



FACULTADE DE CIENCIAS

GRAO EN BIOQUÍMICA

D.^a Estela Pena Hermida

**Caracterización molecular de
Escherichia coli bacteriémicos
pertenecientes a los serogrupos
O8, O9 y O101**

Traballo Fin de Grao

06/2024

Índice de contenidos

1.	Introducción	7
1.1	Características generales de <i>Escherichia coli</i>	7
1.2	<i>Escherichia coli</i> patógeno	7
1.2.1	<i>Escherichia coli</i> patógeno extraintestinal (ExPEC)	8
1.3	Métodos de tipado en <i>Escherichia coli</i>	10
1.3.1	Serotipado	10
1.3.2	Tipado filogenético	10
1.4	Perfil de virulencia en <i>Escherichia coli</i>	12
1.4.1	Adherencia y colonización	12
1.4.2	Captación de hierro	13
1.4.3	Resistencia al suero	14
1.4.4	Producción de toxinas	14
1.5	Perfil de resistencia en <i>Escherichia coli</i>	15
1.5.1	Resistencia a los antibióticos β -lactámicos	16
1.6	Enfoque terapéutico y desarrollo de tratamientos alternativos	17
2.	Hipótesis y objetivos	18
3.	Materiales y métodos	19
3.1	Obtención de la colección de cepas de <i>Escherichia coli</i>	19
3.2	Conservación de las cepas de <i>Escherichia coli</i>	19
3.3	Caracterización fenotípica	19
3.3.1	Susceptibilidad antimicrobiana	19
3.3.2	Serotipado: determinación del antígeno O	20
3.4	Caracterización molecular	22
3.4.1	PCR	22
3.4.1.1	Determinación del grupo filogenético	24
3.4.1.2	Determinación de genes de virulencia	25
3.4.1.3	Determinación de genes de resistencia	28
3.4.2	Tipado del gen <i>fimH</i>	29
3.5	Análisis estadístico	29
4.	Resultados	30
4.1	Caracterización fenotípica	30

4.1.1	Prevalencia de los serogrupos O8, O9 y O101.....	30
4.1.2	Perfil de resistencia	30
4.2	Caracterización molecular	32
4.2.1	Grupos filogenéticos.....	32
4.2.2	Perfil de virulencia	33
4.2.3	Perfil de resistencia	36
4.2.4	Tipado del gen <i>fimH</i>	37
5.	Discusión	39
5.1	Prevalencia de los serogrupos O8, O9 y O101	39
5.2	Serogrupos O8, O9 y O101 y potencial de virulencia	40
5.3	Filoserogrupos, potencial de virulencia y resistencia antimicrobiana	41
5.4	Tipado del gen <i>fimH</i>	43
5.5	Serogrupos O8, O9 y O101 y producción de ESBL	44
6.	Conclusiones	45
7.	Bibliografía	46
8.	Anexos.....	52
8.1	Cepas control	52

Índice de acrónimos

APEC	Del inglés “ <i>Avian pathogenic Escherichia coli</i> ”
CC	Complejo clonal
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
ESBL	Del inglés “ <i>Extended-spectrum beta-lactamase</i> ”
ESBLEC	Del inglés “ <i>Extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli</i> ”
EUCAST	Del inglés “ <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i> ”
ExPEC	Del inglés “ <i>Extraintestinal pathogenic Escherichia coli</i> ”
FV	Factor de virulencia
HULA	Hospital Universitario Lucus Augusti
IED	Del inglés “ <i>Invasive ExPEC disease</i> ”
InPEC	Del inglés “ <i>Intestinal pathogenic Escherichia coli</i> ”
ITU	Infección del tracto urinario
LPS	Lipopolisacáridos
LREC-USC	Laboratorio de Referencia de <i>Escherichia coli</i> - Universidad de Santiago de Compostela
MDR	Del inglés “ <i>Multidrug-resistance</i> ”
MLST	Del inglés “ <i>Multilocus sequence typing</i> ”
NMEC	Del inglés “ <i>Neonatal meningitis associated Escherichia coli</i> ”
PCR	Del inglés “ <i>Polymerase chain reaction</i> ”
PDR	Del inglés “ <i>Pandrug-resistance</i> ”
SEPEC	Del inglés “ <i>Sepsis associated Escherichia coli</i> ”
SNP	Del inglés “ <i>Single Nucleotide Polimorfism</i> ”
SPATEs	Del inglés “ <i>Serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae</i> ”
ST	Secuencia tipo
TSA	Del inglés “ <i>Tryptone Soya Agar</i> ”
UPEC	Del inglés “ <i>Uropathogenic Escherichia coli</i> ”
XDR	Del inglés “ <i>Extensively drug-resistance</i> ”

Resumen

Caracterización molecular de *Escherichia coli* bacteriémicos pertenecientes a los serogrupos O8, O9 y O101

E.coli es el agente etiológico responsable de un mayor número de bacteriemias a nivel mundial y su incidencia se ha ido incrementando a lo largo de los últimos años. En este trabajo, estudiamos la prevalencia de las cepas de *E.coli* bacteriémicas pertenecientes a los serogrupos O8, O9 y O101 en el área sanitaria de Lugo. Además, caracterizamos aquellas cepas que fueron aisladas durante el periodo de 2020-2022, aplicando técnicas tanto fenotípicas como moleculares para establecer su relación con la resistencia a los antimicrobianos, determinar sus principales factores de virulencia y analizar su estructura clonal y relaciones evolutivas.

Los resultados del estudio muestran que los tres serogrupos evaluados se encuentran entre los 10 más prevalentes y que más de la mitad de sus cepas presentan resistencia múltiple a antimicrobianos, representando aproximadamente una tercera parte de las cepas bacteriémicas con resistencia múltiple totales. Por otro lado, la media de genes de virulencia en las cepas de los serogrupos O8 y O9 es muy superior a la obtenida en las cepas del serogrupo O101, lo que teóricamente implica un mayor potencial de virulencia. Por último, los alelos *fimH* y los grupos filogenéticos predominantes en los tres serogrupos son distintos (O8-C-*fimH39*, O9-B1-*fimH32* y O101-A-*fimH54*), lo que indica que la mayoría de sus cepas son evolutivamente muy diferentes. Sin embargo, el grupo filogenético B1 y el alelo *fimH32* también son frecuentes entre algunas cepas del serogrupo O8, lo que sugiere que estas podrían tener una relación genética estrecha con las cepas del serogrupo O9.

La alta prevalencia, asociación con la resistencia múltiple y presencia de numerosos genes de virulencia justificaría la inclusión de los tres serogrupos dentro de las futuras vacunas desarrolladas para la prevención de bacteriemias causadas por *E.coli* en seres humanos.

Palabras clave: *Escherichia coli*, bacteriemia, ExPEC, serogrupo, serotipado, grupo filogenético, genes de virulencia, resistencia a antimicrobianos.

Caracterización molecular de *Escherichia coli* bacteriémicos pertencentes aos serogrupos O8, O9 y O101

E. coli é o axente etiolóxico responsable dun maior número de bacteriemias a nivel mundial e a súa incidencia foise incrementando ao longo dos últimos anos. Neste traballo, estudamos a prevalencia das cepas de *E. coli* bacteriémicas pertencentes aos serogrupos O8, O9 e O101 na área sanitaria de Lugo. Ademais, caracterizamos aquelas cepas que foron illadas durante o período de 2020-2022, aplicando técnicas tanto fenotípicas como moleculares para establecer a súa relación coa resistencia aos antimicrobianos, determinar os seus principais factores de virulencia e analizar a súa estrutura clonal e relación evolutivas.

Os resultados do estudo mostran que os tres serogrupos avaliados atópanse entre os 10 máis prevalentes e que máis da metade das súas cepas presentan resistencia múltiple a antimicrobianos, representando aproximadamente unha terceira parte das cepas bacteriémicas con resistencia múltiple totais. Doutra banda, a media de xenes de virulencia nas cepas dos serogrupos O8 e O9 é moi superior á obtida nas cepas do serogrupo O101, o que teoricamente implica un maior potencial de virulencia. Por último, os alelos *fimH* e os grupos filoxenéticos predominantes nos tres serogrupos son distintos (O8-C-*fimH39*, O9-B1-*fimH32* y O101-A-*fimH54*), o que indica que a maioría das súas cepas son evolutivamente moi diferentes. Con todo, o grupo filoxenético B1 e o alelo *fimH32* tamén son frecuentes entre algunhas cepas do serogrupo O8, o que suxire que estas podería ter unha relación xenética estreita coas cepas do serogrupo O9.

A alta prevalencia, asociación coa resistencia múltiple e presenza de numerosos xenes de virulencia xustificaría a inclusión dos tres serogrupos dentro das futuras vacinas desenvolvidas para a prevención de bacteriemias causadas por *E. coli* en seres humanos.

Palabras chave: *Escherichia coli*, bacteriemia, ExPEC, serogrupo, serotipado, grupo filoxenético, xenes de virulencia, resistencia a antimicrobianos.

Molecular characterization of bacteriemic *Escherichia coli* belonging to serogroups O8, O9 and O101

E.coli is the etiological agent responsible for the highest number of bacteremias worldwide, and its incidence has been increasing over the past few years. In this work, we study the prevalence of bacteremic *E.coli* strains belonging to serogroups O8, O9 and O101 in the healthcare area of Lugo. Additionally, we characterized the strains isolated during the period 2020-2022 using both phenotypic and molecular techniques to establish their relationship with antimicrobial resistance, determine their main virulence factors and analyze their clonal structure and evolutionary relationships.

The study results show that the three evaluated serogroups are among the 10 most prevalent and more than half of their strains exhibit multiple antimicrobial resistance, representing approximately one-third of the total bacteriemic strains with multiple resistance. On the other hand, the average number of virulence genes in strains of serogroups O8 and O9 is much higher than the one obtained in strains of serogroup O101, theoretically implying a greater virulence potential. Finally, the predominant *fimH* alleles and phylogenetic groups in the three serogroups are different (O8-C-*fimH39*, O9-B1-*fimH32* and O101-A-*fimH54*), indicating that most of their strains are evolutionarily very different. However, phylogenetic group B1 and allele *fimH32* are also common among some strains of serogroup O8, suggesting that these might have a close genetic relationship with strains of serogroup O9.

The high prevalence, association with multiple resistance and presence of numerous virulence genes justify the inclusion of the three serogroups in future vaccines developed for the prevention of *E.coli*-caused bacteremias in humans.

Key words: *Escherichia coli*, bacteremia, ExPEC, serogroup, serotyping, phylogenetic group, virulence genes, antimicrobial resistance.

1. Introducción

1.1 Características generales de *Escherichia coli*

La bacteria *Escherichia coli* (*E.coli*) fue descrita por primera vez en 1885 por el pediatra alemán Theodor Von Escherich bajo el nombre de *Bacterium coli commune*, tras su aislamiento a partir de heces de un niño sano (Escherich, 1885).

Se trata de un bacilo gram-negativo, anaerobio facultativo, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* (Ewing, 1986; Blanco *et al.* 2002; Kaper *et al.*, 2004; Beutin, 2006; Bettelheim, 2007). Probablemente sea el organismo procariota más estudiado en todo el mundo debido a su facilidad de crecimiento (una división celular cada 20 minutos a 37°C en un medio nutritivo), su temprano descubrimiento, su importante significado clínico y su gran diversidad genética (Dahbi Zbiti, 2015; Gómez Gómez, 2017).

E.coli pertenece a la microbiota común del intestino y su establecimiento en el mismo se produce desde el tracto urogenital de la madre en el momento del parto y desde el medio ambiente durante las primeras horas y días de vida (Schulze *et al.*, 2006). Su presencia, junto con la de otras bacterias, es necesaria para el correcto funcionamiento del proceso digestivo. En concreto, realiza diferentes funciones de carácter fisiológico beneficiosas para el hospedador, como la ayuda en la absorción de nutrientes, la participación en la síntesis de las vitaminas K y B, el procesamiento de los residuos alimenticios, el constante estímulo de la respuesta inmune en el hospedador y la inhibición competitiva que ejerce sobre el crecimiento de todo tipo de enteropatógenos (Kruis *et al.*, 2004).

1.2 *Escherichia coli* patógeno

A pesar de que la mayor parte de los *E.coli* juegan un papel inocuo o incluso beneficioso en la microbiota normal del hospedador, algunas cepas también pueden comportarse como el agente etiológico de un amplio rango de enfermedades clínicas que afectan a todos los grupos de edad en humanos y animales (Blanco *et al.*, 2002). El término “colibacilosis” hace referencia de manera general a cualquier infección causada por la bacteria *E.coli* (Poirel *et al.*, 2018).

El genoma de *E.coli* se puede dividir en dos partes principales. La primera recibe el nombre de núcleo genómico (*core genome*) y contiene todos los genes comunes de la especie, los cuales provienen de un mismo ancestro. Dichos genes codifican proteínas esenciales para funciones fisiológicas de la bacteria, como por ejemplo aquellas implicadas en la replicación, la traducción o el metabolismo. La segunda parte se denomina genoma accesorio (*accessory*

genome) y contiene genes que codifican para funciones adicionales no esenciales para la vida de la bacteria, pero que sin embargo le confieren ciertas ventajas a la misma. Entre ellos, se encuentran genes que contribuyen a la adaptación a diferentes ambientes, diseminación, resistencia a los antibióticos y patogenicidad (Hacker y Carniel, 2001; Tenaillon *et al.*, 2010). Esta última propiedad se basa en la combinación de factores de virulencia específicos que suelen ser adquiridos por diferentes mecanismos de intercambio genético bacteriano, como son los transposones, plásmidos o bacteriófagos (elementos genéticos transmisibles). Por ello, las cepas patógenas de *E.coli* presentan un genoma mucho más grande y contribuyen a la gran variabilidad del tamaño del genoma de la especie, que puede oscilar entre 4,5 y 5,5 Mb (Dobrindt *et al.*, 2010; Schulze *et al.* 2006).

Ante la inmensa diversidad de las cepas de *E.coli*, estas se clasifican en tres categorías atendiendo a su grado de patogenicidad y al tipo de infecciones que producen: (I) cepas comensales no patógenas, (II) cepas responsables de patologías intestinales o InPEC y (III) cepas responsables de patologías extraintestinales o ExPEC (Russo y Johnson, 2000; Wiles *et al.*, 2008). Este último grupo constituye globalmente el principal agente causal de las infecciones extraintestinales humanas (Manges *et al.*, 2019) y es en el que nos centraremos a lo largo del trabajo.

1.2.1 *Escherichia coli* patógeno extraintestinal (ExPEC)

Los patotipos se definen como poblaciones de cepas de una misma especie asociadas a enfermedades concretas (Denamur *et al.*, 2020). Los ExPEC engloban cuatro patotipos llamados *E.coli* uropatogénicos (del inglés, UPEC), *E.coli* causantes de la meningitis del recién nacido (del inglés, NMEC), *E.coli* septicémicos (del inglés, SEPEC), y *E.coli* patógenos aviares (del inglés, APEC). La atribución de una cepa a un patotipo específico no excluye a la misma de ser capaz de causar una infección en otro sitio anatómico (Ron, 2006; Dale and Woodford, 2015).

A diferencia de las cepas InPEC, que raramente aparecen en la microbiota entérica de hospedadores sanos, las cepas ExPEC establecen una relación simbiótica beneficiosa con las cepas comensales y no suelen causar complicaciones en el entorno entérico (Russo y Johnson, 2000; Wiles *et al.*, 2008). Esto convierte al tracto intestinal en un reservorio de este tipo de cepas, las cuales en determinadas ocasiones colonizan el tracto urinario o respiratorio y llegan al sistema sanguíneo, pudiendo provocar distintos tipos de infecciones (Gómez Gómez, 2017).

Las infecciones del tracto urinario (ITUs) empiezan cuando una cepa patógena de *E.coli* llega al mismo y asciende por la uretra hasta la vejiga, donde se desarrolla la primera infección (cistitis). Algunas cepas pueden progresar por los uréteres y alcanzar el riñón, causando

pielonefritis, o atravesar la barrera endotelial y entrar en la circulación sanguínea, provocando bacteriemias (Wiles *et al.*, 2008; Kaper *et al.*, 2004).

En un principio se desarrollaron dos hipótesis para explicar la relación entre las cepas fecales de *E.coli* y las causantes de ITUs: la hipótesis de la prevalencia, la cual sostenía que la cepa que solía causar las infecciones era aquella más abundante en la microbiota intestinal normal, y la hipótesis de la especial patogenicidad, la cual defendía que sólo determinadas cepas con factores de virulencia eran capaces de producir la infección (Johnson *et al.*, 2003). Posteriormente, surgió un tercer planteamiento para el que cada vez hay más evidencias: la hipótesis de la evolución coincidental, que sugiere la conversión de cepas comensales a patógenas a través de la adquisición de factores de virulencia como resultado de la adaptación a sus nichos ecológicos más que como un mecanismo de patogénesis (Adiba *et al.*, 2010; Flament Simon, 2021).

La infección que da lugar a la meningitis del recién nacido puede suceder a la hora del nacimiento o por transmisión a través del cordón umbilical infectado. Comienza cuando una cepa patógena coloniza e invade las mucosas digestivas o respiratorias, desde donde migra al espacio intravascular. Allí, se multiplica y provoca una bacteriemia, de manera que las bacterias cruzan la barrera hematoencefálica e invaden las meninges y el sistema nervioso central (Gómez Gómez, 2017).

Estudios epidemiológicos estiman que las cepas UPEC son responsables del 80% de los casos de ITUs y pielonefritis (Dale y Woodford, 2015), mientras que las cepas NMEC originan el 30% de los casos de meningitis bacteriana neonatal (Chu *et al.*, 2014). Además, las cepas ExPEC causan del 20% al 30% de las bacteriemias de la comunidad y el 20% de las nosocomiales, siendo el patógeno más prevalente (Javaloyas *et al.*, 2003).

Existe una teoría emergente de que determinadas cepas ExPEC asociadas a humanos han surgido a partir de, o son las mismas que, ciertas cepas APEC causantes de infecciones extraintestinales en aves (Wasiński, 2019). Los ExPEC pueden ser transmitidos al intestino humano por medio de la ingesta de alimentos en los que están presentes y son considerados patógenos alimentarios. Por otro lado, se ha visto que algunas cepas ExPEC aisladas a partir de aves y carne avícola son genéticamente similares a las cepas ExPEC humanas. Además, varios estudios *in vivo* han mostrado que los APEC producen enfermedades infecciosas en modelos de ratón y que ciertos ExPEC derivados de humanos lo hacen en modelos aviares, lo que sugiere el potencial zoonótico de este patotipo de *E.coli*. Por ello, los APEC han sido reconocidos como una fuente primaria de ExPEC alimentarios y un elemento de alto riesgo de infecciones extraintestinales humanas (Xia *et al.*, 2022).

1.3 Métodos de tipado en *Escherichia coli*

A mayores del patotipo, las cepas individuales de *E.coli* pueden ser clasificadas mediante una gran variedad de técnicas tanto moleculares como no moleculares (Flament Simon, 2021).

1.3.1 Serotipado

Inicialmente, la clasificación de las cepas de *E.coli* se hacía en función del biotipo, el cual recoge una serie de características bioquímicas como puede ser la capacidad de fermentar o no ciertos carbohidratos. Sin embargo, este método no permitía diferenciar las cepas patógenas de las inocuas por su bajo nivel discriminatorio (Dahbi Zbiti, 2015).

En 1947, Kauffman propuso la determinación del serotipo (serotipado), basado en los principales antígenos superficiales de la especie: antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (K).

El método convencional de serotipado consiste en un análisis fenotípico en el que se aplican técnicas de aglutinación usando antisueros compuestos de anticuerpos específicos para los antígenos O y H y técnicas de conrainmunolectroforesis para el antígeno K. Debido a su complejidad, la identificación del antígeno K no suele hacerse de manera rutinaria y normalmente se expresa la combinación O:H, que recibe el nombre de serotipo y se ha convertido en un *gold standard* (DebRoy *et al.*, 2011; Orskov and Orskov, 1992).

El antígeno O hace referencia a un polisacárido único que forma parte del lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa de la pared celular, mientras que el antígeno H es una proteína flagelar. En la actualidad, se reconocen 174 grupos-O (O1 a O181, eliminados los O31, O47, O67, O72, O93, O94 y O122) y 53 tipos-H (H1 a H56, eliminados los H13, H22 y H50). Existen miles de serotipos O:H diferentes, pero tan solo algunos son especialmente frecuentes entre las cepas patógenas (DebRoy *et al.*, 2011).

1.3.2 Tipado filogenético

Determinación del grupo filogenético

Existe una amplia subestructura genética dentro de la especie *E.coli* que permite clasificar las diferentes cepas en entidades o grupos filogenéticos (Chaudhuri y Henderson, 2012). Esta distribución no es aleatoria, de manera que un origen filogenético común suele conllevar características similares, incluyendo el serotipo y patotipo (Méric *et al.*, 2013).

En el año 2000, Clermont y sus colaboradores desarrollaron una PCR tríplice que permitía asignar las cepas de *E.coli* a uno de los grupo filogenéticos A, B1, B2 o D evaluando la

presencia o ausencia de los genes *chuA*, *yjaA* y el fragmento de ADN TspE4.C2. A lo largo de los años, la creciente información acerca de las secuencias multilocus y el genoma de la especie ha permitido diferenciar 7 grupos filogenéticos: A, B1, B2, C, D, E y F. Para su identificación, se ha diseñado un nuevo método basado en una PCR cuádruplex en la que se mantienen los genes diana originales y se incluye el gen *arpA* (Clermont et al., 2013).

Mientras que los grupos filogenéticos B2, F y D son los que han divergido más antiguamente y engloban a la mayoría de las cepas patógenas extraintestinales, los grupos C, B1 y A son los que han divergido más recientemente y comprenden a las cepas responsables de patologías intestinales severas (Escobar-Paramo *et al.*, 2004). Esto indica el papel de la dotación genética en la virulencia y justifica la necesidad de identificar los grupos filogenéticos de *E.coli* (Clermont et al., 2019).

Cabe mencionar que recientemente el nuevo método ha sido adaptado *in silico* para poder emplear datos de la secuenciación masiva del genoma (WGS) y se ha puesto en evidencia que algunas cepas pertenecen a un grupo intermedio entre los grupos filogenéticos F y B2. Por ello, algunos autores han propuesto designarlo como grupo filogenético G (Lu *et al.*, 2016).

Determinación de linajes

El origen común del núcleo genómico en *E.coli* permite establecer las distancias taxonómicas entre cepas al comparar genes cromosómicos altamente conservados (Chaudhuri y Henderson, 2012). Actualmente, el principal método destinado a este fin es el tipado multilocus de secuencias o MLST (Multilocus *sequence typing*) (Maiden *et al.*, 1998).

En los esquemas MLST estandarizados, se asigna un número arbitrario a cada secuencia única de unos determinados loci. Aquellas cepas con un perfil alélico idéntico, es decir, con el mismo número de secuencia para los loci analizados, conforman una secuencia tipo (ST) (Maiden *et al.*, 1998). Por otro lado, las cepas también se pueden clasificar en grupos más amplios denominados complejos clonales (CC), los cuales poseen una fuerte asociación de alelos (Maiden *et al.*, 2013). Además, las grandes secuencias tipo se pueden dividir en un pequeño número de subgrupos clonales o clonotipos, lo que ayuda a descifrar una mayor diversidad clonal (Dale y Woodford, 2015).

A pesar de que esta técnica posee una elevada reproducibilidad y poder discriminatorio, cuenta con desventajas como el gran consumo de tiempo, los altos costes y la complejidad del proceso. Por ello, se necesitan métodos de tipado más rápidos, simples y baratos que permitan obtener resultados fiables (Kotłowski et al., 2020). La inmensa mayoría de las cepas de *E.coli* cuentan con el gen *fimH*, que codifica la adhesina fimbrial de tipo I. La región en la que se localiza dentro del cromosoma bacteriano está sometida a una presión positiva para

mutaciones funcionales que producen SNPs (del inglés, *Single Nucleotide Polimorfisms*). Esto da lugar a una amplia heterogeneidad de la secuencia y a numerosas variantes del gen, convirtiéndolo en una diana adecuada para el genotipado. De esta manera, el análisis del SNP *fimH* se emplea como una prueba rápida en estudios epidemiológicos de cepas clínicas de *E.coli* (Tartof et al., 2007; Weissman et al., 2012).

1.4 Perfil de virulencia en *Escherichia coli*

Los factores de virulencia (FV) engloban cualquier función o mecanismo bacteriano que facilite a las cepas patógenas causar una infección (Jonshon *et al*, 1988; Mokady *et al.*, 2005). Estos factores son codificados por genes cromosómicos o plasmídicos y a menudo se encuentran asociados en grandes bloques de ADN llamados islas de patogenicidad (Blanco *et al.*, 1992).

Los ExPEC poseen un amplio conjunto de factores de virulencia (viruloma) que contribuyen de manera conjunta a potenciar su patogenicidad (Dahbi Zbiti, 2015). Normalmente se agrupan en categorías funcionales, incluyendo aquellos relacionados con (I) adherencia y colonización, (II) captación de hierro, (III) resistencia al suero y (IV) producción de toxinas (Sora et al., 2021).

1.4.1 Adherencia y colonización

La adhesión de la bacteria a superficies mucosas es el primer evento en la mayoría de los procesos de patogénesis, promoviendo la colonización del tejido (Kline et al, 2009). Se han asociado diferentes estructuras a esta primera etapa de la infección en ExPEC, tales como las adhesinas (fimbriales o no fimbriales) y los flagelos (Flament Simon, 2021).

Las adhesinas fimbriales se encuentran en la punta de las fimbrias, un orgánulo que se prolonga desde la superficie bacteriana, y reconocen ligandos específicos en el epitelio del hospedador (Kline *et al*, 2009). Las cepas ExPEC normalmente expresan más de un tipo de fimbria, lo que aumenta las probabilidades de supervivencia ante cambios en las condiciones ambientales (Holden and Gally, 2004).

- La fimbria tipo P se encuentra en la mayoría de las cepas causantes de pielonefritis y urosepsis. Esto es debido a que permite a las bacterias fijarse a receptores celulares y colonizar el epitelio urinario, evitando su arrastre a través de la orina (Vigil *et al.*, 2011). Es codificada por el operón *pap* (pili asociado a pielonefritis), el cual contiene 11 genes (de *papA* a *papK*) que dan lugar, entre otros productos, a la proteína principal (PapA), a subunidades adaptadoras (PapE y PapF), a la adhesina (PapG) y a un canal que transloca las subunidades fimbriales a la superficie (PapC) (Sauer et al., 1999).

- La familia Afa/Dr se compone de fimbrias de poliadhesinas relacionadas con cepas que provocan infecciones urinarias y septicemias. En concreto, contribuyen a la evasión del sistema inmune humoral, facilitando la invasión de las células epiteliales, y se unen al antígeno Dr sanguíneo de los glóbulos rojos (Fang *et al.*, 2004; Nowicki *et al.*, 2001). Estas fimbrias están codificadas por los operones *afa*, *dra* y *daa*, los cuales tienen una organización genética similar (Servin, 2014). Afa/draBC es una adhesina resistente a la manosa que ejerce su función dentro del tracto urinario (Gómez Gómez, 2017).
- Las fimbrias S/F1C engloban a la familia S y a su familia análoga F1C, codificadas por los operones *sfa* y *foc*, respectivamente. Sfa/focDE comprende la región central de dichos operones y está asociado especialmente con cepas causantes de septicemias y meningitis (Mitsumori *et al.*, 1998; Spurbeck *et al.*, 2011).

Existe un gran número de sistemas de translocación de proteínas que se encargan del ensamblaje de las fimbrias, entre los que se encuentran las chaperonas-acomodadoras. El gen *yfcV* codifica la subunidad mayor de una fimbria que emplea este sistema y es un factor de virulencia que se suele encontrar en las cepas UPEC (Spurbeck *et al.*, 2012).

1.4.2 Captación de hierro

El hierro es un elemento crítico para la supervivencia y el crecimiento de las bacterias. Por ello, aquellas cepas patógenas que producen septicemias e infecciones en órganos con una muy baja disponibilidad de este elemento deben desarrollar estrategias para conseguirlo. Una de ellas es la síntesis de sideróforos, que son moléculas que capturan los iones férricos (Fe^{3+}) presentes en el medio circundante. Los ExPEC tienen hasta cuatro tipos: enterobactina, salmoquelina, aerobactina y yersiniabactina (Robinson *et al.*, 2018; Sora *et al.*, 2021)

- La enterobactina se encuentra codificada en el núcleo genómico de *E.coli*.
- La salmoquelina está codificada por el clúster de genes no conservado *iro*. El gen *iroN* da lugar a un receptor de la membrana externa que recibe al hierro unido al sideróforo y está relacionado con cepas de *E.coli* uropatógenas (Balbontín *et al.*, 2016).
- La aerobactina está codificada por un conjunto de genes no conservado. Este incluye al operón *iucABCD*, encargado de la síntesis del sideróforo, y al gen *iutA*, un receptor de la membrana externa que recibe al mismo (Koh *et al.*, 2015). Tanto *iucD* como *iutA* son altamente prevalentes en cepas APEC (Ovi *et al.*, 2023).
- La yersiniabactina está codificada por el multioperón de isla de alta patogenicidad *Yersinia*. Este incluye al gen *fyuA*, que produce una proteína receptora para el sideróforo y está considerado como uno de los mejores marcadores de cepas UPEC (Hancock *et al.*, 2008; Koh *et al.*, 2015).

1.4.3 Resistencia al suero

Para tener éxito, los patógenos deben desarrollar un amplio rango de estrategias anti-inmunes (Finlay and McFadden, 2006). En este aspecto, los ExPEC cuentan con una categoría de factores de virulencia que contribuyen a la resistencia al suero, la cual recibe el nombre de protectinas. Entre ellas, se encuentra la proteína de exclusión de superficie para la transferencia conjugativa (TraT), la proteína de supervivencia aumentada en suero (Iss), la proteasa de membrana externa (OmpT) y los antígenos capsulares (Desloges et al., 2019; Johnson et al., 2000; Sora et al., 2021).

TraT interacciona con las proteínas del complemento y evita el contacto de estas con la membrana bacteriana, así como la consiguiente fagocitosis y acción lítica (Sukupolvi y O' Connor, 1990). Iss también se relaciona con la resistencia al complemento, aunque el mecanismo molecular todavía se desconoce (Biran et al., 2021). A su vez, OmpT es una proteasa que escinde e inactiva a los péptidos antimicrobianos que forman parte de las defensas inmunes innatas (Desloges et al., 2019).

La cápsula es una estructura extracelular que permite a la bacteria evadir el sistema inmune del hospedador (Willis & Whitfield, 2013). En *E.coli* está compuesta por polisacáridos capsulares que envuelven la pared celular y que reciben el nombre de antígenos K, de los cuales se han identificado alrededor de 80 tipos diferentes. Estos se clasifican en cuatro grupos según sus propiedades bioquímicas y genéticas, siendo los antígenos K1 y K2 pertenecientes al grupo II los más comunes entre las cepas ExPEC. El gen *kpsMIII* está implicado en la expresión de un transportador de polisacáridos a través de la membrana citoplasmática, mientras que el gen *neuc-K1* participa en la biosíntesis del antígeno K1 y el gen *kpsMII-K2* en la del antígeno K2 (Aldawood & Roberts, 2022; Sora et al., 2021; Gómez Gómez, 2017).

1.4.4 Producción de toxinas

Las toxinas son moléculas capaces de frenar el ciclo celular, generar defectos en la función o forma de las células o incluso originar la lisis celular en el hospedador. En el caso de los ExPEC, se ha descrito la producción de diversas toxinas (Wiles et al., 2008; Denamur et al., 2020).

- La alfa-hemolisina (HlyA) es una proteína expresada por el operón *hlyCABD* (Felmlee et al., 1985). Facilita el suministro de iones férricos a la bacteria al formar poros en la membrana de los eritrocitos y provocar su lisis (Skals et al., 2010).
- La hemolisina F (HlyF) es una proteína codificada por el gen *hlyF* del plásmido ColV. Está involucrada en la sobreproducción de vesículas en la membrana externa que liberan otros factores de virulencia al medio (Murase et al., 2016).

- La toxina autotransportadora vacuolante (Vat) es un miembro de las serina proteasas autotransportadoras de *Enterobacteriaceae* (SPATEs). Aunque su mecanismo de acción se desconoce, la secuencia del gen *vat* ha sido identificada tanto en cepas UPEC como APEC (Díaz et al., 2020).
- La hemaglutinina sensible a la temperatura (Tsh) también forma parte de la subfamilia de las SPATEs y es expresada especialmente en cepas APEC. Posee propiedades adherentes que le permiten unirse a las células del huésped, así como capacidad de hemaglutinación y actividad proteolítica (Kobayashi et al., 2010).

1.5 Perfil de resistencia en *Escherichia coli*

Los antibióticos comprenden un diverso grupo de sustancias antimicrobianas dirigidas a estructuras o procesos bacterianos específicos que interfieren con el crecimiento y reproducción de la bacteria y/o causan su muerte (Pal *et al.*, 2017). Estos pueden clasificarse según su mecanismo de acción en: (I) inhibidores de la síntesis de la pared celular, (II) inhibidores de la membrana citoplasmática, (III) inhibidores de los ácidos nucleicos o (IV) inhibidores de la síntesis de proteínas (Calvo y Martínez-Martínez, 2009).

Por otro lado, la resistencia se define como la habilidad de un microorganismo para multiplicarse en presencia de un compuesto tóxico, lo cual es aplicable a los antibióticos (Lewis, 2008). A su vez, el resistoma hace referencia al conjunto de genes de resistencia existentes en una bacteria (Perry *et al.*, 2014).

Esta resistencia bacteriana puede ser intrínseca o adquirida. En el primer caso, ocurre en todas las bacterias taxonómicamente relacionadas, está codificada en el cromosoma y únicamente se transmite de manera vertical. En el segundo, es desarrollada por un cierto linaje de bacterias como consecuencia de mutaciones o de la transmisión horizontal de elementos genéticos móviles (plásmidos, transposones, integrones, etc), por lo que suele estar codificada fuera del cromosoma (Daza Pérez, 1998; Magiorakos *et al.*, 2012).

Existen seis mecanismos principales de resistencia bacteriana: (I) alteración enzimática del antibiótico, (II) alteración o protección del sitio diana, (III) restricción del acceso a la diana, (IV) sobreproducción de la diana, (V) reducción de la permeabilidad y (VI) eflujo activo (Martínez, 2014; Munita y Arias, 2016).

El uso en exceso y de manera errónea de antibióticos en medicina humana y veterinaria ha ejercido una presión selectiva entre las bacterias que ha favorecido y acelerado el desarrollo de mecanismos de resistencia. Por ello, es común que una única bacteria exprese resistencia a diferentes compuestos simultáneamente y que bacterias que antes eran tratables ahora no

lo sean o requieran el empleo de antibióticos de última generación (Margiorakos *et al.*, 2012; Ventola, 2015).

Así, se han identificado cepas de *E.coli* multirresistentes a fármacos (del inglés, MDR), ampliamente resistentes a fármacos (del inglés, XDR) y panresistentes a fármacos (del inglés, PDR). Estos términos hacen referencia a si han adquirido una no-susceptibilidad ante al menos un agente en tres o más categorías antimicrobianas, ante al menos un agente en todas excepto dos o menos categorías antimicrobianas o ante todos los agentes de todas las categorías antimicrobianas, respectivamente (Boucher *et al.*, 2009; Shlaes *et.al*, 2013).

1.5.1 Resistencia a los antibióticos β -lactámicos

Los antibióticos β -lactámicos son los más utilizados en medicina humana y animal debido a su amplio espectro de acción y baja toxicidad. Bloquean la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana al actuar como análogos estructurales del sustrato natural (D-alanil-D-alanina) de las transpeptidasas y carboxipeptidasas implicadas en dicho proceso, lo que resulta en la activación de enzimas autolíticas y la destrucción celular (Murray *et al.*, 2006). Existen cuatro familias principales de antibióticos β -lactámicos según su estructura química y espectro de actividad: penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, carbapenemes y monobactamas (Gómez Gómez, 2017).

El principal mecanismo de resistencia de las bacterias gramnegativas ante este tipo de antibióticos es la producción de β -lactamasas, enzimas capaces de hidrolizar compuestos químicos que contienen el anillo β -lactámico (Bush, 2018). Estas son codificadas por los genes *bla*, los cuales se localizan principalmente plásmidos (Andrzejczuk *et al.*, 2019). Además, se pueden agrupar según su tamaño molecular y homología entre los motivos aminoacídicos del sitio activo en cuatro clases: A, C y D serina β -lactamasas y B metalo- β -lactamasas (Ambler, 1980).

Las β -lactamasas de espectro extendido (del inglés, ESBLs) son aquellas capaces de hidrolizar las cefalosporinas de amplio espectro y los monobactamas, pero no las cefamicinas o los carbapenemes. Se caracterizan por ser inhibidas por inhibidores de β -lactamasas, como el ácido clavulánico, el sulbactam y el ertapenem (Munita y Arias, 2016).

La fuente más común de ESBLs adquiridas en *E.coli* es la clase A de β -lactamasas, la cual incluye a las familias TEM, SHV y CTX-M. Todos los miembros de la familia CTX-M son ESBLs, mientras que las familias TEM y SHV poseen algunas excepciones. A su vez, las enzimas CTX-M se dividen en varias subfamilias, de las cuales CTX-M-1 y CTX-M-9 son las más frecuentes globalmente. Estas incluyen a CTX-M-15 y CTX-M-14 respectivamente, que son las variantes dominantes (De Witte *et al.*, 2021; Flament Simon, 2021).

1.6 Enfoque terapéutico y desarrollo de tratamientos alternativos

Los ExPEC constituyen uno de los principales patógenos humanos, pudiendo ocasionar enfermedades invasivas por ExPEC (del inglés, IED) con consecuencias sistémicas agudas, como bacteriemias, sepsis o incluso la muerte (Poolman & Wacker, 2016). Las bacteriemias generadas por *E.coli* pueden ocurrir a cualquier edad, aunque su incidencia se ve aumentada progresivamente con la misma (Laupland & Church, 2014). De hecho, los ExPEC son la mayor causa de bacteriemias en adultos en todo el mundo y las tasas globales anuales se están incrementando (Huttner et al., 2017). En parte, esto se debe a la emergencia de cepas MDR, que han complicado el tratamiento de este tipo de infecciones (Pitout & DeVinney, 2017).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha catalogado a las bacterias del orden Enterobacteriales resistentes a carbapenémicos y productoras de ESBLs como patógenos de prioridad crítica para el desarrollo de nuevos tratamientos en esta era de resistencia a antibióticos (OMS, 2024). Para *E.coli*, una de las estrategias alternativas es la elaboración de vacunas multivalentes y profilácticas dirigidas a las cepas ExPEC más prevalentes (Frenck et al., 2019). Con ese fin, se han considerado como diana potencial los serogrupos O que están asociados en mayor medida a las IED y las infecciones MDR (Weerdenburg et al., 2022).

Los serogrupos O8, O9 y O101 no sólo forman parte de los serogrupos más extendidos globalmente entre las cepas ExPEC bacteriémicas, sino que también se encuentran entre los serogrupos más frecuentes en aquellas cepas ExPEC bacteriémicas que además son MDR (Weerdenburg et al., 2022). Por otro lado, estudios realizados en Lugo (zona geográfica foco de nuestra investigación) durante los años 1989-2011 (R. S. Mamani et al., 2015) y 2020-2022 (datos no publicados del grupo LREC-USC), reflejan que de igual manera estos tres serogrupos son de los más prevalentes entre las cepas de *E.coli* bacteriémicas.

ExPEC4V (JNJ-63871860; Janssen Pharmaceuticals, Inc.) es una vacuna conjugada tetravalente destinada a la prevención de infecciones causadas por cepas ExPEC pertenecientes a los cuatro serogrupos O dominantes a nivel mundial. Esta se compone por los antígenos O1, O2, O6 y O25 y ha mostrado ser prometedora en un estudio de fase II (Huttner et al., 2017). A partir de su composición, se ha diseñado la vacuna conjugada decavalente ExPEC10V (VAC52416; Janssen Pharmaceuticals, Inc.), la cual incluye los serogrupos adicionales O4, O8, O15, O16, O18 y O75, elegidos también debido a su significativa prevalencia mundial en cepas clínicas de adultos con bacteriemias. Sin embargo, se ha visto que a dosis óptimas de la vacuna algunas cepas del serogrupo O8 no muestran respuesta, por lo que se ha planteado su eliminación y la elaboración de una vacuna ExPEC9V (Fierro et al., 2023). De esta manera, ninguno de los tres serogrupos mencionados estaría cubierto por las vacunas que actualmente se encuentran en desarrollo.

2. Hipótesis y objetivos

E.coli es el agente etiológico responsable de un mayor número de bacteriemias en seres humanos y su prevalencia a nivel mundial se ha visto incrementada en los últimos años. En parte, esto se debe al aumento en las tasas de resistencia a los antimicrobianos, lo que ha dado lugar a la necesidad de desarrollar vacunas para prevenir las infecciones causadas por las cepas de *E.coli* patógenas extraintestinales (ExPEC). Las más avanzadas en la actualidad (ExPEC4V y ExPEC10V) se basan en los antígenos O e incluyen en su composición aquellos correspondientes a los serogrupos más prevalentes a nivel mundial. No obstante, dicha prevalencia cuenta con variaciones significativas entre los diferentes países, las cuales se ven todavía más potenciadas debido a la reciente emergencia de nuevos clones. Por ello, es necesario realizar estudios de vigilancia periódicamente. Además, también es importante conocer los mecanismos de patogénesis de este tipo de cepas, identificando la combinación de factores de virulencia que les permiten evitar las defensas inmunitarias del hospedador y causar infecciones.

El objetivo del trabajo es conocer las características distintivas de los serogrupos O8, O9 y O101, los cuales se encuentran entre los serogrupos más prevalentes causantes de bacteriemias en la población lucense. Para ello, establecimos los siguientes subobjetivos:

- I. Analizar la prevalencia de las cepas bacteriémicas pertenecientes a los serogrupos O8, O9 y O101 en el área sanitaria de Lugo.
- II. Establecer la relación de dichos serogrupos con la resistencia a los antimicrobianos.
- III. Evaluar si es necesaria la inclusión de estos tres serogrupos en las vacunas que se desarrollen para prevenir las bacteriemias causadas por *E.coli* en los humanos.
- IV. Estudiar la estructura clonal y relaciones evolutivas entre las cepas pertenecientes a los tres serogrupos.
- V. Determinar el potencial de virulencia de los tres serogrupos.

3. Materiales y métodos

3.1 Obtención de la colección de cepas de *Escherichia coli*

La colección bacteriana empleada en este trabajo se compone de 53 cepas de *E.coli* no duplicadas (cada una correspondiente a un individuo distinto) procedentes de muestras sanguíneas de pacientes con bacteriemias. Estas fueron obtenidas entre los años 2020 y 2022 en el Hospital Universitario Lucus Augusti (HULA).

En concreto, un total de 348 cepas de *E.coli* fueron aisladas de sus correspondientes hemocultivos en el Laboratorio de Microbiología del hospital y enviadas al grupo LREC-USC. Entre estas cepas, seleccionamos aquellas con los serogrupos de interés para nuestro estudio: O8, O9 y O101.

3.2 Conservación de las cepas de *Escherichia coli*

Todas las bacterias, incluidas las cepas ExPEC objeto de estudio y las cepas control, fueron conservadas bajo las mismas condiciones siguiendo el protocolo del grupo LREC-USC. Este establece el uso de medios de conservación de agar nutritivo al 0,75% (p/v), cuya preparación requiere la mezcla de agar nutritivo (11,5 g/L) (Applichem-Panreac) y caldo nutritivo (4 g/L) (Applichem-Panreac). Además, el almacenamiento tiene lugar en tubos Vacutainer™ a temperatura ambiente. De esta manera, las cepas mantienen su viabilidad sin necesidad de resiembra hasta como mínimo cada 5 años.

3.3 Caracterización fenotípica

La primera parte de la caracterización fenotípica de las cepas bacterianas tuvo lugar en el Laboratorio de Microbiología del HULA. Esta se basó en el uso del sistema semiautomatizado MicroScan (Beckman Coulter) para realizar un biotipado y pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. La segunda parte la llevamos a cabo en el grupo LREC y consistió en la identificación del antígeno O a través de un serotipado, lo que sirvió para seleccionar las cepas con los serogrupos de interés que constituyen la colección sobre la que se realizó la caracterización molecular.

3.3.1 Susceptibilidad antimicrobiana

En el estudio de la susceptibilidad se determinó la sensibilidad de las cepas a diferentes antimicrobianos, así como la concentración mínima inhibitoria (CMI). La interpretación de los resultados se basó en los criterios recomendados por EUCAST (*European Committee on*

Antimicrobial Susceptibility Testing), que establecen los puntos de corte para diferenciar si un microorganismo es sensible (S), intermedio (I) o resistente (R).

En concreto, se analizaron las 10 siguientes clases de agentes antimicrobianos: penicilinas (ampicilina y piperacilina), combinaciones de penicilinas con inhibidores de β -lactamasas (amoxicilina-ácido clavulánico y piperacilina-tazobactam), cefalosporinas de tercera y cuarta generación de espectro extendido (cefotaxima, ceftazidima y cefepima), cefamicinas (cefoxitina), monobactamas (aztreonam), carbapenemes (imipenem, meropenem y ertapenem), aminoglucósidos (gentamicina, tobramicina y amikacina), quinolonas (ácido nalidíxico, ciprofloxacino y levofloxacina), inhibidores de la ruta del folato (trimetoprim y trimetoprim-sulfametoxazol) y glicilciclinas (tigeciclina).

Los *E.coli* MDR son aquellos que se identifican como resistentes a uno o más agentes en tres o más de las categorías de antimicrobianos testadas (Shlaes *et.al*, 2013). En este caso, las cepas intermedias no se contabilizaron como resistentes.

Por otro lado, los *E.coli* productores de β -lactamasas de espectro extendido (del inglés, ESBLEC) fueron detectados por la prueba de sinergia de doble disco.

3.3.2 Serotipado: determinación del antígeno O

La determinación del antígeno O de *E.coli* se llevó a cabo usando el método previamente descrito por Guinée *et al.* (1981) y posteriormente modificado por Blanco *et. al* (1996). En este método, se identifica el antígeno superficial a través de la aglutinación bacteriana positiva derivada de su reacción con uno de los 174 antisueros O.

Estos antisueros diagnósticos son preparados en el grupo LREC mediante la inmunización de conejos con cepas de referencia. Previamente a su uso, los antisueros han de ser adsorbidos para eliminar reacciones cruzadas y diluidos a 1/80 o 1/40 con solución salina estéril (NaCl al 0,85%, p/v). Se realiza una dilución u otra dependiendo de si el título obtenido tras el enfrentamiento de los mismos con sus cepas homólogas de referencia es $\geq 1/640$ o $< 1/640$, respectivamente.

Para simplificar el proceso, se elaboran antisueros polivalentes (nombrados de la A a la X) constituidos por un número variable de antisueros monovalentes conocidos, los cuales permiten dividir la identificación del antígeno en dos fases: (I) determinación presuntiva del serogrupo O y (II) confirmación del serogrupo O.

Antes de iniciar las fases mencionadas, se debe conseguir una suspensión de antígeno O por cada cepa analizada. Para ello, la cepa es cultivada en Agar Triptona de Soja (del inglés, TSA)

e incubada durante 18-24h a 37°C. Más tarde, se suspende el crecimiento obtenido en 2mL de solución salina estéril (NaCl al 0,85%, p/v) y, con el objetivo de alcanzar una concentración bacteriana de aproximadamente $1,8 \times 10^9$ /mL, se compara la turbidez con el tubo número 6 de la escala McFarland. A continuación, se hierva la suspensión durante 1h a 100 °C, de manera que se destruye el antígeno K (en caso de que la cepa posea cápsula) y se desenmascara el antígeno O. Las cepas de los serogrupos O8, O9, O20 y O101 pueden tener una variante termorresistente del antígeno capsular, por lo que si alguna cepa problema da un resultado negativo ante todos los antisueros O, probablemente pertenezca a alguno de esos serogrupos y se deberá preparar y autoclavar durante 2,5h a 121°C una segunda suspensión. Por último, se deja enfriar la suspensión y se añaden 2 mL de solución salina con formalina al 5% (v/v) y violeta genciana al 0,1% (p/v). Mientras que el primer compuesto actúa como bactericida y contribuye a la fijación de las estructuras bacterianas, el segundo tiñe las células. La suspensión permanece estable durante meses si se mantiene correctamente cerrada a 4 °C.

Determinación presuntiva del serogrupo O

En la determinación del antígeno O se emplean placas de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos (preferiblemente de fondo en “V”), las cuales permiten una fácil lectura de los resultados y un importante ahorro de antisuero.

En esta fase, se dispensan 50 µL de cada antisuero polivalente en tantos pocillos como número de cepas a analizar haya. Luego, se enfrentan dichos antisueros con 50 µL de todas las suspensiones de antígeno O preparadas. Finalmente, se cubren las placas con otras placas y se dejan incubar a 37 °C durante la noche.

La interpretación de los resultados se lleva a cabo examinando las reacciones de aglutinación. Cuando la cepa problema es reconocida por los anticuerpos de alguno de los antisueros O incluidos en un antisuero polivalente, estos actúan como puentes entre las bacterias formando una película que impide su sedimentación, de manera que no se identifica ningún cambio en el pocillo (resultado positivo). Si no existe dicho reconocimiento, las bacterias sedimentan y se visualizan en forma de botones azulados en el centro del pocillo (resultado negativo). En caso de que una cepa aglutine con uno o más antisueros polivalentes, se debe realizar el proceso de confirmación con los antisueros monovalentes correspondientes. Si por el contrario la reacción es negativa con todos los antisueros polivalentes, se prepara la segunda suspensión autoclavada del antígeno O y se enfrenta a los antisueros O8, O9, O20 y O101. En el supuesto de que todavía no haya reacción positiva, la cepa se considera no tipable para el antígeno O (del inglés, ONT).

Confirmación del serogrupo O

La confirmación del serogrupo O se completa al repetir para cada cepa el proceso descrito anteriormente, con la única diferencia de que esta vez se utilizan los antisueros monovalentes que constituyen los antisueros polivalentes cuyas reacciones fueron positivas en la determinación presuntiva del antígeno. Tras la lectura de los resultados, que también se realiza de la misma manera, la cepa puede ser asignada a un serogrupo O o considerada no tipable. Además, en esta fase también se establece el título de la suspensión bacteriana, el cual se define como la máxima dilución del suero capaz de provocar su aglutinación. Normalmente la cepa pertenece al serogrupo O cuyo antisuero presenta un mayor título con la cepa ensayada.

3.4 Caracterización molecular

La caracterización molecular de la colección de cepas de *E. coli* se basó en el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, PCR) para la asignación de los grupos filogenéticos, la identificación de genes codificantes de factores de virulencia y la descripción del perfil de resistencias antimicrobianas. Además, se determinaron las variantes de la secuencia del gen *fimH* a través de la secuenciación Sanger.

3.4.1 PCR

Las PCR llevadas a cabo a lo largo del trabajo fueron realizadas siguiendo el protocolo del grupo LREC-USC. Para extraer el ADN, se suspenden aproximadamente 10 μL (contenidos en el bucle de un asa de siembra estéril) de bacterias cultivadas sobre un medio de TSA en un tubo eppendorf con 600 μL de agua MiliQ esterilizada. La suspensión es hervida a 100°C durante 5 minutos y centrifugada a 11.000 rpm a lo largo de 2 minutos, obteniéndose un sobrenadante del cual se cogen 5 μL .

Todas las reacciones se efectúan en un volumen total de 25 μL que contiene el ADN extraído, de 0,5 a 1 μL de los *primers* adecuados a 20 μM y 12,5 μL de un buffer (NZYtechTaq 2x Green Master Mix) con *Taq* polimerasa, MgCl_2 a 2,5 mM y cada uno de los nucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y DTTP) a 200 μM . El volumen final de la reacción es ajustado añadiendo agua MiliQ esterilizada.

En general, la reacción de PCR consta de una desnaturalización inicial de 3 minutos a 94°C, 35 ciclos compuestos por 1 minuto de desnaturalización a 94 °C, 1 minuto de anillamiento a una temperatura específica para los *primers* y 1 minuto y medio de extensión a 72°C, y una extensión final de 3 minutos a 72 °C. La **figura 1** esquematiza estas condiciones.

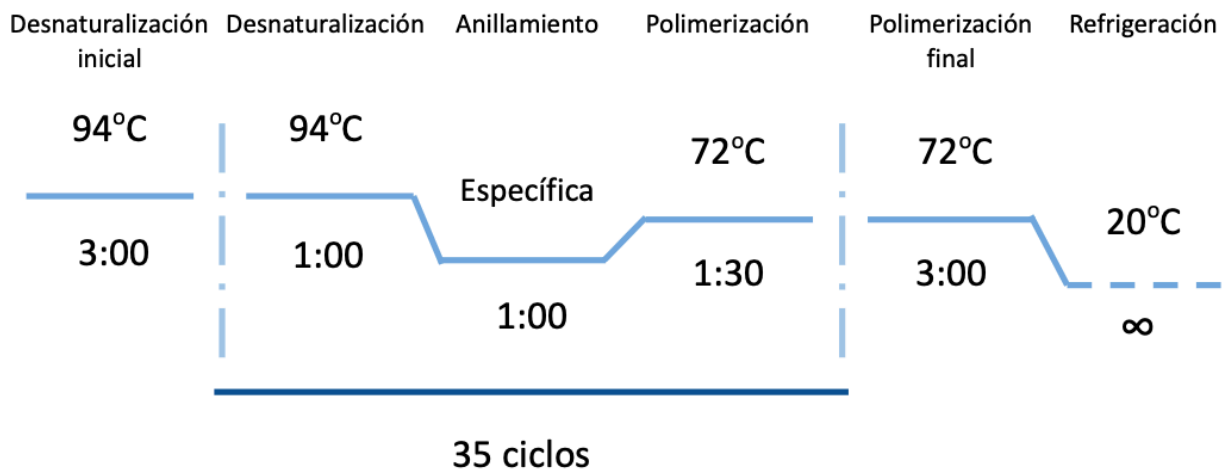


Figura 1. Procesos que constituyen la PCR junto con su duración en minutos y el gradiente de temperaturas que se genera a medida que tienen lugar. Tras la desnaturalización inicial, se desarrollan 35 ciclos de desnaturalización, anillamiento y polimerización, seguidos de una polimerización final. Por último, se mantiene una temperatura de 20°C de manera indefinida hasta que se recogen las muestras.

La lectura de los fragmentos amplificados de ADN se realiza mediante una electroforesis convencional en gel de agarosa bajo luz UV. Dicho gel se constituye de agarosa (Seakem® LE) al 1,5% (p/v) en tampón TAE 1X (compuesto por Tris a 1,6M, acetato sódico a 0,8M y EDTA a 0,025M) con 5 µL del marcador Green Safe Premium (Nzytech) por cada 100 mL. Cabe mencionar que en todos los procedimientos se incluyeron de manera sistemática blancos y controles positivos. Estos últimos se pueden encontrar en la **tabla S1** del anexo 1.

Preparación de los primers

En primer lugar, se debe obtener un stock de almacenamiento de los *primers* a una concentración de 200 µM. Para ello, se da un golpe de centrifuga a cada uno de los tubos de *primers* recibidos (2000 rpm durante 1 minuto). A continuación, los *primers* han de ser hidratados con un tampón de reconstitución 1mM Tris-HCl/0,01 mM EDTA, de pH igual a 8. El volumen añadido dependerá de los nanomoles de *primer* que contenga el tubo, los cuales aparecen indicados en la etiqueta del mismo o en el “Certificado de análisis” enviado por la casa comercial.

En segundo lugar, se debe preparar un stock de trabajo de los *primers* en tubos de 300 µL a partir del stock de almacenamiento. La concentración de *primer* que se debe conseguir es de 20 µM y el diluyente empleado es el tampón de reconstitución.

3.4.1.1 Determinación del grupo filogenético

La asignación de las cepas de *E.coli* a los principales grupos filogenéticos (A, B1, B2, C, D, E y F) se basó en el protocolo de Clermont *et al.*, (2013). La **tabla 1** recoge las características de los *primers* utilizados y las condiciones de trabajo. La **figura 2** muestra la interpretación de los resultados de las dos PCR realizadas.

El volumen empleado de cada *primer* en la mezcla de la PCR cuádruplex de los genes *chuA*, *yjaA*, *TSPE4.C2* y *arpA* para una concentración de alícuota de 20 μ M es de 0,5 μ L. Los parámetros requeridos en esta PCR son diferentes al resto de los casos. En concreto, consta de una desnaturalización inicial de 4 minutos a 94°C, 30 ciclos compuestos por 5 segundos de desnaturalización a 94 °C, 20 segundos de anillamiento a 58 °C y 1 minuto de extensión a 72°C, y una extensión final de 5 minutos a 72°C. Por otro lado, en la PCR dúplex de los genes *trpAgpC* y *trpA*, el volumen añadido de cada *primer* para una concentración de alícuota de 50 μ M es de 0,5 μ L y 0,1 μ L respectivamente.

TABLA 1. *Primers* usados para la determinación de los grupos filogenéticos A, B1, B2, C, D, E y F (Clermont *et al.*, 2013).

Diana	Primer	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Producto PCR (pb)	Tª (°C) Anillamiento	Referencia
<i>chuA</i>	ChuA.1b	ATGGTACCGGACGAACCAAC	288	58 °C	Clermont <i>et al.</i> (2013)
	ChuA.2b	TGCCGCCAGTACCAAAGACA			
<i>yjaA</i>	YjaA.1b	CAAACGTGAAGTGTCAGGAG	211	58 °C	Clermont <i>et al.</i> (2013)
	YjaA.2b	AATGCGTTCCTCAACCTGTG			
<i>TSPE4.C2</i>	TSPE4.C2.1b	CACTATTCGTAAGGTCATCC	152	58 °C	Clermont <i>et al.</i> (2000)
	TSPE4.C2.2b	AGTTTATCGCTGCGGGTCGC			
<i>arpA</i>	AceK.f	AACGCTATTCGCCAGCTTGC	400	56 °C	Clermont <i>et al.</i> (2008)
	ArpA1.r	TCTCCCCATACCGTACGCTA			
<i>trpAgpC</i>	trpAgpC.1	AGTTTTATGCCAGTGCGAG	219	56 °C	Lescat <i>et al.</i> (2013)
	trpAgpC.2	TCTGCGCCGGTCACGCCC			
<i>trpA</i>	trpBA.f	CGGCGATAAAGACATCTTCAC	489	56 °C	Clermont <i>et al.</i> (2008)
	trpBA.r	GCAACGCGCCTGGCGGAAG			

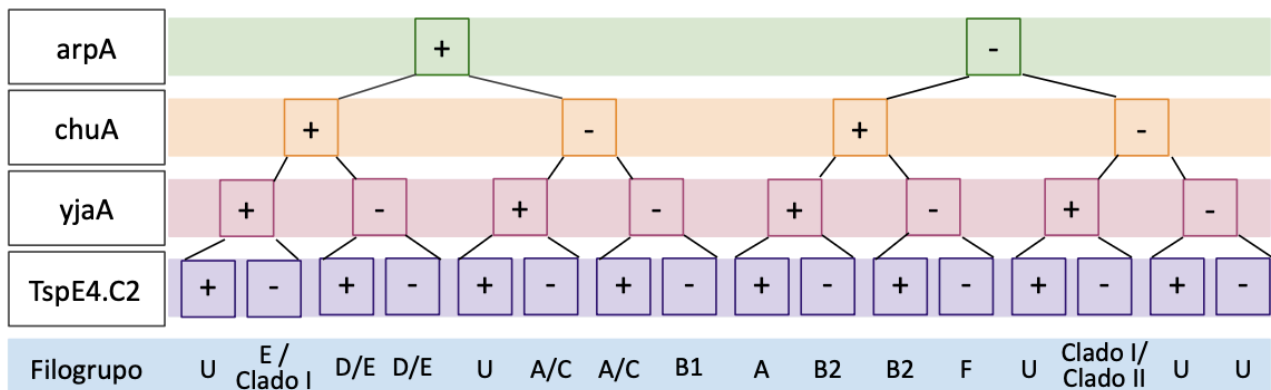


Figura 2. Interpretación de los resultados de la PCR cuádruplex para asignar los grupos filogenéticos según el protocolo de Clermont *et al.* (2013). La letra “U” hace referencia a un grupo filogenético desconocido, de manera que la cepa no es clasificable. La distinción entre los grupos filogenéticos A y C depende del resultado obtenido con los *primers* *trpA* y *trpAgpC*. El primero da positivo en ambos casos, mientras que el segundo únicamente lo hace para el grupo C. Por otro lado, la distinción entre los grupos filogenéticos D y E, entre el grupo filogenético E y el Clado I y entre el Clado I y el Clado II también requiere una caracterización complementaria con *primers* específicos. Adaptada de Flament Simon, (2021).

3.4.1.2 Determinación de genes de virulencia

En cada una de las cepas de *E.coli* se evaluó la presencia de genes codificantes de factores de virulencia causantes de infecciones extraintestinales (Clermont *et al.*, 2013; Dahbi *et al.*, 2014; Mamani *et al.*, 2019). La **tabla 2** recoge las características de los *primers* utilizados y las condiciones de la PCR.

El criterio para la determinación del estatus ExPEC en una cepa consiste en la presencia de dos o más de los siguientes genes: *papAH* y/o *papC*, *sfa/focDE*, *afa/draBC*, *KpsMII* y *iutA* (Johnson *et al.*, 2015). Por otro lado, una cepa es considerada UPEC si posee al menos tres de los siguientes genes: *chuA*, *fyuA*, *vat* y *yfcV* (Spurbeck *et al.*, 2012). A su vez, las cepas APEC son aquellas que tienen como mínimo cuatro de los siguientes genes: *hlyF*, *iutA*, *iroN*, *iss* y *ompT* (Johnson *et al.*, 2008).

TABLA 2. *Primers* usados para la detección de genes codificantes de factores de virulencia característicos de *E.coli* causantes de infecciones extraintestinales. Los volúmenes de trabajo se calcularon a partir de una concentración de alícuota 20 µM.

Diana	Primer	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Volumen (µL)	Producto PCR (pb)	Tª (°C) Anillamiento	Referencia
Adherencia y colonización						
PapC	Forward	GTGGCAGTATGAGTAATGACCGTTA	0.5	205	60	Johnson <i>et al.</i> (2015)
	Reverse	ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA				
PapEF	PapEF F	ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	0.5	336	62	Yamamoto <i>et al.</i> (1995)
	PapEF R	AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA				
Sfa/focDE	sfa 1	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC	0.5	410	64	Le Bouguenec <i>et al.</i> (1992)
	Sfa 2	CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA				
Afa/draBC	afa1	GCTGGGCAGCAAACCTGATAACTCTC	0.5	750		
	afa2	CATCAAGCTGTTTGTCGTCGGCCG				
yfcV	yfcV-F	ACATGGAGACCACGTTACCC	0.5	292	66	Spurbeck <i>et al.</i> (2012)
	yfcV-R	GTAATCTGGAATGTGGTCAGG				
Captación de hierro						
iucD	Aer f	TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT	0.5	602	64	Yamamoto <i>et al.</i> (1995)
	Aer r	AATATCTTCTCCAGTCCGGAGAAG				
iutA	Aer-851f	GGCTGGACATCATGGGAACTGG	0.5	301		Johnson <i>et al.</i> (1997)
	Aer-1152r	CGTCGGGAACGGGTAGAATCG				
iroN	Ironec-f	AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG	0.3	665	66	Jonhson <i>et al.</i> (2000)
	Ironec-r	GACGCCGACATTAAGACGCAG				
fyuA	fyuA-F	GTAAACAATCTCCCGCTCGGCAT	0.5	850	66	Spurbeck <i>et al.</i> (2012)
	fyuA-R	TGACGATTAACGAACCGGAAGGGA				
Resistencia al suero						
iss	is-f	CAGCAACCCGAACCACTTGATG	0.3	323	66	Johnson <i>et al.</i> (2008)
	is-r	AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA				

TABLA 2. Continuación.

Diana	Primer	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Volumen (μL)	Producto PCR (pb)	T ^a (°C) Anillamiento	Referencia
Resistencia al suero						
traT	TraTf	GGTGTGGTGCGATGAGCACAG	0.5	290	60	Johnson and Stell, (2000)
	TraTr	CACGGTTCAGCCATCCCTGAG				
OmpT	Forward	ATCTAGCCGAAGAAGGAGGC	1	559		Johnson <i>et al.</i> (2015)
	Reverse	CCCGGGTCATAGTGTTCATC				
kpsM II	KpsII f	GCGCATTTGCTGATACTGTTG	0.5	272	64	Johnson and Stell, (2000)
	KpsII r	CATCCAGACGATAAGCATGAGCA				
neuc-k1	neu1	AGGTGAAAAGCCTGGTAGTGTG	0.5	676		Moulin-Schouleur <i>et al.</i> (2006)
	neu2	GGTGGTACATCCCGGGATGTC				
kpsM II-k2	kpsII f	GCGCATTTGCTGATACTGTTG	0.5	570	60	Johnson and O'Bryan, (2004)
	KpsII-K2r	AGGTAGTTCAGACTCACACCT				
Producción de toxinas						
hlyA	hly f	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	0.3	1177	64	Yamamoto <i>et al.</i> (1995)
	hly r	ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA				
hlyF	Forward	TCGTTTAGGGTGCTTACCTCAA	0.5	444	60	Morales <i>et al.</i> (2004)
	Reverse	TTTGGCGGTTTAGGCATTCC				
tsh	tsh03	GGTGGTGCACTGGAGTGG	0.5	640	62	Dozois <i>et al.</i> (2000)
	tsh15	AGTCCAGCGTGATAGTGG				
vat	vat-F	TCAGGACACGTTTCAGGCATTCACT	0.5	1100	66	Spurbeck <i>et al.</i> (2012)
	Vat-R	GGCCAGAACATTTGCTCCCTTGTT				

El tipo de cápsula de *E.coli* se establece interpretando los resultados de la PCR tal y como se muestra en la **tabla 3**.

TABLA 3. Designación del tipo de cápsula basada en los resultados de la PCR.

Cápsula	Gen <i>kpsM-II</i>	Gen <i>neuC-K1</i>	Gen <i>kpsM-II-K2</i>	Gen <i>kpsM-II-K5</i>
Tipo II-K1	+	+	+	-
Tipo II-K2	+	-	+	-
Tipo II-K5	+	-	+	+

3.4.1.3 Determinación de genes de resistencia

La detección de los genes *bla* que codifican las enzimas de tipo TEM, SHV y CTX-M se realizó en aquellas cepas que previamente habían sido identificadas como productoras de ESBL. Para ello, se pusieron a punto las PCR pertinentes. Dicho proceso consistió en la preparación de un gradiente de temperaturas de anillamiento (48, 50, 55, 58, 60 y 64°C) y la adición de distintas concentraciones de los *primers* a la mezcla de reacción (volúmenes 0,3, 0,5 y 1µL empleando alícuotas 20µM). La **tabla 4** recoge las características de los *primers* utilizados y las condiciones de PCR que finalmente se determinaron como óptimas.

TABLA 4. *Primers* y condiciones de trabajo escogidas para la detección de las betalactamasas TEM, SHV y CTX-M de los grupos 1 y 9.

Diana	Primer	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Volumen (µL)	Producto PCR (pb)	T ^a (°C) Anillamiento	Referencia
<i>bla</i> CTX-M-grupo 9	CTX-M9-F	GTGACAAAGAGAGTGCAACGG	0,3	856	64	Simarro <i>et al.</i> 2000
	CTX-M9-R	ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC				
<i>bla</i> CTX-M-grupo 1	M13U	GGTTAAAAAATCACTGCGTC	0,5	863	60	Saladin <i>et al.</i> 2002
	M13L	TTGGTGACGATTTTAGCCGC				
<i>bla</i> TEM	TEM-1F	ATGAGTATTCAACATTTCCG	0,5	868	58	Rasheed <i>et al.</i> 1997
	TEM-1R	CTGACAGTTACCAATGCTTA				
<i>bla</i> SHV	SHV-F2	TTGTCGCTTCTTTACTCGCC	0,3	879	64	Mora <i>et al.</i> 2013
	SHV-R2	CCCGGCGATTTGCTGATTTTCGC				

Los primers *bla*CTX-M-grupo 9 y *bla*CTX-M-grupo 1 permiten detectar genes codificantes de betalactamasas de los grupos 9 y 1, respectivamente. Para identificar el tipo concreto de *bla*CTX-M producido por una cepa, sería necesario realizar su secuenciación.

3.4.2 Tipado del gen *fimH*

En primer lugar, se amplifica el gen *fimH* por medio de una PCR convencional. La reacción se efectúa en un volumen total de 50µL que contiene 1µL de ADN extraído, 1µL de cada uno de los *primers* específicos (**Tabla 5**) preparados a una concentración de 20µM y 10µL del buffer de reacción My Taq™ 5X (Bioline). Este último incluye los dNTPs a 5mM, MgCl₂ a 15 mM y 0,2µL de ADN polimerasa MyTaq™ (Bioline). El volumen final se ajusta añadiendo agua MiliQ esterilizada. Por otro lado, la reacción consta de una desnaturalización inicial de 3 minutos a 94°C, 35 ciclos compuestos por 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 1 minuto de anillamiento a 57°C y 1 minuto de extensión a 72°C, y una extensión final de 3 minutos a 72°C (Weissman *et al.*, 2012).

TABLA 5. *Primers* y condiciones de trabajo empleadas para la amplificación del gen *fimH*.

Gen	Primer	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Producto PCR (pb)	Tª (°C) Anillamiento	Referencia
<i>fimH</i> (tamaño del locus de 469pb)	fimH-wf	CACTCAGGGAACCATTCAGGCA	975	57	Weissman et al. (2012)
	fimH-wr	CTTATTGATAAACAAGTCAC			

Tras esto, se deben obtener las secuencias complementarias a las hebras *forward* y *reverse*. En nuestro caso, enviamos los amplicones al Servicio de Secuenciación de la Universidad de Santiago de Compostela (Lugo), donde implementaron el protocolo de Secuenciación Sanger por Ciclos con BigDye™ Terminator v3.1.

Por último, se analizan las secuencias nucleotídicas utilizando el software de secuenciación de CLUSTALw y BLAST, la base de datos GenBank [marca registrada de la NIH (*National Library of Medicine*) y el NCBI (*National Center of Biotechnology Information*)] y los servicios del CGE (*Centre for Genomic Epidemiology*).

3.5 Análisis estadístico

Se compararon los datos empleando la prueba exacta de Fisher (two-tailed) y el test Chi-cuadrado con la corrección de Yates. Una $P < 0,005$ indica una diferencia estadísticamente significativa.

4. Resultados

4.1 Caracterización fenotípica

4.1.1 Prevalencia de los serogrupos O8, O9 y O101

De los tres serogrupos a estudiar, el que se detectó más frecuentemente fue el O8, con una prevalencia del 9,8%, seguido del O101 con un 4,0% y el O9 con un 3,0%. Así, los tres serogrupos supusieron de manera conjunta el 17,0% de las cepas serotipadas. La prevalencia de los mismos no varió significativamente durante los tres años del estudio (**Tabla 6**).

TABLA 6. Prevalencia de los serogrupos O8, O9 y O101 entre las 348 cepas de *E.coli* bacteriémicas y distribución entre los años 2020, 2021 y 2022.

Serogrupos	Número (%) de cepas de <i>E.coli</i>			
	Total (n=348)	2020 (n=119)	2021 (n=177)	2022 (n=52)
O8	34 (9,8)	14 (11,8)	15 (8,5)	5 (9,6)
O9	11 (3,1)	6 (5,0)	3 (1,7)	2 (3,8)
O101	14 (4,0)	4 (3,4)	9 (5,1)	1 (1,9)
O8, O9, O101	59 (17,0)	24 (20,2)	27 (15,3)	8 (15,4)

4.1.2 Perfil de resistencia

Entre los 21 antimicrobianos analizados, en 6 (ampicilina, piperacilina, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, levofloxacina y trimetoprim-sulfametoxazol) se detectó que más del 50% de las cepas de la colección mostraban resistencia. Además, al menos el 25% de las cepas resultó ser resistente a 10 de ellos (los seis citados anteriormente y amoxicilina-ácido clavulánico, cefuroxima, gentamicina y tobramicina). Por el contrario, hubo 6 antibióticos (cefoxitina, imipenem, meropenem, ertapenem, amikacina y tigeciclina) para los que ninguna de las cepas fue resistente (**Tabla 7**).

En cuanto a diferencias estadísticamente significativas entre serogrupos, observamos que las cepas del serogrupo O101 (85,7%) resultaron ser más resistentes al ácido nalidíxico que las cepas de los serogrupos O8 (52,9%) y O9 (45,5%) ($P=0,029$ con Fisher-two-tailed; $P=0,046$ con Chi-cuadrado-Yates/ Valores P calculados acumulando los datos de resistencias de las cepas O8 y O9). Lo mismo ocurre con las resistencias a las otras dos quinolonas analizadas; la ciprofloxacina (85,7% para O101; 52,9% para O8; 36,4% para O9) ($P=0,027$ con Fisher-two-

tailed; $P=0,033$ con Chi-cuadrado-Yates) y la levofloxacin (85,7% para O101; 50,0% para O8; 36,4% para O9) ($P=0,013$ con Fisher-two-tailed; $P=0,023$ con Chi-cuadrado-Yates) (**Tabla 7**).

Por último, la mayoría de las cepas de los tres serogrupos fueron resistentes al menos a un agente de 3 o más clases de antimicrobianos, habiendo un 55,9% de cepas MDR para el serogrupo O8, un 63,6% para el O9 y un 71,4% para el O101 (**Tabla 7**).

TABLA 7. Resistencias de las cepas de E.coli de los serogrupos O8, O9 y O101.

Antimicrobiano	Número (%) de cepas de <i>E.coli</i>			
	Total (n=59)	O8 (n=34)	O9 (n=11)	O101 (n=14)
Ampicilina	49 (83,1)	26 (76,5)	10 (90,9)	13 (92,9)
Piperacilina	44 (74,5)	24 (70,6)	9 (81,8)	11 (78,6)
Piperacilina-Tazobactam	6 (10,2)	5 (14,7)	1 (9,1)	0
Amoxicilina-Clavulánico	23 (39,0)	13 (38,2)	5 (45,5)	5 (35,7)
Cefuroxima	15 (25,4)	9 (26,5)	2 (18,2)	4 (28,6)
Cefotaxima	9 (15,3)	5 (14,7)	1 (9,1)	3 (21,4)
Ceftazidima	5 (8,5)	4 (11,8)	0	1 (7,1)
Cefepime	11 (18,6)	6 (17,6)	1 (9,1)	4 (28,6)
Aztreonam	7 (11,9)	4 (11,8)	0	3 (21,4)
Gentamicina	19 (32,2)	12 (35,3)	2 (18,2)	5 (35,7)
Tobramicina	18 (30,5)	12 (35,3)	2 (18,2)	4 (28,6)
Ácido Nalidíxico	35 (52,3)	18 (52,9)	5 (45,5)	12 (85,7)
Ciprofloxacina	34 (57,6)	18 (52,9)	4 (36,4)	12 (85,7)
Levofloxacina	33 (55,9)	17 (50,0)	4 (36,4)	12 (85,7)
Trimetoprim-Sulfametoxazol	39 (66,1)	22 (64,7)	6 (54,5)	11 (78,6)
Resistencia múltiple	36 (61,0)	19 (55,9)	7 (63,6)	10 (71,4)

TABLA 7. Continuación.

	Número (%) de cepas de <i>E.coli</i>			
	Total (n=59)	O8 (n=34)	O9 (n=11)	O101 (n=14)
Productoras de ESBL	9 (15,3)	5 (14,7)	1 (9,1)	3 (21,4)

^aNinguna de las 348 cepas analizadas fue resistente a los siguientes antimicrobianos: Cefoxitina, Imipenem, Meropenem, Ertapenem, Amikacina y Tigeciclina.

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

Las cepas de los serogrupos O8, O9 y O101 resultaron ser más prevalentes entre las cepas con resistencias múltiple (34,3%) que entre las cepas sin resistencia múltiple (9,5%), siendo las diferencias estadísticamente significativas tanto si los datos se analizan individualmente por serogrupo como si se hace conjuntamente (**Tabla 8**).

TABLA 8. Prevalencia de los serogrupos O8, O9 y O101 entre las 348 cepas de *E.coli* bacteriémicos y distribución de cepas con resistencia múltiple.

Serogrupos	Número (%) de cepas de <i>E.coli</i>			P-valor MDR vs no-MDR
	Total (n=348)	MDR (n=105)	No-MDR (n=243)	
O8	34 (9,8)	19 (18,1)	15 (6,2)	0,0009 (Fisher/two-tailed) 0,001 (Chi-cuadrado/Yates)
O9	11 (3,1)	7 (6,7)	4 (1,6)	0,02 (Fisher/two-tailed)
O101	14 (4,0)	10 (9,5)	4 (1,6)	0,001 (Fisher/two-tailed)
O8, O9, O101	59 (17,0)	36 (34,3)	23 (9,5)	<0,0001 (Fisher/two-tailed) <0,0001 (Chi-cuadrado/Yates)

Cuando las diferencias son estadísticamente significativas figuran en negrilla.

4.2 Caracterización molecular

La caracterización molecular se realizó sobre una selección aleatoria de 53 de las 59 cepas totales pertenecientes a los serogrupos O8, O9 y O101.

4.2.1 Grupos filogenéticos

Los grupos filogenéticos más abundantes entre las cepas de nuestra colección son el C (35,8%), el B1 (34,0%) y el A (24,5%). Las cepas del grupo C son prácticamente en su totalidad del serogrupo O8 (18 de 19) ($P=0,0084$ y $P=0,0001$ para O8 vs O9 y O8 vs O101 respectivamente, con la prueba de Fisher-two-tailed), englobando el 62,1% de las cepas O8. Las cepas del grupo A pertenecen todas al serogrupo O101 (13 de 13) ($P=0,001$ y $P<0,0001$ para O101 vs O8 y O101 vs O9 respectivamente, con la prueba de Fisher-two-tailed), representando 13 de las 14 cepas O101. A su vez, las cepas del grupo B1 se dividen más o

menos a partes iguales entre el serogrupo O8 y el O9, abarcando la mayoría de los miembros de este último serogrupo (8 de 10). A mayores, se detectó una cepa del grupo filogenético B2 perteneciente al serogrupo O8 y dos cepas de grupo filogenético desconocido correspondientes a los serogrupos O8 y O9 (**Tabla 9**).

TABLA 9. Comparación de la prevalencia de los grupos filogenéticos entre las 53 cepas bacteriémicas de *E.coli* pertenecientes a los serogrupos O8, O9 y O101.

Grupos filogenéticos	Número (%) de cepas				P-valor ^a		
	Total (n=53)	O8 (n=29)	O9 (n=10)	O101 (n=14)	O8 vs O9	O8 vs O101	O9 vs O101
A	13 (24,5)	0	0	13 (92,9)		0,0001	<0,0001
B1	18 (34,0)	9 (31,0)	8 (80)	1 (7,1)	0,0107		0,0005
B2	1 (1,9)	1 (3,4)	0	0			
C	19 (35,8)	18 (62,1)	1 (10)	0	0,0084	0,0001	
U	2 (3,8)	1 (3,4)	1 (10)	0			

^a Únicamente se muestran los P-valores obtenidos mediante la prueba exacta de Fisher-two-tailed cuando estos son menores que 0,05.

^bLa letra “U” hace referencia a un grupo filogenético desconocido, de manera que la cepa no es clasificable.

4.2.2 Perfil de virulencia

En lo que se refiere a los genes que codifican para adhesinas, vemos que *papC* y *papEF*, los cuales pertenecen al mismo operón, se han detectado en aproximadamente la tercera parte (34%) de las cepas, siendo especialmente frecuentes entre las cepas del serogrupo O8 (41,4%). En contraste, los genes *sfa/focDE* e *yfcV* únicamente se han encontrado en una y dos cepas, respectivamente, mientras que la secuencia génica *afa/draBC* no se identificó en ninguna cepa (**Tabla 10**).

En cuanto a los cuatro genes (*iucD*, *iutA*, *IroN* y *fyuA*) que codifican para sideróforos encargados de la captación de hierro, observamos que se han detectado en más del 50% de las cepas, siendo mucho más abundantes entre las cepas de los serogrupos O8 y O9 que entre aquellas del serogrupo O101 (**Tabla 10**).

A su vez, los genes *iss*, *traT* y *ompT*, implicados en la resistencia al suero, también se han hallado en más del 50% de las cepas, siendo nuevamente mucho más prevalentes entre las cepas O8 y O9 que entre las O101. En contraste, los genes que codifican para los antígenos capsulares K1 y K2 únicamente se localizaron en una cepa del serogrupo O8 (**Tabla 10**).

En lo que respecta a los genes que codifican para la producción de toxinas, vemos que el gen *hlyF* está presente en la mayoría (84,9%) de las cepas de la colección, mientras que los genes *tsh* (7,5%) y *vat* (5,7%) se han identificado en una pequeña proporción de las mismas y el gen *hlyA* en ninguna de las 53 cepas analizadas (**Tabla 10**).

Por otro lado, la mayoría de las cepas de los tres serogrupos no contaron con los genes de virulencia necesarios para poder ser clasificados dentro de los estatus ExPEC y UPEC. Sin embargo, el 78,9% y el 70,0% de las cepas del serogrupos O8 y O9 respectivamente, resultaron presentar el estatus APEC (**Tabla 10**).

Por último, la media de genes codificantes de factores de virulencia se mostró mayor en el serogrupo O8 (6,9), seguido del serogrupo O9 (6,2) y el O101 (2,7) (**Tabla 10**).

TABLA 10. Genes codificantes de factores de virulencia estudiados en las 53 cepas bacteriémicas de *E.coli* pertenecientes a los serogrupos O8, O9 y O101.

Genes codificantes de FV	Número (%) de cepas				P-valor ^a		
	Total (N=53)	O8 (N=29)	O9 (N=10)	O101 (N=14)	P-valor O8 vs O9	P-valor O8 vs O101	P-valor O9 vs O101
Adherencia y colonización							
PapC	18 (34,0)	12 (41,4)	4 (40,0)	2 (14,3)			
PapEF	18 (34,0)	12 (41,4)	3 (30,0)	3 (21,4)			
Sfa/focDE	1 (1,9)	1 (3,4)	0	0			
Afa/draBC	0	0	0	0			
yfcV	2 (3,8)	2 (6,9)	0	0			
Captación de hierro							
iucD	37 (69,8)	23 (79,3)	8 (80,0)	6 (42,9)		0,0347	
iutA	39 (73,6)	24 (82,8)	8 (80,0)	7 (50,0)		0,0351	
IroN	36 (67,9)	26 (89,7)	7 (70,0)	3 (21,4)		0,0001	0,0351

TABLA 10. Continuación.

Genes codificantes de FV	Número (%) de cepas				P-valor ^a		
	Total (N=53)	O8 (N=29)	O9 (N=10)	O101 (N=14)	P-valor O8 vs O9	P-valor O8 vs O101	P-valor O9 vs O101
Captación de hierro							
fyuA	31 (58,5)	19 (65,5)	10 (100,0)	2 (14,3)	0,0401	0,0028	0,0001
Resistencia al suero							
iss	33 (62,3)	23 (79,3)	7 (70,0)	3 (21,4)		0,0006	0,0351
traT	34 (64,2)	24 (82,8)	7 (70,0)	3 (21,4)			0,0351
OmpT	30 (56,6)	21 (72,4)	7 (70,0)	2 (14,3)			0,0104
kpsM II	1 (1,9)	1 (3,4)	0	0			
neuc-k1	1 (1,9)	1 (3,4)	0	0			
kpsM II-K2	1 (1,9)	1 (3,4)	0	0			
Producción de toxinas							
hlyA	0	0	0	0			
hlyF	45 (84,9)	28 (96,6)	8 (80,0)	9 (64,3)			
tsh	4 (7,5)	3 (10,3)	0	1 (7,14)			
vat	3 (5,7)	3 (10,3)	0	0			
Estatus ExPEC	17 (32,7)	12 (41,4)	3 (30,0)	2 (14,3)		0,0949	
Estatus UPEC	2 (3,8)	2 (6,9)	0	0			
Estatus APEC	32 (60,4)	22 (78,9)	7 (70,0)	3 (21,4)		0,0011	0,0351
Media de genes de virulencia	5,7	6,9	6,2	2,7			

^a Únicamente se muestran los P-valores obtenidos mediante la prueba exacta de Fisher de dos colas cuando estos son menores que 0,05.

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

Asignación de la cápsula

En la cepa número 46 de la colección, perteneciente al serogrupo O8, se detectó la presencia de los genes *kpsM II*, *neuc-k1* y *kpsM II-K2*. Siguiendo las indicaciones de la **tabla 3**, esto nos indica que posee una cápsula del tipo II-K1, siendo así la única cepa de para la que se ha detectado una cápsula de tipo II.

4.2.3 Perfil de resistencia

De las nueve cepas identificadas como ESBLEC, cinco pertenecen al serogrupo O8, tres al serogrupo O101 y una al serogrupo O9. Entre las betalactamasas que se estudiaron en dichas cepas, la más abundante fue TEM (77,8% de las cepas ESBLEC), seguida de CTX-M-Grupo 1 (55,6%) y CTX-M-Grupo 9 (22,2%). Por el contrario, la enzima SHV no fue detectada en ninguna cepa. Además, el 44,4% de las cepas ESBLEC cuentan con el estatus APEC y el 33,3% con el estatus ExPEC (**Tabla 11**).

TABLA 11. Características de las 9 cepas de *E.coli* bacteriémicas ESBLEC. Análisis del serogrupo, de la presencia de genes de β -lactamasas (CTX-M-G1, CTX-M-G9, TEM y SHV) y del estatus ExPEC, UPEC y APEC.

Cepas ESBLEC (número colección)	Serogrupo	Genes de β -lactamasas				Estatus		
		CTX-M-G1	CTX-M-G9	TEM	SHV	ExPEC	UPEC	APEC
3	O8	-	-	-	-	+	-	+
10	O9	-	+	-	-	+	-	+
15	O8	+	-	+	-	-	-	+
18	O8	+	-	+	-	-	-	+
22	O101	-	-	+	-	+	-	-
26	O101	+	-	+	-	-	-	-
43	O101	-	+	+	-	-	-	-
45	O8	+	-	+	-	-	-	-
53	O8	+	-	+	-	-	-	-
Recuento (n=9)		5 (55,6%)	2 (22,2%)	7 (77,8%)	0	3 (33,3%)	0	4 (44,4%)

4.2.4 Tipado del gen *fimH*

De las 16 variantes diferentes del gen *fimH* identificadas en la colección, 12 (3,25, 30, 34, 35, 38, 53, 87, 142, 248-like, 303 y 511) fueron detectadas únicamente en cepas del serogrupo O8. Por otro lado, las variantes 39 y 54 se encontraron en cepas de los filoserogrupos O8-C y O101-A. Además, la variante 27 se observó en cepas de los grupos filogenéticos B1 y C tanto en el serogrupo O8 como en el O9. Por último, la variante 32 se localizó en cepas de los tres serogrupos pertenecientes en todos los casos al grupo filogenético B1. Estos datos se muestran en la **tabla 12** y la **figura 3**.

TABLA 12. Variantes del gen *fimH* identificadas en la colección, filoserogrupos en los que fueron encontradas y número de cepas en las que se detectaron.

Variantes del gen <i>fimH</i>	Filoserogrupo	Número de cepas
3	O8-B2	1
25	O8-C	1
27	O8-C	1
	O8-B1	1
	O9-C	1
	O9-B1	2
30	O8-B1	1
32	O8-B1	4
	O9-B1	6
	O101-B1	1
34	O8-B1	1
35	O8-C	1
38	O8-B1	1
39	O8-C	9
	O101-A	1
53	O8-C	1
54	O8-C	1
	O101-A	11
87	O8-B1	1
142	O8-C	1
248-like	O8-U	1
303	O8-C	1
511	O8-C	1
No tipable (Nt)	O8-C	1
	O9-U	1
	O101-A	1

Los cuatro clones predominantes aparecen resaltados en negrilla: **O8-B1-*fimH32*** (4 cepas), **O9-B1 *fimH32*** (6 cepas), **O8-C-*fimH39*** (9 cepas) y **O101-A-*fimH54*** (11 cepas).

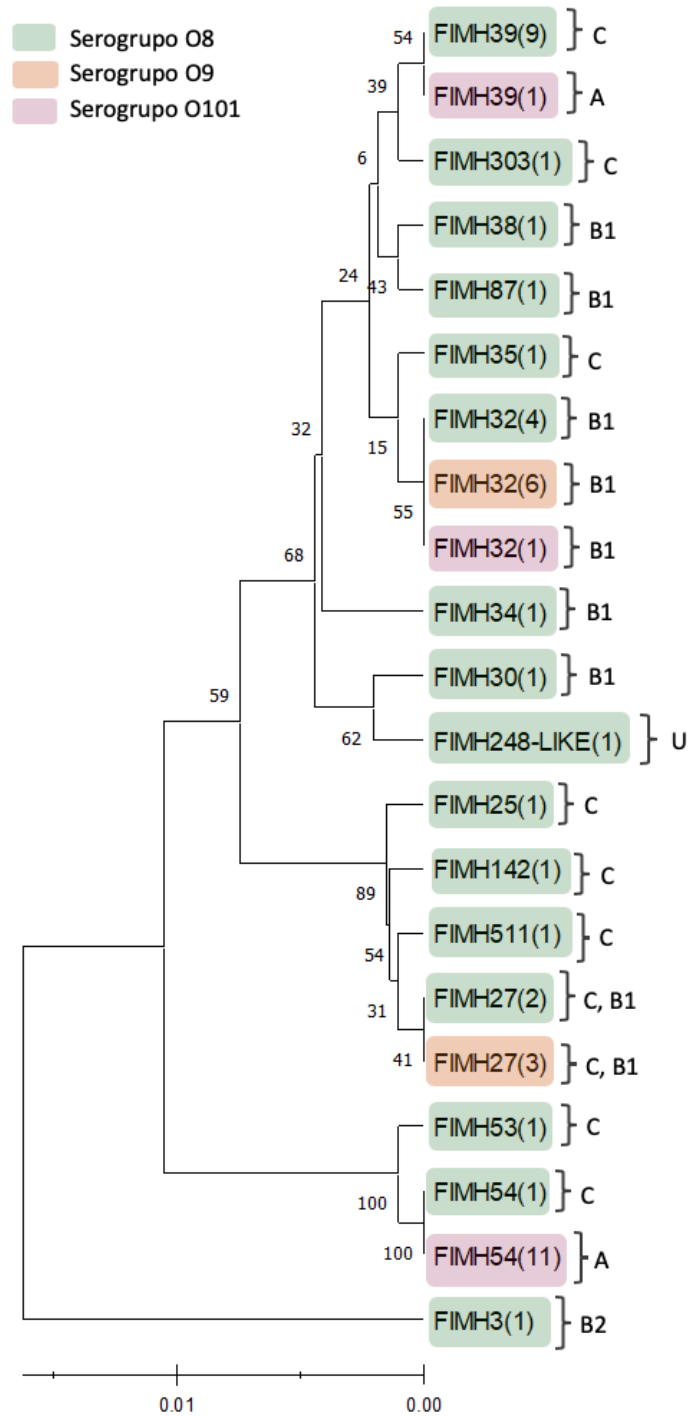


Figura 3. Árbol filogenético de las secuencias nucleotídicas de los alelos *fimH* encontrados en las 53 cepas de *E.coli* bacteriémicas pertenecientes a los serogrupos O8, O9 y O101.

^aEl árbol fue construido mediante el método de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) de MEGA 11. El modelo de sustitución nucleotídica empleado fue la distancia *p*, incluyendo tanto transiciones como transversiones. Las tasas de sustitución fueron uniformes entre sitios y se aplicó el mismo patrón en todos los linajes. La robustez del árbol se evaluó utilizando el método Bootstrap con 100 réplicas.

^bEl esquema muestra todas las variantes del gen *fimH* encontradas en cada serogrupo (color verde para el serogrupo O8, rosa para el O9 y naranja para el O101), así como el número de cepas en el que están presentes (indicado entre paréntesis). Además, también se especifican los grupos filogenéticos a los que pertenecen dichas cepas.

5. Discusión

5.1 Prevalencia de los serogrupos O8, O9 y O101

En este trabajo hemos analizado una colección de 53 cepas de *E.coli* bacteriémicas pertenecientes a los serogrupos O8, O9 y O101. Dicha colección proviene de una selección de los serogrupos mencionados en el conjunto total de las 348 cepas que fueron aisladas en el HULA durante los años 2020, 2021 y 2022. El serogrupo O8 engloba el 9,8% de ese conjunto muestral inicial, siendo el serogrupo más prevalente, junto con el O2 y el O25, entre las cepas de *E.coli* causantes de bacteriemias en Lugo. A su vez, los serogrupos O9 y O101 representan el 3,1% y el 4,0% respectivamente, entrando también en el TOP10 de los serogrupos más prevalentes.

Previamente en el LREC-USC se había realizado un estudio donde se determinaron los serogrupos de las 3.260 cepas de *E.coli* bacteriémicas aisladas en el HULA entre los años 1989 y 2011 (Mamani R.S., 2015). Comparando nuestros datos con los de este estudio, podemos ver que la frecuencia de los serogrupos O8 (7,5% vs 9,8%) y O9 (3,7% vs 3,1%) se ha mantenido bastante estable. Por el contrario, la presencia del serogrupo O101 ha sufrido un aumento significativo (2,1% vs 4,0%; $P=0,042$) (Tabla 13). Cabe mencionar que, por aquel entonces, los tres serogrupos ya se encontraban entre los 10 más prevalentes (Tabla 14).

TABLA 13. Comparación de la prevalencia de los serogrupos O8, O9 y O101 entre las cepas de *E.coli* bacteriémicas aisladas en el HULA durante los periodos 1989-2011 (Mamani R. S., 2015) y 2020-2022.

Periodo del estudio	Serogrupo			P-valor ¹		
	O8	O9	O101	O8 vs no O8	O9 vs no O9	O101 vs no O101
1989-2011 (n=3.260)	243 (7,5%)	120 (3,7%)	70 (2,1%)			0,042
2020-2022 (n=348)	34 (9,8%)	11 (3,1%)	14 (4,0%)			

¹ Únicamente se muestran los P-valores cuando las diferencias son significativas. Como en uno de los estudios el tamaño muestral es muy grande, el valor de la P se obtiene exclusivamente con el test Chi-cuadrado-Yates.

Comparando con otros estudios de identificación de los serogrupos en cepas de *E.coli* bacteriémicas realizados en diferentes zonas geográficas, observamos que en ninguno de ellos los tres serogrupos O8, O9 y O101 se encuentran de manera conjunta entre los 10 serogrupos más prevalentes (Tabla 14). No obstante, en casi todos los casos sí se sitúan entre los 15 primeros puestos. Quizás la diferencia más radical se encuentre en el serogrupo O8, que es mucho más prevalente en nuestra área sanitaria que en otras regiones. Estos registros

muestran que la prevalencia de los serogrupos en las cepas de *E.coli* bacteriémicas varía según la zona geográfica, lo cual dificulta el diseño de una vacuna eficaz en todo el mundo.

TABLA 14. Comparación de la prevalencia de los serogrupos O8, O9 y O101 entre cepas de *E.coli* bacteriémicas aisladas en diferentes países y periodos de tiempo: Lugo 1989-2011 (Mamani R. S., 2015), Lugo 2020-2022), París (Royer *et al.*, 2022), Inglaterra (Kallonen *et al.*, 2017), Japón (Matsumoto *et al.*, 2022) y Global (Europa, norte y sur de América y Asia-Pacífico) (Weerdenburg *et al.*, 2022). Además, se indica en qué posición se encuentra cada serogrupo en el ranking de prevalencia.

Serogrupo	Lugo 1989-2011 (n=3260)	Lugo 2020-2022 (n=348)	París 2005, 2016-2017 (n=912)	Inglaterra 2001-2011 (n=1509)	Japón 2015-2017 (n=401)	Global 2011-2017 (n=3217)
O8	243 (7,5%)	34 (9,8%)	51 (5,6%)	45 (3,0%)	5 (1,2%)	104 (3,2%)
Posición	3	1-2-3 ^a	7	11	12-13	7
O9	120 (3,7%)	11 (3,1%)	37 (4,1%)	27 (1,8%)		51 (1,6%)
Posición	8	9-10	8	12		13
O101	70 (2,1%)	14 (4,0%)	20 (2,2%)			50 (1,6%)
Posición	10	6-7	14			14

^aEmpate con otros dos serogrupos (O2 y O25) en la misma posición.

5.2 Serogrupos O8, O9 y O101 y potencial de virulencia

Durante los años 1989-1993 y 2010-2011, se estudiaron muchos de los genes codificantes de factores de virulencia analizados en nuestro trabajo en cepas de *E.coli* bacteriémicas pertenecientes a los serogrupos O8 y O9 que también fueron aisladas en el HULA (Mamani R. S., 2015). Comparando estos datos con los resultados que hemos obtenido, observamos que en las dos investigaciones ambos serogrupos comparten sus genes más prevalentes: *iucD*, *iroN*, *iss*, *traT* y *papEF*. La frecuencia de los genes *iucD* y *traT* para los serogrupos O8 y O9 y del gen *papEF* para el serogrupo O8 no sufrió cambios significativos a lo largo de los tres periodos evaluados. Sin embargo, para el serogrupo O9 la prevalencia de los genes *iroN*, *iss* y *papEF* aumentó significativamente del periodo de 1989-1993 al de 2010-2011. Además, para el serogrupo O8 la prevalencia de los genes *iroN* e *iss* se incrementó significativamente del periodo de 2010-2011 al de 2020-2022 (**Tabla 15**).

TABLA 15. Comparación de los genes de virulencia más prevalentes de las cepas de *E.coli* bacteriémicas pertenecientes a los serogrupos O8 y O9 aisladas en el HULA en los periodos de 1989-1993 y 2010-2011 (Mamani R. S., 2015) y el periodo 2020-2022.

Genes codificantes de FV	Cepas 1989-1993		Cepas 2010-2011		Cepas 2020-2022	
	O8 (n=17)	O9 (n=9)	O8 (n=60)	O9 (n=35)	O8 (n=29)	O9 (n=10)
iucD	10 (59%)	5 (56%)	47 (78%)	23 (66%)	23 (79%)	8 (80%)
iroN	8 (47%)	2 (22%)	40 (67%)	22 (63%)	26 (90%)	7 (70%)

TABLA 15. Continuación.

Genes codificantes de FV	Cepas 1989-1993		Cepas 2010-2011		Cepas 2020-2022	
	O8 (n=17)	O9 (n=9)	O8 (n=60)	O9 (n=35)	O8 (n=29)	O9 (n=10)
iss	8 (47%)	2 (22%)	26 (43%)	22 (63%)	23 (79%)	7 (70%)
traT	13 (76%)	4 (44%)	45 (75%)	23 (66%)	24 (83%)	7 (70%)
papEF	4 (24%)	1 (11%)	24 (40%)	18 (51%)	12 (41%)	3 (30%)

En negrilla se señalan las variaciones estadísticamente significativas ($P < 0,005$) entre un periodo y el siguiente. El P -valor fue obtenido mediante la prueba exacta de Fisher de dos colas.

Por otro lado, el valor medio de genes de virulencia por cepa ha ido aumentando a lo largo de estos tres periodos. Para el serogrupo O8, los valores han sido de 4,4, 5,3 y 6,9 consecutivamente, mientras que para el serogrupo O9 han sido de 3,0, 5,4 y 6,2. En ambos casos, la media ha sido mayor que la obtenida durante los años 2020-2022 para el serogrupo O101, que ha resultado ser de 2,7. Sin embargo, analizando datos adicionales del estudio de Mamani R.S. (2015), vemos que los tres serogrupos presentan una media de genes de virulencia mucho menor que las cepas de otros serogrupos prevalentes como O2, O4, O6, O18 y O25. Esto concuerda con estudios como el de Blanco *et al.* (1994). También coincide con el hecho de que normalmente esos últimos serogrupos están asociados con los grupos filogenéticos B2 y D, los cuales se ha visto que dan lugar a la gran parte de las cepas ExPEC (Clermont *et al.*, 2000; Gordon *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2008) y que poseen un mayor número de genes de virulencia (Bingen-Bidois *et al.*, 2002; Johnson y Stell, 2000; Jonhson *et al.*, 2002; Moreno *et al.*, 2005; Sannes *et al.*, 2004).

Otra prueba de la escasez de genes de virulencia en estos serogrupos es que en la mayoría de los casos no se alcanzó el estatus ExPEC. En concreto, únicamente lo hizo el 41,4%, el 30% y el 14,3% de las cepas de los serogrupos O8, O9 y O101, respectivamente. Al comparar estas frecuencias con las obtenidas durante los años 1989-1993 y 2010-2011, no se observan variaciones significativas. Además, se detectaron solo 2 cepas con estatus UPEC en toda la colección, ambas pertenecientes al serogrupo O8. En cambio, la mayor parte de las cepas de los serogrupos O8 (78,9%) y O9 (70,0%) cuentan con el estatus APEC. El serogrupo O8 es uno de los más comunes en las colibacilosis aviarias (Cordoni *et al.*, 2016; Maluta *et al.*, 2014) y ambos serogrupos han sido detectados previamente en cepas APEC, tal y como muestra el estudio de Rodríguez-Siek *et al.* (2005).

5.3 Filoserogrupos, potencial de virulencia y resistencia antimicrobiana

A pesar de que anteriormente hemos analizado los genes de virulencia en función de los serogrupos O, conviene hacerlo en relación a los filoserogrupos, ya que este concepto no sólo engloba las características antigénicas sino también las relaciones evolutivas. De esta manera,

nos acercamos más a lo que hoy en día se entiende como grupo clonal o clon, un término que describe aquellos microorganismos genéticamente idénticos o muy similares que provienen de un ancestro común (Spratt, 2004).

En nuestra colección, los filoserogrupos más prevalentes fueron el O8-C, O8-B1, O9-B1 y O101-A, observándose que las cepas con el estatus ExPEC predominan especialmente entre las de los filoserogrupos O8-C (55,0%) (**Tabla 16**).

TABLA 16. Relación de los serogrupos más frecuentes entre las cepas de *E.coli* bacteriémicas aisladas durante los años 2020-2022 con el estatus ExPEC.

Filoserogrupo	Número de cepas	Estatus ExPEC
O8-C	18	10 (55,0%)
O8-B1	9	1 (11,1%)
O9-B1	8	3 (37,5%)
O101-A	14	2 (14,3%)

El hecho de que la mayoría de las cepas de los filoserogrupos O8-B1, O9-B1 y O101-A no hayan presentado los genes de virulencia necesarios para poder ser clasificados dentro del estatus ExPEC, sugiere que estos pueden poseer otros genes que jueguen un papel esencial en su virulencia o contar con un nivel elevado de resistencias a antimicrobianos que justifique su alta prevalencia.

Por este motivo, es de especial interés estudiar el perfil de resistencia de estos filoserogrupos y ver su evolución a lo largo del tiempo. En el estudio de Mamani R. S (2015), se evalúa la resistencia a diferentes clases de antibióticos en las cepas aisladas entre los años 2010 y 2011. Al comparar dichos datos con los de nuestra colección, observamos que en los tres filoserogrupos los porcentajes derivados del recuento total de cepas resistentes, sin importar el número de antibióticos a los que lo sean, se han mantenido elevados. Sin embargo, sí ha habido un aumento significativo en el número de cepas con resistencia múltiple (MDR), es decir, resistentes a antibióticos de 3 o más clases. Esto nos indica que en los últimos años cepas que únicamente eran resistentes a una o dos clases de antibióticos han desarrollado nuevas resistencias. A mayores, tanto la resistencia a las cefalosporinas de espectro extendido como la producción β -lactamasas de espectro extendido se ha incrementado significativamente en el filoserogrupo O8-B1 (**Tabla 17**).

De esta manera, hoy en día los filoserogrupos multirresistentes O8-B1, O9-B1 y O101-A que han emergido en Lugo podrían estar representando grupos clonales con la capacidad de expandirse exitosamente. Por ello, es crucial que en un futuro se dirijan recursos hacia la caracterización de sus cepas.

TABLA 17. Resistencias a antimicrobianos en cepas de *E.coli* bacteriémicas aisladas en el HULA durante el periodo de 2010-2011 (Mamani R. S., 2014) y de 2020-2022 pertenecientes a los filoserogrupos O8-B1, O9-B1 y O101-A.

Filoserogrupo	Periodo	CIP	SXT	AMINO	AMC	CEE	ESBL	R3	R2	R1	R
O8-B1	2010-2011 (n=20)	8 (40)	7 (35)	2 (10)	2 (10)	1 (5)	1 (5)	2 (10)	3 (15)	8 (40)	13 (65)
	2020-2022 (n=9)	3 (33)	6 (67)	2 (22)	2 (22)	4 (44)	4 (44)	5 (56)	2 (22)	0	7 (78)
O9-B1	2010-2011 (n=9)	1 (11)	7 (78)	3 (33)	0	1 (11)	1 (11)	0	4 (44)	4 (44)	8 (89)
	2020-2022 (n=8)	3 (38)	4 (50)	1 (13)	2 (25)	1 (13)	1 (13)	4 (50)	4 (50)	0	8 (100)
O101-A	2010-2011 (n=16)	14 (88)	10 (63)	6 (38)	3 (19)	1 (6)	1 (6)	6 (38)	5 (31)	4 (25)	15 (94)
	2020-2022 (n=13)	11 (85)	11 (85)	5 (38)	5 (38)	4 (31)	3 (23)	11 (85)	0	0	11 (85)

^aCIP= resistencia a ciprofloxacina, SXT= resistencia al trimetoprim/sulfametoxazol, AMINO= resistencia a aminoglucósidos, AMC= resistencia a amoxicilina-ácido clavulánico, CEE= resistencia a cefalosporinas de espectro extendido (cefotaxima, ceftazidima y cefepima), ESBL= producción de β-lactamasas de espectro extendido, R3= resistencia a antimicrobianos de 3 o más clases, R2= resistencia a antimicrobianos de 2 clases, R1= resistencia a antimicrobianos de una única clase, R= total de cepas resistentes.

^bEn negrilla se señalan las variaciones estadísticamente significativas (P<0,005) entre un periodo y el siguiente. El P-valor fue obtenido mediante la prueba exacta de Fisher de dos colas.

5.4 Tipado del gen *fimH*

Históricamente, el alelo *fimH* se ha utilizado para clasificar los distintos linajes de *E.coli* en grupos clonales o incluso subgrupos dentro de los mismos, como es el caso del grupo clonal ST131, causante de la mayoría de las infecciones extraintestinales en seres humanos. Este se subdivide en tres grupos principalmente asociados a *fimH*, denominados clado A (*fimH41*), clado B (*fimH22*) y clado C (*fimH30*) (Nicholas-Chanoine *et al.*, 2007, 2014). En nuestra colección, la variante *fimH32* fue detectada en cepas de los tres serogrupos, lo que sugiere un origen evolutivo común de las mismas. Esta hipótesis se ve reforzada por el hecho de que dichas cepas resultaron ser en su totalidad del grupo filogenético B1 (**Figura 3**). Por otro lado, en la literatura únicamente se describe la asociación del alelo *fimH32* con el serogrupo O8 y del *fimH35* con el O9 (Weissman *et al.*, 2012). Sin embargo, las cepas analizadas muestran nuevas combinaciones posibles, lo que indica la necesidad de realizar estudios adicionales destinados a descifrar estas relaciones.

5.5 Serogrupos O8, O9 y O101 y producción de ESBL

E.coli es la principal causa de las infecciones en el torrente sanguíneo, las cuales han aumentado significativamente en los últimos años debido a la aparición de cepas multirresistentes y productoras β -lactamasas de espectro extendido (Mamani et al., 2019; Tumbarello et al., 2010). Del conjunto de 348 cepas de *E.coli* bacteriémicas aisladas en el HULA durante los años 2020-2022 al que pertenece la colección utilizada en este trabajo, se analizaron los 221 ejemplares correspondientes a los serogrupos más prevalentes, de los cuales 22 resultaron ser productores de ESBL (10,0%). La presencia de ESBLEC causantes de bacteriemias en el HULA ya había sido examinada previamente. Entre los años 1989 y 2000, se aislaron 975 cepas de *E.coli* a partir de hemocultivos y ninguna de ellas se identificó como productora de ESBL (Mamani R.S., 2015). Por otro lado, durante los periodos de 2000-2005 y 2006-2011 se obtuvieron 827 y 1600 cepas respectivamente, detectándose la producción de ESBL en 8 (1,0%) y 88 (5,5%) de las mismas (Mamani et al., 2019). Asimismo, entre enero y abril del año 2012 se recogieron 1763 cepas y se determinó la presencia de ESBL en 141 (8,0%) de ellas (Dahbi Zbiti, 2015). Además, en el año 2016 se aislaron en total 100 cepas, de las cuales 6 (6,0%) contaban con ESBL (Flament-Simon et al., 2020). Estos datos reflejan un incremento progresivo de la prevalencia de las cepas ESBL en el hospital lucense.

Entre las 59 cepas bacteriémicas pertenecientes a los serogrupos O8, O9 y O101 aisladas durante el periodo 2020-2022, se encontraron 9 cepas ESBL, lo que representa un 15,3% de las mismas. Este porcentaje es algo superior al 10,0% hallado en el conjunto total de cepas recolectadas a lo largo de dicho periodo, lo que sugiere que estos tres serogrupos figuran entre los más frecuentes en los ESBLEC. Esto concuerda con el estudio realizado por Mamani *et al.* (2019) en cepas bacteriémicas aisladas en el HULA entre los años 2000 y 2011, en el que se determinó que el serogrupo más prevalente era el O25, seguido del O15, O9, O7, O8, O101 y O153.

Por este motivo, es importante estudiar si las cepas de estos serogrupos son productoras de ESBL, así como intentar descubrir los mecanismos moleculares implicados y el tipo concreto de enzima codificada. Las CTX-M son las β -lactamasas más diseminadas en todo el mundo y su presencia es más frecuente en *E.coli* que en el resto de enterobacterias (Cantón *et al.*, 2007; Cantón *et al.*, 2008). En nuestro pequeño análisis, se detectó la presencia de enzimas de tipo CTX-M del grupo 1 en cepas de los serogrupos O8 y O101 y del grupo 9 en cepas de los serogrupos O9 y O101. Las dos subfamilias mencionadas ya se habían identificado anteriormente en los tres serogrupos, tal y como se muestra en los estudios de Mamani R.S (2015) y Mamani *et al.* (2019). Sin embargo, una de las cepas ESBL no obtuvo un resultado positivo en ninguna de las enzimas evaluadas, lo que evidencia la necesidad de realizar un análisis más exhaustivo.

6. Conclusiones

Las conclusiones de este trabajo son las siguientes:

- I. Los serogrupos O8, O9 y O101 se encuentran entre los 10 más prevalentes en la colección de cepas de *E.coli* bacteriémicas aisladas durante los años 2020, 2021 y 2022 en el área sanitaria de Lugo.
- II. Más de la mitad de las cepas de estos tres serogrupos presentan resistencia múltiple a antimicrobianos (MDR), representando aproximadamente la tercera parte de las cepas bacteriémicas totales con resistencia múltiple.
- III. La alta prevalencia de los tres serogrupos y su asociación con la resistencia múltiple a los antimicrobianos justifica una futura inclusión de los mismos en las vacunas que se desarrollen para la prevención de bacteriemias causadas por *E.coli* en seres humanos.
- IV. Los grupos filogenéticos y los alelos *fimH* predominantes en las cepas de los serogrupos estudiados son distintos (O8-C-*fimH39*, O9-B1-*fimH32* y O101-A-*fimH54*), lo que indica que la mayoría de las cepas pertenecientes a los mismos son evolutivamente muy diferentes. Sin embargo, el hecho de que el grupo filogenético B1 y el alelo *fimH32* también sean frecuentes entre las cepas del serogrupo O8 sugiere que parte de estas cepas podrían tener una relación genética estrecha con las cepas del serogrupo O9.
- V. La media de genes de virulencia de las cepas de los serogrupos O8 y O9 es muy superior a la obtenida para las cepas del serogrupo O101, lo que teóricamente implicaría que el potencial de virulencia de las cepas de los dos primeros serogrupos es superior al de las cepas del segundo.

7. Bibliografía

- Adiba, S., Nizak, C., van Baalen, M., Denamur, E., & Depaulis, F. (2010).** "From Grazing Resistance to Pathogenesis: The Coincidental Evolution of Virulence Factors". *PLoS ONE*, 5(8).
- Aldawood, E., & Roberts, I. S. (2022).** "Regulation of Escherichia coli Group 2 Capsule Gene Expression: A Mini Review and Update". *Frontiers in Microbiology*, 13.
- Ambler, R. P. (1980).** "The structure of β -lactamases". *Philos. Trans. R. Soc. London. B, Biol. Sci.* 289, 321–331.
- Andrzejczuk, S., Kosikowska, U., Chwiejczak, E., Stępień-Pysiński, D., & Malm, A. (2019).** "Prevalence of Resistance to β -Lactam Antibiotics and bla Genes Among Commensal Haemophilus parainfluenzae Isolates from Respiratory Microbiota in Poland". *Microorganisms* 2019, Vol. 7, Page 427, 7 (10), 427.
- Balbontín, R., Villagra, N., Pardos de la Gándara, M., Mora, G., Figueroa-Bossi, N., & Bossi, L. (2016).** "Expression of IroN, the salmochelin siderophore receptor, requires mRNA activation by RyhB small RNA homologues". *Molecular Microbiology*, 100(1), 139–155.
- Beutin L. (2006).** "Emerging enterohaemorrhagic Escherichia coli, causes and effects of the rise of a human pathogen." *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 53: 299-305.
- Bingen-Bidois M., Clermont O., et al. (2002).** "Phylogenetic analysis and prevalence of urosepsis strains of *Escherichia coli* bearing pathogenicity island-like domains." *Infect Immun* 70: 3216-3226.
- Biran, D., Sura, T., Otto, A., Yair, Y., Becher, D., & Ron, E. Z. (2021).** "Surviving Serum: the *Escherichia coli* iss Gene of Extraintestinal Pathogenic *E. coli* Is Required for the Synthesis of Group 4 Capsule". *Infection and Immunity*, 89 (10).
- Blanco J., Blanco, J. E., Alonso, M. P., and Blanco, M. (1996).** "Virulence factors and O groups of *Escherichia coli* isolates from patients with acute pyelonephritis, cystitis and asymptomatic bacteriuria". *Eur. J. Epidemiol.* 12, 191–198.
- Blanco J., Blanco M., Alonso MP., Garabal JI., Blanco JE., González EA. (1992).** "Factores de virulencia de los *Escherichia coli* causantes de infecciones extraintestinales". Lugo, Monografía nº 170, Servicio de Publicaciones de Intercambio Científico. Universidade de Santiago de Compostela.
- Blanco J., Blanco M., et al. (2002).** "Enterobacterias: características generales. Género *Escherichia*." En: Manual de Microbiología Veterinaria. Eds. Vadillo S., Píriz S & Mateos E. McGraw-Hill Interamericana, Madrid. pp.301-325.
- Blanco M, Blanco JE, Alonso MP, Blanco J. (1994).** "Virulence factors and O groups of *Escherichia coli* strains isolated from cultures of blood specimens from urosepsis and non-urosepsis patients". *Microbiologia*. 10(3):249-56.
- Boucher, H. W., Talbot, G. H., Bradley, J. S., Edwards, J. E., Gilbert, D., Rice, L. B., et al. (2009).** "Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America". *Clin. Infect. Dis.* 48, 1-12.
- Bush, K. (2018).** "Past and Present Perspectives on Lactamases". *Antimicrob Agents Chemother.*; 62(10):e01076-18.
- Calvo J. and Martínez-Martínez. (2009).** "Mecanismos de acción de los antimicrobianos." *Enferm Infecc Microbiol Clin* 27: 44-52.
- Cantón R., Novais A., et al. (2008).** "Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe." *Clin Microbiol Infect* 14: 144-153.
- Cantón R., Valverde A., et al. (2007).** "Evolución y panorama actual de las BLEE." *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2: 2-10.
- Chaudhuri, R.R., and Henderson, I.R. (2012)** "The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny". *Infect Genet Evol* 12: 214–226.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., and Bingen, E. (2000).** "Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group". *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4555–4558.
- Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., & Gordon, D. M. (2013).** "The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups". *Environmental Microbiology Reports*, 5(1), 58–65.
- 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.
- Clermont, O., Lavollay, M., Vimont, S., Deschamps, C., Forestier, C., Branger, C., et al. (2008).** "The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup". *J. Antimicrob. Chemother.* 61, 1024–1028.
- Cordoni, G., Woodward, M. J., Wu, H., Alanazi, M., Wallis, T., & Ragione, R. M. La. (2016).** "Comparative genomics of European avian pathogenic *E. Coli* (APEC)". *BMC Genomics*, 17:960.
- 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

025b:H4 H30/H30-Rx." Tesis doctoral de la Universidad de Santiago de Compostela.

Dale, A. P., and Woodford, N. (2015). "Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): Disease, carriage and clones." *J. Infect.* 71, 615-626.

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

DebRoy C., Roberts E., Fratamico P.M. (2011). "Detection of O antigens in *Escherichia coli*". *Animal Health Research Reviews*, 12(2), 169-185.

De Witte C., Vereecke N., Theuns S., De Ruyck C., Vercammen F., Bouts T., Boyen F., Nauwynck H., Haesebrouck F. (2021). "Presence of Broad-Spectrum Beta-Lactamase- Producing Enterobacteriaceae in Zoo Mammals". *Microorganisms* 9, 834.

Denamur, E., Clermont, O., Bonacorsi, S., and Gordon, D. (2020). "The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*." *Nat. Rev. Microbiol.*; 19(1):37-54.

Desloges, I., Taylor, J. A., Leclerc, J. M., Brannon, J. R., Portt, A., Spencer, J. D., Dewar, K., Marczynski, G. T., Manges, A., Gruenheid, S., Le Moual, H., & Thomassin, J. L. (2019). "Identification and characterization of OmpT-like proteases in uropathogenic *Escherichia coli* clinical isolates". *MicrobiologyOpen*, 8(11).

Díaz, J. M., Dozois, C. M., Avelar-González, F. J., Hernández-Cuellar, E., Pokharel, P., de Santiago, A. S., & Guerrero-Barrera, A. L. (2020). "The Vacuolating Autotransporter Toxin (Vat) of *Escherichia coli* Causes Cell Cytoskeleton Changes and Produces Non-lysosomal Vacuole Formation in Bladder Epithelial Cells". *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10.

Dobrindt U., Chowdary MG., et al. (2010). "Genome dynamics and its impact on evolution of *Escherichia coli*". *Med Microbiol Immunol.*; 199(3):145-54.

Dozois, C. M., Dho-Moulin, M., Brée, A., Fairbrother, J. M., Desautels, C., and Curtiss, R. (2000). "Relationship between the Tsh Autotransporter and Pathogenicity of Avian *Escherichia coli* and Localization and Analysis of the tsh Genetic Region". *Infect. Immun.* 68, 4145-4154.

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

Escobar-Paramo, P., Clermont, O., Blanc-Potard, A.B., Bui, H., Le Bouguenec, C., and Denamur, E. (2004). "A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*". *Mol Biol Evol* 21: 1085-1094.

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

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

Felmlee, T., Pellett, S., & Welch, R. A. (1985). "Nucleotide sequence of an *Escherichia coli* chromosomal hemolysin". *Journal of Bacteriology*, 163(1), 94-105.

Fierro, C. A., Sarnecki, M., Doua, J., Spiessens, B., Go, O., Davies, T. A., Van Den Dobbelaere, G., Poolman, J., Abbanat, D., & Haazen, W. (2023). "Safety, Reactogenicity, Immunogenicity, and Dose Selection of 10-Valent Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Bioconjugate Vaccine (VAC52416) in Adults Aged 60-85 Years in a Randomized, Multicenter, Interventional, First-in-Human, Phase 1/2a Study". *Open Forum Infectious Diseases*, 10.

Finlay, B. B., and McFadden, G. (2006). "Anti-Immunology: Evasion of the Host Immune System by Bacterial and Viral Pathogens". *Cell* 124, 767-782.

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." Tesis doctoral de la Universidad de Santiago de Compostela.

Flament-Simon S-C, García V, Duprilot M, Mayer N, Alonso MP, García-Meniño I, Blanco JE, Blanco M, Nicolas-Chanoine M-H and Blanco J (2020). "High Prevalence of ST131 Subclades C2-H30Rx and C1-M27 Among Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Causing Human Extraintestinal Infections in Patients From Two Hospitals of Spain and France During 2015". *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10:125.

Frenck, R. W., Ervin, J., Chu, L., Abbanat, D., Spiessens, B., Go, O., Haazen, W., van den Dobbelaere, G., Poolman, J., Thoelen, S., & Ibarra de Palacios, P. (2019). "Safety and immunogenicity of a vaccine for extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ESTELLA): a phase 2 randomised controlled trial". *The Lancet Infectious Diseases*, 19(6), 631-640.

Gómez Gómez, V. (2017). "Caracterización de cepas de origen aviar de *Escherichia coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido y del grupo clonal de alto riesgo ST131." Tesis doctoral de la Universidad de Santiago de Compostela.

Gordon D.M., Clermont O., et al. (2008). "Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method." *Environ Microbiol* 10: 2484-2496.

Guinée, P. A. M., Jansen, W. H., Wadström, T., and Sellwood, R. (1981). "*Escherichia Coli* Associated with Neonatal Diarrhoea in Piglets and Calves," in *Laboratory Diagnosis in Neonatal Calf and Pig Diarrhoea*, eds. P. W. de Leeuw and P. A. M. Guinée (Dordrecht: Springer Netherlands), 126-162.

Hacker J. and Carniel E. (2001). "Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes". *EMBO Rep* 2: 376-81.

- Hancock, V., Ferrières, L., & Klemm, P. (2008).** "The ferric yersiniabactin uptake receptor FyuA is required for efficient biofilm formation by urinary tract infectious *Escherichia coli* in human urine". *Microbiology (Reading, England)*, 154(Pt 1), 167–175.
- Holden, N. J., and Gally, D. L. (2004).** "Switches, cross-talk and memory in *Escherichia coli* adherence". *J. Med. Microbiol.* 53, 585–593.
- Huttner, A., Hatz, C., van den Dobbelen, G., Abbanat, D., Hornacek, A., Frölich, R., Dreyer, A. M., Martin, P., Davies, T., Fae, K., van den Nieuwenhof, I., Thoelen, S., de Vallière, S., Kuhn, A., Bernasconi, E., Viereck, V., Kavvadias, T., Kling, K., Ryu, G., ... Fonck, V. G. (2017).** "Safety, immunogenicity, and preliminary clinical efficacy of a vaccine against extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in women with a history of recurrent urinary tract infection: a randomised, single-blind, placebo-controlled phase 1b trial". *The Lancet Infectious Diseases*, 17(5), 528–537.
- Jaureguy, F., Landraud, L., Passet, V., Diancourt, L., Frapy, E., Guigon, G., et al. (2008).** "Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains". *BMC Genomics* 9, 560.
- Javaloyas M, García-Somoza D, Gudiol F. (2003).** "Bacteriemia por *Escherichia coli*: análisis epidemiológico y de la sensibilidad a los antibióticos en un hospital comarcal". *Medicina Clínica*, 120(4): 125-127.
- Johnson J.R., Johnston B., et al. (2008).** "Virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* serogroup O6 isolates from humans, dogs, and cats." *J Clin Microbiol* 46: 417-422.
- Johnson J. R., Kaster N, Kuskowski MA, Ling GV. (2003).** "Identification of urovirulence traits in *Escherichia coli* by comparison of urinary and rectal E. coli isolates from dogs with urinary tract infection." *J Clin Microbiol.* 41(1):337-45.
- Johnson J.R., Kuskowski M.A., et al. (2002).** "Epidemiological correlates of virulence genotype and phylogenetic background among *Escherichia coli* blood isolates from adults with diverse-source Bacteremia." *J Infect Dis* 185: 1439-1447.
- Johnson, J. R., Moseley, S. L., Roberts, P. L., and Stamm, W. E. (1988).** "Aerobactin and ther virulence factor genes among strains of *Escherichia coli* causing urosepsis: association with patient characteristics". *Infect. Immun.* 56, 405–412.
- Johnson, J. R., Porter, S., Johnston, B., Kuskowski, M. A., Spurbeck, R. R., Mobley, H. L. T., et al. (2015).** "Host Characteristics and Bacterial Traits Predict Experimental Virulence for *Escherichia coli* Bloodstream Isolates From Patients With Urosepsis". *Open Forum Infect. Dis.* 2.
- Johnson, J. R., Russo, T. A., Tarr, P. I., Carlino, U., Bilge, S. S., Vary, J. C., et al. (2000).** "Molecular Epidemiological and Phylogenetic Associations of Two Novel Putative Virulence Genes, iha and iroNE. coli, among *Escherichia coli* Isolates from Patients with Urosepsis". *Infect. Immun.* 68, 3040–3047.
- Johnson, J. R., and O'Bryan, T. T. (2004).** "Detection of the *Escherichia coli* Group 2 Polysaccharide Capsule Synthesis Gene kpsM by a Rapid and Specific PCR-Based Assay". *J. Clin. Microbiol.* 42, 1773–1776.
- Johnson, J. R., Stapleton, A. E., Russo, T. A., Scheutz, F., Brown, J. J., and 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". *Infect. Immun.* 65, 2153–2159.
- Johnson, J. R., and Stell, A. L. (2000).** "Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise". *J. Infect. Dis.* 181, 261–272.
- Johnson, T. J., Wannemuehler, Y., Doetkott, C., Johnson, S. J., Rosenberger, S. C., and Nolan, L. K. (2008).** "Identification of Minimal Predictors of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Virulence for Use as a Rapid Diagnostic Tool". *J. Clin. Microbiol.*
- Kallonen T, Brodrick HJ, Harris SR, Corander J, Brown NM, Martin V, Peacock SJ, 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 Res.* 18;27(8):1437–49.
- Kaper J.B., Nataro J.P., et al. (2004).** "Pathogenic *Escherichia coli*." *Nat Rev Microbiol* 2: 123-40.
- Kline, K. A., Fälker, S., Dahlberg, S., Normark, S., and Henriques-Normark, B. (2009).** "Bacterial Adhesins in Host-Microbe Interactions". *Cell Host Microbe* 5, 580–592.
- Kobayashi, R. K. T., Gaziri, L. C. J., & Vidotto, M. C. (2010).** "Functional activities of the Tsh protein from avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strains". *Journal of Veterinary Science*, 11(4), 315–319.
- Koh, E.-I., Hung, C. S., Parker, K. S., Crowley, J. R., Giblin, D. E., and Henderson, J. P. (2015).** "Metal selectivity by the virulence-associated yersiniabactin metallophore system". *Metallomics* 7, 1011-1022.
- Kotłowski, R., Grecka, K., Kot, B., & Szveda, P. (2020).** "New Approaches for *Escherichia coli* Genotyping". *Pathogens* 2020, Vol. 9, Page 73, 9(2), 73.
- Kruis W., Fric P., et al. (2004).** "Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine." *Gut* 53:1617-23.
- Laupland, K. B., & Church, D. L. (2014).** Population-based epidemiology and microbiology of community-onset bloodstream infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 647–664.
- Le Bouguenec, C., Archambaud, M., and 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". *J. Clin. Microbiol.* 30, 1189–93.

- Lescat, M., Clermont, O., Woerther, P. L., Glodt, J., Dion, S., Skurnik, D., et al. (2013). "Commensal *Escherichia coli* strains in Guiana reveal a high genetic diversity with host-dependant population structure". *Environ. Microbiol. Rep.* 5, 49–57.
- Lewis, K. (2008). "Multidrug Tolerance of Biofilms and Persister Cells," *Curr Top Microbiol Immunol.*; 322:107–131.
- Lu, S., Jin, D., Wu, S., Yang, J., Lan, R., Bai, X., et al. (2016). "Insights into the evolution of pathogenicity of *Escherichia coli* from genomic analysis of intestinal *E. coli* of *Marmota himalayana* in Qinghai-Tibet plateau of China". *Emerg Microbes Infect* 5: e122.
- Magiorakos, A.-P. P., Srinivasan, A., Carey, R., B. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E. E., Giske, C. G. G., et al. (2012). "Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance". *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 268–281.
- Maiden, M. C. J., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., et al. (1998). "Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 3140–3145.
- Maiden, M. C. J., van Rensburg, M. J. J., Bray, J. E., Earle, S. G., Ford, S. A., Jolley, K. A., et al. (2013). "MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics". *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 728–736.
- Mamani, 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." Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela.
- Mamani, R. S., Flament-Simon, S. C., García, V., Mora, A., Alonso, M. P., López, C., et al. (2019). "Sequence Types, Clonotypes, Serotypes, and Virotypes of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Causing Bacteraemia in a Spanish Hospital Over a 12-Year Period (2000 to 2011)". *Front. 2Microbiol.* 10.
- Maluta, R. P., Logue, C. M., Casas, M. R. T., Meng, T., Guastalli, E. A. L., Rojas, T. C. G., Montelli, A. C., Sadatsune, T., Ramos, M. D. C., Nolan, L. K., & Silveira, W. D. Da. (2014). "Overlapped sequence types (STs) and serogroups of avian pathogenic (APEC) and human extra-intestinal pathogenic (ExPEC) *Escherichia coli* isolated in Brazil". *PloS One*, 9(8).
- Martínez, J. L. (2014). "General principles of antibiotic resistance in bacteria". *Drug Discov. Today Technol.* 11, 33–39.
- 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". *J Infect Chemother*, 28(11):1445-1451.
- Méric, G., Kemsley, E. K., Falush, D., Siggers, E. J., and Lucchini, S. (2013). "Phylogenetic distribution of traits associated with plant colonization in *Escherichia coli*". *Environ. Microbiol.* 15, 487-501.
- Mitsumori, K., Terai, A., Yamamoto, S., & Yoshida, O. (1998). "Identification of S, F1C and three PapG fimbrial adhesins in uropathogenic *Escherichia coli* by polymerase chain reaction". *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 21(4), 261–268.
- Mokady, D., Gophna, U., & Ron, E. Z. (2005). "Virulence factors of septicemic *Escherichia coli* strains". *International Journal of Medical Microbiology*, 295, 455–462.
- Mora A, Viso S, López C, Alonso MP, García-Garrote F, Dabhi G, Mamani R, Herrera A, Marzoa J, Blanco M, Blanco JE, Moulin-Schouleur M, Schouler C, Blanco J (2013). "Poultry as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O45:K1:H7-B2-ST95 in humans". *Vet Microbiol.* 167 (3-4):506-12.
- Morales, C., Lee, M. D., Hofacre, C., and Maurer, J. J. (2004). "Detection of a Novel Virulence Gene and a Salmonella Virulence Homologue Among *Escherichia coli* Isolated from Broiler Chickens". *Foodborne Pathog. Dis.* 1, 160–165.
- Moreno E., Planells I., et al. (2005). "Comparative study of *Escherichia coli* virulence determinants in strains causing urinary tract bacteremia versus strains causing pyelonephritis and other sources of bacteremia." *Diagn Microbiol Infect Dis* 53: 93-99.
- Moulin-Schouleur, M., Schouler, C., Tailliez, P., Kao, M.-R., Bree, A., Germon, P., et al. (2006). "Common Virulence Factors and Genetic Relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* Isolates of Human and Avian Origin". *J. Clin. Microbiol.* 44.
- Munita, J. M., and Arias, C. A. (2016). "Mechanisms of Antibiotic Resistance". *Microbiol. Spectr.* 4.
- Murase, K., Martin, P., Porcheron, G., Houle, S., Helloin, E., Pénary, M., Nougayrède, J. P., Dozois, C. M., Hayashi, T., & Oswald, E. (2016). "HlyF Produced by Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Is a Virulence Factor That Regulates Outer Membrane Vesicle Biogenesis". *The Journal of Infectious Diseases*, 213(5), 856–865.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. (2006). "Microbiología Médica." Capítulo 20: Antibióticos (pp. 203-212). Versión española de la 5ª edición de la obra en inglés: Medical Microbiology. Elsevier Mosby SA, Madrid.
- Nicolas-Chanoine, M.-H., Bertrand, X., and Madec, J.-Y. (2014). "*Escherichia coli* ST131, an Intriguing Clonal Group". *Clin. Microbiol. Rev.* 27, 543–574.
- Nicolas-Chanoine, M.-H. M. H., Blanco, J., Leflon-Guibout, V., Demarty, R., Alonso, M. P., Canica, M. M., et al. (2007). "Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15". *J. Antimicrob. Chemother.* 61, 273–281.

- Nowicki, B., Selvarangan, R., and Nowicki, S. (2001).** "Family of *Escherichia coli* Dr Adhesins: Decay-Accelerating Factor Receptor Recognition and Invasiveness". *J. Infect. Dis.* 183, S24–S27.
- Organización Mundial de la Salud (2024).** "La OMS pone al día la lista de bacterias farmacorresistentes más peligrosas para la salud humana".
- Orskov, F. and Orskov, I. (1992).** "*Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals". *Can. J. Microbiol.* 38, 699–704.
- Ovi, F., Zhang, L., Nabors, H., Jia, L., & Adhikari, P. (2023).** "A compilation of virulence-associated genes that are frequently reported in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) compared to other *E. coli*". *Journal of Applied Microbiology*, 134(3).
- Pal, C., Asiani, K., Arya, S., Rensing, C., Stekel, D. J., Larsson, D. G. J., et al. (2017).** "Metal Resistance and Its Association With Antibiotic Resistance," in, 261–313.
- Perry, J. A., Westman, E. L., and Wright, G. D. (2014).** "The antibiotic resistome: what's new?" *Curr. Opin. Microbiol.* 21, 45–50.
- Pitout, J. D. D., & DeVinney, R. (2017).** "*Escherichia coli* ST131: A multidrug-resistant clone primed for global domination". *F1000Research*, 6.
- Poirel, L., Madec, J., Lupo, A., Schink, A., Kieffer, N., Nordmann, P., et al. (2018).** "Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*." *Microbiol. Spectr.* 6, 1-27.
- Poolman, J. T., & Wacker, M. (2016).** "Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*, a Common Human Pathogen: Challenges for Vaccine Development and Progress in the Field". *The Journal of Infectious Diseases*, 213(1), 6–13.
- Rasheed JK, Jay C, Metchock B, Berkowitz F, Weigel L, Crellin J, Steward C, Hill B, Medeiros AA, Tenover FC (1997).** "Evolution of extended-spectrum beta-lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. Antimicrob Agents Chemother". 41(3):647-53.
- Robinson, A. E., Heffernan, J. R., and Henderson, J. P. (2018).** "The iron hand of uropathogenic *Escherichia coli*: the role of transition metal control in virulence". *Future Microbiol.* 13, 745–756.
- Rodriguez-Siek KE, Giddings CW, Doetkott C, Johnson TJ, Nolan LK. (2005).** "Characterizing the APEC pathotype". *Vet Res.*; 36(2):241-56.
- Ron, E. Z. (2006).** "Host specificity of septicemic *Escherichia coli*: human and avian pathogens." *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 28-32.
- Russo TA, Johnson JR (2000).** "Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC." *Journal of Infectious Diseases*, 181(5): 1753-1754.
- Royer G, Clermont O, Condamine B, Mercier-Darty M, Laouénan C, Lefort A, Denamur E, de Lastours V; COLIBAFI and SEPTICOLI Groups (2022).** "O-Antigen Targeted Vaccines Against *Escherichia coli* May Be Useful in Reducing Morbidity, Mortality, and Antimicrobial Resistance". *Clin Infect Dis.* 29;74(2):364-366.
- Saladin M, Cao VT, Lambert T, Donay JL, Herrmann JL, Ould-Hocine Z, Verdet C, Delisle F, Philippon A, Arlet G (2022).** "Diversity of CTX-M beta-lactamases and their promoter regions from Enterobacteriaceae isolated in three Parisian hospitals". *FEMS Microbiol Lett.* 209(2):161-8.
- Sannes M.R., Kuskowski M., et al. (2004).** "Virulence factor profiles and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from veterans with bacteremia and uninfected control subjects." *J Infect Dis* 190: 2121-2128.
- Sauer, F. G., Fütterer, K., Pinkner, J. S., Dodson, K. W., Hultgren, S. J., & Waksman, G. (1999).** "Structural Basis of Chaperone Function and Pilus Biogenesis". *Science*, 285(5430), 1058–1061.
- Schulze J., Schiemann M., et al. (2006).** "120 years of *E. coli*. Its importance in research and medicine." Hagen, Germany: Alfred-Nissle-Gesellschaft.
- Servin, A. L. (2014).** "Pathogenesis of Human Diffusely Adhering *Escherichia coli* Expressing Afa/Dr Adhesins (Afa/Dr DAEC): Current Insights and Future Challenges". *Clin. Microbiol. Rev.* 27, 823–869.
- Shlaes, D. M., Sahm, D., Opiela, C., and Spellberg, B. (2013).** "The FDA Reboot of Antibiotic Development. Antimicrob. Agents Chemother". *Antimicrob Agents Chemother*; 57(10):4605–4607.
- Simarro E, Navarro F, Ruiz J, Miró E, Gómez J, Mirelis B (2000).** "*Salmonella enterica* serovar virchow with CTX-M-like beta-lactamase in Spain". *J Clin Microbiol.*38:4676-8.
- Skals, M., Jensen, U. B., Ousingsawat, J., Kunzelmann, K., Leipziger, J., & Praetorius, H. A. (2010).** "*Escherichia coli* α -hemolysin triggers shrinkage of erythrocytes via KCa3.1 and TMEM16A channels with subsequent phosphatidylserine exposure". *Journal of Biological Chemistry*, 285(20), 15557–15565.
- Sora, V. M., Meroni, G., Martino, P. A., Soggiu, A., Bonizzi, L., Zecconi, A., & Pérez-Gracia, M.-T. (2021).** "Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: Virulence Factors and Antibiotic Resistance". *Pathogens*; 10(11):1355.
- Spratt, B. G. (2004).** "Exploring the concept of clonality in bacteria". *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 266, 323–352.
- Spurbeck, R. R., Dinh, P. C., Walk, S. T., Stapleton, A. E., Hooton, T. M., Nolan, L. K., et al. (2012).** "*Escherichia coli* Isolates That Carry *vat*, *fyuA*, *chuA*, and *yfcV* Efficiently Colonize the Urinary Tract". *Infect. Immun.* 80, 4115–4122.
- Spurbeck R.R., Stapleton A.E., et al. (2011).** "Fimbrial profiles predict virulence of uropathogenic *Escherichia*

coli strains: contribution of *ygi* and *yad* fimbriae". *Infect Immun* 79: 4753-4763.

Spurbeck, R. R., Dinh, P. C., 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.

Sukupolvi S. and O'Connor D. (1990). "TraT lipoproteina, a plasmid-specified mediator of interactions between gram-negative bacteria and their environment". *Microbiol Rev* 54: 331-341.

Tartof, S. Y., Solberg, O. D., & Riley, L. W. (2007). "Genotypic analyses of uropathogenic *Escherichia coli* based on *fimH* single nucleotide polymorphisms (SNPs)". *Journal of Medical Microbiology*, 56(10), 1363–1369.

Tenaillon O., Skurnik D., et al. (2010). "The population genetics of commensal *Escherichia coli*." *Nat Rev Microbiol* 8:207-17.

Tumbarello, M., Spanu, T., Di Bidino, R., Marchetti, M., Ruggeri, M., Trecarichi, E. M., De Pascale, G., Proli, E. M., Cauda, R., Cicchetti, A., & Fadda, G. (2010). "Costs of Bloodstream Infections Caused by *Escherichia coli* and Influence of Extended-Spectrum- β -Lactamase Production and Inadequate Initial Antibiotic Therapy". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(10), 4085.

Ventola, C. L. (2015). "The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats". *P T*; 40, 277–83.

Wasiński, B. (2019). "Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* threat connected with food-borne infections." *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 26(4), 532–537.

Weerdenburg, E., Davies, T., Morrow, B., Zomer, A. L., Hermans, P., Go, O., Spiessens, B., Van Den Hoven, T., Van Geet, G., Aitabi, M., Debroy, C., Dudley, E. G., Bonten, M., Poolman, J., & Geurtsen, J. (2022). "Global Distribution of O Serotypes and Antibiotic Resistance in Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Collected From the Blood of Patients With Bacteremia Across Multiple Surveillance Studies". *Clin Infect Dis.*;76(3):e1236-e1243.

Weissman, S. J., Johnson, J. R., Tchesnokova, V., Billig, M., Dykhuizen, D., Riddell, K., et al. (2012). "High-Resolution Two-Locus Clonal Typing of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*". *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1353–1360.

Wiles, T. J., Kulesus, R. R., and Mulvey, M.A. (2008). "Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*." *Exp. Mol. Pathol.* 85, 11-19.

Willis, L. M., & Whitfield, C. (2013). "Structure, biosynthesis, and function of bacterial capsular polysaccharides synthesized by ABC transporter-dependent pathways". *Carbohydrate Research*, 378, 35–44.

Xia, F., Jiang, M., Wen, Z., Wang, Z., Wang, M., Xu, Y., Zhuge, X., & Dai, J. (2022). "Complete genomic analysis of ST117 lineage extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) to reveal multiple genetic determinants to drive its global transmission: ST117 E. coli as an emerging multidrug-resistant foodborne ExPEC with zoonotic potential." *Transboundary and Emerging Diseases*, 69(6), 3256–3273.

Yamamoto, S., Terai, A., Yuri, K., Kurazono, H., Takeda, Y., and Yoshida, O. (1995). "Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction". *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 12, 85–90.

8. Anexos

8.1 Cepas control

Tabla S1. Cepas utilizadas como controles positivos en las PCR realizadas a lo largo del trabajo.

Código de la cepa	Procedimiento en el que se empleó
FV14067	PCR múltiplex grupo filogenético
FV14087	
O157.807	
O157.1103	
FV19459	PCR grupo filogenético C
FV19460	
FV17090(CV15A)	PCR genes ExPEC
CV15D	
FV17132	
FV17133	
FV17134	
FV17159	
FV14390	PCR gen <i>bla</i> CTX-M-9
FV14391	
FV14390	PCR gen <i>bla</i> CTX-M-1
FV14391	
FV14390	PCR gen <i>bla</i> TEM
FV14391	
FV19247	PCR gen <i>bla</i> SHV