	fimH-wr	CTTATTGATAAACAAAAGTCAC			

7.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables dicotómicas se describieron mediante enumeración y porcentajes, y se compararon mediante la prueba exacta de Fisher bilateral. Los valores de $p \leq 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. Todos los análisis se realizaron con el programa estadístico SPSS.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 DETERMINACIÓN DE LOS SEROGRUPOS DE LOS AISLADOS CLÍNICOS

En este apartado analizamos la prevalencia de los serogrupos O1 y O2 dentro de la colección original de cepas del LREC-USC (n=348).

Como se puede ver en la Tabla 8 la prevalencia de cepas del serogrupo O2 fue del 9,8% y las del serogrupo O1 del 5,7%. Ambos serogrupos se sitúan dentro del TOP5 más prevalentes: O2 con la misma prevalencia que el O8 y el O25, a continuación el O6 (7,8%) y en quinta posición el O1 (Tabla 1).

Tabla 8. Distribución de los serogrupos por años (Lugo, 2020-2022).

Sero grupos	Número (%) de cepas de <i>E. coli</i>			
	Total n = 348	2020 n = 119	2021 n = 177	2022 n = 52
O1	20 (5,7)	7 (5,9)	11 (6,2)	2 (3,8)
O2	34 (9,8)	7 (5,9)	20 (11,3) ^a	7 (13,5) ^a

^aNo hay diferencias estadísticamente significativas (P = 0,088/Fisher bilateral; P = 0,116/ 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 2020 con el 2021 y el 2020 con el 2022.

Las cepas de *E. coli* pertenecientes a los serogrupos O1 y O2 se encontraron entre los primeros 20 serogrupos definidos por Kauffman en 1944 (*Methods in Microbiology - Google Libros*, n.d.) Desde entonces cada vez más estudios relacionan estos serogrupos con enfermedades tanto en humanos como animales. Ambos serogrupos se encuentran entre los más frecuentes entre las cepas que causan bacteriemia y sepsis en pacientes humanos (Olesen et al., 1995; F. Orskov & Orskov, 2011b).

Existen varios estudios a través de los cuales podemos comparar la prevalencia de los serogrupos O1 y O2 entre cepas de *E. coli* bacteriémicas aisladas en diferentes países. Como el estudio llevado a cabo por Royer et al. (2022), en el cual realizaron un seguimiento de los serogrupos de las cepas causantes de bacteriemia en los años 2005, 2016 y 2017 en París. De un total de 912 cepas analizadas, 60 cepas (6,6%) pertenecieron al serogrupo O1 y 63 (6,9%) al serogrupo O2. Igualmente, entre los años 2000 y 2011, Kallonen et al. (2017) analizaron un total de 1.509 aislados de *E. coli* de Inglaterra. Del total, 119 cepas (7,9%) resultaron ser del serogrupo O1 y 154 (10,2%) del serogrupo O2. En Japón, entre los años 2015 y 2017, Matsumoto et al. (2022) llevaron a cabo el análisis de 401 cepas de las cuales 57 (14,2%) resultaron ser O1 y 34 (8,5%) fueron O2. También se realizó un estudio global en Europa, Norte y Sur de América y Asia-Pacífico por Weerdenburg et al. (2022). De un total de 3.217 cepas, 255 (7,9%) pertenecieron al serogrupo O1 y 268 (8,3%) al serogrupo O2.

En Lugo, en un estudio realizado entre 1989 y 2011 en el HULA (Mamani Huarani, 2015) con un tamaño muestral de 3.260 cepas, 214 (6,6%) de ellas pertenecieron al serogrupo O1 y 270 (8,3%) al serogrupo O2. Asimismo, entre el 2020 y 2022, los resultados obtenidos en el mismo hospital en una colección de 348 cepas muestran que 20 cepas (5,7%) pertenecieron al serogrupo O1 y 34 (9,8%) al serogrupo O2. Ambos serogrupos se encuentran entre los cinco serogrupos más prevalentes aislados en cepas productoras de bacteriemia en los tres años. Todos estos datos justifican la inclusión de los antígenos de los serogrupos O1 y O2 en la composición de las vacunas candidatas para prevenir las diversas infecciones de ExPEC. Como es el caso de las vacunas ExPEC4V y ExPEC10 en las cuales se incluyen entre los serotipos bioconjugados a O1 y O2. La vacuna ExPEC4V incluye en su composición a los serogrupos O1, O2, O6 y O25 mientras que la ExPEC10V añade a la composición otros 6 serogrupos que son el O4, O8, O15, O16, O18 y O75 (Lipworth et al., 2021). La composición de las vacunas ExPEC4V y ExPEC10V se justifica con los resultados obtenidos del seguimiento epidemiológico de cepas

causantes de infecciones extraintestinales a nivel global, hay que destacar que tanto el serogrupo O1 como O2 destacan encontrándose entre los 5 serogrupos más prevalentes en todos los estudios mencionados anteriormente.

Podemos concluir que, pese a que su prevalencia varíe temporal y geográficamente estos serogrupos siempre encabezan la lista de principales responsables de bacteriemias, ITUs y meningitis neonatal en todo el mundo y como acabamos de constatar también en Lugo.

8.1.3 PERFIL DE RESISTENCIA

Se ha determinado la susceptibilidad de todas las cepas frente a 21 agentes antimicrobianos. Entre las 53 cepas no se encontró ninguna productora de β -lactamasas de espectro extendido (ESBL), es decir cepas productoras de enzimas que confieren resistencia a las penicilinas, la mayoría de las cefalosporinas y monobactamas. No obstante, se encontraron un total de 6 cepas multirresistentes (MDR), la mitad de ellas pertenecientes al serogrupo O1 y la otra mitad al serogrupo O2.

La Tabla 9 resume los resultados obtenidos de los antibiogramas realizados en la colección completa (n=348). Es importante señalar que una gran parte de las cepas seleccionadas para este trabajo fueron sensibles a la mayoría de los antibióticos. Destacan las resistencias a la ampicilina y la piperacilina. Probablemente esto se deba a que son dos de los antibióticos de mayor antigüedad y más utilizados en clínica.

Tabla 9. Resistencia de las cepas *E. coli* de los serogrupos O1 y O2 (Lugo, 2020-2022).

Antimicrobianos	Número (%) de cepas <i>E.coli</i>		
	Total n=348	O1 n=20	O2 n=34
Ampicilina	197 (56,6)	7 (35)	11 (32,4)
Piperacilina	183 (52,6)	7 (35)	11 (32,4)
Piperacilina- Tazobactam	13 (3,7)	1 (5)	0
Amoxicilina-Clavulánico	63 (18,1)	1 (5)	3 (8,8)
Cefuroxima	39 (11,2)	0	2 (5,9)
Cefotaxima	24 (6,9)	0	0
Ceftazidima	17 (4,9)	0	0
Cefepime	26 (7,5)	0	0
Cefoxitin	7 (2,0)	0	1 (2,9)
Aztreonam	27 (7,8)	2 (10)	0
Gentamicina	47 (13,5)	0	1 (2,9)
Tobramicina	47 (13,5)	0	1 (2,9)
Ácido Nalidíxico	115 (33)	2 (10)	7 (20,6)
Ciprofloxacina	92 (26,4)	0	2 (5,9)
Levofloxacina	87 (25)	0	2 (5,9)
Trimethoprim-Sulfamethoxazol	121 (34,8)	3 (15)	4 (11,8)
Resistencia múltiple	105 (30,2)	3 (15)	3 (8,8)
Productoras de ESBL	24 (6,9)	0	0

^aNinguna de las 348 cepas analizadas fué resistente a los siguientes antimicrobianos: Imipenem, meropenem, ertapenem, amikacina y tigeciclina. ^bCuando los porcentajes son mayores del 20% figuran en negrilla.

Por lo tanto, se puede concluir que la resistencia a los antibióticos no es la razón principal del éxito de las cepas de los serogrupos O1 y O2. Como veremos en el próximo apartado los resultados de nuestro estudio apoyan la

idea de que el éxito de estas cepas se debe principalmente al elevado número de genes codificadores de factores de virulencia que poseen. A pesar de ello, es necesario seguir vigilando la sensibilidad a los antibióticos de ExPEC, tanto a escala local como mundial, para evaluar el impacto del uso de antibióticos en uno de los patógenos bacterianos humanos más importantes. No hay que descartar que la gran capacidad de adaptación de estas bacterias, que en un principio apenas muestran resistencia, podría permitirles en el futuro adquirir genes de resistencia dando lugar a cepas con un complejo perfil de virulencia que además no responden a la terapia antimicrobiana.

El consumo y abuso de los antibióticos, tanto en medicina humana como veterinaria, contribuye al desarrollo de resistencias adquiridas, lo cual representa un grave problema sanitario (Garrido Díez & Gervas, 2000). Por ello, es urgente realizar una política de administración de antimicrobianos adecuada.

8.1.1 PERFIL DE VIRULENCIA

Es interesante destacar que nuestros resultados refuerzan la hipótesis de la especial patogenicidad: que expone que las cepas patógenas de *E. coli* presentan factores de virulencia (FV) que las distinguen de las cepas comensales y las hacen potencialmente patógenas.

Es evidente que tanto las cepas del serogrupo O1 como las del serogrupo O2 poseen una amplísima variedad de genes de virulencia, presentando la mayoría de las cepas de estos serogrupos los status ExPEC y UPEC lo que acredita su elevado potencial de virulencia. Además, observamos que el estatus APEC asociado con el serogrupo O2 ($P=0,046$) (Tabla 10).

Tras analizar un total de 17 genes de virulencia observamos que en general, las cepas pertenecientes a los dos serogrupos incluidos en este estudio presentaron perfiles de virulencia semejantes. No obstante, tres genes (*sfa/focDE*, *hlyA* e *iroN*) presentaron una asociación estadísticamente significativa con las cepas del serogrupo O2.

Destacar la amplia representación de cepas con los genes *papC* y *papEF* que codifican las fimbrias P asociadas especialmente con cepas causantes de pielonefritis. Este tipo de infecciones pueden ocasionar también bacteriemias y por ello no sorprende que estos genes también sean muy frecuentes entre las cepas analizadas en este estudio. Las fimbrias Sfa/Foc también se han detectado en muchas de las cepas del serogrupo O2 que también resultaron positivas para los genes que codifican la fimbria P. Por lo tanto, una proporción significativa de las cepas O2 presentan a la vez dos importantes adhesinas que le permiten adherirse al epitelio urinario.

Los genes que codifican para sideróforos (*chuA*, *fyuA*, *iuCD*, *iuTA*) se encontraron en la mayoría de las cepas. Todos ellos participan en la captación de hierro, algo lógico ya que todos los aislados se obtuvieron de hemocultivos, donde los microorganismos deben competir con hemoproteínas humanas por la captación del hierro para su supervivencia y proliferación. El gen *hlyF*, toxina encargada de lisar a los glóbulos rojos y, por tanto, participa también en la captación de hierro y nutrientes de la sangre, fue hallado en el 100% de las cepas.

En 52 de las 53 cepas se encontró *ompT*, que codifica para una proteasa de membrana externa frecuentemente asociada con cepas responsables de infecciones del tracto urinario. Otro gen muy prevalente también fue el *yfcV*, relacionado con la uropatogenicidad, que codifica para una fimbria acompañante.

Entre los años 1989-1993 y 2010-2011, los serogrupos O1 y O2 estuvieron entre los grupos analizados en Lugo con un mayor rango de genes de virulencia (Mamani Huarani, 2015). El perfil de virulencia de ambos serogrupos está representado por un amplio y completo repertorio de genes codificantes de adhesinas, toxinas, sideróforos, cápsula tipo II y proteínas que aumentan la infectividad. Estas características son a las cuales se les atribuye el éxito de su gran prevalencia mundial.

Tabla 10. Genes de virulencia de las cepas pertenecientes a los serogrupos O1 y O2 (Lugo, 2020-2022).

	Número (%) de cepas <i>E.coli</i>			
	Total (n=53)	O1 (n=20)	O2 (n=33)	p-valor
Adhesinas				
<i>afa/draBC</i>	4	1 (5)	3 (9,1)	
<i>papC</i>	38	16 (80)	22 (66,7)	
<i>papEF</i>	37	15 (75)	22(66,7)	
<i>sfa/focDE</i>	15	1 (5)	14 (42,4)	0,004
<i>yfcV</i>	46	18 (90)	28 (84,8)	
Toxinas				
<i>hlyA</i>	11	0	11 (33,3)	0,004
<i>hlyF</i>	53	20 (100)	33 (100)	
<i>Tsh</i>	3	2 (10)	1 (3)	
<i>Vat</i>	38	14 (70)	24 (72,7)	
Sideróforos				
<i>chuA</i>	49	18 (90)	31 (93,9)	
<i>fyuA</i>	51	18 (90)	33 (100)	
<i>iroN</i>	35	9 (45)	26 (78,8)	0,017
<i>iucD</i>	32	12 (60)	20 (60,6)	
<i>iuTA</i>	40	15 (75)	25 (75,8)	
Cápsula				
<i>KpsM-II</i>	50	18 (90)	32 (97)	
Misceláneos				
<i>Iss</i>	23	9 (45)	14 (42,4)	
<i>ompT</i>	52	20 (100)	32 (97)	
Estatus ExPEC	46	17 (85)	29 (87,9)	
Estatus UPEC	48	18 (90)	30 (90,9)	
Estatus APEC	31	8 (40)	23 (69,7)	0,046

El valor de P fue obtenido mediante test de Fisher bilateral. Únicamente se muestran si son estadísticamente significativos (P<0,05).

8.1.3 GRUPOS FILOGENÉTICOS

El filogrupo B2 fue el más frecuente (79,2%) entre las 53 cepas incluidas en este estudio (Tabla 11). A este filogrupo pertenecieron el 60% de los aislados del serogrupo O1 y el 91% de las cepas O2. El segundo filogrupo más frecuente fue el F, al que pertenecen el 11,3% de las cepas analizadas. Este filogrupo fue especialmente prevalente entre las cepas del serogrupo O1 (25%). En cambio, apenas encontramos representación de los filogramos A, E u otros desconocidos (U), siendo nula la detección de cepas pertenecientes a los filogramos C y D.

Tabla 11. Pertenencia a los grupos filogenéticos de las cepas de los serogramos O1 y O2 (Lugo, 2020-2022).

Grupo filogenético	Número (%) de cepas de <i>E.coli</i>		
	Total (n=53)	O1 (n=20)	O2 (n=33)
A	1 (1,9)	0	1 (3)
B1	2 (3,8)	2 (10)	0
B2	42 (79,2)	12 (60)	30 (91)
C	0	0	0
D	0	0	0
E	1 (1,9)	0	1 (3)
F	6 (11,3)	5 (25)	1 (3)
U	1 (1,9)	1 (5)	0

Estudios realizados con cepas de *E. coli* de origen humano han puesto de manifiesto que las cepas comensales usualmente derivan de los grupos filogenéticos C, A y B1, mientras que la mayoría de las cepas ExPEC derivan de los grupos B2, F y D (Beghain et al., 2018; Clermont et al., 2019), concordando con los resultados obtenidos en nuestro estudio.

8.2 GRUPO CLONAL ST95

El 45,3% de las cepas analizadas en este estudio pertenecen a la ST95. Esta secuencia tipo se ha encontrado con mayor incidencia entre las cepas del serogrupo O1 (65%) que entre las del serogrupo O2 (33,3%) (Tabla 12).

Tabla 12. Distribución de las cepas ST95 por serogramos (Lugo, 2020-2022).

Secuencia tipo	Número (%) de cepas de <i>E.coli</i>		
	Total (n=53)	O1 (n=20)	O2 (n=33)
ST95	24 (45,3)	13 (65)	11 (33,3)

ST95 se encuentra entre los denominados linajes ExPEC pandémicos (Riley, 2014b). A este conjunto de linajes ExPEC pandémicos pertenecen los genotipos de *E. coli* ST10, ST69, ST73, ST95, ST127 y ST131, que representan más del 50% de las infecciones extraintestinales patógenas por *E. coli* a nivel mundial (Adams-Sapper et al., 2013; Kallonen et al., 2017).

Existen diversos estudios sobre la prevalencia de distintas ST de aislados de bacteriemia causadas por *E. coli*. Así, Adams-Sapper et al. (2013), analizando 220 aislados del torrente sanguíneo obtenidos en San Francisco entre 2007 y 2010, encontraron solo cinco ST prevalentes y complejos clonales, que representaban el 65% de los aislados. Se trataba de ST131 (23%), ST95 (18%), ST73 (8%), ST69 (9%) y ST12 (6%). Por su parte, Cole et al. (2019), estudiando 43 aislamientos de *E. coli* bacteriémicos de recién nacidos obtenidos entre 2006 y 2016 en Oklahoma, encontraron que ST95 era la ST más prevalente (11,3%), seguida de ST131 (9,2%) y ST1193 (3,7%). Cole et al., (2019) observaron que los aislados ST95 y ST131 estuvieron presentes durante todos los años estudiados, mientras que ST1193 solo se observó en los últimos años.

Fibke et al. (2019) analizaron el genoma de aislados de *E. coli* responsables de ITU en Canadá, en 385 mujeres entre 2012 y 2015. Los principales ST incluyeron ST95 (18,4%), ST73 (10,1%), ST127 (9,1%), ST131 (8,8%) y ST69 (7,5%). En otros estudios realizados por Banerjee et al. (2013) en EE.UU., estudiaron 299 aislados clínicos extraintestinales de *E. coli* (90% procedentes de ITU) obtenidos durante 2011 en Minnesota, e identificaron los cinco ST más prevalentes, que fueron ST131 (27%), ST95 (11%), ST73 (8%), ST127 (6%) y ST69 (5%). Por su parte, Yamaji et al., (2018), que estudiaron 233 *E. coli* aislados de ITU en California durante 2016 y 2017, y 225 aislados recogidos de forma similar entre 1999 y 2000, mostraron que los aislados ST131 se identificaron con menor frecuencia que los ST95, ST127, ST73 y ST69 en estos dos periodos.

En cuanto al perfil de resistencia. Cabe destacar que la gran mayoría de las cepas de nuestra colección que presentaban resistencias a antimicrobianos pertenecían a ST95. De las seis cepas multirresistentes encontradas, cinco pertenecen a esta secuencia tipo. Pese a ello, sigue siendo un número bajo de aislados MDR en comparación con otros linajes ExPEC predominantes (Tabla 13).

En un estudio realizado por Yamaji et al. en 2018 analizaron las resistencias adquiridas a diversos antimicrobianos (ampicilina, trimetoprima-sulfametoxazol y ciprofloxacina) en cepas pertenecientes a la secuencia tipo ST95 y otros linajes dominantes durante dos periodos de tiempo. En dicho estudio, ST95 pese a ser la secuencia tipo más prevalente en ambos cribados, resultó ser el grupo que menos resistencia a los antibióticos mostraba de entre todos los linajes. Además, tampoco presentaron capacidad de producción de ningún tipo de betalactamasas de espectro extendido. De entre los tres antimicrobianos enfrentados a ST95 con una diferencia de tiempo de 17 años, únicamente aumentó la resistencia a la ampicilina del 2,9% al 20,5%.

En otro estudio realizado en 2016 por Flament-Simon et al. (2020) se describe a ST95 como uno de los grupos clonales con menor número de MDR entre una amplia variedad de cepas de *E. coli* aisladas de infecciones extraintestinales causadas en pacientes procedentes de Lugo y de París lo cual coincide con los resultados obtenidos en este trabajo.

Sin embargo, la comunidad investigadora señala que existen un incremento alarmante de cepas de *E. coli* MDR. Otras secuencias tipo como ST131 son bien reconocidas como MDR y están ampliamente extendidas por el mundo (Petty et al., 2014; Rogers et al., 2011) . Pese a ello, llama la atención como estas secuencias tipo multirresistentes no logran desplazar a ST95, ya que la frecuencia con la que las cepas ST95 son responsables de infecciones extraintestinales parece haberse mantenido estable durante los últimos 15 años a nivel mundial (Flament-Simon et al., 2020; Gordon et al., 2017a).

Tabla 13. Resistencias de las cepas ST95 y de otras secuencias tipo (Lugo, 2020-2022).

Antimicrobianos	Número (%) de cepas	
	ST95 (n=24)	No ST95 (n=29)
Ampicilina	11 (45,8)	7 (24,1)
Piperacilina	7 (29,2)	11 (37,9)
Piperacilina- Tazobactam	1 (4,2)	0
Amoxicilina-Clavulánico	2 (8,3)	2 (6,9)
Cefuroxima	0	2 (6,9)
Cefotaxima	0	0
Ceftazidima	0	0
Cefepime	0	0
Cefoxitin	1 (4,2)	0
Aztreonam	0	2 (6,9)
Gentamicina	1 (4,2)	0
Tobramicina	1 (4,2)	0
Ácido Nalidíxico	9 (37,5)	0
Ciprofloxacina	2 (8,3)	0
Levofloxacina	0	2 (6,9)
Trimethoprim-Sulfamethoxazol	5 (20,8)	2 (6,9)
Resistencia múltiple	3 (12,5)	3 (10,3)
Productoras de ESBL	0	0

Con todo, se puede concluir que la resistencia a los antibióticos no es el mecanismo responsable del éxito evolutivo del grupo clonal ST95, secuencia tipo que se encuentra entre las más prevalentes a nivel global. Numerosas investigaciones apoyan que el dominio comunitario de este clon pueda deberse a su aptitud biológica intrínseca junto a otros factores epidemiológicos que contribuyen a su difusión global (Yamaji et al., 2018).

Por otra parte, analizamos la presencia de 17 genes que codifican para factores de virulencia típicos de cepas ExPEC, tres de estos genes de virulencia (*papC*, *papEF*, *iss*) fueron asociados de manera estadísticamente significativa con las cepas ST95 y dos con las cepas de otras secuencias tipo (*sfa/focDE*, *hlyA*) (Tabla 14).

Además, las cepas ST95 se asociaron significativamente con el estatus ExPEC, ya que las 24 cepas de esta secuencia tipo cumplían los requisitos de esta clasificación frente al 75,9% de las de otras secuencias tipo. Asimismo, cerca de la totalidad de las cepas ST95 alcanzaron el estatus UPEC (95,8%) y el 70,8% el estatus APEC (Tabla 14). Los porcentajes de cepas no ST95 con el estatus UPEC (80,2%) y APEC (48,3%) fueron bastante inferiores, pero las diferencias no son estadísticamente significativas. Precisamente, en la literatura, a menudo se asocian estos patotipos con las cepas ST95 (Flament-Simon et al., 2020; Gordon et al., 2017a).

Tabla 14. Genes virulencia y estatus de las cepas ST95 y de otras secuencias tipo (Lugo, 2020-2022).

Genes de virulencia	Número (%) de cepas <i>E. coli</i>		
	ST95 (n=24)	No ST95 (n=29)	P-valor
Adhesinas			
<i>afa/draBC</i>	1 (4,2)	3 (10,3)	
<i>papC</i>	24 (100)	14 (48,3)	<0,001
<i>papEF</i>	22 (91,7)	15 (51,7)	0,002
<i>sfa/focDE</i>	1 (4,2)	14 (48,3)	<0,001
<i>yfcV</i>	22 (91,7)	24 (82,8)	
Toxinas			
<i>hlyA</i>	1 (4,2)	10 (34,5)	0,008
<i>hlyF</i>	24 (100)	29 (100)	
<i>tsh</i>	3 (12,5)	0	
<i>vat</i>	20 (83,3)	18 (60,1)	
Sideroforos			
<i>chuA</i>	24 (100)	25 (86,2)	
<i>fyuA</i>	24 (100)	27 (93,1)	
<i>iroN</i>	18 (75)	17 (58,6)	
<i>iucD</i>	18 (75)	14 (48,3)	
<i>iuTA</i>	19 (79,2)	21 (72,4)	
Cápsula			
<i>KpsM-II</i>	23 (95,8)	27 (93,1)	
Misceláneos			
<i>iss</i>	17 (70,8)	6 (20,6)	<0,001
<i>ompT</i>	23 (95,8)	29 (100)	
Estatus ExPEC	24 (100)	22 (75,9)	0,012
Estatus UPEC	23 (95,8)	25 (80,2)	
Estatus APEC	17 (70,8)	14 (48,3)	

El valor de P fue obtenido mediante la prueba exacta de Fisher bilateral. Únicamente se muestran si son estadísticamente significativos ($P \leq 0,05$)

En un estudio anterior, realizado en 2016 en Lugo (Flament-Simon et al., 2020), ST95 resultó ser una de las secuencias tipo más frecuentes (6%) entre cepas causantes de diferentes tipos de infecciones extraintestinales, mostrando un perfil de virulencia muy similar al encontrado en este trabajo.

En este trabajo hemos encontrado una asociación positiva entre varios de los genes de virulencia analizados y ST95. Por ejemplo, *papC* o *papEF*, genes que además han sido a menudo asociados con pielonefritis (Vigil, Alteri, et al., 2011). Sin embargo, para *sfa/focDE*, que codifica para una fimbria asociada con pielonefritis, obtuvimos

una correlación negativa ($p < 0,001$) (Tarchouna et al., 2013). Por otra parte, el gen *Iss*, que codifica para una proteína de resistencia al sistema del complemento que consigue aumentar la supervivencia sérica, también se asoció significativamente con ST95 ($p < 0,001$) (Nolan et al., 2003). En el estudio realizado por Flament-Simon et al. (2020) analizaron la media de genes de virulencia detectados en cepas aisladas de infecciones extraintestinales pertenecientes a distintas secuencias tipo, encontrando que la media de las cepas ST95 era de las más elevadas. Esto podría explicar la exitosa expansión de ST95 pese a su gran sensibilidad a los distintos antibióticos.

En cuanto a la determinación de los grupos filogenéticos, observamos que tanto si pertenecen al serogrupo O1 como O2, la inmensa mayoría de las cepas de ST95 se engloban en el grupo filogenético B2 (Tabla 15).

Tabla 15. Análisis filogenético de las cepas pertenecientes a ST95 (Lugo, 2020-2022).

Grupo filogenético	Número (%) de cepas <i>E.coli</i>		
	Total ST95 (n=24)	O1- ST95 (n=13)	O2-ST95 (n=11)
A	0	0	0
B1	0	0	0
B2	21 (87,5)	11 (84,6)	10 (90,9)
C	0	0	0
D	0	0	0
E	0	0	0
F	2 (8,3)	1 (7,7)	1 (9,1)
U	1 (4,2)	1 (7,7)	0

En general, una gran parte de las cepas de ST95 pertenecen al grupo filogenético B2, al igual que la mayoría de aislados de *E. coli* responsables de patologías extraintestinales, como han demostrado diversos estudios (Flament-Simon et al., 2020; Gordon et al., 2017a; Xia et al., 2022). Esta relación se ve reflejada en nuestros resultados, donde 21 de las 24 cepas ST95 pertenecen al grupo filogenético B2; seguido de lejos del filogrupo F, también a menudo asociado con ExPEC.

Tras realizar la PCR descrita por Gordon et al. (2017a) para clasificar los distintos aislados del complejo clonal ST95 dentro de distintos subgrupos obtuvimos los resultados mostrados en la Tabla 16.

Observamos que la mayoría de las cepas ST95 del serogrupo O1 pertenecían a los subgrupos A, C y D, mientras que la mayoría de las cepas del serogrupo O2 se englobaban en el subgrupo E, estando estadísticamente asociado el subgrupo D a las cepas O1 y el subgrupo E a las cepas O2. Nuestros resultados están en la línea de los obtenidos en estudios previos (Gordon et al., 2017a).

Tabla 16. Distribución de las cepas de ST95 en los distintos subgrupos

Complejo clonal 95, subgrupos	Número (%) de cepas <i>E.coli</i>			
	ST95 (n=24)	O1-ST95 (n=13)	O2-ST95 (n=11)	p-valor
Subgrupo A	5 (20,8)	4 (30,8)	1 (9,1)	
Subgrupo B	0	0	0	
Subgrupo C*	7 (29,2)	5 (38,5)	2 (18,2)	
Subgrupo D*	7 (29,2)	7 (53,8)	0	0,0059
Subgrupo E	8 (33,3)	0	8 (72,7)	0,0002

*tres de las cepas ST95 fueron positivos tanto para el subgrupo C como D

Con el fin de conocer mejor la estructura clonal de las cepas ST95 realizamos la secuenciación del alelo *fimH* de las cepas positivas para el gen *svg* (Gordon et al., 2017a):

- Nuestras cinco cepas pertenecientes al subgrupo A presentaron *fimH41*, variante alélica típicamente asociada a ese subgrupo.
- Cuatro de las siete cepas asignadas al subgrupo C presentaron la variante alélica típica correspondiente, *fimH27*. De las tres cepas restantes de este subgrupo, dos, también positivas para el gen *gpD*, presentaron el *fimH30* típica del subgrupo D. Por último, una única cepa presentó la secuencia *fimH3251* no descrita anteriormente como representativa de este subgrupo.
- De las siete cepas positivas para el subgrupo D, cinco presentaron el *fimH30* característico dicho grupo. Una de ellas, que presentó tanto el gen *gpC* como *gpD* en la PCR, exhibió el gen *fimH27* relacionado con el subgrupo C.
- Del subgrupo E tres de las ocho cepas mostraron el *fimH27* característico del grupo y un total de cuatro el *fimH2431*, no calificado como peculiar de este subgrupo. El restante presentó el *fimH32*.

A la vista de estos resultados realizamos un árbol UPGMA seleccionando una cepa representante de cada alel *fimH* (Ilustración 2). Con este método se agrupan las secuencias con menor distancia filogenética.

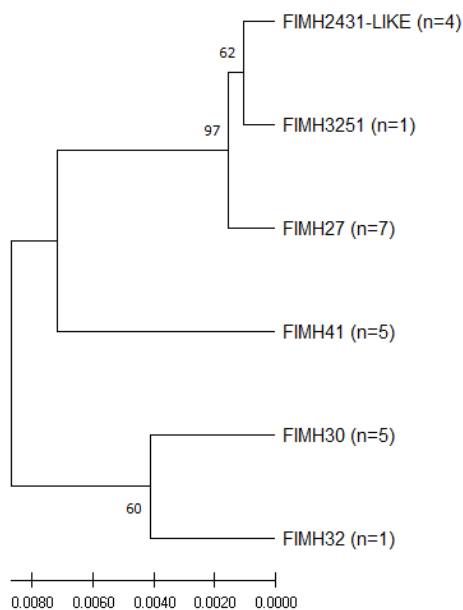


Ilustración 2. Distribución de los alelos *fimH* de 23 cepas ST95. Este árbol fue realizado en MEGA 11. Método estadístico UPGMA (método Bootstrap).

Atendiendo a la abundancia relativa de estos subgrupos en colecciones de aislados ST95 provenientes de hemocultivos de Australia y Francia, observamos que efectivamente la distribución de los subgrupos difiere geográficamente (Gordon et al., 2017a).

En nuestro estudio 17 (70,8) de las 24 cepas ST95 de los serogrupos O1 y O2 presentaron el estatus APEC pudiendo por lo tanto un posible potencial zoonótico. Recientemente, varios estudios epidemiológicos han dado como resultado informes de que la *E. coli* uropatógena puede transmitirse a través de productos alimenticios contaminados (J. R. Johnson, Delavari, et al., 2005; T. J. Johnson et al., 2009; Manges et al., 2015). Al igual que los patógenos entéricos de *E. coli*, las cepas ExPEC también pueden colonizar el intestino antes de causar enfermedades como ITU y BSI (Riley, 2014a).

Durante mucho tiempo ha existido especulación sobre el origen alimentario de las cepas patógenas extraintestinales de *E. coli*. Aunque se ha asumido ampliamente que la mayoría de las cepas de APEC no poseen potencial zoonótico, estudios recientes sugieren los APEC (particularmente los aislados que pertenecen a los tipos de secuencia ST95 y ST131 o a los serogrupos O1, O2 y O18 como posibles patógenos zoonóticos transmitidos por los alimentos, así como un reservorio de infecciones extraintestinales en humanos (Bélanger et al., 2011; Liu et al., 2018; Markland et al., 2015; Mellata, 2013). En particular, APEC comparte similitud genética tanto como con UPEC como con NMEC y posee genes de virulencia que definen a estos dos patotipos con la capacidad de causar infecciones del tracto urinario (ITU) y meningitis en modelos de ratones y ratas (Mellata, 2013; Tivendale et al., 2010). Además, la detección de plásmidos colicina V específicos de APEC en aislados de ExPEC humanos sugiere una posible transmisión zoonótica de APEC de aves de corral a humanos (Liu et al., 2018; Tivendale et al., 2010).

Si bien existen datos que apoyan la idea de que dichas cepas pueden representar una amenaza para la salud humana y animal, se requiere más trabajo para determinar el verdadero potencial zoonótico de estas cepas (T. J. Johnson, Wannemuehler, Johnson, et al., 2008).

9. CONCLUSIONES

1. Los serogrupos O1 y O2 se encuentran entre los TOP5 más frecuentes entre las cepas de *E. coli* bacteriémicos de nuestra área sanitaria, estando por lo tanto totalmente justificada su inclusión en una vacuna contra las cepas ExPEC.
2. El éxito de las cepas de estos dos serogrupos posiblemente es debido al gran arsenal de genes de virulencia a poseen, presentando la gran mayoría los estatus ExPEC y UPEC.
3. Al ser la mayoría susceptibles a numerosos antimicrobianos se descarta que la resistencia a los antibióticos contribuya a su éxito expansivo.
4. La secuencia tipo ST95 asociada con el grupo filogenético B2 es la más extendida en nuestro estudio como ocurre a nivel mundial.
5. Dentro de las cepas ST95 se observa una amplia variedad clones asociados con diferentes alelos *fimH*, estando asociado el subgrupo genético D con las cepas del serogrupo O1 y el subgrupo genético E con las cepas del serogrupo O2.
6. Es posible que algunas de las cepas ST95 de los serogrupos O1 y O2 con el estatus APEC posean potencial zoonótico.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Adams-Sapper, S., Diep, B. A., Perdreau-Remington, F., & Riley, L. W. (2013). Clonal composition and community clustering of drug-susceptible and -resistant *Escherichia coli* isolates from bloodstream infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(1), 490–497.
<https://doi.org/10.1128/AAC.01025-12>
- Balado Dacosta, Miguel. (2009). *Caracterización de un nuevo sistema de asimilación de hierro mediante sideróforos en "Vibrio anguillarum."*
<https://minerva.usc.es/xmlui/handle/10347/2575>
- Banerjee, R., Johnston, B., Lohse, C., Chattopadhyay, S., Tchesnokova, V., Sokurenko, E. V., & Johnson, J. R. (2013). The clonal distribution and diversity of extraintestinal *Escherichia coli* isolates vary according to patient characteristics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(12), 5912–5917.
<https://doi.org/10.1128/AAC.01065-13>
- Barnich, N., & Darfeuille-Michaud, A. (2007). Adherent-invasive *Escherichia coli* and Crohn's disease. *Current Opinion in Gastroenterology*, 23(1), 16–20.
<https://doi.org/10.1097/MOG.0B013E3280105A38>
- Beghain, J., Bridier-Nahmias, A., Nagard, H. Le, Denamur, E., & Clermont, O. (2018). ClermonTyping: an easy-to-use and accurate in silico method for *Escherichia* genus strain phylotyping. *Microbial Genomics*, 4(7).
<https://doi.org/10.1099/MGEN.0.000192>
- Bélanger, L., Garenaux, A., Harel, J., Boulianne, M., Nadeau, E., & Dozois, C. M. (2011). *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 62(1), 1–10.
<https://doi.org/10.1111/J.1574-695X.2011.00797.X>
- Ben Zakour, N. L., Alsheikh-Hussain, A. S., Ashcroft, M. M., Khanh Nhu, N. T., Roberts, L. W., Stanton-Cook, M., Schembri, M. A., & Beatson, S. A. (2016). Sequential Acquisition of Virulence and Fluoroquinolone Resistance Has Shaped the Evolution of *Escherichia coli* ST131. *MBio*, 7(2).
<https://doi.org/10.1128/MBIO.00347-16>
- Bidet, P., Mahjoub-Messai, F., Blanco, J., Blanco, J., Dehem, M., Aujard, Y., Bingen, E., & Bonacorsi, S. (2007). Combined multilocus sequence typing and O serogrouping distinguishes *Escherichia coli* subtypes associated with infant urosepsis and/or meningitis. *The Journal of Infectious Diseases*, 196(2), 297–303.
<https://doi.org/10.1086/518897>
- Blanco, J., Blanco, J. E., Alonso, M. P., Blanco, M., Garabal, J. I., Gonzalez, E. A., Blanco, J., Blanco, J. E., Alonso, M. P., Blanco, M., Garabal, J. I., & Gonzalez, E. A. (1992). FACTORES DE VIRULENCIA DE *ESCHERICHIA COLI* CAUSANTES DE PERITONITIS, APENDICITIS Y OTRAS INFECCIONES EXTRAINTESTINALES. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 10(7), 393–398.
- Blanco, M., Blanco, J. E., Alonso, M. P., & Blanco, J. (1996). Virulence factors and O groups of *Escherichia coli* isolates from patients with acute pyelonephritis, cystitis and asymptomatic bacteriuria. *European Journal of Epidemiology*, 12(2), 191–198.
<https://doi.org/10.1007/BF00145506>
- Blanco, M., Blanco, J. E., Alonso, M. P., Mora, A., Balsalobre, C., Muñoa, F., Juárez, A., & Blanco, J. (1997). Detection of pap, sfa and afa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains:

- Relationship with expression of adhesins and production of toxins. *Research in Microbiology*, 148(9), 745–755. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(97\)82450-3](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(97)82450-3)
- Blum-Oehler, G., Heesemann, J., Kranzfelder, D., Scheutz, F., & Hacker, J. (1997). Characterization of *Escherichia coli* serotype O12:K1:H7 isolates from an immunocompetent carrier with a history of spontaneous abortion and septicemia. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 16(2), 153–155. <https://doi.org/10.1007/BF01709475>
- Bonacorsi, S., Clermont, O., Houdouin, V., Cordevant, C., Brahimi, N., Marecat, A., Tinsley, C., Nassif, X., Lange, M., & Bingen, E. (2003). Molecular analysis and experimental virulence of French and North American *Escherichia coli* neonatal meningitis isolates: identification of a new virulent clone. *The Journal of Infectious Diseases*, 187(12), 1895–1906. <https://doi.org/10.1086/375347>
- Bundy, L. M., Rajnik, M., & Noor, A. (2023). *Neonatal Meningitis*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532264/>
- Chaudhuri, R. R., & Henderson, I. R. (2012). The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 12(2), 214–226. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2012.01.005>
- Clermont, O., Bonacorsi, S., & Bingen, E. (2000a). 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., Bonacorsi, S., & Bingen, E. (2000b). 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., Denamur, E., & Gordon, D. M. (2013a). 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., Christenson, J. K., Denamur, E., & Gordon, D. M. (2013b). 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., Gordon, D. M., Brisse, S., Walk, S. T., & Denamur, E. (2011). Characterization of the cryptic *Escherichia* lineages: rapid identification and prevalence. *Environmental Microbiology*, 13(9), 2468–2477. <https://doi.org/10.1111/J.1462-2920.2011.02519.X>
- Clermont, O., Lescat, M., O'Brien, C. L., Gordon, D. M., Tenailon, O., & Denamur, E. (2008). Evidence for a human-specific *Escherichia coli* clone. *Environmental Microbiology*, 10(4), 1000–1006. <https://doi.org/10.1111/J.1462-2920.2007.01520.X>

- Cole, B. K., Ilikj, M., McCloskey, C. B., & Chavez-Bueno, S. (2019). Antibiotic resistance and molecular characterization of bacteremia *Escherichia coli* isolates from newborns in the United States. *PLoS One*, *14*(7).
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0219352>
- Conover, M. S., Ruer, S., Taganna, J., Kalas, V., De Greve, H., Pinkner, J. S., Dodson, K. W., Remaut, H., & Hultgren, S. J. (2016). Inflammation-Induced Adhesin-Receptor Interaction Provides a Fitness Advantage to Uropathogenic *E. coli* during Chronic Infection. *Cell Host & Microbe*, *20*(4), 482–492.
<https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2016.08.013>
- Dahbi Zbiti, G. (2015). *Epidemiología molecular y virulencia de cepas de Escherichia coli del grupo clonal ST131: comparación de los subclones O16:H5 H41 y O25b:H4 H30/H30-Rx*. <http://hdl.handle.net/10347/13771>
- Dale, A. P., & Woodford, N. (2015). Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): Disease, carriage and clones. *The Journal of Infection*, *71*(6), 615–626.
<https://doi.org/10.1016/J.JINF.2015.09.009>
- Dias, R. C. S., Marangoni, D. V., Smith, S. P., Alves, E. M., Pellegrino, F. L. P. C., Riley, L. W., & Moreira, B. M. (2009). Clonal composition of *Escherichia coli* causing community-acquired urinary tract infections in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, *15*(4), 303–308.
<https://doi.org/10.1089/MDR.2009.0067>
- 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>
 ASSET/66B7737E-B947-4B16-A6CF-CA5B0F4AD874/ASSETS/GRAPHIC/II0701936004.JPEG
- Duprilot, M., Baron, A., Blanquart, F., Dion, S., Lettéron, P., Flament-Simon, S.-C., Clermont, O., Denamur, E., & Nicolas-Chanoine, M.-H. (2019). Success of *Escherichia coli* O25b:H4 ST131 clade C associated with a decrease in virulence. *BioRxiv*, 786350.
<https://doi.org/10.1101/786350>
- Escobar-Páramo, P., Clermont, O., Blanc-Potard, A. B., Bui, H., Le Bouguéneq, C., & Denamur, E. (2004). 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>
- Etymologia: *Escherichia coli*. (2015). *Emerging Infectious Diseases*, *21*(8), 1310.
<https://doi.org/10.3201/EID2108.ET2108>
- Fang, L., Nowicki, B. J., Urvil, P., Goluszko, P., Nowicki, S., Young, S. L., & Yallampalli, C. (2004). Epithelial invasion by *Escherichia coli* bearing Dr fimbriae is controlled by nitric oxide-regulated expression of CD55. *Infection and Immunity*, *72*(5), 2907–2914.
<https://doi.org/10.1128/IAI.72.5.2907-2914.2004>
- Fibke, C. D., Croxen, M. A., Geum, H. M., Glass, M., Wong, E., Avery, B. P., Daignault, D., Mulvey, M. R., Reid-Smith, R. J., Parmley, E. J., Portt, A., Boerlin, P., & Manges, A. R. (2019). Genomic Epidemiology of Major Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Lineages Causing Urinary Tract Infections in Young Women Across Canada. *Open Forum Infectious Diseases*, *6*(11).
<https://doi.org/10.1093/OFID/OFZ431>
- Flament Simon, S. C. (2021). *Molecular Characterization of Extended-Spectrum beta-*

- Lactamase-Producing Escherichia coli and Clones Causing Extraintestinal Infections in Humans. Animals as Reservoir of High-Risk E. coli Clones Pathogenic for Humans.*
<http://hdl.handle.net/10347/26039>
- Flament-Simon, S. C., Nicolas-Chanoine, M. H., García, V., Duprilot, M., Mayer, N., Alonso, M. P., García-Meniño, I., Blanco, J. E., Blanco, M., & Blanco, J. (2020). Clonal Structure, Virulence Factor-encoding Genes and Antibiotic Resistance of *Escherichia coli*, Causing Urinary Tract Infections and Other Extraintestinal Infections in Humans in Spain and France during 2016. *Antibiotics*, *9*(4).
<https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS9040161>
- Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature Reviews. Microbiology*, *13*(5), 269–284.
<https://doi.org/10.1038/NRMICRO3432>
- Fratamico, P. M., DebRoy, C., Liu, Y., Needleman, D. S., Baranzoni, G. M., & Feng, P. (2016). Advances in Molecular Serotyping and Subtyping of *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, *7*(MAY).
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.00644>
- Funahara, Y., & Nikaido, H. (1980). Asymmetric localization of lipopolysaccharides on the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, *141*(3), 1463–1465.
<https://doi.org/10.1128/JB.141.3.1463-1465.1980>
- Garénaux, A., Caza, M., & Dozois, C. M. (2011). The Ins and Outs of siderophore mediated iron uptake by extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology*, *153*(1–2), 89–98.
<https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2011.05.023>
- Garrido Díez, A. J., & Gervas, J. (2000). La resistencia a los antibióticos: un problema de salud pública. *Atencion Primaria*, *26*(9), 649.
[https://doi.org/10.1016/S0212-6567\(00\)78742-7](https://doi.org/10.1016/S0212-6567(00)78742-7)
- Geurtsen, J., de Been, M., Weerdenburg, E., Zomer, A., McNally, A., & Poolman, J. (2022). Genomics and pathotypes of the many faces of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Reviews*, *46*(6).
<https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUAC031>
- Goluszko, P., Moseley, S. L., Truong, L. D., Kaul, A., Williford, J. R., Selvarangan, R., Nowicki, S., & Nowicki, B. (1997). Development of experimental model of chronic pyelonephritis with *Escherichia coli* O75:K5:H-bearing Dr fimbriae: mutation in the dra region prevented tubulointerstitial nephritis. *The Journal of Clinical Investigation*, *99*(7), 1662–1672.
<https://doi.org/10.1172/JCI119329>
- Gómez-Duarte, O. G. (2014). Enfermedad diarreica aguda por *Escherichia coli* patógenas en Colombia. *Revista Chilena de Infectología : Organo Oficial de La Sociedad Chilena de Infectología*, *31*(5), 577.
<https://doi.org/10.4067/S0716-10182014000500010>
- Gordon, D. M., & Cowling, A. (2003). The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology (Reading, England)*, *149*(Pt 12), 3575–3586.
<https://doi.org/10.1099/MIC.0.26486-0>
- Gordon, D. M., Geyik, S., Clermont, O., O'Brien, C. L., Huang, S., Abayasekara, C., Rajesh, A., Kennedy, K., Collignon, P., Pavli, P., Rodriguez, C., Johnston, B. D., Johnson, J. R., Decousser, J.-W., & Denamur, E. (2017a). Fine-Scale Structure Analysis Shows Epidemic Patterns of Clonal Complex 95, a Cosmopolitan *Escherichia coli* Lineage Responsible for Extraintestinal Infection. *MSphere*, *2*(3).
<https://doi.org/10.1128/MSPHERE.00168-17>
- Gordon, D. M., Geyik, S., Clermont, O., O'Brien, C. L., Huang, S., Abayasekara, C., Rajesh, A., Kennedy, K., Collignon, P., Pavli, P.,

- Rodriguez, C., Johnston, B. D., Johnson, J. R., Decousser, J.-W., & Denamur, E. (2017b). Fine-Scale Structure Analysis Shows Epidemic Patterns of Clonal Complex 95, a Cosmopolitan *Escherichia coli* Lineage Responsible for Extraintestinal Infection. *MSphere*, 2(3).
<https://doi.org/10.1128/MSPHERE.00168-17>
- 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>
- Hannan, T. J., Totsika, M., Mansfield, K. J., Moore, K. H., Schembri, M. A., & Hultgren, S. J. (2012a). Host-pathogen checkpoints and population bottlenecks in persistent and intracellular uropathogenic *Escherichia coli* bladder infection. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(3), 616–648.
<https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2012.00339.X>
- Hannan, T. J., Totsika, M., Mansfield, K. J., Moore, K. H., Schembri, M. A., & Hultgren, S. J. (2012b). Host-pathogen checkpoints and population bottlenecks in persistent and intracellular uropathogenic *Escherichia coli* bladder infection. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(3), 616–648.
<https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2012.00339.X>
- Harvill, E. T., Preston, A., Cotter, P. A., Allen, A. G., Maskell, D. J., & Miller, J. F. (2000). Multiple Roles for *Bordetella* Lipopolysaccharide Molecules during Respiratory Tract Infection. *Infection and Immunity*, 68(12), 6720.
<https://doi.org/10.1128/IAI.68.12.6720-6728.2000>
- Jarlier, V., Nicolas, M. H., Fournier, G., & Philippon, A. (1988). Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Reviews of Infectious Diseases*, 10(4), 867–878.
<https://doi.org/10.1093/CLINIDS/10.4.867>
- Jauregui, F., Landraud, L., Passet, V., Diancourt, L., Frapy, E., Guigon, G., Carbone, 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.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-560>
- Joensen, K. G., Tetzschner, A. M. M., Iguchi, A., Aarestrup, F. M., & Scheut, F. (2015). Rapid and Easy In Silico Serotyping of *Escherichia coli* Isolates by Use of Whole-Genome Sequencing Data. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(8), 2410–2426.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00008-15>
- Johnson, J. R., Delavari, P., O'Bryan, T. T., Smith, K. E., & Tatini, S. (2005). Contamination of retail foods, particularly turkey, from community markets (Minnesota, 1999–2000) with antimicrobial-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2(1), 38–49.
<https://doi.org/10.1089/FPD.2005.2.38>
- Johnson, J. R., Gajewski, A., Lesse, A. J., & Russo, T. A. (2003). Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* as a Cause of Invasive Nonurinary Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(12), 5798.
<https://doi.org/10.1128/JCM.41.12.5798-5802.2003>
- Johnson, J. R., Kaster, N., Kuskowski, M. A., & Ling, G. V. (2003). Identification of urovirulence traits in *Escherichia coli* by comparison of urinary and rectal *E. coli* isolates from dogs with urinary tract infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1), 337–345.
<https://doi.org/10.1128/JCM.41.1.337-345.2003>
- Johnson, J. R., Menard, M., Johnston, B., Kuskowski, M. A., Nichol, K., & Zhanel, G. G. (2009). Epidemic Clonal Groups of *Escherichia coli* as a Cause of Antimicrobial-

- Resistant Urinary Tract Infections in Canada, 2002 to 2004. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(7), 2733.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00297-09>
- Johnson, J. 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, J. R., Russo, T. A., Tarr, P. I., Carlino, U., Bilge, S. S., Vary, J. C., & Stell, A. L. (2000). Molecular Epidemiological and Phylogenetic Associations of Two Novel Putative Virulence Genes, *iha* and *iroNE*, 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, J. R., Scheutz, F., Ulleryd, P., Kuskowski, M. A., O'Bryan, T. T., & Sandberg, T. (2005a). Host-pathogen relationships among *Escherichia coli* isolates recovered from men with febrile urinary tract infection. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 40(6), 813–822.
<https://doi.org/10.1086/428048>
- Johnson, J. R., Scheutz, F., Ulleryd, P., Kuskowski, M. A., O'Bryan, T. T., & Sandberg, T. (2005b). Phylogenetic and pathotypic comparison of concurrent urine and rectal *Escherichia coli* isolates from men with febrile urinary tract infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(8), 3895–3900.
<https://doi.org/10.1128/JCM.43.8.3895-3900.2005>
- 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., & Stell, A. L. (2000). 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, J. R., Stell, A. L., Scheutz, F., O'Bryan, T. T., Russo, T. A., Carlino, U. B., Fasching, C., Kavle, J., Van Dijk, L., & Gaastra, W. (2000). Analysis of the F antigen-specific papA alleles of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* using a novel multiplex PCR-based assay. *Infection and Immunity*, 68(3), 1587–1599.
<https://doi.org/10.1128/IAI.68.3.1587-1599.2000>
- Johnson, T. J., Logue, C. M., Wannemuehler, Y., Kariyawasam, S., Doetkott, C., Debroy, C., White, D. G., & Nolan, L. K. (2009). Examination of the source and extended virulence genotypes of *Escherichia coli* contaminating retail poultry meat. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(6), 657–667.
<https://doi.org/10.1089/FPD.2009.0266>
- Johnson, T. J., Wannemuehler, Y., Johnson, S. J., Stell, A. L., Doetkott, C., Johnson, J. R., Kim, K. S., Spanjaard, L., & Nolan, L. K. (2008). Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(22), 7043–7050.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01395-08>
- Johnson, T. J., Wannemuehler, Y. M., & Nolan, L. K. (2008). Evolution of the *iss* gene in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), 2360–2369.
https://doi.org/10.1128/AEM.02634-07/SUPPL_FILE/SUPPLEMENTARY_TABLE_1.XLS

- Jørgensen, S. L., Stegger, M., Kudirkiene, E., Lilje, B., Poulsen, L. L., Ronco, T., Pires Dos Santos, T., Kiil, K., Bisgaard, M., Pedersen, K., Nolan, L. K., Price, L. B., Olsen, R. H., Andersen, P. S., & Christensen, H. (2019). Diversity and Population Overlap between Avian and Human *Escherichia coli* Belonging to Sequence Type 95. *MSphere*, *4*(1). <https://doi.org/10.1128/MSPHERE.00333-18>
- Juhas, M., Van Der Meer, J. R., Gaillard, M., Harding, R. M., Hood, D. W., & Crook, D. W. (2009). Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, *33*(2), 376–393. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2008.00136.X>
- 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>
- Kanamaru, S., Kurazono, H., Ishitoya, S., Terai, A., Habuchi, T., Nakano, M., Ogawa, O., & Yamamoto, S. (2003). Distribution and genetic association of putative uropathogenic virulence factors *iroN*, *iha*, *kpsMT*, *ompT* and *usp* in *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in Japan. *The Journal of Urology*, *170*(6 Pt 1), 2490–2493. <https://doi.org/10.1097/01.JU.0000094185.48467.DC>
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews. Microbiology*, *2*(2), 123–140. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO818>
- Kita, H., & Nikaido, H. (1973). Structure of Cell Wall Lipopolysaccharide from *Salmonella typhimurium* IV. Anomeric Configuration of l-Rhamnose Residues and Its Taxonomic Implications. *Journal of Bacteriology*, *113*(2), 672. <https://doi.org/10.1128/JB.113.2.672-679.1973>
- Korhonen, T. K., Valtonen, M. V., Parkkinen, J., Väisänen-Rhen, V., Finne, J., Ørskov, F., Ørskov, I., Svenson, S. B., & Helena Mäkelä, P. (1985). Serotypes, hemolysin production, and receptor recognition of *Escherichia coli* strains associated with neonatal sepsis and meningitis. *Infection and Immunity*, *48*(2), 486–491. <https://doi.org/10.1128/IAI.48.2.486-491.1985>
- Kruis, W., Frič, P., Pokrotnieks, J., Lukáš, M., Fixa, B., Kaščák, 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>
- Ku, L. C., Boggess, K. A., & Cohen-Wolkowicz, M. (2015). Bacterial meningitis in infants. *Clinics in Perinatology*, *42*(1), 29–45. <https://doi.org/10.1016/J.CLP.2014.10.004>
- Lane, M. C., Alteri, C. J., Smith, S. N., & Mobley, H. L. T. (2007). Expression of flagella is coincident with uropathogenic *Escherichia coli* ascension to the upper urinary tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(42), 16669–16674. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0607898104>
- 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., & Tenaille, 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>
- Leimbach, A., Hacker, J., & Dobrindt, U. (2013). E. coli as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 358, 3–32. https://doi.org/10.1007/82_2012_303
- Lescat, M., Clermont, O., Woerther, P. L., Glodt, J., Dion, S., Skurnik, D., Djossou, F., Dupont, C., Perroz, G., Picard, B., Catzeflis, F., Andremont, A., & Denamur, E. (2013). Commensal *Escherichia coli* strains in Guiana reveal a high genetic diversity with host-dependant population structure. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1), 49–57. <https://doi.org/10.1111/J.1758-2229.2012.00374.X>
- Lindberg, S., Xia, Y., Sondén, B., Göransson, M., Hacker, J., & Uhlin, B. E. (2008). Regulatory Interactions among Adhesin Gene Systems of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 76(2), 771.
<https://doi.org/10.1128/IAI.01010-07>
- Lipworth, S., Vihta, K. D., 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 : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 73(12), 2276–2282.
<https://doi.org/10.1093/CID/CIAB006>
- Liu, C. M., Stegger, M., Aziz, M., Johnson, T. J., Waits, K., Nordstrom, L., Gauld, L., Weaver, B., Rolland, D., Statham, S., Horwinski, J., Sariya, S., Davis, G. S., Sokurenko, E., Keim, P., Johnson, J. R., & Price, L. B. (2018). *Escherichia coli* ST131- H 22 as a Foodborne Uropathogen. *MBio*, 9(4).
<https://doi.org/10.1128/MBIO.00470-18>
- Llompарт Vázquez, C. M. (2009). Papel de la cadena O del lipopolisacárido en la regulación de factores de virulencia de *Yersinia enterocolitica*. *TDX (Tesis Doctorals En Xarxa)*.
<https://www.tdx.cat/handle/10803/9375>
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., & Krieger, M. (n.d.). *Biología celular y molecular*.
- Machado, J., Grimont, F., & Grimont, P. A. D. (2000). Identification of *Escherichia coli* flagellar types by restriction of the amplified *fliC* gene. *Research in Microbiology*, 151(7), 535–546. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(00\)00223-0](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(00)00223-0)
- 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 : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 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>
- Mamani Huarani, R. 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.
<http://hdl.handle.net/10347/13047>
- Manges, A. R., Geum, H. M., Guo, A., Edens, T. J., Fibke, C. D., & Pitout, J. D. D. (2019). Global Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli (ExPEC) Lineages. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(3).
<https://doi.org/10.1128/CMR.00135-18>
- Manges, A. R., Harel, J., Masson, L., Edens, T. J., Portt, A., Reid-Smith, R. J., Zhanel, G. G., Kropinski, A. M., & Boerlin, P. (2015). Multilocus sequence typing and virulence gene profiles associated with Escherichia coli from human and animal sources. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12(4), 302–310.
<https://doi.org/10.1089/FPD.2014.1860>
- Markland, S. M., Lestrangle, K. J., Sharma, M., & Kniel, K. E. (2015). Old Friends in New Places: Exploring the Role of Extraintestinal E. coli in Intestinal Disease and Foodborne Illness. *Zoonoses and Public Health*, 62(7), 491–496.
<https://doi.org/10.1111/ZPH.12194>
- Martinez, J. J., Mulvey, M. A., Schilling, J. D., Pinkner, J. S., & Hultgren, S. J. (2000). Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *The EMBO Journal*, 19(12), 2803–2812.
<https://doi.org/10.1093/EMBOJ/19.12.2803>
- Martinez-Medina, M., Mora, A., Blanco, M., López, C., Alonso, M. P., Bonacorsi, S., Nicolas-Chanoine, M. H., Darfeuille-Michaud, A., Garcia-Gil, J., & Blanco, J. (2009). Similarity and Divergence among Adherent-Invasive Escherichia coli and Extraintestinal Pathogenic E. coli Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(12), 3968.
<https://doi.org/10.1128/JCM.01484-09>
- Massella, E., Reid, C. J., Cummins, M. L., Anantanawat, K., Zingali, T., Serraino, A., Piva, S., Giacometti, F., & Djordjevic, S. P. (2020). Snapshot Study of Whole Genome Sequences of Escherichia coli from Healthy Companion Animals, Livestock, Wildlife, Humans and Food in Italy. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 9(11), 1–22.
<https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS9110782>
- 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 : Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 28(11), 1445–1451.
<https://doi.org/10.1016/J.JIAC.2022.07.001>
- McNally, A., Oren, Y., Kelly, D., Pascoe, B., Dunn, S., Sreecharan, T., Vehkala, M., Välimäki, N., Prentice, M. B., Ashour, A., Avram, O., Pupko, T., Dobrindt, U., Literak, I., Guenther, S., Schaufler, K., Wieler, L. H., Zhiyong, Z., Sheppard, S. K., ... Corander, J. (2016). Combined Analysis of Variation in Core, Accessory and Regulatory Genome Regions Provides a Super-Resolution View into the Evolution of Bacterial Populations. *PLoS Genetics*, 12(9).
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1006280>
- Mellata, M. (2013). Human and avian extraintestinal pathogenic Escherichia coli: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(11), 916–932.
<https://doi.org/10.1089/FPD.2013.1533>
- Méric, G., Hitchings, M. D., Pascoe, B., & Sheppard, S. K. (2016). From Escherich to the Escherichia coli genome. *The Lancet. Infectious Diseases*, 16(6), 634–636.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30066-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30066-4)
- Methods in Microbiology - Google Libros.* (n.d.). Retrieved June 15, 2024, from https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=xQv3AD4sOXAC&oi=fnd&pg=PP1&ots=S-z8wtDPWQ&sig=04VMBK1WkylCyA_Z8RGvSjH7aTk&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false

- Microbiología Parasitología Bacteriología, de. (n.d.). *Programa académico de la asignatura Manuales Departamentales*.
- 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. *Https://Home.Liebertpub.Com/Fpd*, 1(3), 160–165. <https://doi.org/10.1089/FPD.2004.1.160>
- Moran, R. A., & Hall, R. M. (2018). Evolution of Regions Containing Antibiotic Resistance Genes in FII-2-FIB-1 ColV-Colla Virulence Plasmids. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, 24(4), 411–421. <https://doi.org/10.1089/MDR.2017.0177>
- Moriel, D. G., Tan, L., Goh, K. G. K., Phan, M.-D., Ipe, D. S., Lo, A. W., Peters, K. M., Ulett, G. C., Beatson, S. A., & Schembri, M. A. (2016). A Novel Protective Vaccine Antigen from the Core *Escherichia coli* Genome. *MSphere*, 1(6). <https://doi.org/10.1128/MSPHERE.00326-16>
- Moulin-Schouleur, M., Schouler, C., Tailliez, P., Kao, M. R., Brée, 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/ASSET/F46B4A3D-0775-4061-8EAE-CD9BFC30C647/ASSETS/GRAPHIC/ZJM0100667760003.JPEG>
- 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>
- Nielsen, K. L., Dynesen, P., Larsen, P., & Frimodt-Møller, N. (2014). Faecal *Escherichia coli* from patients with *E. coli* urinary tract infection and healthy controls who have never had a urinary tract infection. *Journal of Medical Microbiology*, 63(Pt 4), 582–589. <https://doi.org/10.1099/JMM.0.068783-0>
- Nogueira, T., Rankin, D. J., Touchon, M., Taddei, F., Brown, S. P., & Rocha, E. P. C. (2009). Horizontal gene transfer of the secretome drives the evolution of bacterial cooperation and virulence. *Current Biology : CB*, 19(20), 1683–1691. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2009.08.056>
- Nolan, L. K., Horne, S. M., Giddings, C. W., Foley, S. L., Johnson, T. J., Lynne, A. M., & Skyberg, J. (2003). Resistance to serum complement, iss, and virulence of avian *Escherichia coli*. *Veterinary Research Communications*, 27(2), 101–110. <https://doi.org/10.1023/A:1022854902700>
- Nowicki, B., Selvarangan, R., & Nowicki, S. (2001). Family of *Escherichia coli* Dr adhesins: decay-accelerating factor receptor recognition and invasiveness. *The Journal of Infectious Diseases*, 183 Suppl 1, S24–S27. <https://doi.org/10.1086/318846>
- 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., Strannegård, I. L., Åberg, 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>
- Olesen, B., Kolmos, H. J., Ørskov, F., & Ørskov, I. (1995). A comparative study of nosocomial and community-acquired strains of *Escherichia coli* causing bacteraemia in a Danish University Hospital. *Journal of Hospital Infection*, 31(4), 295–304. [https://doi.org/10.1016/0195-6701\(95\)90208-2](https://doi.org/10.1016/0195-6701(95)90208-2)

- Orskov, F., & Orskov, I. (2011a). Escherichia coli serotyping and disease in man and animals. *Https://Doi.Org/10.1139/M92-115*, 38(7), 699–704. <https://doi.org/10.1139/M92-115>
- Orskov, F., & Orskov, I. (2011b). Escherichia coli serotyping and disease in man and animals. *Https://Doi.Org/10.1139/M92-115*, 38(7), 699–704. <https://doi.org/10.1139/M92-115>
- Ørskov, I., & Ørskov, F. (1985). Escherichia coli in extra-intestinal infections. *The Journal of Hygiene*, 95(3), 551. <https://doi.org/10.1017/S0022172400060678>
- Orskov, I., Orskov, F., Jann, B., & Jann, K. (1977). Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of Escherichia coli. *Bacteriological Reviews*, 41(3), 667. <https://doi.org/10.1128/BR.41.3.667-710.1977>
- Peigne, C., Bidet, P., Mahjoub-Messai, F., Plainvert, C., Barbe, V., Médigue, C., Frapy, E., Nassif, X., Denamur, E., Bingen, E., & Bonacorsi, S. (2009). The plasmid of Escherichia coli strain S88 (O45:K1:H7) that causes neonatal meningitis is closely related to avian pathogenic E. coli plasmids and is associated with high-level bacteremia in a neonatal rat meningitis model. *Infection and Immunity*, 77(6), 2272–2284. <https://doi.org/10.1128/IAI.01333-08>
- Petty, N. K., Zakour, N. L. B., Stanton-Cook, M., Skippington, E., Totsika, M., Forde, B. M., Phan, M. D., Moriel, D. G., Peters, K. M., Davies, M., Rogers, B. A., Dougan, G., Rodriguez-Baño, J., Pascual, A., Pitout, J. D. D., Upton, M., Paterson, D. L., Walsh, T. R., Schembri, M. A., & Beatson, S. A. (2014). Global dissemination of a multidrug resistant Escherichia coli clone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(15), 5694–5699. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1322678111/-/DCSUPPLEMENTAL/SD02.XLSX>
- Picard, B., Garcia, J. S., Gouriou, S., Duriez, P., Brahimi, N., Bingen, E., Elion, J., & Denamur, E. (1999). The link between phylogeny and virulence in Escherichia coli extraintestinal infection. *Infection and Immunity*, 67(2), 546–553. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.2.546-553.1999>
- Pons Ximénez, J. Ignacio., Juárez Giménez, A., & Universitat de Barcelona. Departament de Microbiologia. (2006). Familia de proteínas Hha/YmoA: estudios estructurales y papel regulador en “Y. enterocolitica”, La. *Tesis Doctorals - Departament - Microbiologia*. <https://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/42400>
- Poolman, J. T., & Anderson, A. S. (2018). Escherichia coli and Staphylococcus aureus: leading bacterial pathogens of healthcare associated infections and bacteremia in older-age populations. *Expert Review of Vaccines*, 17(7), 607–618. <https://doi.org/10.1080/14760584.2018.1488590>
- Prats, G., Navarro, F., Mirelis, B., Dalmau, D., Margall, N., Coll, P., Stell, A., & Johnson, J. R. (2000). Escherichia coli Serotype O15:K52:H1 as a Uropathogenic Clone. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(1), 201. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.1.201-209.2000>
- Raetz, C. R. H., & Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, 71, 635–700. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.71.110601.135414>
- Rasko, D. A., Rosovitz, M. J., Myers, G. S. A., Mongodin, E. F., Fricke, W. F., Gajer, P., Crabtree, J., Sebaihia, M., Thomson, N. R., Chaudhuri, R., Henderson, I. R., Sperandio, V., & Ravel, J. (2008). The pangenome structure of Escherichia coli: comparative genomic analysis of E. coli commensal and pathogenic isolates. *Journal of Bacteriology*, 190(20), 6881–6893. <https://doi.org/10.1128/JB.00619-08>

- Rhee, C., Kadri, S. S., Dekker, J. P., Danner, R. L., Chen, H. C., Fram, D., Zhang, F., Wang, R., & Klompas, M. (2020). Prevalence of Antibiotic-Resistant Pathogens in Culture-Proven Sepsis and Outcomes Associated With Inadequate and Broad-Spectrum Empiric Antibiotic Use. *JAMA Network Open*, 3(4), e202899. <https://doi.org/10.1001/JAMANETWORKOPEN.2020.2899>
- Riley, L. W. (2014a). Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 20(5), 380–390. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12646>
- Riley, L. W. (2014b). Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 20(5), 380–390. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12646>
- Roberts, I. S. (1996). The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 50, 285–315. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.MICRO.50.1.285>
- Rogers, B. A., Sidjabat, H. E., & Paterson, D. L. (2011). *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(1), 1–14. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKQ415>
- Romero, S., Carlos, H. /, & Iregui, A. (2010). El Lipopolisacárido. *Revista de Medicina Veterinaria, ISSN 0122-9354, N° 19, 2010, Págs. 37-45, 19, 37–45*. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4943924&info=resumen&idioma=EN>
- Rouli, L., Merhej, V., Fournier, P. E., & Raoult, D. (2015). The bacterial pangenome as a new tool for analysing pathogenic bacteria. *New Microbes and New Infections*, 7, 72–85. <https://doi.org/10.1016/J.NMNI.2015.06.005>
- Royer, G., Clermont, O., Condamine, B., Mercier-Darty, M. D. S., Laouénan, C., Lefort, A., Denamur, E., De Lastours, V., Wolff, M., Alavoine, L., Duval, X., Skurnik, D., Woerther, P. L., Andremont, A., Carbone, E., Lortholary, O., Nassif, X., Abgrall, S., Jauregui, F., ... Basse, B. (2022). O-Antigen Targeted Vaccines Against *Escherichia coli* May Be Useful in Reducing Morbidity, Mortality, and Antimicrobial Resistance. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 74(2), 364–366. <https://doi.org/10.1093/CID/CIAB458>
- Russo, T. A., & Johnson, J. R. (2003). Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: Focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes and Infection*, 5(5), 449–456. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(03\)00049-2](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(03)00049-2)
- Sarkar, S., Ulett, G. C., Totsika, M., Phan, M. D., & Schembri, M. A. (2014). Role of capsule and O antigen in the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *PloS One*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0094786>
- Scaletsky, I. C. A., Fabbri, S. H., Carvalho, R. L. B., Nunes, C. R., Maranhão, H. S., Morais, M. B., & Fagundes-Neto, U. (2002). Diffusely adherent *Escherichia coli* as a cause of acute diarrhea in young children in Northeast Brazil: a case-control study. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(2), 645–648. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.2.645-648.2002>
- Schilling, J. D., Mulvey, M. A., & Hultgren, S. J. (2001). Structure and function of *Escherichia coli* type 1 pili: new insight into the pathogenesis of urinary tract infections. *The Journal of Infectious Diseases*, 183 Suppl 1(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1086/318855>

- Smith, J. L., Fratamico, P. M., & Gunther, N. W. (2007). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 4(2), 134–163.
<https://doi.org/10.1089/FPD.2007.0087>
- Smithson Amat, Alejandro., Vila Estapé, J., Lozano Soto, F., & Universitat de Barcelona. Departament de Medicina. (2009). Factores dependientes del microorganismo y del huésped en la patogenia de las infecciones urinarias. *Tesis Doctorals - Departament - Medicina*.
<https://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/42270>
- 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. (2012). *Escherichia coli* Isolates That Carry *vat*, *fyuA*, *chuA*, and *yfcV* Efficiently Colonize the Urinary Tract. *Infection and Immunity*, 80(12), 4115.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00752-12>
- Spurbeck, R. R., Stapleton, A. E., Johnson, J. R., Walk, S. T., Hooton, T. M., & Mobley, H. L. T. (2011). Fimbrial Profiles Predict Virulence of Uropathogenic *Escherichia coli* Strains: Contribution of *Ygi* and *Yad* Fimbriae. *Infection and Immunity*, 79(12), 4753.
<https://doi.org/10.1128/IAI.05621-11>
- Stenutz, R., Weintraub, A., & Widmalm, G. (2006). The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(3), 382–403.
<https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2006.00016.X>
- Stephens, C. M., Adams-Sapper, S., Sekhon, M., Johnson, J. R., & Riley, L. W. (2017). Genomic Analysis of Factors Associated with Low Prevalence of Antibiotic Resistance in Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Sequence Type 95 Strains. *MSphere*, 2(2).
<https://doi.org/10.1128/MSPHERE.00390-16>
- Stoesser, N., Sheppard, A. E., Pankhurst, L., de Maio, N., Moore, C. E., Sebra, R., Turner, P., Anson, L. W., Kasarskis, A., Batty, E. M., Kos, V., Wilson, D. J., Phetsouvanh, R., Wyllie, D., Sokurenko, E., Manges, A. R., Johnson, T. J., Price, L. B., Peto, T. E. A., ... Crook, D. W. (2016). Evolutionary History of the Global Emergence of the *Escherichia coli* Epidemic Clone ST131. *MBio*, 7(2).
<https://doi.org/10.1128/MBIO.02162-15>
- Tarchouna, M., Ferjani, A., Ben-Selma, W., & Boukadida, J. (2013). Distribution of uropathogenic virulence genes in *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection. *International Journal of Infectious Diseases*, 17(6), e450–e453.
<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.01.025>
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., & Denamur, E. (2010a). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(3), 207–217.
<https://doi.org/10.1038/NRMICRO2298>
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., & Denamur, E. (2010b). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(3), 207–217.
<https://doi.org/10.1038/NRMICRO2298>
- Thompson, M. F., Litster, A. L., Platell, J. L., & Trott, D. J. (2011). Canine bacterial urinary tract infections: new developments in old pathogens. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 190(1), 22–27.
<https://doi.org/10.1016/J.TVJL.2010.11.013>
- Tivendale, K. A., Logue, C. M., Kariyawasam, S., Jordan, D., Hussein, A., Li, G., Wannemuehler, Y., & Nolan, L. K. (2010). Avian-pathogenic *Escherichia coli* strains are similar to neonatal meningitis *E. coli* strains and are able to cause meningitis in the rat model of human disease. *Infection and Immunity*, 78(8), 3412–3419.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00347-10>
- Van Den Bosch, J. F., Postma, P., Koopman, P. A. R., Graaff, J., Maclaren, D. M., Van Brenk, D. G., & Guinée, P. A. M. (1982). Virulence of urinary and faecal *Escherichia coli* in relation to serotype, haemolysis and haemagglutination. *The Journal of Hygiene*,

- 88(3), 567–577.
<https://doi.org/10.1017/S002217240007042X>
- Vigil, P. D., Alteri, C. J., & Mobley, H. L. T. (2011). Identification of In Vivo-Induced Antigens Including an RTX Family Exoprotein Required for Uropathogenic *Escherichia coli* Virulence. *Infection and Immunity*, 79(6), 2335. <https://doi.org/10.1128/IAI.00110-11>
- Vigil, P. D., Stapleton, A. E., Johnson, J. R., Hooton, T. M., Hodges, A. P., He, Y., & Mobley, H. L. T. (2011). Presence of putative repeat-in-toxin gene *tosA* in *Escherichia coli* predicts successful colonization of the urinary tract. *MBio*, 2(3). <https://doi.org/10.1128/MBIO.00066-11>
- Wang, L., Rothmund, D., Curd, H., & Reeves, P. R. (2003). Species-wide variation in the *Escherichia coli* flagellin (H-antigen) gene. *Journal of Bacteriology*, 185(9), 2936–2943. <https://doi.org/10.1128/JB.185.9.2936-2943.2003>
- Wang, S., Zhao, S. Y., Xiao, S. Z., Gu, F. F., Liu, Q. Z., Tang, J., Guo, X. K., Ni, Y. X., & Han, L. Z. (2016). Antimicrobial Resistance and Molecular Epidemiology of *Escherichia coli* Causing Bloodstream Infections in Three Hospitals in Shanghai, China. *PloS One*, 11(1). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0147740>
- 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. (2023). 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 : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 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>
- Whitfield, C. (2006). Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annual Review of Biochemistry*, 75, 39–68. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.75.103004.142545>
- Whittam, T. S., Wolfe, M. L., & Wilson, R. A. (1989). Genetic relationships among *Escherichia coli* isolates causing urinary tract infections in humans and animals. *Epidemiology and Infection*, 102(1), 37–46. <https://doi.org/10.1017/S0950268800029666>
- 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>
- Xia, F., Cheng, J., Jiang, M., Wang, Z., Wen, Z., Wang, M., Ren, J., & Zhuge, X. (2022). Genomics Analysis to Identify Multiple Genetic Determinants That Drive the Global Transmission of the Pandemic ST95 Lineage of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC). *Pathogens*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS11121489/S1>

- Yamaji, R., Rubin, J., Thys, E., Friedman, C. R., & Riley, L. W. (2018). Persistent Pandemic Lineages of Uropathogenic *Escherichia coli* in a College Community from 1999 to 2017. *Journal of Clinical Microbiology*, *56*(4). <https://doi.org/10.1128/JCM.01834-17>
- Yamamoto A-B, S., Terai, A., Yuri', K., Kurazono, H., Takeda B-D, 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>
- Yu, D., Banting, G., & Neumann, N. F. (2021). A review of the taxonomy, genetics, and biology of the genus *Escherichia* and the type species *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Microbiology*, *67*(8), 553–571. <https://doi.org/10.1139/CJM-2020-0508/ASSET/IMAGES/LARGE/CJM-2020-0508F2.JPEG>

11. ANEXO: CONTROLES POSITIVOS

Todas las cepas utilizadas como control positivo han sido obtenidas de la colección del Laboratorio de Referencia de *Escherichia coli* de la USC.

MÚLTIPLEX GRUPO FILOGENÉTICO

- FV14067
- FV14087
- O157.807
- O157.1103

PCR GRUPO FILOGENÉTICO E

- O157.807
- O157.1103

PCR GRUPO FILOGENÉTICO C

- FV 19459
- FV19460

PCRS GENES DE VIRULENCIA

- FV17090 (CV15A)
- CV15D, FV17132
- FV17133
- FV17134
- FV17159.

PCR ST95

- B2-CH38-15-ST95
- B2-CH38-18-ST1231
- B2-CH38-27-ST95
- B2-CH38-30-ST95
- B2-CH38-41-ST95
- B2-CH38-54-ST95
- B2-CH38-92-ST421)