



**FACULTADE DE CIENCIAS**

**GRAO EN BIOQUÍMICA**

**D.<sup>a</sup> Cristina Díaz González**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *ESCHERICHIA COLI*  
BACTERIÉMICOS PERTENECIENTES A LOS SEROGRUPOS 025 Y 015**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *ESCHERICHIA COLI*  
BACTERIÉMICOS PERTENECIENTES AOS SEROGRUPOS 025 E 015**

***MOLECULAR CHARACTERIZATION OF BACTEREMIC ESCHERICHIA COLI  
BELONGING TO SEROGROUPS 025 AND 015***

Traballo Fin de Grao

*06/2024*

# ÍNDICE

RESUMEN [RESUMO/SUMMARY].....	2
ÍNDICE DE ABREVIATURAS .....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	6
1.2. PATOGENICIDAD.....	7
1.2.1. CARACTERÍSTICAS PATOGENICAS DE <i>E. coli</i> .....	7
1.2.2. TEORÍAS DE PATOGENICIDAD de ExPEC.....	9
1.3. FACTORES DE VIRULENCIA.....	9
1.4. RESISTENCIA.....	11
1.5. CLONES Y ÉXITO EVOLUTIVO DE <i>E. coli</i> .....	13
1.6. SEROGRUPOS.....	14
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	17
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	18
3.1. COLECCIÓN DE CEPAS DE ESTUDIO.....	18
3.1.1. PROCEDENCIA DE LA COLECCIÓN DE CEPAS.....	18
3.1.2. CONSERVACIÓN BACTERIANA .....	18
3.2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA.....	18
3.2.1. DETERMINACIÓN DE SEROGRUPOS.....	18
3.2.2. PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA.....	20
3.3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.....	20
3.3.1. DETERMINACIÓN DE GRUPOS FILOGENÉTICOS.....	21
3.3.2. DETERMINACIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA.....	22
3.3.3. DETECCIÓN DEL GRUPO CLONAL ST131, CLADO C y SUBCLADOS C1 y C1-M27.....	24
3.3.2. SECUENCIACIÓN SANGER.....	25
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	26
4. RESULTADOS.....	27
4.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA.....	27
4.1.1. ANÁLISIS DE LOS SEROGRUPOS.....	27
4.1.2. ANÁLISIS DEL PERFIL DE RESISTENCIA.....	27
4.2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.....	29
4.2.1. DETERMINACIÓN DE GRUPOS FILOGENÉTICOS.....	29
4.3. DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL CLON ST131.....	32
4.3.1. ANÁLISIS DEL PERFIL DE RESISTENCIA DE LAS CEPAS ST131.....	35
4.3.3. ANÁLISIS DEL PERFIL DE VIRULENCIA DE LAS CEPAS ST131.....	36
5. DISCUSIÓN.....	38
5.1. CLON ST131.....	40
6. CONCLUSIONES.....	43
7. BIBLIOGRAFÍA .....	44
ANEXO .....	49

**RESUMEN**

*Escherichia coli* es uno de los patógenos más prevalentes causantes de infecciones extraintestinales a nivel mundial. En este trabajo llevamos a cabo una caracterización fenotípica (serotipado y antibiograma) y molecular (PCR convencional y secuenciación sanger) de 48 cepas de *E. coli* pertenecientes a los serogrupos O15 y O25, procedentes de una colección de 348 cepas de *E. coli* aisladas de bacteriemias de pacientes del Hospital Lucus Augusti (HULA) durante los años 2020 a 2022. Se determinaron los grupos filogenéticos y los perfiles de virulencia y resistencia de las cepas. Además, estudiamos la estructura clonal de las cepas pertenecientes a la secuencia tipo ST131.

Los serogrupos estudiados se encuentran entre los más prevalentes causantes de bacteriemias en el área sanitaria de Lugo; aunque las cepas de *E. coli* del serogrupo O25 presentan una mayor frecuencia que las O15 (10% vs 4%). Además, las cepas O25 expresan un mayor número de resistencias a los antimicrobianos que las O15 y, aunque en ambos grupos encontramos cepas MDR, la totalidad de las ESBL son O25, representando un 35% de las cepas. Un 81% de las cepas se clasificaron como ExPEC, un 71% como UPEC y un 29% como APEC y se observó una correlación entre los serogrupos, filogrupos y los genes de virulencia estudiados. Así también, se detectaron 27 cepas ST131 bacteriémicas, destacando la predominancia del clado C y el subclado C2, y la presencia de 4 cepas pertenecientes al subclado emergente C1-M27. Además, describimos clones de ST131 atípicos asociados a los alelos *fimH16*, *27* y *260*.

En este contexto, una vacuna profiláctica dirigida a los serotipos O prevalentes podría ser un método preventivo útil contra infecciones causadas por ExPEC, pero, teniendo en cuenta las variaciones epidemiológicas existentes a nivel global, debería adaptarse a la epidemiología local para poder garantizar una cobertura óptima.

**Palabras clave:** *Escherichia coli*, serogrupo, O25, O15, bacteriemia, ST131, resistencia, virulencia, ESBL.

**RESUMO**

*Escherichia coli* é un dos patóxenos máis prevalentes causantes de infeccións extraintestinais a nivel mundial. Neste traballo lévase a cabo unha caracterización fenotípica (serotipado e antibiograma) e molecular (PCR convencional e secuenciación sanger) de 48 cepas de *E. coli* pertencentes aos serogrupos O15 e O25, procedentes dunha colección de 348 cepas de *E. coli* illadas de bacteriemias de pacientes do Hospital Lucus Augusti (HULA) durante os anos 2020 a 2022. Determináronse os grupos filoxenéticos e os perfís de virulencia e resistencia das cepas. Ademais, estudamos a estrutura clonal das cepas pertencentes á secuencia tipo ST131.

Os serogrupos estudados atópanse entre os máis prevalentes causantes de bacteriemias na área sanitaria de Lugo; aínda que as cepas de *E. coli* do serogrupo O25 presentan unha maior frecuencia que as O15 (10% vs 4%). Ademais, as cepas O25 expresan un maior número de resistencias aos antimicrobianos que as O15 e, aínda que en ambos os grupos atopamos cepas MDR, a totalidade das ESBL son O25, representando un 35% das cepas. Un 81% das cepas clasificáronse como ExPEC, un 71% como UPEC e un 29% como APEC e observouse unha correlación entre os serogrupos, filogrupos e os xenes de virulencia estudados. Así tamén, detectáronse 27 cepas ST131 bacteriémicas, destacando a predominancia do clado C e o subclado C2, e a presenza de 4 cepas pertencentes ao subclado emerxente C1-M27. Ademais, describimos clons de ST131 atípicos asociados aos alelos *fimH*16, 27 e 260.

Neste contexto, unha vacina profiláctica dirixida aos serotipos O prevalentes podería ser un método preventivo útil contra infeccións causadas por ExPEC, pero, tendo en conta as variacións epidemiolóxicas existentes a nivel global, debería adaptarse á epidemioloxía local para poder garantir unha cobertura óptima.

**Palabras chave:** *Escherichia coli*, serogrupo, O25, O15, bacteriemia, ST131, resistencia, virulencia, ESBL.

## SUMMARY

*Escherichia coli* is one of the most prevalent pathogens causing extraintestinal infections worldwide. In this work, we carried out a phenotypic (serotyping and antibiogram) and molecular (conventional PCR and sanger sequencing) characterization of 48 *E. coli* strains belonging to serogroups O15 and O25, from a collection of 348 *E. coli* strains isolated from bacteremia from patients at the Lucus Augusti Hospital (HULA) during the years 2020 to 2022. The phylogenetic groups and virulence and resistance profiles of the strains were determined. In addition, we studied the clonal structure of the strains belonging to the ST131 type sequence.

The serogroups studied are among the most prevalent causes of bacteremia in the health area of Lugo; although *E. coli* strains of serogroup O25 have a higher frequency than O15 (10% vs 4%). In addition, O25 strains express a greater number of antimicrobial resistances than O15 strains and, although in both groups we find MDR strains, all ESBLs are O25, representing 35% of the strains. 81% of the strains were classified as ExPEC, 71% as UPEC and 29% as APEC, and a correlation was observed between the serogroups, phylogroups and virulence genes studied. Likewise, 27 bacteremic ST131 strains were detected, highlighting the predominance of clade C and subclade C2, and the presence of 4 strains belonging to the emerging subclade C1-M27. In addition, we describe atypical ST131 clones associated with the *fimH*16, 27 and 260 alleles.

In this context, a prophylactic vaccine targeting prevalent O serotypes could be a useful preventive method against infections caused by ExPEC, but, taking into account the existing epidemiological variations at the global level, it should be adapted to the local epidemiology in order to ensure optimal coverage.

**Key words:** *Escherichia coli*, serogroup, O25, O15, bacteremia, ST131, resistance, virulence, ESBL.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>ADEC</b> <i>E. coli</i> de adherencia difusa	<b>ITU</b> Infección del tracto urinario
<b>ADN</b> Ácido desoxirribonucleico	<b>LPS</b> Lipopolisacáridos
<b>AMC</b> Amoxicilina-ácido clavulánico	<b>LREC</b> Laboratorio de Referencia de <i>Escherichia coli</i>
<b>AMK</b> Amikacina	<b>LVX</b> Levofloxacina
<b>AMP</b> Ampicilina	<b>MDR</b> Resistencia múltiple
<b>APEC</b> <i>E. coli</i> patógeno aviar	<b>MgCl<sub>2</sub></b> Cloruro de magnesio
<b>AT</b> Proteínas autotransportadoras	<b>ML</b> Agar MacConkey Lactosa
<b>ATM</b> Aztreonam	<b>MLST</b> Multi-locus sequence typing
<b>BHE</b> Barrera hematoencefálica	<b>NaCl</b> Cloruro de sodio
<b>BLAST</b> <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>	<b>NAL</b> Ácido Nalidíxico
<b>CGE</b> Centro de Epidemiología Genómica	<b>NCBI</b> <i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>bp</b> Pares de bases	<b>NIH</b> National Library of Medicine
<b>CAZ</b> Ceftazidima	<b>NIT</b> Nitrofurantoína
<b>CIP</b> Ciprofloxacino	<b>NMEC</b> <i>Neonatal meningitis associated E. coli</i>
<b>CLSI</b> <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>	<b>NT</b> No tipable
<b>CMI</b> Concentración mínima inhibitoria	<b>NT-AA</b> No tipable autoaglutinante
<b>CTX</b> Cefotaxima	<b>OMS</b> Organización Mundial de la Salud
<b>CXM</b> Cefuroxima	<b>ONT</b> Antígeno O no tipable
<b>dATP</b> <i>Deoxyadenosine triphosphate</i>	<b>p</b> p-valor
<b>dCTP</b> <i>Deoxycytosine triphosphate</i>	<b>PCR</b> Polymerase Chain Reaction
<b>dGTP</b> <i>Deoxyguanine triphosphate</i>	<b>PIP</b> Piperacilina
<b>dNTPs</b> <i>Deoxynucleotide Triphosphates</i>	<b>RAM</b> Resistencia a Antimicrobianos
<b>dTTP</b> <i>Deoxythymine triphosphate</i>	<b>SEPEC</b> <i>Sepsis associated E. coli o E. coli</i> septicémico
<b>EAEC</b> <i>E. coli</i> enteroagregativa	<b>SNC</b> Sistema Nervioso Central
<b>EDTA</b> ácido etilendiaminotetraacético	<b>SNP</b> <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
<b>EHEC</b> <i>E. coli</i> enterohemorrágica	<b>STEC</b> <i>E. coli</i> productora de toxina Shiga
<b>EIEC</b> <i>E. coli</i> enteroinvasiva	<b>SXT</b> Clotrimoxazol
<b>EPEC</b> <i>E. coli</i> enteropatogénica	<b>T<sup>a</sup></b> Temperatura
<b>ESBL</b> β-lactamasa de espectro extendido	<b>TCS</b> Sistema de dos componentes
<b>ETEC</b> <i>E. coli</i> enteropatogénica	<b>TGC</b> Tigeciclina
<b>ETM</b> Ertapenem	<b>TOB</b> Tobramicina
<b>EUCAST</b> <i>European Union Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>	<b>TSA</b> Agar Triptona de Soja
<b>ExPEC</b> <i>E. coli</i> patógeno extraintestinal	<b>UE</b> Unión Europea
<b>FEP</b> Cefepime	<b>UPEC</b> <i>Escherichia coli</i> uropatogénico
<b>fimH</b> Type 1 fimbrial adhesin gene	<b>USC</b> Universidad de Santiago de Compostela
<b>fumC</b> Fumarate hydratase gene	<b>UV</b> Ultravioleta
<b>FOX</b> Cefoxitina	<b>VTEC</b> <i>E. coli</i> verotoxigénico
<b>FV</b> Factores de virulencia	
<b>GEN</b> Gentamicina	
<b>HULA</b> Hospital Universitario Lucus Augusti	
<b>IED</b> <i>Invasive Escherichia coli disease</i>	
<b>InPEC o IPEC</b> <i>E. coli</i> patógeno intestinal	

---

## 1. INTRODUCCIÓN

---

### 1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE *ESCHERICHIA COLI*

*Escherichia coli*, también conocida como colibacilo, es una bacteria Gram-negativa no esporulante anaerobia facultativa; es decir, puede sobrevivir en presencia o no de oxígeno ya que activa o reprime las enzimas metabólicas requeridas dependiendo de los niveles de oxígeno. Se caracteriza por presentar una pared celular compuesta principalmente por una capa delgada de peptidoglicano rodeada por una membrana externa de fosfolípidos, proteínas y lipopolisacáridos, que puede estar envuelta o no por una cápsula. Presenta la capacidad de fermentar glucosa y lactosa, es oxidasa negativa, y, aunque no todas, existen cepas móviles peritricas que poseen flagelos que se proyectan en todas las direcciones y que le confieren capacidad de movimiento a través de medios líquidos (Dahbi Zbiti, 2015).

Pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, dentro de la clase *Gammaproteobacteria* y reside en el tubo digestivo del ser humano y numerosas especies de animales (Gordon & Cowling, 2003). Es una de las especies bacterianas más comunes de la microbiota intestinal; representa aproximadamente el 0,1 % de la microbiota intestinal de un adulto y el 80% de la microbiota anaerobia facultativa (Eckburg et al., 2005). Se encuentra en cantidades variables a lo largo de la cavidad oral y del tracto gastrointestinal, pero su presencia se concentra en las partes distales del tubo digestivo. Su establecimiento inicial en el organismo se produce desde el tracto urogenital de la madre en el momento del parto, pues el tracto digestivo antes del nacimiento es estéril, y desde el medio ambiente durante las primeras horas y días de vida (Meléndez et al., 2018). Se trata de una colonización secuencial del intestino de los neonatos por bacterias aerobias y anaerobias, iniciada por bacterias anaerobias facultativas (entre las que se encuentran las enterobacterias y estreptococos), y seguida de otros procariotas pertenecientes a los géneros *Staphylococcus*, *Enterococcus* y *Lactobacillus* (Enrique et al., 2021). A partir de este momento, se establece una asociación permanente y comensal, de manera que este microorganismo pasa a formar parte importante de la microbiota intestinal, siendo la especie más abundante durante los primeros meses de vida. Existe una sucesión continua de una variedad de cepas de *Escherichia coli* en el tracto intestinal durante toda la vida; algunas persisten en la flora durante meses mientras que otras colonizan transitoriamente durante solo algunos días (Dahbi Zbiti, 2015).

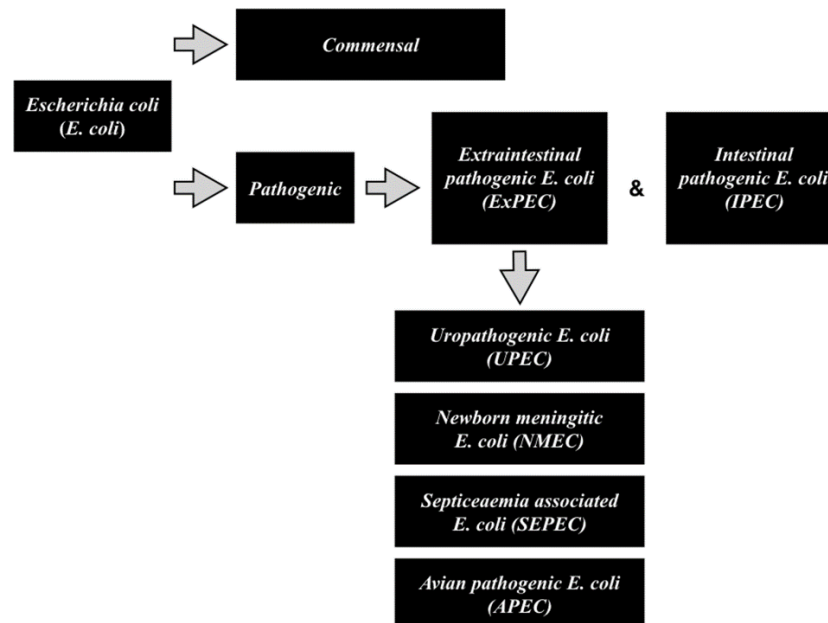
Fue descubierta en 1885 por el pediatra alemán Theodor Von Escherich tras aislarla de las heces de un niño pues, al tratarse de una bacteria intestinal, se excreta diariamente con las heces de manera abundante (Escherich, 1885). Se estima que las heces de un ser humano contienen entre  $10^8$  y  $10^{21}$  *E. coli/g*, de las cuales aproximadamente el 90% sobreviven pudiendo encontrarse en el medio ambiente, agua y alimentos debido a que la mayoría de los sistemas de alcantarillado de cualquier lugar del mundo no se tratan adecuadamente, facilitando así su amplia distribución (Dahbi Zbiti, 2015).

Su importancia biológica radica en que interviene, junto con otras bacterias presentes en el intestino, en el correcto funcionamiento del proceso digestivo, favoreciendo la absorción de nutrientes, procesamiento de residuos alimenticios, síntesis de vitaminas K y B; así también, sirve como un elemento de defensa del organismo pues supone un constante estímulo de la respuesta inmune en el hospedador y ejerce inhibición competitiva sobre el crecimiento de todo tipo de enteropatógenos. Es por ello, junto con su facilidad de crecimiento, gran diversidad genética y su importante significado clínico que, desde su temprano descubrimiento, ha sido un candidato de gran interés para la investigación científica (Dahbi Zbiti, 2015).

## 1.2. PATOGENICIDAD

A pesar de que la mayoría de las cepas de *E. coli* son inocuas, existen algunas con el potencial para causar un amplio espectro de enfermedades. Se diferencian principalmente 3 categorías: comensales no patógenas, cepas responsables de patologías intestinales (InPEC o IPEC) y cepas responsables de patologías extraintestinales (ExPEC), es decir, que causan infecciones fuera del tracto intestinal (que es el reservorio del huésped) (Figura 1) (Dobrindt et al., 2003).

**Figura 1: Diversidad patogénica de cepas de *Escherichia coli*.** Extraída de: (Sarowska et al., 2019).



### 1.2.1. CARACTERÍSTICAS PATOGENICAS DE *E. coli*

Las cepas de *E. coli* patógeno intestinal (InPEC) se engloban en diferentes grupos o patotipos en función de sus mecanismos de virulencia y patogenicidad específicos, y síndromes entéricos que producen. Existen 7 patotipos principales: *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* de adherencia difusa (ADEC) y *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (Mirsepasi-Lauridsen et al., 2019). Estas cepas patógenas superan las barreras de defensa del hospedador, tanto los movimientos peristálticos intestinales como la microflora comensal, y sobreviven y se multiplican en el tracto intestinal; este fenómeno es debido a su alta capacidad, en condiciones de anaerobiosis, por competir por las fuentes de energía, carbono hierro, producir bacteriocinas y por su rápido crecimiento. En general, las cepas *E. coli* diarreagénicas para humanos no suelen producir infecciones en animales y viceversa porque, aunque pueden compartir determinados factores de virulencia, la gran mayoría poseen adhesinas específicas para su hospedador. Sin embargo, sí que se ha comprobado que los animales pueden ser un reservorio de *E. coli* enteropatógenos para las personas como es el caso de los *E. coli* verotoxigénicos (VTEC) que forman parte de la microbiota intestinal de los rumiantes y causan CH y SUH en humanos (Dahbi Zbiti, 2015).

Las cepas de *E. coli* patógenas extraintestinales (cepas ExPEC) son las principales responsables de múltiples infecciones en seres humanos y animales de sangre caliente; no solo urinarias sino también bacteriemias o sepsis (Sarowska et al., 2019). El término ExPEC fue sugerido por Russo y Johnson en el 2000 e incluye a todos los aislados de *E. coli* no comensales capaces de causar enfermedades extraintestinales (J. R. Johnson et al., 2000). Estas cepas de *E. coli* dentro del intestino rara vez causa complicaciones, de hecho, existe una relación simbiótica beneficiosa con la microbiota intestinal; pero cuando abandonan el tracto gastrointestinal e infectan otras partes del cuerpo, como el tracto urinario, la sangre o los pulmones, tienen una mayor capacidad para superar las defensas del huésped y causar una enfermedad debido a que poseen factores de virulencia. Dentro del del grupo de cepas ExPEC diferenciamos otros 4 patotipos

principales: *E. coli* causante de infecciones urinarias o uropatógenos (UPEC), *E. coli* bacteriémicos o septicémicos (SEPEC), *E. coli* asociada a meningitis neonatales (NMEC) y *E. coli* patógenos aviarios (APEC). Estas últimas son de especial relevancia en el mundo animal, concretamente en la industria avícola, debido a las elevadas pérdidas económicas derivadas de las infecciones respiratorias y sepsis que causan (Smith et al., 2007). Además, el ganado porcino, bovino y los animales de compañía también pueden sufrir infecciones por ExPEC y ser portadores asintomáticos por lo que estos patógenos pueden adquirirse a través del consumo de alimentos como carne o productos avícolas (huevos), entre otros, o del contacto con estos animales, suponiendo así un riesgo para la salud de los seres humanos como patógenos responsables de zoonosis (Mitchell et al., 2015). De hecho, algunos estudios revelaron que las cepas APEC y ExPEC, que causan infecciones en humanos, están estrechamente relacionadas filogenéticamente y comparten algunos genes de virulencia (como el gen *iss*, que es responsable del aumento de la supervivencia de las bacterias en el suero) (Manges, 2016), lo que sugiere que cepas APEC podrían ser un reservorio de genes de virulencia de ExPEC patógenos para los humanos, pudiendo ser esta la razón de la diversidad genética e intercambio de genes entre cepas patógenas de *E. coli* humanas y aviarias.

Los ExPEC son ampliamente conocidos como patógenos urinarios. Las infecciones del tracto urinario (ITUs) son infecciones muy comunes en los seres humanos (con mayor frecuencia en las mujeres), y el 90% de las mismas, junto con las pielonefritis, son causadas por UPEC (Dale & Woodford, 2015). La mayoría de las ITU no complicadas se manifiestan como infecciones del tracto urinario inferior, ya sea una infección e inflamación de la uretra (uretritis) o bien cistitis, si el patógeno asciende por la uretra hasta la vejiga. En las ITU complicadas, la infección asciende por los uréteres hasta el tracto urinario superior causando una infección renal (pielonefritis). Incluso, algunas cepas son capaces de atravesar la barrera endotelial, migrar al espacio intravascular entrando en la circulación sanguínea y multiplicarse provocando bacteriemias o septicemias (infección del torrente sanguíneo). Es más, si la concentración de bacterias en sangre es elevada, podrían llegar a atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) invadiendo las meninges en el SNC, lo que desencadenaría una respuesta inflamatoria con disminución de presión intracraneal, formación de edemas y lesiones neuronales. Afortunadamente, las ITU rara vez causan daños graves y pueden ser eliminadas de forma natural por el sistema inmunitario del huésped; exceptuando algunos casos complicados que requieren un tratamiento prolongado que se asocian a graves complicaciones y fracaso del tratamiento (Terlizzi et al., 2017; Kaper et al., 2004).

Así también, las cepas ExPEC causan aproximadamente 10 millones de casos al año de enfermedad invasiva ExPEC (IED) en todo el mundo y constituyen una de las principales causas bacterianas de sepsis, especialmente en adultos mayores. La sepsis es una infección del torrente sanguíneo potencialmente mortal acompañada de una enfermedad grave y daño generalizado a los órganos, generada por la respuesta autodestructiva del cuerpo a la infección (Rudd et al., 2020). Se produce como consecuencia de la bacteriemia (presencia de bacterias en el torrente sanguíneo que se pone de manifiesto mediante el aislamiento de éstas en los hemocultivos) que puede ser transitoria y no causar secuelas, o tener consecuencias sistémicas (Frank et al., 2011). Los principales factores de riesgo incluyen la edad, especialmente mayores de 60 años, y enfermedades crónicas como diabetes, cáncer o enfermedad renal, entre otras. Las bacteriemias son una preocupación constante en materia de atención médica, y las cepas ExPEC son uno de los principales impulsores de la crisis mundial de la resistencia a los antimicrobianos (RAM) (Rudd et al., 2020).

Cabe destacar que la atribución a un patotipo específico no excluye que la cepa pueda causar infección en otro lugar anatómico (Manges, 2016). Además, durante los últimos años se han descrito patotipos híbridos complejos como, por ejemplo, un portador de verotoxina (STEC) que causó la enfermedad en más de tres mil personas, causando la muerte de 54 personas durante un gran brote surgido en 2011 (Frank et al., 2011).

### 1.2.2. TEORÍAS DE PATOGENICIDAD de ExPEC

Se han propuesto tres hipótesis sobre la patogenicidad de ExPEC que intentan explicar la relación entre las cepas comensales fecales de *E. coli* y las cepas causantes de infecciones. La teoría de la prevalencia sostiene que la mayoría de las infecciones del tracto urinario causadas por ExPEC son casos de pacientes con un sistema inmunitario comprometido que son infectados por patógenos oportunistas que predominan en la flora fecal. Por otra parte, la teoría de la especial patogenicidad apoya la idea de que solo determinadas cepas que presentan unos rasgos virulentos específicos y representan un subconjunto distintivo de la población fecal de *E. coli* son capaces de producir las infecciones extraintestinales. Diversos estudios realizados en las décadas de los ochenta y noventa del siglo pasado confirman la validez de la teoría de la especial patogenicidad (Blanco et al., 1996); sin embargo, ninguna de estas hipótesis se considera realmente adecuada actualmente. De hecho, existen cada vez más evidencias de que las cepas de *E. coli* comensales se convierten en patógenas a través de una selección de factores de virulencia que están relacionados con la ecología de la bacteria más que con su contribución directa a la patogénesis (hipótesis de la evolución coincidente) (Denamur et al., 2020). Además, se ha demostrado que una fracción considerable de los genes asociados a virulencia en ExPEC también están presentes en muchos aislados comensales de *E. coli*, lo que sugiere que la virulencia puede ser un producto del comensalismo que aumenta su adaptabilidad y competitividad (Duprilot et al., 2019).

### 1.3. FACTORES DE VIRULENCIA

En ExPEC se ha descrito un amplio conjunto de factores asociados a la virulencia o viruloma y se ha comprobado que existe una gran variabilidad de perfiles de virulencia dentro de los grupos filogenéticos, clones e incluso entre subclones. Un factor de virulencia (FV) se define como cualquier función bacteriana que facilite la infección (J. R. Johnson, 1991). Ningún factor de virulencia es suficiente por sí solo para causar una enfermedad, sino que la virulencia bacteriana es un fenómeno multifactorial en el que distintos tipos de factores de virulencia contribuyen conjuntamente a potenciar su patogenicidad (Sarkar et al., 2014).

Todos los patotipos de ExPEC que hemos visto, comparten diversos factores de virulencia que les permiten adherirse a las células infectadas (adhesinas), factores que les permiten evitar o sobrevivir a los sistemas de defensa del huésped (como cápsulas y lipopolisacáridos), mecanismos de adquisición de hierro (sideróforos), proteasas, invasinas y toxinas (hemolisina y el factor necrosante citotóxico CNF1) (Smith et al., 2007).

Estos factores de virulencia se pueden agrupar en una serie de categorías teniendo en cuenta su función:

1. **Adherencia y colonización:** La patogénesis de la mayoría de las enfermedades infecciosas se inicia con una etapa de adhesión de las bacterias a las superficies mucosas del organismo. Por ello, la capacidad de adherencia es una propiedad esencial de las cepas patógenas de *E. coli* que aumenta su virulencia y les permite establecer un contacto estrecho con la membrana de las células del hospedador. De hecho, suele estar relacionada con la especificidad del hospedador e incluso del tejido, favoreciendo así la colonización (Kline et al., 2009; Sarowska et al., 2019). Las cepas ExPEC poseen varios apéndices en su superficie que juegan un papel importante en el proceso de infección:
  - a. Adhesinas fimbriales: Las fimbrias son unas extensiones largas de carácter proteico que intervienen en diversas funciones como la adherencia o la formación de biopelículas. Las más comunes son el tipo 1, el tipo P, el tipo S y el F1C, codificados por los operones *fim*, *pap*, *sfa* y *foc*, respectivamente. La fimbria común tipo 1 está presente en el genoma del 99% de las cepas *E. coli* y está constituida por varias subunidades (*FimA*, *FimC*, *FimD*, *FimH*, *FimF* y *FimG*) entre las que la *FimH* representa la actual adhesina; se encuentra implicada en la invasión de las células de la vejiga. Las fimbrias P se asocian a cepas aisladas de pacientes con pielonefritis y urosepsis y permiten la fijación a los receptores celulares; entre sus varias subunidades (*PapA*, *PapC*, *PapE*, *PapF* y *PapK*) la *PapG* representa la

- adhesina real. Las fimbrias S/F1C son factores de virulencia presentes especialmente en cepas causantes de septicemias y meningitis; el operón *sfa* codifica para varias de sus subunidades denominadas *SfaA*, *SfaG*, *SfaH* y *SfaF*, siendo esta la última la verdadera adhesina. Muchas cepas uropatogénicas y septicémicas humanas expresan las fimbrias P y S al mismo tiempo. Por último, existen otro tipo de fimbrias *Afa/Dr*, unas poliadhesinas (codificadas por los operones *afa*, *dra* y *daa*) que destacan por su capacidad de unirse a los eritrocitos gracias a la especificidad del receptor para el antígeno del grupo sanguíneo Dr.
- b. Adhesinas no fimbriales: se incluyen un amplio número de estructuras heterogéneas que cumplen funciones similares contribuyendo a la adherencia y colonización como proteínas autotransportadoras (AT), proteína del factor de adherencia de *E. coli* (*FdeC*), hemaglutinina sensible a la temperatura (*tsh*), antígeno Ag-43 de la membrana externa y proteínas AT triméricas de la superficie.
  - c. Flagelos: Consisten en un polímero proteico constituido por flagelinas o proteínas FliC (monómeros) y constituyen un elemento fundamental en la colonización e invasión ya que son los responsables de la movilidad de las bacterias, proporcionándoles así un mayor acceso a los tejidos diana para comenzar la adherencia e infección. Consisten en un polímero proteico constituido por flagelinas o proteínas FliC (monómeros) (Mulvey, 2002; Kline et al., 2009; Dahbi Zbiti, 2015; Flament-Simon, 2021; Fonseca-Martínez et al., 2023).
2. Metabolismo y captación de nutrientes: Fuera de su reservorio, el intestino, el ambiente es nutricionalmente diverso y *E. coli* necesita una fuente de carbono, su principal limitación nutricional. Por ello, las cepas ExPEC han desarrollado una maquinaria especializada para la regulación de sus vías metabólicas (El sistema TCS o sistema de dos componentes), para la adquisición de hierro (sideróforos) y sistemas de secreción.
    - a. Sistema de dos componentes (TCS): está compuesto por una histidina quinasa sensora unida a la membrana (HK) y un regulador de respuesta citoplasmático de la expresión génica (RR). Es la principal vía de transducción de señales ambientales (como la detección de *quorum*) y tiene un papel clave en la regulación eficaz de algunas vías metabólicas.
    - b. Sideróforos: consisten en moléculas secuestradoras de iones de hierro ( $Fe^{3+}$ ) con distintas estructuras químicas y niveles de afinidad, incluyendo enterobactinas (codificada por los genes *fep* y *fes*), salmochelinas (codificadas por *iroN* e *iroD*), aerobactinas (codificada por *iutA*) y yersiniabactinas (codificada por *fyuA* e *ybtPQ*). Son esenciales sobre todo en el caso de los patógenos septicémicos para captar el hierro unido a las proteínas de la sangre como la ferritina o la hemosiderina. Además, ExPEC también puede conseguir hierro mediante la producción de toxinas como la alfa-hemolisina para lisar las células y conseguir micronutrientes como el complejo hemo.
    - c. Los sistemas de secreción contribuyen a la patogénesis facilitando el transporte transmembrana de moléculas como toxinas, sideróforos y exopolisacáridos (Dahbi Zbiti, 2015; Mann et al., 2017; Robinson et al., 2018; Sarowska et al., 2019; Flament-Simon, 2021; Fonseca-Martínez et al., 2023).
  3. Mecanismos de evasión del sistema inmune del huésped: Una de las propiedades de las cepas ExPEC es la resistencia a la actividad bactericida del suero evitando su bacteriólisis gracias a dos lipoproteínas involucradas en su supervivencia en el suero (*Iss* o *Increased Serum Survival*) y su resistencia a la acción lítica del complemento, disminuyendo así su fagocitosis (*TraT* o proteína de exclusión de la superficie de transferencia conjugal). Por otra parte, la membrana externa de ExPEC está compuesta por varios lipopolisacáridos (LPS) como el antígeno somático O, que también interviene en la resistencia al suero, y puede estar recubierta por una cápsula (antígeno K) que interacciona con el entorno inmediato protegiendo a la bacteria de su fagocitosis. El antígeno O es una endotoxina y se considera también un factor de patogenicidad debido a su efecto tóxico y respuesta inflamatoria asociada. Las vesículas de la membrana externa participan en la liberación y protección de toxinas, adhesinas, enzimas y otros antígenos no proteicos vehiculizándolos desde la célula bacteriana al

medio externo (J. R. Johnson et al., 2000; Phan et al., 2013; Dahbi Zbiti, 2015; Sarowska et al., 2019; Flament-Simon, 2021).

4. **Toxinas:** ExPEC ha desarrollado la capacidad de sintetizar una serie de moléculas perjudiciales para las células, causando desde disfuncionalidad, detección del ciclo celular, alteración de la morfología hasta la lisis celular. El factor de virulencia más secretado es la alfa-hemolisina (*HlyA*), una toxina proinflamatoria que promueve la liberación de citoquinas como IL-6 e IL-8 agravando así las infecciones. Destacan también el factor necrotizante citotóxico 1 (CNF), la toxina distensora citolítica (CDT), la citotoxina autotransportadora vacuolizante (*Vat*) y la toxina autotransportadora secretada (*Sat*) (Denamur et al., 2020; Fonseca-Martínez et al., 2023).
5. **Otras estrategias:** Por último, ExPEC también ha desarrollado otro tipo de estrategias que contribuyen a su virulencia como la producción de biopelículas, la constitución de comunidades bacterianas intracelulares recubiertas por una matriz (IBC) y de reservorios intracelulares quiescentes (QR) que se asocian a infecciones recurrentes (Dahbi Zbiti, 2015).

El amplio espectro de características patogénicas y de diferentes síntomas clínicos causados por *E. coli* refleja la presencia de diferentes subconjuntos de genes asociados a la virulencia en ciertos patotipos que están ausentes en los aislados comensales (Dobrindt et al., 2003). Muchos de los genes asociados a la virulencia se localizan en elementos genéticos móviles, como bacteriófagos, plásmidos e islas de patogenicidad (PAI), por lo que la transferencia horizontal de genes juega un papel importante en la evolución de diferentes patotipos bacterianos (Dobrindt et al., 2003).

Actualmente se acepta que una cepa pertenece al estatus ExPEC cuando posee al menos dos de los siguientes genes de virulencia asociados con infecciones extraintestinales: *papA* y/o *papC*, *Sfa/foc*, *afa/dra*, *iutA* y *kpsM II* (Johnson et al 2007; Randall singer 2015). Dentro del estatus UPEC si las cepas son positivas para  $\geq 3$  de estos 4 marcadores (*chuA*, *fyuA*, *vat*, y *yfcV*) (Spurbeck et al., 2012); y como cepas APEC si son positivas para  $\geq 4$  de los 5 marcadores siguientes (*hlyF*, *iutA*, *iron*, *iss* y *ompT*) (T. J. Johnson, Wannemuehler, Doetkott, et al., 2008). A diferencia de los estatus UPEC y APEC, todavía no se han definido criterios basados en la presencia de determinados genes de virulencia para los patotipos NMEC y SEPEC. Lo que sí que se conoce es que la mayoría de las cepas de NMEC presentan antígenos capsulares K1 (*kpsM*, *neuA*) o el gen de invasión *ibeA* y que las cepas SEPEC suelen poseer los antígenos capsulares *kpsM II-K2* o K5, las fimbrias P y/o S, y producir alfa-hemolisina y/ó el factor necrosante citotóxico CNF1 (Sarowska et al., 2019).

#### 1.4. RESISTENCIA

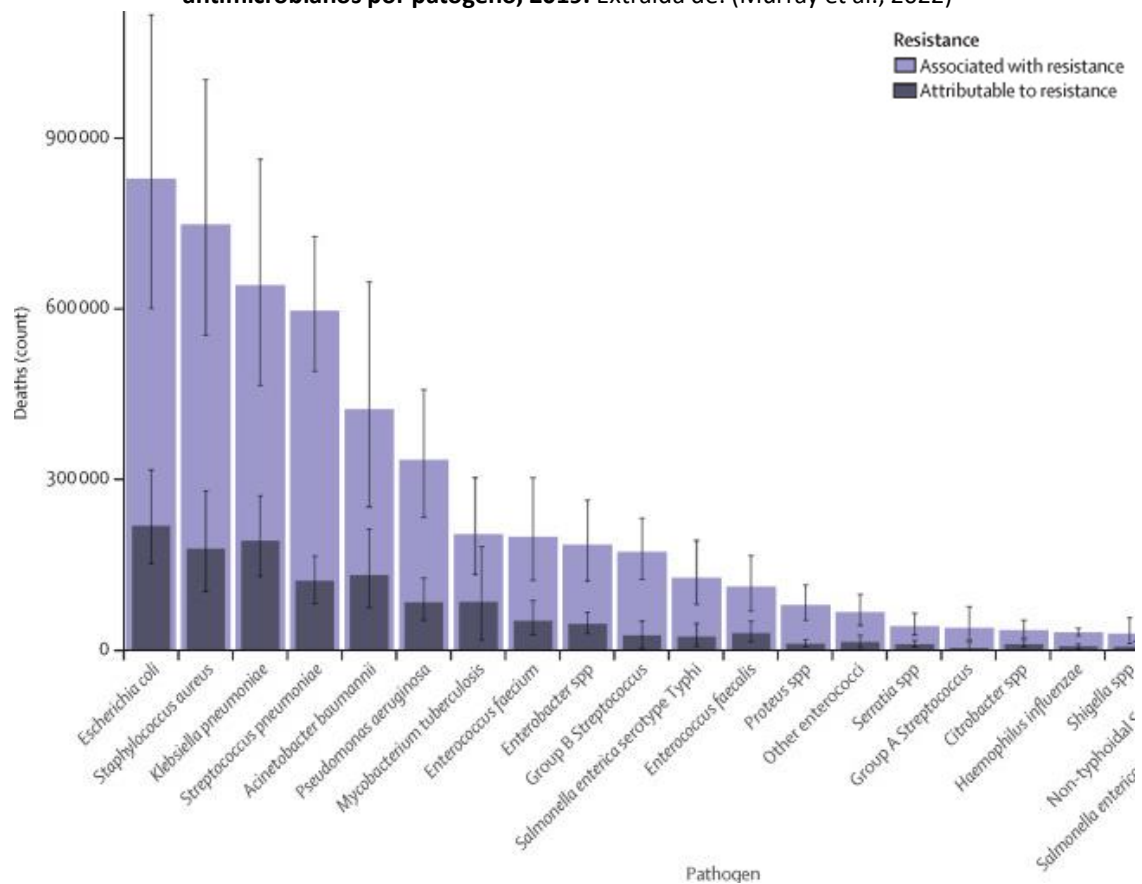
La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en 2050 la resistencia bacteriana ocasionará 10 millones de muertes. La resistencia se define como la capacidad de un microorganismo para multiplicarse en presencia de un compuesto tóxico y es aplicable a los antibióticos bacteriostáticos y bactericidas (Lewis, 2006; Lewis, 2008). Entre los principales mecanismos de resistencia bacteriana se encuentran: la alteración enzimática del antibiótico, la alteración o protección del sitio diana, la restricción del acceso a la diana, la sobreproducción de la diana, la permeabilidad reducida y el eflujo activo (Martínez, 2014; Munita & Arias, 2016). Como consecuencia de la farmacoresistencia, los antibióticos y otros medicamentos antimicrobianos se vuelven ineficaces, lo que complica el tratamiento de infecciones, que adquieren mayor gravedad llegando incluso a la muerte, e incrementa también el riesgo de propagación de dichas enfermedades.

La resistencia a los antibióticos en *E. coli* es un problema actual en rápida expansión. *E. coli* se incluye entre los patógenos con prioridad crítica y uno de los principales impulsores de la crisis mundial de resistencia a antimicrobianos (RAM); pues constituye el 23,4% de las muertes atribuibles a la resistencia a los antimicrobianos y el 24,3% de las muertes asociadas a la resistencia a los antimicrobianos (**Figura 2**)

(Murray et al., 2022). Esto es debido, en gran parte, a la aparición y propagación de cepas ExPEC resistentes a múltiples fármacos (MDR) y, especialmente, a la rápida diseminación de cepas de *E. coli* productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (ESBL), que provocan una cantidad considerable de fracasos terapéuticos y costes de hospitalización, y contribuyen a la propagación de la resistencia a los fármacos entre el microbioma humano (Xing et al., 2023).

Por otra parte, la resistencia a las oximiinocefalosporinas (como la cefotaxima, ceftazidima, cefuroxima, cefepima) y a los monobactámicos (aztreonam) se debe a menudo a la producción de un grupo de enzimas hidrolizantes conocidas como  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (ESBL). Estas enzimas se caracterizan por ser inhibidas por los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas de clase A (como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) (Munita & Arias, 2016; Sarowska et al., 2019).

**Figura 2. Muertes mundiales (recuentos) atribuibles y asociadas a la resistencia bacteriana a los antimicrobianos por patógeno, 2019.** Extraída de: (Murray et al., 2022)



Las bacterias pueden mostrar resistencia intrínseca (codificada cromosómicamente y transmisible verticalmente, es decir, a la descendencia) o desarrollar una resistencia adquirida contra antibióticos (codificada fuera del cromosoma en elementos genéticos móviles como EGM y que se transfiere horizontalmente entre bacterias (Perry et al., 2014). Las *E. coli* patógenas extraintestinales (ExPEC), además de presentar una estructura filogenética compleja y una amplia gama de factores de virulencia (FV), tienen una plasticidad considerable del genoma. Esta capacidad para mutar, adquirir y transmitir plásmidos y otros elementos genéticos móviles que codifican genes de resistencia contribuye a la creciente aparición resistencias (Chroma & Kolar, 2010).

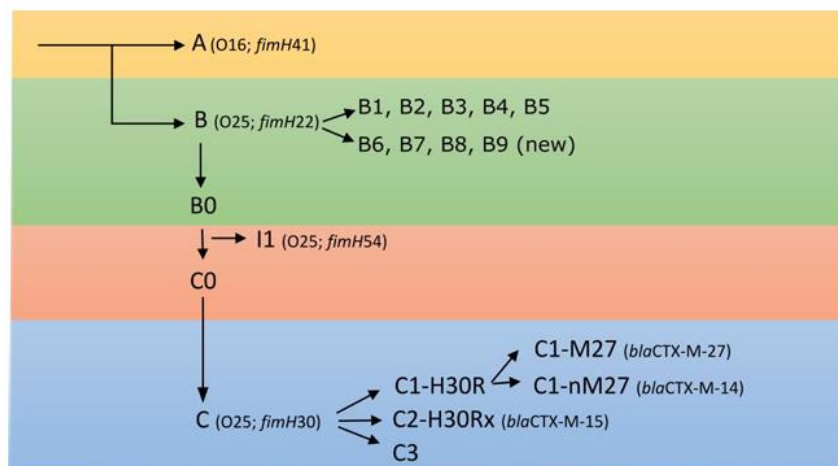
### 1.5. CLONES Y ÉXITO EVOLUTIVO DE *E. coli*

Existe una enorme diversidad entre los aislados de *E. coli*; sin embargo, estudios epidemiológicos indican que ciertos serotipos O:H, secuencias tipo (ST) y clonotipos son más predominantes y especialmente exitosos (Flament-Simon, 2021; Nicolas-Chanoine, et al., 2020). El término clon se refiere a bacterias aisladas que comparten rasgos similares, lo que indica que pertenecen al mismo linaje y tienen un ancestro común. Se observan diferencias notables en la prevalencia de linajes de *E. coli* entre diferentes hospedadores e incluso diversidad intrahospedador. La prevalencia de grupos filogenéticos difiere también entre animales y humanos; siendo los más frecuentes el grupo filogenético A, B2 y D (Tenaillon et al., 2010). La mayoría de las cepas patógenas de ExPEC pertenecen al grupo filogenético B2 y, en menor medida, al D; estos filogrupos se consideran más virulentos y susceptibles a los antibióticos en comparación con los de los grupos A y B1 (que suelen asociarse a cepas comensales) (Stoppe et al., 2017).

Además, existen una serie de linajes concretos o grupos clonales de ExPEC que son responsables de una gran parte de las infecciones extraintestinales humanas y animales; siendo los de mayor preocupación los clones MDR de alto riesgo, entre ellos los pertenecientes a las siguientes secuencias tipo: ST10, ST38, ST69, ST88, ST131, ST155, ST167, ST315, ST393, ST405, ST410 y ST648. Estos clones de alto riesgo se caracterizan por presentar una distribución internacional, colonización exitosa y persistencia en hospedadores durante largos intervalos de tiempo (>6 meses), una transmisión efectiva entre hospedadores, poseer varios determinantes de resistencia a los antimicrobianos y causar infecciones graves y/o recurrentes. La resistencia a los antimicrobianos y los factores de virulencia podrían ser la razón de que estos clones prevalecen sobre el resto (Dobrindt, 2005; Stoesser et al., 2016). Las secuencias tipo se establecen por el método MLST (*Multi-locus sequence typing*) de Achtman mediante amplificación génica y secuenciación de siete alelos altamente conservados (*adhA*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* y *recA*), según el protocolo y *primers* especificados en el sitio web de *E. coli* MLST (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>) (Wirth et al., 2006). Existe otro método ampliamente extendido para estudiar los linajes de *E. coli* basado en la secuenciación de los alelos *fimH* y *fumC* lo que permite asignar clonotipos (CH) (Weissman et al., 2012).

La secuencia tipo 131 (ST131) se ha convertido en el representante de la mayor proporción de infecciones extraintestinales humanas desde su aparición en el año 2000. Es el linaje de *E. coli* resistente a múltiples fármacos epidemiológicamente más exitoso y el responsable del aumento global de ESBL. El éxito de las cepas del grupo clonal ST131 se podría explicar por la adquisición de genes de virulencia y de resistencia a antibióticos, por la enorme diversidad genética que presentan y por su capacidad de colonización a nivel intestinal y diseminación (*E. coli*, OMS). Estudios filogenéticos han revelado que *E. coli* ST131 integra a cuatro clados (A, B, C e I) y a muchos subclados diferentes, tres dentro del clado C (C1, C2 y C3) y seis dentro del clado B (de B1 a B5, más el intermedio B0). Cada uno de los clados están asociados a un alelo *fimH* concreto (gen que codifica para la adhesina *fimbrial* tipo 1): las cepas pertenecientes al clado A se asocian a *fimH41*, el clado B a *fimH22*, el clado C a *fimH30* y el clado I a *fimH54*. El clado B-H22, es el predecesor susceptible a las fluoroquinolonas (FQ) y a las cefalosporinas que evolucionó en el clado C-H30R (donde "R" indica resistencia a la FQ) y que a su vez dio lugar a dos subclados hermanos C1-H30R y C2-H30Rx (a menudo portadores de la enzima blaCTX-M-15). Posteriormente, surgieron otros dos sublinajes ST131 C1-M27 (positivo para la enzima blaCTX-M-27) y C1-nM27 (no ESBL o positivo para la enzima blaCTX-M-14) positivo para la enzima blaCTX-M-14) (Flament-Simon, 2021).

Aunque hasta el momento la atención se centraba en el subclado C2 (también conocido como subclon H30Rx) asociado a la producción de CTX-M-15; recientemente se ha expandido el clado C1-M27 que pertenece al subclado C1 y produce CTX-M-27, primero en Japón (Matsumura et al., 2016, 2017) y después en otros países (Tailandia, Australia, Canadá, Estados Unidos, Francia, Italia, Alemania, Países Bajos y España) (Blanc et al., 2014; Birgy et al., 2016; Bevan et al., 2017; Merino et al., 2018; Peirano & Pitout, 2019).

**Figura 3. Representación gráfica del linaje.** Extraída de: (Flament-Simon, 2021).

## 1.6. SEROGRUPOS

El estudio de la diversidad de *E. coli* comenzó en los años cuarenta del siglo pasado clasificando las cepas mediante el biotipado (método basado en pruebas bioquímicas como la fermentación o no de ciertos carbohidratos), pero esto no permitía diferenciar las cepas patógenas de las inocuas por su bajo nivel discriminatorio. El sistema internacional de serotipado de las cepas de *E. coli* permitió solucionar en parte este problema y fue propuesto por Kauffman en 1947 y se fundamenta en diferenciar las cepas de *E. coli* en función de sus principales antígenos de superficie, diferenciando antígenos somáticos (O), capsulares (K) y flagelares (H). En la actualidad, se reconocen 174 antígenos O y 53 antígenos H, cuya determinación se realiza por técnicas de aglutinación, y más de 103 antígenos K, aunque debido a la complejidad de su identificación por contra inmunoelectroforesis se suelen expresar los serotipos únicamente con la combinación O:H. El antígeno O es un polisacárido termoestable (121°C/2h) que forma parte del lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa de la pared celular y el antígeno H se asocia a los distintos tipos de flagelina que componen la estructura del flagelo. Aunque existen muchos serotipos O:H diferentes, solo algunos son especialmente frecuentes entre las cepas patógenas (Dahbi Zbiti, 2015).

El Laboratorio de Referencia de *Escherichia coli* (LREC) de la Universidad de Santiago de Compostela (USC) ha llevado a cabo un seguimiento epidemiológico de las cepas de *E. coli* causantes de bacteriemias en la población lucense gracias al desarrollo de varios proyectos de investigación en colaboración con el Hospital Universitario Lucus Agustí (HULA). En la **Tabla 1** se muestran los serogrupos a los que pertenecieron las cepas causantes de bacteriemias en dos estudios, el primero consistió en un seguimiento epidemiológico realizado desde el año 1989 hasta el 2011 que incluyó un total de 3,260 cepas (Mamani Huarani, 2015) y el segundo realizado entre los años 2020 y 2022 con un total de 348 cepas (LREC sin publicar). En estos trabajos se identificaron los serogrupos más prevalentes causantes de estas infecciones, observándose que los serogrupos O1, O2, O4, O6, O8, O9, O15, O25 y O101 están entre los 10 serogrupos más prevalentes en los dos periodos de estudio.

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

Serogrupos <sup>a</sup>	Estudio 2020-2022 (n = 348)	Estudio 1989-2011 (n = 3.260)	Test Chi-Cuadrado con la corrección de Yates
	15	18	
<b>O1</b>	<b>20 (5,7)<sup>b</sup></b>	<b>214 (6,6)</b>	0,63904 (DNS)
<b>O2</b>	<b>34 (9,8)</b>	<b>270 (8,3)</b>	0,396144 (DNS)
O4	13 (3,7)	117 (3,6)	1,0 (DNS)
<b>O6</b>	<b>27 (7,8)</b>	<b>278 (8,5)</b>	0,698535 (DNS)

Tabla 1. Continuación

Serogrupos <sup>a</sup>	Estudio 2020-2022 (n = 348)	Estudio 1989-2011 (n = 3.260)	Test Chi-Cuadrado con la corrección de Yates
O7	4 (1,1)	37 (1,1)	1,0 (DNS)
<b>O8</b>	<b>34 (9,8)</b>	<b>243 (7,5)</b>	0,15121 (DNS)
O9	11 (3,1)	120 (3,7)	0,729034 (DNS)
O11		47 (1,4)	
O15	14 (4,0)	137 (4,2)	1,0 (DNS)
O16	4 (1,1)		
O17		44 (1,3)	
O18	7 (2,0)	129 (4,0)	0,096046 (DNS)
O22		38 (1,2)	
<b>O25</b>	<b>34 (9,8)</b>	<b>220 (6,7)</b>	<b>0,047151 (DS)</b>
O75	11 (3,2)	58 (1,8)	0.113126 (DNS)
O77		51 (1,6)	
O83	5 (1,4)	37 (1,1)	DNS (test no applicable)
O101	14 (4,0)	70 (2,1)	<b>0.043394 (DS)</b>
O153	6 (1,7)	37 (1,1)	DNS (test no applicable)

<sup>a</sup>Aparecen únicamente los serogrupos O con una prevalencia superior al 1,0 %.

<sup>b</sup>Entre parentesis figuran los % y en negrilla los 5 serogrupos más prevalentes en ambos estudios y las diferencias estadísticamente significativas (DS). DNS = Diferencias no significativas.

El alarmante incremento de cepas multirresistentes a los antibióticos hace necesario el desarrollo de herramientas de prevención como son las vacunas. A pesar de numerosos estudios realizados sobre *E. coli* patógenos que abarcan más de cinco décadas, ninguna vacuna *E. coli* ha sido aprobada por la FDA de EE. UU por lo existe la urgencia de identificar una vacuna novedosa, específica, inmunogénica y protectora contra ExPEC. En este contexto, el desarrollo de vacunas conjugadas multivalentes dirigidas al antígeno O representan una solución real para reducir la morbilidad, la mortalidad y la resistencia a los antimicrobianos (Frenck et al., 2019; Xing et al., 2023; Weerdenburg et al., 2023).

En un trabajo publicado por Lipworth y colaboradores en 2021 se describen dos novedosas vacunas en vías de desarrollo para prevenir infecciones extraintestinales causadas por *E. coli*. La vacuna ExPEC4V incluye en su composición los antígenos O1, O2, O6, O25 de *E. coli* y la vacuna ExPEC10V incluye en su composición 6 antígenos-O más que son el O4, O8, O15, O16, O18 y O75. No obstante, la prevalencia con la que estos serogrupos son aislados de muestras clínicas sufre variaciones que pueden ser significativas a nivel global, estas variaciones se presentan en la **Tabla 2** elaborada por el LREC-USC. En este trabajo se evidencia que la cobertura teórica de las vacunas ExPEC4V y ExPEC10V varía considerablemente en función de la epidemiología local (datos no publicados LREC-USC) (Mamani Huarani, 2015; Kallonen et al., 2017; Royer et al., 2022; Matsumoto et al., 2022; Weerdenburg et al., 2023).

**Tabla 2. Comparación de los serogrupos O más prevalentes entre cepas de *E. coli* bacteriémicas aisladas en diferentes países y grado de protección teórico de las vacunas ExPEC 4V y ExPEC 10V**

Serogrupos	Lugo	Lugo	París	Inglaterra	Japón	Global
	2020-2022	1989-2011	2005, 2016-2017	2001-2011	2015-2017	2011-2017
	n=348	n=3260	n= 912	n= 1509	n= 401	n= 3217
O1 <sup>a,b</sup>	<b>20 (5,7)</b>	<b>214 (6,6)</b>	<b>60 (6.6)<sup>e</sup></b>	<b>119 (7.9)</b>	<b>57 (14.2)</b>	<b>255 (7.9)</b>
O2 <sup>a,b</sup>	<b>34 (9,8)</b>	<b>270 (8,3)</b>	<b>63 (6.9)</b>	<b>154 (10.2)</b>	<b>34 (8.5)</b>	<b>268 (8.3)</b>
O4 <sup>b</sup>	13 (3,7)	117 (3,6)	35 (3.8)	65 (4.3)	6 (1.5)	96 (3.0)
O6 <sup>a,b</sup>	<b>27 (7,8)</b>	<b>278 (8,5)</b>	<b>97 (10.6)</b>	<b>222 (14.7)</b>	<b>22 (5.5)</b>	<b>261 (8.1)</b>
O7	4 (1,1)	37 (1,1)	22 (2.4)	24 (1.6)		30 (0.9)
O8 <sup>b</sup>	<b>34 (9,8)</b>	<b>243 (7,5)</b>	51 (5.6)	45 (3.0)	5 (1.2)	104 (3.2)
O9	11 (3,1)	120 (3,7)	37 (4.1)	27 (1.8)		51 (1.6)
O11		47 (1,4)	12 (1.3)	11 (0.7)		27 (0.8)
O13 grupo <sup>c</sup>					17 (4.2)	34 (1.1)
O15 <sup>b</sup>	14 (4,0)	137 (4,2)	38 (4.2)	52 (3.4)	7 (1.7)	110 (3.4)
O16 <sup>b</sup>	4 (1,1)	8 (0,2)	26 (2.8)	46 (3.0)	13 (3.2)	103 (3.2)
O17		44 (1,3)	<b>52 (5.7)</b>	<b>74 (4.9)</b>		
O18 <sup>b</sup>	7 (2,0)	129 (4,0)	29 (3.2)	65 (4.3)	17 (4.2)	91 (2.8)
O22		38 (1,2)				
O25 <sup>a,b</sup>	<b>34 (9.7)</b>	<b>220 (6,7)</b>	<b>96 (10.5)</b>	<b>225 (14.9)</b>	<b>115 (28.7)</b>	<b>737 (22.9)</b>
O45			19 (2.1)	18 (1.2)		
O46, O134					6 (1.5)	19 (0.6)
O75 <sup>b</sup>	11 (3,2)	58 (1,8)	31 (3.4)	55 (3.6)	<b>19 (4.7)</b>	<b>145 (4.5)</b>
O77 grupo <sup>d</sup>		51 (1,6)	≥ 52 (5.7)	≥ 74 (4.9)		82 (2.5)
O83	5 (1,4)	37 (1,1)			4 (1.0)	21 (0.7)
O86					5 (1.2)	45 (1.4)
O153	6 (1,7)	37 (1,1)	17 (1.9)	0		63 (2.0)
ExPEC 4V <sup>a</sup>	115 (33,0)	982 (30,1)	316 (34.6)	720 (47.7)	228 (56.9)	1521 (47.3)
ExPEC 10V <sup>b</sup>	198 (56,9)	1674 (51,3)	526 (57.7)	1048 (69.4)	295 (73.6)	2170 (67.5)

<sup>a</sup>Serogrupos cubiertos por la vacuna ExPEC 4V: O1, O2, O6 y O25. (Lipworth et al., 2021) (1499 de 3278 (45,7%) cepas de *E. coli* bacteriémicas; Oxford, 2008-2018).

<sup>b</sup>Serogrupos cubiertos por la vacuna ExPEC 10V vaccine: O1, O2, O4, O6, O8, O15, O16, O18, O25 y O75. (Lipworth et al., 2021) (2347 de 3278 (71,6%) cepas de *E. coli* bacteriémicas; Oxford, 2008-2018).

<sup>c</sup>El grupo O13 comprende 3 serogrupos estructuralmente e inmunológicamente relacionados O13, O129 y O135.

<sup>d</sup>El grupo O77 comprende 5 serogrupos estructuralmente e inmunológicamente relacionados O17, O44, O73, O77 y O106.

<sup>e</sup>Los 5 serogrupos más prevalentes de cada estudio están destacados en negrilla.

(Mamani Huarani, 2015; Kallonen et al., 2017; Royer et al., 2022; Matsumoto et al., 2022; Weerdenburg et al., 2023).

---

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

Las cepas ExPEC son responsables de la mayoría de las infecciones extraintestinales a nivel mundial y aunque comprenden una gran variedad de linajes, tan solo un pequeño grupo de clones son responsables de la mayoría de las infecciones, destacando el clon de alto riesgo ST131 asociado especialmente con el serogrupo O25. El alarmante incremento de cepas multirresistentes a los antibióticos hace necesario el desarrollo de herramientas de prevención como son las vacunas, en la actualidad las más avanzadas se basan en los antígenos O (ExPEC4V y ExPEC10V), incluyendo en su composición a los serogrupos más prevalentes. No obstante, los resultados de las investigaciones donde se realiza un seguimiento de los serogrupos más prevalentes en infecciones extraintestinales en seres humanos describen ciertas diferencias entre las distintas regiones geográficas. Por todo ello, consideramos que es necesario: (I) estudiar estas variaciones para el diseño de vacunas mejor adaptadas a la epidemiología local y (II) comprender los mecanismos de patogénesis de estas cepas.

En este trabajo realizaremos la caracterización molecular de un total de 48 cepas causantes de bacteriemias en seres humanos en el Hospital Lucus Augusti durante los años 2020 a 2022 pertenecientes a los serogrupos O25 (n=34) y O15 (n=14). Nuestro objetivo es conocer las características distintivas de dos de los serogrupos más prevalentes causantes bacteriemia en la población lucense. Para ello, establecimos los siguientes subobjetivos:

- Evaluar si es necesaria la inclusión de estos serogrupos en las vacunas que se desarrollen para prevenir las bacteriemias causadas por *E.coli* en los humanos.
- Establecer la relación de dichos serogrupos con la resistencia a los antimicrobianos.
- Determinar el potencial de virulencia de los dos serogrupos analizados en este trabajo.
- Caracterizar los aislados de *E. coli* pertenecientes a la secuencia tipo ST131 resistente a múltiples fármacos (MDR) y evaluar su prevalencia en la población lucense de los últimos años, en concreto el clon de alto riesgo productor de *bla*CTX-M-27.

---

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

---

#### 3.1. COLECCIÓN DE CEPAS DE ESTUDIO

##### 3.1.1. PROCEDENCIA DE LA COLECCIÓN DE CEPAS

En este estudio se caracterizaron un total de 48 cepas *E. coli* aisladas de bacteriemias pertenecientes a los serogrupos O25 y O15 que fueron aisladas durante los años 2020, 2021 y 2022 de pacientes del Hospital Lucus Augusti de Lugo (HULA).

Además, en todos los ensayos se emplearon cepas control positivas y negativas procedentes de la colección de cepas del Laboratorio de Referencia de *E. coli* (LREC) (**anexo**).

##### 3.1.2. CONSERVACIÓN BACTERIANA

Todos las cepas de esta colección (controles y cepas clínicas) se conservaron en las mismas condiciones siguiendo el protocolo LREC-USC: las cepas aisladas se cultivaron en agar nutriente con 0,75% (w / v) y se almacenaron a temperatura ambiente en tubos Vacutainer™. En estas condiciones, las cepas de *E. coli* mantienen su viabilidad durante al menos 10 años. Para la preparación del medio de conservación, se utilizó una mezcla de agar nutritivo (11,5 g/l) (*Applichem-Panreac*) y caldo nutritivo (4 g/l) (*Applichem-Panreac*) en tubos estériles.

#### 3.2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

##### 3.2.1. DETERMINACIÓN DE SEROGRUPOS

La determinación del antígeno O se llevó a cabo mediante el método descrito previamente por Guinée et al. (1981) y modificado por Blanco et al. (1996). Este método determina los antígenos O de *E. coli* mediante aglutinación positiva con los antisueros O (O1 a O181) disponibles. Los antisueros de diagnóstico utilizados en este trabajo se obtuvieron en el LREC-USC. La especificidad se controló mediante ensayos de aglutinación con cepas de referencia conocidas. Los tipos de antígenos O31, O47, O67, O72, O93, O94 y O122 se excluyeron de esta clasificación, ya que se demostró que no son antígenos somáticos.

El procedimiento de serotipado del LREC-USC incluye 176 antisueros O específicos. La determinación del serogrupo O se lleva a cabo en dos fases: una primera determinación presuntiva del antígeno O y una confirmación del serogrupo por titulación del antígeno O.

La primera etapa consiste en preparar una suspensión bacteriana de las cepas problema para analizar. Para ello, se cultivan las cepas en agar triptona soja (TSA) y se incuban 18-24h a 37°C, y se suspenden en 2 ml de solución salina al 0,85% de NaCl. La concentración bacteriana debe ajustarse al número 6 de la escala de sulfato de bario de McFarland para alcanzar aproximadamente  $1,8 \times 10^9$  bacterias por ml. El antígeno O es un polisacárido termoestable (sigue siendo viable tras ser calentado a 100°C durante 2h) que es el principal componente de la membrana externa de las bacterias gramnegativas. En muchos casos, las cepas de *E. coli* están recubiertas por otra capa denominada cápsula que es termolábil y contiene el antígeno K. Así, una suspensión se hierve durante 1 hora (1h a 100°C) y la segunda se esteriliza en autoclave a 121°C durante 2,5 h para garantizar la inactivación del antígeno K (descubriendo el antígeno O). Tras el enfriamiento, se añaden 2 ml de suero salino formalizado (0,5%, v/v) con violeta de genciana (0,005%, p/v). Las suspensiones permanecen viables durante meses si se conservan bien cerradas a 4°C.

Para simplificar el método, los antisueros de diagnóstico se agrupan en antisueros polivalentes constituidos por un número variable de antisueros monovalentes conocidos que se utilizan en la primera etapa de la identificación del antígeno (**Tabla 3**).

**Tabla 3. Composición de antisueros polivalentes “O”**

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
O1	O8	O15	O22	O29*	O37	O44	O52	O59	O66	O75	O82	O89*
O2*	O9	O16	O23	O30	O38	O45	O53	O60	O67	O76	O83	O90*
O3*	O20	O17	O24	O32	O39	O46	O54	O61*	O68	O77	O84	O91
O4	O11	O18	O25	O33*	O40*	O48	O55	O62	O69	O78	O85	O92
O5	O12	O19*	O26	O34	O41*	O49*	O56	O63*	O70*	O79	O86	O95
O6*	O13	O20	O27	O35	O42	O50	O57*	O64	O71	O80	O87	O96*
O7	O14*	O21	O28	O36	O43	O51	O58	O65	O72	O81	O88	O97*
N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	
O98*	O105*	O112	O119	O127	O134	O141	O148	O155	O164*	O171	O178	
O99	O106	O113	O120	O128*	O135*	O142	O149	O156	O165	O172	O179	
O100	O107*	O114	O121	O129	O136	O143	O150	O157	O166	O173	O180	
O101	O108	O115*	O123	O130	O137*	O144	O151*	O158	O167	O174*	O181	
O102	O109	O116	O124*	O131*	O138	O145	O152*	O159	O168	O175*	O183*	
O103	O110	O117	O125	O132	O139	O146	O153	O160*	O169	O176*	O185	
O104	O111	O118*	O126	O133	O140	O147	O154	O161	O170*	O177		

NOTA: Todos los antisueros están diluidos al 1:80, excepto los marcados con \* que están diluidos al 1:40, en función del título del antisuero, pues si es superior a 1:640 se puede utilizar a una menor concentración (1:80), mientras que si el antisuero tiene un título igual o inferior a 1:640 no es posible diluirlo más de 1:40 para que la reacción de reconocimiento del antígeno ocurra correctamente. El título de un antisuero es la concentración más pequeña (o la dilución más alta) a la que el antisuero es capaz de reconocer a la cepa.

El procedimiento es el siguiente: primero se dispensan 50 µl de cada antisuero polivalente en los pocillos de una placa de microtitulación de poliestireno y se añaden 50 µl de la suspensión de antígeno O hervida a 100°C en cada pocillo; luego se tapan las placas de microtitulación y se incuban a 37°C durante la noche; por último, se examinan al día siguiente para ver si hay aglutinación.

- Reacción positiva (ausencia de botón en el pocillo). Si la cepa tiene un antígeno que es reconocido por uno de los antisueros monovalentes que forman parte del antisuero polivalente de ese pocillo, los anticuerpos aglutinan las bacterias formando una especie de red, por lo que las bacterias no se depositan en el fondo.
- Reacción negativa (presencia de botón en el pocillo). Por el contrario, si el antígeno de la cepa no es reconocido por ninguno de los antisueros que componen el polivalente, los anticuerpos quedan por un lado y las bacterias por otro y se depositan acumulándose en el fondo del pocillo, lo que se visualiza en forma de botón.

Cuando se obtenga una reacción positiva con uno o varios antisueros polivalentes, la suspensión de antígeno O deberá ensayarse con todos los antisueros monovalentes incluidos en el polivalente correspondiente. Si la reacción es negativa con todos los antisueros polivalentes, las suspensiones de antígeno O esterilizadas en el autoclave a 121°C durante 2,5 h se ensayan con los antisueros O O8, O9, O20 y O101, y si sigue sin haber reacción positiva, la cepa problema se considera no tipable (ONT). En el caso que se observe una reacción semipositiva en todos los pocillos se considera la cepa como no tipable autoaglutinante (NT-AA); es decir, tiene un antígeno “O” que no se puede establecer debido a que poseen fimbrias o antígenos en su superficie que provocan que las bacterias se agrupen y formen una red que impide que se depositen en el fondo del pocillo.

La determinación del antígeno O se completa con el proceso de confirmación de la titulación que se lleva a cabo de esta forma: (I) dispensar 50 µl de solución salina en los pocillos 2 a 12 de una fila de la placa de microtitulación; (II) añadir 50 µl de un antisuero O diluido (1:40 o 1:80) a los pocillos 1 y 2; (III) preparar una dilución en serie (Transferir 50 µl del segundo pocillo al pocillo siguiente, mezclar y continuar hasta el pocillo número 10, desechar los últimos 50 µl de la mezcla del pocillo 10). Mantener los pocillos 11 y 12 como controles negativos. (IV) añadir 50 µl de suspensión de antígeno O a cada uno de los doce pocillos de la fila correspondiente, desde el pocillo 12 hasta el pocillo 1; (V) tapar e incuban la placa de microtitulación a 37°C durante toda la noche; y (VI) examinar la aglutinación. El título representa la mayor dilución de antisuero que muestra aglutinación de la cepa ensayada.

### 3.2.2. PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

La susceptibilidad a los antimicrobianos fue determinada en el Hospital Lucus Augusti (HULA) utilizando el sistema MicroScan. Es un sistema semiautomático que permite determinar las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI). Los resultados fueron interpretados siguiendo las recomendaciones EUCAST (*European committee on antimicrobial susceptibility testing*) que establece 3 categorías en función del grado de sensibilidad a un antibiótico para un microorganismo: Resistente (R), Sensible (S) e Intermedia (I). La confirmación del fenotipo ESBL (*Extended-spectrum beta-lactamase*) se llevó a cabo mediante el test de sinergia.

Para la realización del presente estudio se analizaron diez clases de agentes antimicrobianos con interés desde un punto de vista clínico y epidemiológico, incluyendo: penicilinas (ampicilina y piperacilina), cefamicinas (cefotaxima), cefalosporinas de 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup> generación (cefuroxima, cefotaxima, ceftazidima y cefepima), carbapenems (imipenem, meropenem, ertapenem), monobactámicos (aztreonam), betalactámicos con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas (amoxicilina-ácido clavulánico y piperacilina-tazobactam), aminoglucósidos (gentamicina, tobramicina y amikacina), inhibidores de la vía del folato (trimetoprima-sulfametoxazol), quinolonas (ácido nalidíxico y ciprofloxacino) y tigeciclina.

La designación de MDR (del inglés, *Multidrug Resistant*) se definió como la resistencia a más de tres clases de fármacos antimicrobianos probados (Magiorakos et al., 2012).

### 3.3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCRs) se realizaron siguiendo un protocolo estandarizado puesto a punto por el LREC-USC con el fin de simplificar el trabajo de laboratorio. Las condiciones de trabajo fueron las siguientes:

1. Extracción del ADN bacteriano. Las cepas problema se siembran en medio TSA (agar de triptona de soja, Oxoid) y se incuban a 37°C/18h. Se recoge el crecimiento equivalente a una o dos colonias utilizando asas de inoculación estériles de 10  $\mu$ M y se suspende en 600  $\mu$ l de agua estéril MiliQ en un tubo *ependorf*. Se hierven los tubos *ependorfs* con las suspensiones a 100°C durante 5 min para lograr la extracción de ADN. Después se centrifugan las suspensiones calentadas a 11.000 rpm durante 2 min y se toman 5  $\mu$ l del sobrenadante para la PCR.
2. Preparación de la mezcla de reacción: todas las reacciones se llevaron a cabo en microtubos de PCR en un volumen final de 25  $\mu$ l por cada muestra que incluyó:
  - a. 5  $\mu$ l de ADN extraído de la muestra problema.
  - b. 20  $\mu$ l de Mezcla de PCR constituida por:
    - 12,5  $\mu$ l de Mix de PCR, que contiene tampón suministrado con Taq polimerasa, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> y 200  $\mu$ M de cada nucleótido: dATP, dCTP, dGTP y dTTP (*NZYtech Taq 2x Green Master Mix*).
    - *Primers* específicos a concentración 20  $\mu$ M (hidratados con 1 mM TRIS-HCL/ 0.01 mM EDTA). El volumen a utilizar es variable en función de la concentración óptima establecida para cada uno de ellos.
    - Se ajusta el volumen final de la reacción a 20  $\mu$ l añadiendo agua estéril MiliQ.
3. Amplificación: desnaturalización 3 min a 94°C, 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a la temperatura específica de *primer* (**Tablas 5, 6 y 7**) y un paso final de extensión de 90s a 72°C. Además, una extensión final de 3 min a 72°C.
4. Revelado de los resultados de la PCR. Los productos amplificados en las pruebas de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (*Seakem LE agarose, Lonza*) al 1,5% (p/v) en

tampón TAE con 3 µl de marcador *Green Safe Premium* (Nzytech) por cada 100 ml], cargando en cada pocillo 7 µL de cada muestra.

La electroforesis se realizó con fuentes y cubetas de electroforesis de *Bio-Rad*. El voltaje aplicado a los geles dependió de su tamaño (Tabla 4). Los geles de agarosa se observaron bajo luz ultravioleta (*Molecular Imager® Gel Doc™ XR System*).

Tabla 4. Condiciones de la electroforesis.

Tamaño gel	Agarosa (1,5%)	Green Safe	Tampón TAE 1X	Voltaje/ miliamperaje (minutos)
Pequeño (100 mL)	1,5 g	3 uL	Ajustar hasta volumen total en probeta	120V /400 mA (20-40')
Mediano (150 mL)	2,25 g	4,5 uL		140V /400 mA (20-40')
Grande (200 mL)	3 g	6uL		160V /400 mA (20-40')

### 3.3.1. DETERMINACIÓN DE GRUPOS FILOGENÉTICOS

La identificación de los grupos filogenéticos (A, B1, B2, C, D, E, F) de *E. coli* se realizó por PCR siguiendo el método descrito por Clermont et al., (2013) con ligeras modificaciones adaptándolo a los reactivos y protocolos del LREC-USC. Este método cuádruplex extendido permite asignar correctamente más del 95% de las cepas de *E. coli*. Se trata de una modificación del método de PCR triplex original de Clermont et al., (2000) manteniendo los mismos genes objetivos originales de *chuA*, *yjaA* y *TspE4.C2* y tamaños de fragmentos de productos de PCR similares, pero modificando un poco las secuencias con el fin de evitar polimorfismos en la secuencia de nucleótidos utilizada para la hibridación de los *primers*. Además, se añadió un gen objetivo adicional que actúa como control interno de la calidad del ADN, *arpA*, convirtiendo así el nuevo método en una PCR cuádruplex. Finalmente, para identificar cepas que pertenecen a los filogrupos C y E, se diseñaron dos pares de *primers* de PCR específicos de alelo adicionales (Lescat et al., 2013). Los *primers* utilizados, sus secuencias nucleotídicas y el tamaño del producto amplificado de pares de bases; así como las condiciones de PCR se indican en las Tablas 5 y 6.

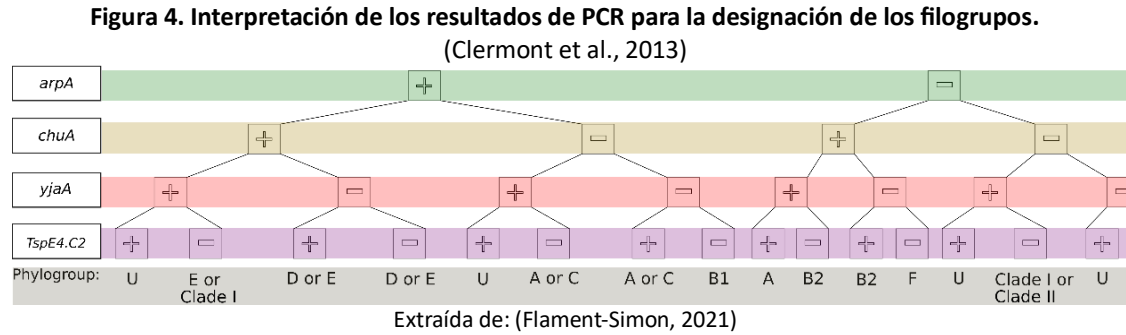
Tabla 5. *Primers* utilizados en la identificación de grupos filogenéticos (A/C, B1, B2, D/E, F)

Nombre del gen	<i>Primers</i>	[ 50 µl ]	Tª de annealing	Secuencia nucleotídica (5´- 3´)	Tamaño (pb)	Referencia
<i>chuA</i>	<i>chuA</i> .1b	0.5 µl	58°C	ATGGTACCGGACGAACCAAC	288	(Clermont et al., 2013)
	<i>chuA</i> .2			TGCCGCCAGTACCAAAGACA		(Clermont et al., 2000)
<i>yjaA</i>	<i>yjaA</i> .1b	0.5 µl		CAAACGTGAAGTGTGAGGAG	211	(Clermont et al., 2013)
	<i>yjaA</i> .2b			AATGCGTTCCTCAACTGTG		
<i>TspE4C2</i>	<i>TspE4C2</i> .1b	1 µl		CACTATTCGTAAGGTCATCC	152	
	<i>TspE4C2</i> .2b			AGTTTATCGCTGCGGGTCGC		
<i>arpA</i>	<i>AceK</i> .f	1 µl		AACGCTATTCGCCAGCTTGC	400	
	<i>ArpA</i> 1.r			TCTCCCATACCGTACGCTA		

Tabla 6. *Primers* utilizados en la identificación de grupo filogenético E.

Diana	<i>Primers</i>	[50µM]	Tª de annealing	Secuencia nucleotídica (5´- 3´)	Tamaño (pb)	Referencia
<i>arpA</i>	<i>ArpAgpE</i> .f	0.5 µl	57°C	GATTCATCTTGTCAAATATGCC	301	(Lescat et al., 2013)
	<i>ArpAgpE</i> .r			GAAAAGAAAAGAATTCCAAGAG		
<i>trpA</i>	<i>trpBA</i> .f	0.3 µl		CGGCGATAAAGACATCTTAC	489	(Clermont et al., 2008)
	<i>trpBA</i> .r			GCAACGCGGCTGGCGGAAG		

La **Figura 4** presentada a continuación esquematiza la interpretación de los resultados de la PCR para la designación de los grupos filogenéticos de *E. coli*. La distinción entre los filogrupos A y C depende de los resultados obtenidos con los *primers trpAgpC*; asignando el filogrupo C cuando el resultado es positivo para la presencia de *trpAgpC*. La distinción entre los filogrupos D y E depende de los resultados obtenidos con los *primers ArpAgpE*; es decir que el filogrupo E se asigna en caso de positividad de *ArpAgpE* (Clermont et al., 2013).



### 3.3.2. DETERMINACIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA

La detección de los genes que codifican los factores de virulencia (FV) de *E. coli* asociados a los estatus ExPEC, UPEC y APEC se realizó mediante PCR convencional, agrupándolos en 4 PCRs multiplex en función de la temperatura de hibridación de los *primers* (Clermont et al., 2013; Dahbi et al., 2014; Mamani et al., 2019)- Las condiciones de trabajo se muestran en la **Tabla 7**.

Los aislados se designan presuntamente como *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC) si resultan positivos para  $\geq 2$  de 5 marcadores (incluidos *papAH* y/o *papC*, *sfa/focDE*, *afa/draBC*, *kpsM II* e *iutA*) (J. R. Johnson et al., 2015) ; como *E. coli* uropatógena (UPEC) si son positivos para  $\geq 3$  de estos 4 marcadores (*chuA*, *fyuA*, *vat*, y *yfcV*) (Spurbeck et al., 2012); y se clasifican como *E. coli* patógena aviar (APEC) si son positivos para  $\geq 4$  de los 5 marcadores siguientes (*hlyF*, *iutA*, *iroN*, *iss* y *ompT*) (T. J. Johnson, Wannemuehler, Doetkott, et al., 2008)-

Las cápsulas de *E. coli* se designaron tras la interpretación de los resultados de la PCR siguiendo el esquema de la **Tabla 8**.

**Tabla 7. Primers utilizados en la detección de los genes de virulencia de los ExPEC.**

Pool	Secuencia nucleotídica (5' - 3')	Primers	Diana	Concen. de trabajo (µl) [alícuotas 20µM]	Tª de annealing (°C)	Tamaño (pb)	Referencia
1	GTGGCAGTATGAGTAATGACCGTTA	Forward	<i>papC</i>	0.5	60	205	(J. R. Johnson et al., 2015)
	ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	Reverse					
	GCGCATTGCTGATACTGTTG	<i>kpsII f</i>	<i>kpsM II-k2</i>	0.5		570	(J. R. Johnson & O'Bryan, 2004)
	AGGTAGTTCAGACTCACACCT	<i>KpsII-K2r</i>					
	GGTGTGGTGCGATGAGCACAG	<i>TraTf</i>	<i>traT</i>	0.5		290	(J. R. Johnson & Stell, 2000)
	CACGGTTCAGCCATCCCTGAG	<i>TraTr</i>	<i>ompT</i>	1		559	(J. R. Johnson et al., 2015)
	ATCTAGCCGAAGAAGGAGGC	Forward					
	CCCGGGTCATAGTGTTTCATC	Reverse	<i>hlyF</i>	0.5		444	(Morales et al., 2004)
TCGTTTAGGGTGCTTACCTTCAAC	Forward						
TTTGCGGGTTTAGGCATTCC	Reverse						

Tabla 7. Continuación

Pool	Secuencia nucleotídica (5´- 3´)	Primers	Diana	Concen. de trabajo (µl) [alícuotas 20µM]	Tª de annealing (°C)	Tamaño (pb)	Referencia
2	TCAGGACACGTTTCAGGCATTTCAGT	vat-F	vat	0.5	66	1100	(Spurbeck et al., 2012)
	GGCCAGAACATTTGCTCCCTTGTT	vat-R					
	GTAACAATCTTCCCCGCTCGGCAT	fyuA-F	fyuA	0.5		850	(Spurbeck et al., 2012)
	TGACGATTAACGAACCGGAAGGGA	fyuA-R					
	ACATGGAGACCACGTTTCACC	yfcV-F	yfcV	0.5		292	(Spurbeck et al., 2012)
	GTAATCTGGAATGTGGTCAGG	YfcV-R					
	AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG	Ironec-f	iroN	0.3		665	(J. R. Johnson et al., 2000)
	GACGCCGACATTAAGACGCAG	Ironec-r					
	CAGCAACCCGAACCACTTGATG	is-f	iss	0.3		323	(T. J. Johnson, Wannemuehler, & Nolan, 2008)
AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA	is-r						
3	GCAACAGCAACGCTGTTGCATCAT	PapEF F	papEF	0.5	64	336	(Yamamoto A-B et al., 1995)
	AGAGAGAGCCACTTATACGGACA	PapEF R					
	GGTGGTGCCTGGAGTGG	tsh03	tsh	0.5		640	(Dozois et al., 2000)
	AGTCCAGCGTGATAGTGG	tsh15					
	GGCTGGACATCATGGGAACCTGG	aer-851f	iutA	0.5		301	(J. R. Johnson et al., 1997)
	CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	aer-1152r					
	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC	sfa 1	sfa/focDE	0.5		410	(Le Bouguenec et al., 1992)
	CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	sfa 2					
	TACCGGATTGCATATGCAGACCGT	Aer f	iucD	0.5		602	(Yamamoto A-B et al., 1995)
AATATCTTCTCCAGTCCGGAGAAG	Aer r						
4	AGGTGAAAAGCCTGGTAGTGTG	neu1	neuC-K1	0.5	64	676	(Moulin-Schouleur et al., 2006)
	GGTGGTACATCCCGGGATGTC	neu2					
	GCGCATTTGCTGATACTGTTG	KpsII f	kpsM II	0.5		272	(J. R. Johnson & Stell, 2000)
	CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	KpsII r					
	GCTGGGCAGCAAAGTATAACTCTC	afa1	afa/draBC	0.5		750	(Le Bouguenec et al., 1992)
	CATCAAGCTGTTTGTTCGTCGCCCG	afa2					
	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	hly f	hlyA	0.3		1177	(Yamamoto A-B et al., 1995)
	ACCATATAAGCGGTCAATCCCGTCA	hly r					

Tabla 8. Interpretación de los resultados de PCR para la designación de las cápsulas de *E. coli*. (J. R. Johnson & Stell, 2000)

Capsule	<i>kpsM II gene</i>	<i>neuC-K1 gene</i>	<i>kpsM II-K2 gene</i>
type II-K1	+	+	+
type II-K2	+	-	+

El gen *kpsM II* determina la cápsula tipo II. Existen 3 genes que codifican tres variantes de la cápsula del grupo II (*kpsM II-K2*, *neuC-K1* y *kpsM II-K5*). En este estudio, únicamente se ha realizado un subtipado de las cápsulas de tipo II en 2 categorías (tipo II-K2 y tipo II-K1). No se han determinado las cápsulas tipo II-K5 ni las cápsulas tipo III.

**3.3.3. DETECCIÓN DEL GRUPO CLONAL ST131, CLADO C y SUBCLADOS C1 y C1-M27.**

La detección de las cepas pertenecientes al grupo clonal ST131 y el subtipado del clado C y subclados C1 y C1-M27 se realizó mediante un protocolo adaptado en este trabajo a partir del nuevo método de PCR multiplex descrito por Johnston et al., (2022). El cual proporciona un método rápido para la detección y caracterización subclonal de alta resolución de aislados de *Escherichia Coli* tipo ST131.

Para este trabajo se seleccionaron un total de 14 *primers* relevantes dirigidos a polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) específicos de alelos o secuencias de nucleótidos presentes en ST131: los genes *mdh36* y *gyrB47* específicos de ST131 (*mdh* y *gyrB* son 2 de los 7 alelos que se secuencian en el MLST para la determinación de la secuencia tipo) y otros *primers* que actúan como marcadores específicos para la determinación de los clados/subclados, siendo *kefC* designado como gen diana para la identificación del clado C, *rmuC* para la identificación del subclado C1 y un finalmente un gen marcador de profago para el subclado C1-M27. Además, realizamos la determinación del alelo *fimH30* asociado específicamente clado C de ST131 (**Tabla 9**).

**Tabla 9. Primers y condiciones finales utilizados en la PCR multiplex para la identificación de clados y subclados ST131 (C, C1, C1-M27 Y C1-no-M27) (Johnston et al., 2022)**

Pool	Secuencia nucleotídica (5' - 3')	Primers	Diana	Concen. de trabajo (µl) [alícuotas 20µM]	Tª de annealing (°C)	Tamaño del producto (pb)	Referencia
1	TTACTCCGACTATGCGTTCAC	Forward	<i>Prophage</i>	0.2	65	822	(Birgy et al., 2017)
	CTTCTTCGCTGGCAACTTCT	Reverse					(Johnston et al., 2022)
	GCCAATGGTACCGCTATT	Forward	<i>fimH30 allele</i>	0.5		350	(J. R. Johnson et al., 2013)
	GCTTTAATCGCCACCCCA	Reverse					
	TTAACGTTAACGCCGGT	Forward	<i>mdh36</i>	0.5		273	(J. R. Johnson et al., 2009)
	TGGTAACACCAGATGACCA	Reverse					
	CTGCGCGATAAGCGCGAC	Forward	<i>gyrB47</i>	1		138	
	AATACCGTCTTTTTTCGGTGGAA	Reverse					
2	TATCGCGTCGGTGC GTAAC	Forward	<i>rmuC</i>	0.5	67	353	(Johnston et al., 2022)
	CCTGCGCTTTGTCGAGAT	Reverse					
	CGCAAATGGGCCG CAGA	Forward	<i>kefC</i>	1		238	
	GCACTAAACACTTCCCGCA	Reverse					

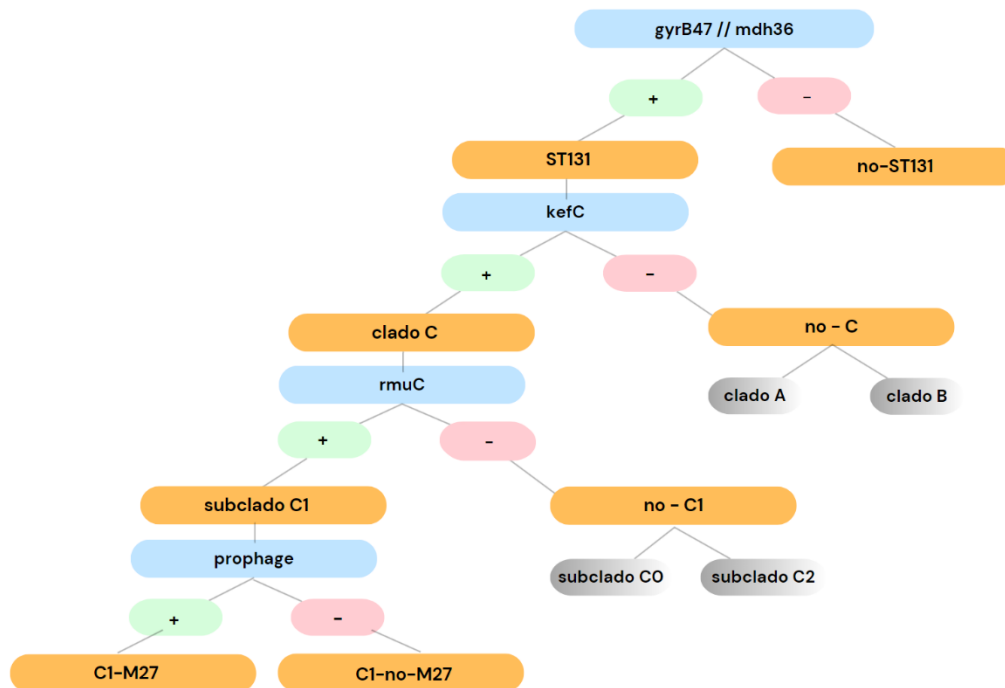
El protocolo puesto a punto en este trabajo se basa en la realización de dos reacciones de PCR que en su conjunto incluyen todos los primers previamente seleccionados (**Tabla 9**):

- pool 1: 95°C 2 min; 30 ciclos cada uno (94°C 15 s, 65°C 1 min 15 s), 72°C 2 min.
- pool 2: 95°C 2 min; 34 ciclos cada uno (94°C 15 s, 67°C 45 s), 72°C 2 min

La mezcla para la reacción mantuvo en todos los casos un volumen final de 25 µl incluyendo 12.5 µl de **MasterMix** (NZYTaQ II 2x Colourless Master Mix), los *primers* según las condiciones establecidas en la **Tabla 9** y 5 µl de ADN.

La siguiente figura (**Figura 5**) esquematiza la interpretación de los resultados de la PCR para la designación de los clados y subclados ST131 (C, C1, C1-M27 Y C1-no-M27) según nuestro protocolo adaptado de (Johnston et al., 2022).

Figura 5. Interpretación de los resultados de PCR para la designación de los clados y subclados ST131 (C, C1, C1-M27 Y C1-no-M27)



La distinción entre ST131 y NO-ST131 depende de los resultados obtenidos con los *primers mdh36* y *gyrB47*; asignando la secuencia tipo ST131 cuando el resultado es positivo para la presencia de ambos genes. La distinción entre clado C y otros clados (A o B) depende de los resultados obtenidos con el primer *kefC*; es decir que el clado C se asigna en caso de positividad de *kefC*. Se clasifican como subclado C1 cuando el resultado es positivo para *rmuC*; y se definen como C1-M27 cuando presentan el *profago* positivo.

### 3.3.2 SECUENCIACIÓN SANGER

Se realizó la secuenciación Sanger del alelo *fimH* para las 27 cepas identificadas como ST131 con el fin de confirmar y completar los resultados obtenidos por el método de PCR multiplex para la designación de clados y subclados ST131 (Johnston et al., 2022).

Los amplicones se obtuvieron por PCR convencional. La mezcla de reacción mantuvo un volumen final de 50 µl incluyendo 1 µl de ADN extraído, 1 µl de los *primers* apropiados a una concentración de 20 µM y 10 µl del tampón de reacción 5x My Taq™ (Bioline) que contenía 5mM de dNTPs, 15 mM de MgCl<sub>2</sub> y 0,2 µl de MyTaq™ ADN polimerasa (Bioline). Las condiciones de trabajo fueron las siguientes: desnaturalización 3 min a 94°C, 35 ciclos (1 min a 94°C y 1 min a 57°C y 1 min a 72°C) y la extensión final duró 3 min a 72°C. Para la PCR del alelo *fimH* se usaron los *primers* indicados en la **Tabla 10**.

Tabla 10. *Primers* utilizados para la amplificación del alelo *fimH*

Secuencia nucleotídica (5´- 3´)	<i>Primers</i>	Diana	Tª de <i>annealing</i> (°C)	Tamaño (pb)	Referencia
CACTCAGGGAACCATTTCAGGCA	<i>fimH-wf</i>	<i>fimH</i> (locus size 469)	975	57°C	(Weissman et al., 2012)
CTTATTGATAAACAAAAGTCAC	<i>fimH-wr</i>				

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

### **3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para determinar el grado de asociación estadística entre las variables de estudio, todos los valores de P se calcularon mediante la prueba exacta de Fisher. Los valores de  $p \leq 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos. Para los análisis estadísticos se utilizó el software SPSS (IBM SPSS statistics).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

#### 4.1.1. ANÁLISIS DE LOS SEROGRUPOS

Del total de cepas *E. coli* bacteriémicas aisladas entre los años 2020 y 2022 a partir de hemocultivos en el HULA las cepas de *E. coli* O25 ocupan la primera posición junto a los serogrupos O2 y O8, mientras que O15 ocupa la cuarta posición en cuanto a prevalencia (**Tabla 1**). Las cepas de *E. coli* pertenecientes a los serogrupos O25 y O15 están representadas por un total de 48 cepas (13,8%) de las 348 cepas integrantes de la colección original. El serogrupo O25 tuvo una prevalencia mucho mayor (9,8%) que el O15 (4%); y en ambos casos, la frecuencia de aislamiento se mantuvo más o menos estable durante el periodo de estudio (**Tabla 11**).

**Tabla 11. Prevalencia de los serogrupos O15 y O25 de la colección de 348 cepas de *E. coli* causantes de bacteriemias en el HULA y distribución entre años (2020-2022)**

Serogrupos	Número (%) de cepas de <i>E. coli</i>			
	Total (n = 348)	2020 (n = 119)	2021 (n = 177)	2022 (n = 52)
O15	14 (4,0)	5 (4,2)	6 (3,4)	3 (5,8)
O25	34 (9,8)	14 (11,8)	13 (7,3)	7 (13,5)
<b>Total (O15 + O25)</b>	<b>48 (13,8%)</b>	<b>19 (16,0)</b>	<b>19 (10,7)</b>	<b>10 (19,2)</b>

#### 4.1.2. ANÁLISIS DEL PERFIL DE RESISTENCIA

En este apartado se presentan los resultados obtenidos en los antibiogramas realizados en el HULA para las 48 cepas seleccionadas en este trabajo.

Se observa que un mayor número de resistencias en las cepas de *E. coli* pertenecientes al serogrupo O25 frente a las que son O15. En ambos serogrupos se encontraron cepas MDR, 5 de 14 O15 (representando un 4,8% de las cepas MDR totales) y 19 de 34 O25 (representando un 18,1% de las cepas MDR totales). Destacamos que todas las cepas que resultaron ser productoras de betalactamasas de espectro extendido (ESBL) pertenecieron al serogrupo O25 (n=12, 35%) (**Tabla 12 y Tabla 13**).

**Tabla 12. Prevalencia de los serogrupos O15 y O25 entre las 348 cepas de *E. coli* bacteriémicas del HULA (2020-2022) y distribución de cepas resistentes a múltiples fármacos (MDR)**

Serogrupos	Número (%) de cepas de <i>E. coli</i>			p-valor <sup>a</sup> MDR vs no-MDR
	Total (n = 348)	MDR (n = 105)	no-MDR (n = 243)	
O15	14 (4,0)	5 (4,8)	9 (3,7)	
O25	34 (9,8)	19 (18,1)	15 (6,2)	<0,001

<sup>a</sup> El valor de *p* fue obtenido mediante la Prueba exacta de Fisher (bilateral) y por la prueba de Chi-Square de Yates. Únicamente se muestran si son estadísticamente significativos ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabla 13. Resistencias a antimicrobianos en cepas de *E. coli* pertenecientes a los Serogrupos O15 y O25 causantes de bacteriemias en el HULA (2020-2022)**

Antimicrobianos <sup>a</sup>		Número (%) de cepas resistentes <sup>d</sup> de <i>E. coli</i>			p-valor <sup>c</sup> O15 vs O25
		Total n=348	O15 n=14	O25 n=34	
Penicilinas	<b>Ampicilina (AMP)</b>	<b>197</b> <b>(56,6)<sup>b</sup></b>	<b>13</b> <b>(92,9)</b>	<b>24</b> <b>(70,6)</b>	
	<b>Piperacilina (PIP)</b>	<b>183</b> <b>(52,6)</b>	<b>13</b> <b>(92,9)</b>	<b>24</b> <b>(70,6)</b>	
Penicilinas e inhibidores de β-lactamasas	<b>Piperacilina-Tazobactam (TZP)</b>	13 (3,7)	0	1 (2,9)	
	<b>Amoxicilina-Clavulánico (AMC)</b>	63 (18,1)	1 (7,1)	<b>12</b> <b>(35,3)</b>	
Cefalosporinas (2 <sup>a</sup> generación)	<b>Cefuroxima (CXM)</b>	39 (11,2)	0	<b>13</b> <b>(38,2)</b>	0.009
Cefalosporinas (3 <sup>a</sup> generación)	<b>Cefotaxima (CTX)</b>	24 (6,9)	0	<b>12</b> <b>(35,3)</b>	0.023
	<b>Ceftazidima (CAZ)</b>	17 (4,9)	0	<b>10</b> <b>(29,4)</b>	0.044
Cefalosporinas (4 <sup>a</sup> generación)	<b>Cefepime (FEP)</b>	26 (7,5)	0	<b>11</b> <b>(32,4)</b>	0.020
Cefamicinas	<b>Cefoxitina (FOX)</b>	7 (2,0)	0	3 (8,8)	
Macrólidos	<b>Aztreonam (ATM)</b>	27 (7,8)	1 (7,1)	<b>11</b> <b>(32,4)</b>	
Aminoglucósidos	<b>Gentamicina (GEN)</b>	47 (13,5)	1 (7,1)	<b>13</b> <b>(38,2)</b>	0.039
	<b>Tobramicina (TOB)</b>	47 (13,5)	1 (7,1)	<b>13</b> <b>(38,2)</b>	0.039
Quinolonas	<b>Ácido Nalidíxico (NAL)</b>	<b>115</b> <b>(33,0)</b>	2 (14,3)	<b>24</b> <b>(70,6)</b>	0.0004
	<b>Ciprofloxacino (CIP)</b>	<b>92</b> <b>(26,4)</b>	2 (14,3)	<b>20</b> <b>(58,8)</b>	0.009
	<b>Levofloxacina (LVX)</b>	<b>87</b> <b>(25,0)</b>	1 (7,1)	<b>18</b> <b>(52,9)</b>	0.003
Inhibidores de la vía del folato	<b>Trimethoprim-Sulfamethoxazol (SXT)</b>	<b>121</b> <b>(34,8)</b>	<b>11</b> <b>(78,6)</b>	<b>17</b> <b>(50,0)</b>	
<b>Resistencia múltiple (MDR)</b>		<b>105</b> <b>(30,2)</b>	<b>5</b> <b>(35,7)</b>	<b>19</b> <b>(55,9)</b>	
<b>Productoras de ESBL</b>		24 (6,9)	0	<b>12</b> <b>(35,3)</b>	0.023

<sup>a</sup>Ninguna de las 348 cepas analizadas fue resistente a los siguientes antimicrobianos: Imipenem, meropenem, ertapenem, amikacina y tigeciclina.

<sup>b</sup>Cuando los porcentajes son mayores del 20% figuran en negrilla.

<sup>c</sup>El valor de *p* fue obtenido mediante la Prueba exacta de Fisher (bilateral) o *Fisher/two-tailed*. Únicamente se muestran si son estadísticamente significativos ( $p \leq 0,05$ ).

<sup>d</sup> Los aislados que presentan una categoría de resistencia intermedia no fueron considerados como resistentes para el análisis de datos.

## 4.2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

### 4.2.1. DETERMINACIÓN DE GRUPOS FILOGENÉTICOS

En la colección de cepas estudiada predominan los aislados pertenecientes al grupo filogenético B2 (n=31, 64,6 %), seguidos de los del grupo filogenético E (n= 11, 22,9%) y en una pequeña proporción se encuentra alguna cepa perteneciente al filogrupo D (n=2 ,4,2%), F (n=1, 2,1%) y B1 (n=1, 2,1%). También se encontraron 2 cepas atípicas cuyo grupo filogenético se desconoce (se designa como grupo filogenético U) (Figura 6).

Además, nuestros resultados indican que existe una correlación entre serogrupos y grupos filogenéticos, ya que la mayoría de las cepas O25 se clasificaron como grupo filogenético B2 (n=31, 91,2%), quedando solo tres cepas no asignadas a este filogrupo (una B1, una F y una de filogrupo desconocido, U). Mientras que la mayor parte de las cepas O15 resultaron pertenecer al grupo filogenético E (n=11, 78,6%), quedando solo tres cepas no asignadas a este filogrupo (dos D y de filogrupo desconocido, U) (Figura 7).

Figura 6. Grupos filogenéticos en cepas *E. coli* pertenecientes a los serogrupos O15 y O25 (n=48) causantes de bacteriemias en el HULA (2020-2022)

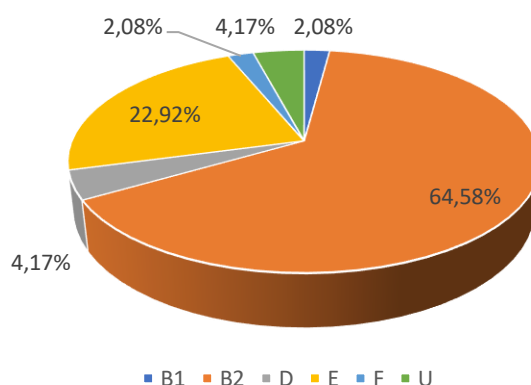
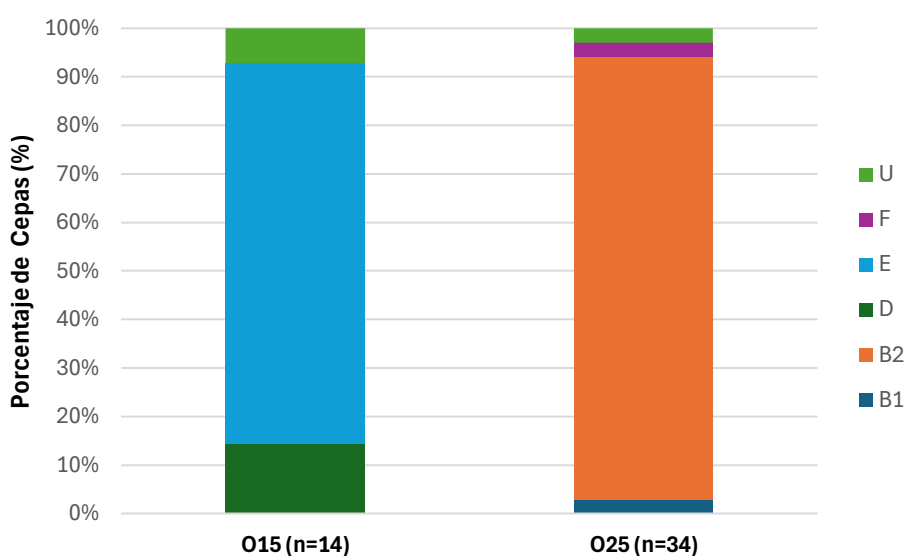


Figura 7. Distribución de grupos filogenéticos en cepas *E. coli* pertenecientes a los serogrupos O15 y O25 causantes de bacteriemias en el HULA (2020-2022)



4.2.2. DETERMINACIÓN DE GENES DE VIRULENCIA

De los 19 genes codificantes de factores de virulencia (FV) analizados, siete, *chuA*, *fyuA*, *iutA*, *iucD*, *kpsM II*, *kpsMII-K2* y *ompT* se detectaron en más del 79% de los 48 aislados. En contraste, el gen *Sfa/focDE* fue hallado en menos del 10% de los aislados. Además, observamos una asociación entre determinados genes de virulencia y los serogrupos de las cepas estudiadas. En general, las cepas pertenecientes al serogrupo O25 vehiculan un mayor número de genes de virulencia en comparación con las O15 (media de FV 8,39 vs 7,64), a excepción de los genes *tsh* y *hlyF* que se encontraron en mayor proporción en cepas O15 (aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa) (Tabla 14).

Además, realizamos la identificación de las cápsulas tipo II para las 38 cepas que resultaron positivas para *kpsM II*, de las cuales un 89,5% resultaron ser del subtipo K2 (n=34) mientras que solo un 4,94% de las mismas pertenecen al subtipo K1 (n=4) (Tabla 15).

La gran mayoría de las cepas se clasificaron como ExPEC (81,3%) y UPEC (70,8%), mientras que solo el 29,2% de las mismas resultó APEC. También en este caso se observó una distribución distinta de los estatus (ExPEC, UPEC y APEC) con respecto a los serogrupos O15 y O25. Más del 88% de las cepas O25 se clasificaron como ExPEC y UPEC, mientras que en las cepas O15 solo la mitad se clasificaron como UPEC y un 28,6% como UPEC ( $p=0.001$  y  $<0,001$ , respectivamente). Sin embargo, el estatus APEC fue observado con más frecuencia en las cepas O15 (35,7%) que entre las cepas O25 (26,5%) (Tabla 14 y Figura 8).

**Tabla 14. Distribución de los genes de factores de virulencia (FV) detectados en *E. coli* pertenecientes a los serogrupos O15 y O25 causantes de bacteriemias en el HULA (2020-2022)**

Genes codificantes de Factores de Virulencia	Número (%) de cepas portadoras			
	Total (n=48)	O15 (n=14)	O25 (n=34)	p-valor <sup>a</sup> O15 vs O25
<b>Adhesinas</b>				
<i>afa/draBC</i>	7 (14,6)	0 (0,0)	7 (20,6)	
<i>papC</i>	14 (29,2)	2 (14,3)	12 (35,3)	
<i>papEF</i>	17 (35,4)	5 (35,7)	12 (35,3)	
<i>Sfa/focDE</i>	2 (4,2)	0 (0%)	2 (5,9)	
<i>tsh</i>	10 (20,8)	6 (42,9)	4 (11,8)	0,045
<i>yfcV</i>	32 (66,7)	2 (14,3)	30 (88,2)	<0,001
<b>Toxinas</b>				
<i>hlyA</i>	9 (18,8)	2 (14,3)	7 (20,6)	
<i>hlyF</i>	13 (27,1)	7 (50,0)	6 (17,6)	0,034
<i>vat</i>	10 (20,8)	4 (28,6)	6 (17,6)	
<b>Sideróforos</b>				
<i>chuA</i>	47 (97,9)	14 (100,0)	33 (97,1)	
<i>fyuA</i>	45 (93,8)	13 (92,9)	32 (94,1)	
<i>iroN</i>	18 (37,5)	7 (50,0)	11 (32,4)	
<i>iutA</i>	41 (85,4)	9 (64,3)	32 (94,1)	0,017
<i>iucD</i>	41 (85,4)	9 (64,3)	32 (94,1)	0,017
<b>Cápsula</b>				
<i>kpsM II</i>	38 (79,2)	8 (57,1)	30 (88,2)	0,045
<i>kpsM II-K1</i>	4 (8,3)	2 (14,3)	2 (5,9)	
<i>kpsM II-K2</i>	38 (79,2)	8 (57,1)	30 (88,2)	0,012

Tabla 14. Continuación

Genes codificantes de Factores de Virulencia	Número (%) de cepas portadoras			
	Total (n=48)	O15 (n=14)	O25 (n=34)	p-valor <sup>a</sup> O15 vs O25
<b>Otros (participan en la evasión del sistema inmune)</b>				
<i>iss</i>	17 (35,4)	5 (35,7)	12 (35,3)	
<i>ompT</i>	47 (97,9)	14 (100,0)	33 (97,1)	
ExPEC status	39 (81,3)	7 (50,0)	32 (94,1)	0,001
UPEC status	34 (70,8)	4 (28,6)	30 (88,2)	<0,001
APEC status	14 (29,2)	5 (35,7)	9 (26,5)	
Media FV <sup>b</sup>	8,21	7,64	8,39	

<sup>a</sup> El valor de *p* fue obtenido mediante la Prueba exacta de Fisher (bilateral) o *Fisher/two-tailed*. Únicamente se muestran si son estadísticamente significativos ( $p \leq 0,05$ ).

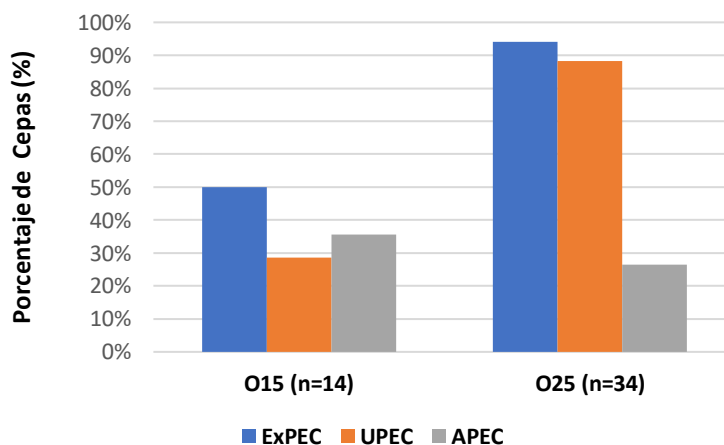
<sup>b</sup> La media de factores de virulencia se calculó haciendo el promedio de genes de virulencia del grupo estudiando (excluyendo los genes de subtipo de las cápsulas de tipo II *KpsM II-K1* y *KpsM II-K2*).

Tabla 15. Designación de las cápsulas de *E. coli* de tipo II y subtipos K1y K2 en cepas O15 y O25

Tipo de cápsula	Número (%) de cepas portadoras			
	Total (n=48)	O15 (n=14)	O25 (n=34)	p-valor <sup>a</sup> O15 vs O25
Tipo II	38 (79,2)	8 (57,1)	30 (88,2)	0,045
Tipo II-K2	34 (70,8)	6 (42,9)	28 (82,4)	0,012
Tipo II-K1	4 (8,3)	2 (14,3)	2 (5,9)	

<sup>a</sup> El valor de *p* fue obtenido mediante la Prueba exacta de Fisher (bilateral) o *Fisher/two-tailed*. Únicamente se muestran si son estadísticamente significativos ( $p \leq 0,05$ ).

Figura 8. Distribución de los estatus ExPEC, UPEC y APEC en 48 cepas de *E. coli* pertenecientes a los serogrupos O15 y O25 causantes de bacteriemias en el HULA (2020-2022)



Los estatus no son excluyentes, una misma cepa puede asignarse a más de un estatus.

### 4.3. DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL CLON ST131

A continuación, identificamos las cepas de *E. coli* pertenecientes al clon ST131 dentro de los serogrupos O15 y O25 y designamos los clados (A, B y C) y subclados (C1, C1-M27, C1-no-M27 y C2) de ST131 a partir de los datos extraídos del nuevo método de PCR multiplex y de la secuenciación del alelo *fimH*.

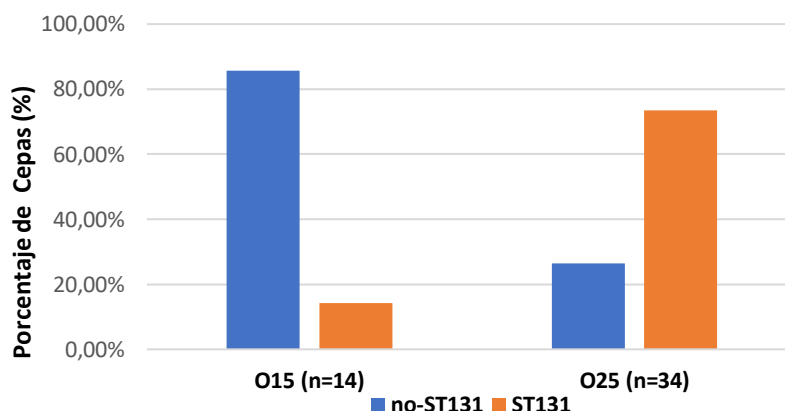
El clon ST131 representa más de la mitad de las cepas estudiadas (n=27, 56,3%), de las cuales prácticamente su totalidad (25 cepas) pertenecen al serogrupo O25, excepto 2 cepas que resultaron O15 ( $p < 0,001$ ) (Tabla 16) (Figura 9).

**Tabla 16. Distribución de las cepas de *E. coli* ST131 y no-ST131 entre la colección de 48 cepas pertenecientes a los serogrupos O15 y O25 causantes de bacteriemias en el HULA (2020-2022)**

Serogrupos	Número (%) de cepas			p-valor <sup>a</sup>
	Total (n=48)	O15 (n=14)	O25 (n=34)	
no-ST131	21 (43,8)	12 (85,7)	9 (26,5)	<0,001
ST131	27 (56,3)	2 (14,3)	25 (73,5)	<0,001

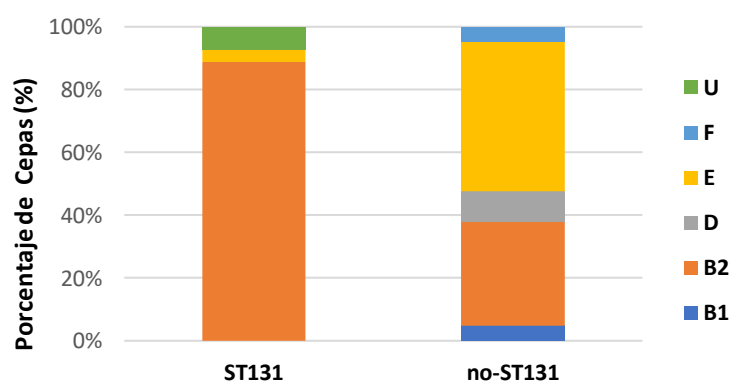
<sup>a</sup> El valor de *p* fue obtenido mediante la Prueba exacta de Fisher (bilateral) o *Fisher/two-tailed*. Únicamente se muestran si son estadísticamente significativos ( $p \leq 0,05$ ).

**Figura 9. Distribución de las cepas de *E. coli* ST131 y no-ST131 entre la colección de 48 cepas pertenecientes a los serogrupos O15 y O25 causantes de bacteriemias en el HULA (2020-2022)**



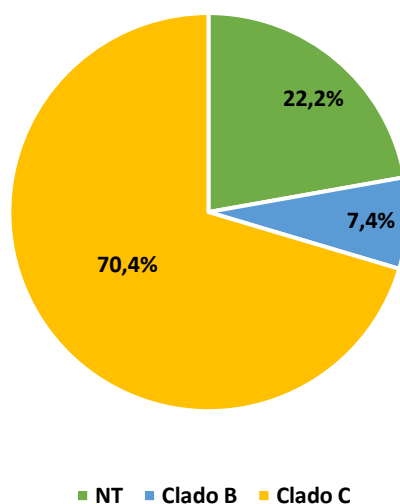
Previamente observamos que existía una correlación entre el serogrupo O25 y el filogrupo B2 (Figura 7) y ya que la mayoría de nuestras cepas O25 son ST131, esta asociación se hace expansible a la secuencia tipo. Las cepas ST131 se clasificaron como grupo filogenético B2 (88,9%), mientras que en las cepas no-ST131 predomina el grupo filogenético E (47,6%) seguido del grupo filogenético B2 (33,3%) (Figura 10).

**Figura 10. Distribución de los grupos filogenéticos entre la colección de 48 cepas de *E. coli* ST131 y no-ST131 causantes de bacteriemias en el HULA (2020-2022)**



Del total de cepas de *E. coli* ST131 (n=27), 19 pertenecieron al clado C (*fimH30*) (70,4%) representando con diferencia el subgrupo más abundante, 2 pertenecieron al clado B (*fimH22*) (7,4%) y ninguna al clado A (lo que concuerda con lo esperado ya que la colección de estudio únicamente incluye a los serogrupos O15 y O25, ninguna cepa O16). Sin embargo, 6 cepas no fueron clasificables según los métodos utilizados en este trabajo (22,2%), de las cuales 5 presentaron alelos *fimH* atípicos: *fimH16*, *fimH27*, *fimH27-like* y *fimH260* (Figuras 11 y 13).

**Figura 11. Distribución de los clados en 27 cepas de *E. coli* ST131 causantes de bacteriemias en el HULA (2020-2022).**



NT (No tipables). Cepas no clasificables según los métodos que hemos utilizado en este trabajo. La colección de cepas de estudio pertenece a los serogrupos O15 y O25 por lo que la nula detección de cepas pertenecientes al clado A concuerda con lo esperado (asociado al serogrupo O16).

Dentro del clado C (19 cepas), distinguimos 12 (63,2%) cepas pertenecientes al subclado C2 y 7 (36,8%) del subclado C1. Además, entre las cepas pertenecientes al subclado C1, detectamos 4 cepas pertenecientes al subclado emergente C1-M27 (que produce la betalactamasa CTX-M-27) y 3 cepas del subclado C1-no-M27 (Figura 12).

**Figura 12. Distribución de los subclados (C1, C2, C1-M27 Y C1-no-M27) en 19 cepas de *E. coli* ST131 pertenecientes al clado C causantes de bacteriemias en el HULA (2020-2022).**

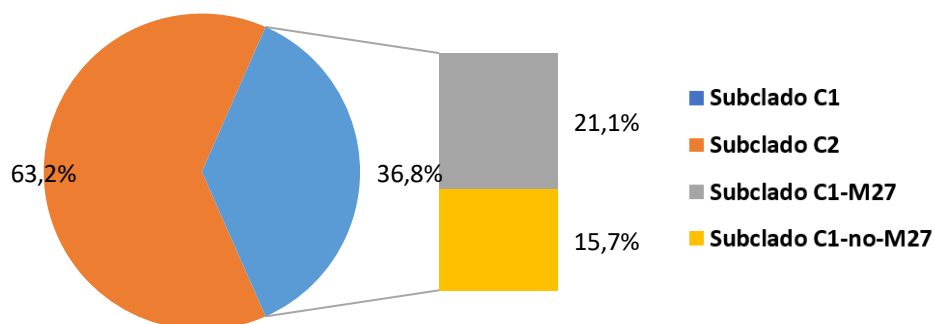
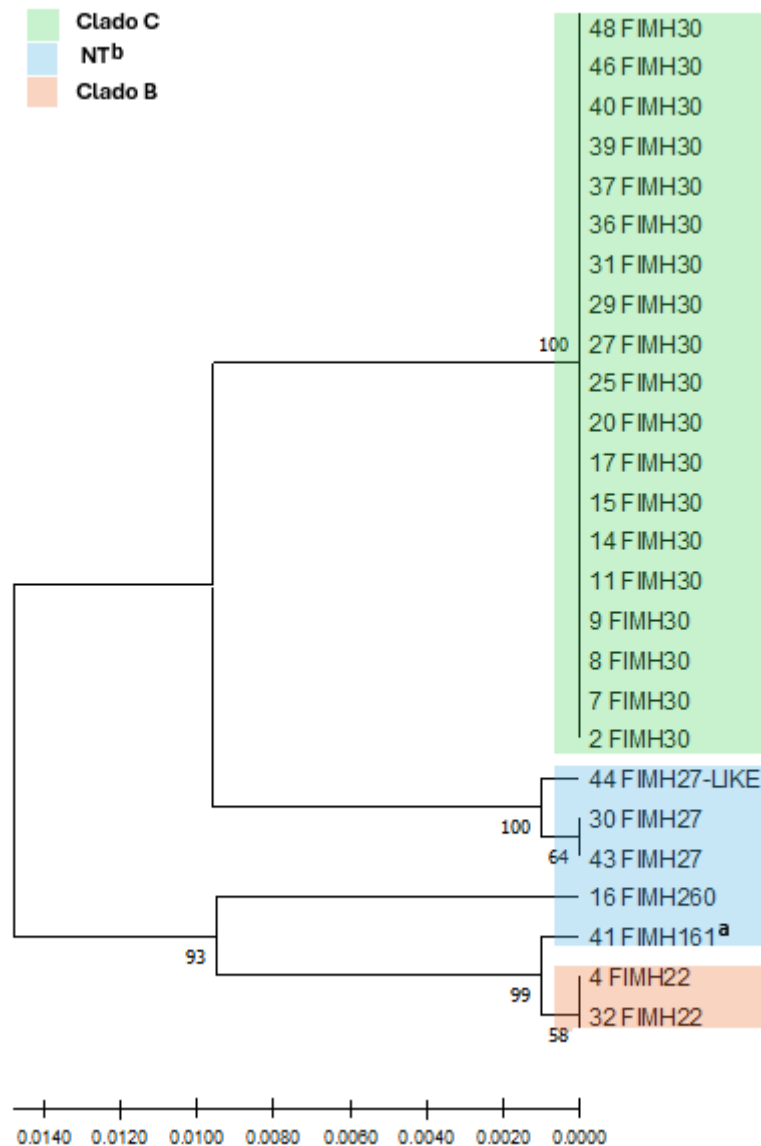


Figura 13. Árbol filogenético de las secuencias nucleotídicas de los alelos *fimH* encontrados en las 26 cepas de *E. coli* del grupo clonal ST131 causantes de bacteriemias en el HULA (2020-2022)



<sup>a</sup> El *fimH161* fue identificado como una variante alélica de *fimH22*.

<sup>b</sup> NT (No tipables). Cepas no clasificables según los métodos que hemos utilizado en este trabajo. No se pudo identificar 1 alelo *fimH* de una de las 27 cepas ST131 por lo que se excluye de la figura.

Este árbol filogenético ha sido construido con MEGA11 por el método UPGMA (distancias p no corregidas).

4.3.1. ANÁLISIS DEL PERFIL DE RESISTENCIA DE LAS CEPAS ST131

En este apartado analizamos los resultados de los antibiogramas realizados en el Servicio de Microbiología del HULA para las cepas de *E. coli* pertenecientes al clon de alto riesgo ST131.

Para la mayoría de los agentes antimicrobianos estudiados, se observa una mayor prevalencia de cepas ST131 resistentes con respecto a las no ST131 (Tabla 17).

**Tabla 17. Resistencias a antimicrobianos en cepas de *E. coli* ST131 y no-ST131 causantes de bacteriemias en el HULA (2020-2022)**

Antimicrobianos <sup>a</sup>		Número (%) de cepas resistentes <sup>d</sup> de <i>E. coli</i>			p-valor <sup>c</sup> ST131 vs no -ST131
		Total (n=48)	ST131 (n=27)	no-ST131 (n=21)	
Penicilinas	Ampicilina (AMP)	37,0 (77,1)	19 (70,4)	18 (85,7)	
	Piperacilina (PIP)	37,0 (77,1)	19 (70,4)	18 (85,7)	
Penicilinas e inhibidores de β-lactamasas	Piperacilina-Tazobactam (TZP)	3 (6,3)	3 (11,1)	0 (0,0)	
	Amoxicilina-Clavulánico (AMC)	13 (27,1)	11 (40,7)	2 (9,5)	0,022
Cefalosporinas (2ª generación)	Cefuroxima (CXM)	13 (27,1)	12 (44,4)	1 (4,8)	0,003
Cefalosporinas (3ª generación)	Cefotaxima (CTX)	12,0 (25,0)	11 (40,7)	1 (4,8)	0,006
	Ceftazidima (CAZ)	11,0 (22,9)	11 (40,7)	0 (0,0)	0,001
Cefalosporinas (4ª generación)	Cefepime (FEP)	13 (27,1)	12 (44,4)	1 (4,8)	0,003
Cefamicinas	Cefoxitina (FOX)	3 (6,3)	3 (11,1)	0 (0,0)	
Macrólidos	Aztreonam (ATM)	14 (29,2)	13 (48,1)	1 (4,8)	0,001
Aminoglucósidos	Gentamicina (GEN)	15 (31,3)	12 (44,4)	3 (14,3)	0,032
	Tobramicina (TOB)	15 (31,3)	12 (44,4)	3 (14,3)	0,032
Quinolonas	Ácido Nalidíxico (NAL)	26 (33,0)	20 (74,1)	6 (28,6)	0,003
	Ciprofloxacino (CIP)	22 (45,8)	18 (66,7)	4 (19,0)	0,001
	Levofloxacina (LVX)	20 (41,67)	18 (66,7)	2 (9,5)	<0,001
Inhibidores de la vía del folato	Trimethoprim-Sulfamethoxazol (SXT)	28 (58,33)	16 (59,3)	12 (57,1)	
<b>Resistencia múltiple (MDR)</b>		24 (50,0)	20 (74,0)	4 (19,0)	<0,001
<b>Productoras de ESBL</b>		12 (25,0)	11 (40,7)	1 (4,8)	0.006

<sup>a</sup>Ninguna de las 48 cepas analizadas fue resistente a los siguientes antimicrobianos: Imipenem, meropenem, ertapenem, amikacina y tigeciclina.

<sup>b</sup>Cuando los porcentajes son mayores del 20% figuran en negrilla.

<sup>c</sup>El valor de *p* fue obtenido mediante la Prueba exacta de Fisher (bilateral) o *Fisher/two-tailed*. Únicamente se muestran si son estadísticamente significativos ( $p \leq 0,05$ ).

<sup>d</sup> Los aislados que presentan una categoría de resistencia intermedia fueron considerados como sensibles para el análisis de datos.

La mayoría de las cepas pertenecientes a la secuencia tipo ST131 (74%) resultaron multirresistentes a uno o más agentes de tres o más clases de fármacos probados (MDR); mientras que solo el 19% de las cepas no-ST131 fueron clasificadas como MDR ( $p < 0.001$ ) (Tabla 17). Así también, en el clado C y todos sus subclados analizados (C2, C1-M27 y C1-no-M27) más del 70% de las cepas se mostraron como multirresistentes; mientras que solo 1 cepa del clado B se identificó como MDR. De las 12 cepas que resultaron ser productoras de betalactamasas de espectro extendido (ESBL) 11 resultaron ser ST131, pertenecientes todas ellas al clado C (Tabla 18).

**Tabla 18. Resistencia a múltiples fármacos (MDR) y producción de ESBL en cepas de *E. coli* ST131 y no-ST131 causantes de bacteriemias en el HULA (2020-2022)**

Distribución de linajes de <i>E. coli</i> (número de cepas)	Número (%) <sup>b</sup> de cepas de <i>E. coli</i>				p-valor <sup>a</sup> MDR vs no-MDR	p-valor <sup>a</sup> ESBL vs no-ESBL
	MDR (n=24)	no-MDR (n=24)	ESBL (n=12)	no-ESBL (n=36)		
no-ST131 (21)	4 (19,0)	17 (81,0)	1 (4,8)	20 (95,2)	<0,001	0,006
ST131 (27)	20 (70,4)	7 (25,9)	11 (40,7)	16 (59,3)	<0,001	0,006
Clado B (2)	1 (50,0)	2 (66,7)	0 (0,0)	0 (0,0)		
Clado C (19)	14 (73,7)	5 (26,3)	11 (61,1)	8 (38,9)		<0,001
Subclado C2 (12)	9 (75)	3 (25)	6 (50)	6 (50)	0.0391	
Subclado C1 (7)	5 (71,4)	2 (28,6)	4 (57,1)	3 (42,9)		0,055
C1-M27 (4)	3 (75)	1 (25)	2 (50,0)	2 (50,0)		

<sup>a</sup> El valor de  $p$  fue obtenido mediante la Prueba exacta de Fisher (bilateral) o *Fisher/two-tailed*. considerándose como significativos aquellos resultados donde  $p \leq 0.05$ .

<sup>b</sup> Los porcentajes han sido calculados tomando como  $n$  total el número de cepas pertenecientes a cada uno de los clados y subclados.

#### 4.3.3. ANÁLISIS DEL PERFIL DE VIRULENCIA DE LAS CEPAS ST131

La Tabla 19 muestra la distribución de los genes de virulencia analizados con respecto a dos categorías ST131 y no-ST131. Evidenciamos que existe una correlación entre determinados genes codificantes de factores de virulencia (FV) y la secuencia tipo ST131, y lo mismo pasa con los estatus ExPEC y UPEC también asociados con las cepas ST131. Sin embargo, no se aprecian diferencias en cuanto a la media de factores de virulencia entre las cepas del grupo clonal ST131 y no-ST131 (media de FV 8,26 vs 8,14, respectivamente).

**Tabla 19. Distribución de los genes codificantes de FV detectados en cepas de *E. Coli* ST131 y no-ST131 causantes de bacteriemias en el HULA (2020-2022)**

Genes codificantes de Factores de Virulencia	Número (%) de cepas portadoras				p-valor <sup>a</sup> ST131 vs no-ST131
	Total (n=48)	ST131 (n=27)	no-ST131 (n=21)		
<b>Adhesinas</b>					
<i>afa/draBC</i>	7 (14,6)	5 (18,5)	2 (9,5)		
<i>papC</i>	14 (29,2)	10 (37,0)	4 (19,0)		
<i>papEF</i>	17 (35,4)	10 (37,0)	7 (33,3)		
<i>Sfa/focDE</i>	2 (4,2)	1 (3,7)	1 (4,7)		
<i>tsh</i>	10 (20,8)	3 (11,1)	7 (33,3)		
<i>yfcV</i>	32 (66,7)	24 (88,9)	8 (38,1)		<0,001
<b>Toxinas</b>					
<i>hlyA</i>	9 (18,8)	5 (18,5)	4 (19,0)		
<i>hlyF</i>	13 (27,1)	4 (14,8)	9 (42,9)		0,049
<i>vat</i>	10 (20,8)	2 (7,4)	8 (38,1)		0,013

Tabla 19. Continuación

Genes codificantes de Factores de Virulencia	Número (%) de cepas portadoras			
	Total (n=48)	ST131 (n=27)	no-ST131 (n=21)	p-valor <sup>a</sup> ST131 vs no-ST131
<b>Sideróforos</b>				
<i>chuA</i>	47 (97,9)	27 (100,0)	20 (95,2)	
<i>fyuA</i>	45 (93,8)	27 (100,0)	18 (85,7)	
<i>iroN</i>	18 (37,5)	8 (29,6)	10 (47,6)	
<i>iutA</i>	41 (85,4)	25 (92,6)	16 (76,2)	
<i>iucD</i>	41 (85,4)	25 (92,6)	16 (76,2)	
<b>Cápsula</b>				
<i>kpsM II</i>	38 (79,2)	24 (88,9)	14 (66,7)	
<i>kpsM II-K1</i>	4 (8,3)	2 (7,4)	2 (9,5)	
<i>kpsM II-K2</i>	38 (79,2)	24 (88,9)	14 (66,7)	0,031
<b>Otros (participan en la evasión del sistema inmune)</b>				
<i>iss</i>	17 (35,4)	9 (33,3)	8 (38,1)	
<i>ompT</i>	47 (97,9)	27 (100)	20 (95,2)	
ExPEC status	39 (81,3)	25 (92,6)	14 (66,7)	0,031
UPEC status	34 (70,8)	24 (88,9)	10 (47,6)	0,003
APEC status	14 (29,2)	8 (29,6)	6 (28,6)	
Media de FV <sup>b</sup>	8,21	8,26	8,14	

<sup>a</sup> El valor de *p* fue obtenido mediante la Prueba exacta de Fisher (bilateral) o *Fisher/two-tailed*. Únicamente se muestran si son estadísticamente significativos ( $p \leq 0,05$ ).

<sup>b</sup> La media de factores de virulencia se calculó haciendo el promedio de genes de virulencia del grupo estudiando (excluyendo los genes de subtipado de las cápsulas de tipo II *KpsMII-K1* y *KpsMII-K2*).

Además, la cápsula tipo II está presente en el 79,2% de las cepas analizadas (n=38) y es más frecuente en las ST131 frente a las no-ST131. Se detectó el tipo II-K2 en 34 cepas, de las cuales 22 eran ST131 y 17 pertenecían al clado C, incluyendo el subclado C2 (n=11) y el subclado C1 (n=6), 4 de ellas C1-M27. El tipo II-K1 predomina entre las cepas del clado B en comparación con el clado C (2 de 3 cepas vs 0 de 17) (Tabla 20).

Tabla 20. Designación de las cápsulas de *E. coli* de tipo II y subtipos K1 y K2 en cepas ST131 y no-ST131

Tipo de cápsula	Número (%) de cepas portadoras							p-valor <sup>a</sup> ST131 vs no-ST131
	Total (n=48)	ST131 (n=27)	no-ST131 (n=21)	Clado B (n=3)	Subclado C2 (n=12)	Subclado C1 (n=7)	Subclado C1-M27 (n=4)	
Tipo II	38 (79,2)	24 (88,9)	14 (66,7)	3 (100)	11 (91,7)	6 (85,7)	4 (100)	
Tipo II-K2	34 (70,8)	22 (81,5)	12 (57,1)	1 (33,3)	11 (91,7)	6 (85,7)	4 (100)	0,031
Tipo II-K1	4 (8,3)	2 (7,4)	2 (9,5)	2 (66,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	

<sup>a</sup> El valor de *p* fue obtenido mediante la Prueba exacta de Fisher (bilateral) o *Fisher/two-tailed*. Únicamente se muestran si son estadísticamente significativos ( $p \leq 0,05$ ).

---

## 5. DISCUSIÓN

---

Las infecciones causadas por ExPEC son un importante problema sanitario a nivel mundial que se ha visto agravado por la emergencia de cepas multirresistentes (MDR). En la actualidad, existe un aumento gradual de la incidencia de las infecciones bacteriémicas por *E. coli* en todo el mundo (de Kraker et al., 2012; Alhashash et al., 2013). En concreto, en el área sanitaria del HULA se han registrado en el periodo comprendido entre 2006 a 2011 un 25% de bacteriemias causadas por *E. coli* sobre un total de 1.986 casos de bacteriemia que afectaron a 1.686 pacientes (Mamani Huarani, 2015). El desarrollo de una vacuna profiláctica polivalente contra ExPEC dirigida al antígeno O puede resultar una solución útil para reducir la morbilidad, la mortalidad y la resistencia a los antimicrobianos. Sin embargo, estudios recientes han revelado diferencias en la distribución de los serogrupos más prevalentes de los *E. coli* bacteriémicos entre distintas regiones geográficas, lo que supone un impedimento para el diseño de una vacuna universal y tal vez la necesidad de diseñar formulaciones más adaptadas a la epidemiología local (**Tabla 2**) (Mamani Huarani, 2015; Kallonen et al., 2017; Royer et al., 2022; Matsumoto et al., 2022; Weerdenburg et al., 2023; datos no publicados del LREC-USC).

Las cepas de *E. coli* más prevalentes causantes de bacteriemia en la población lucense durante el periodo 2020 a 2022 pertenecieron mayoritariamente a los serogrupos O8 (9,8%), O2 (9,8%), O25 (9,7%), O6 (7,8%), O1 (5,7%), O15 (4%), O101 (4%) y O4 (3,7%) (datos no publicados del LREC-USC, **Tabla 1**), coincidiendo con los datos previos obtenidos por Mamani y colaboradores al analizar 3.260 cepas bacteriémicas aisladas en el HULA durante el período 1989-2011 (Mamani Huarani, 2015). No obstante, se aprecian diferencias significativas en el caso del serogrupo O25, que en estos últimos años ha incrementado todavía más su frecuencia pasando de un 6,7% en el primer período (1989-2011) a un 9,7% en el segundo (2020-2022), desplazando incluso al serogrupo O6 (**Tabla 1**).

Estos resultados son similares a los encontrados en los estudios realizados en otras zonas geográficas y donde se confirma que hay cuatro serogrupos (O1, O2, O6 y O25) que están ampliamente diseminados y que son predominantes a nivel mundial entre las cepas de *E. coli* bacteriémicas (Weerdenburg et al., 2023). No obstante, existen otros serogrupos que presentan prevalencias dispares entre países como son el serogrupo O8 (en Lugo, 9,8% sobre un total de 348 cepas aisladas entre los años 2020-2022), el O17 (en Inglaterra y París, 4,9% sobre un total de 1509 cepas aisladas entre los años 2001-2011 y 5,7% sobre un total de 912 cepas aisladas en los años 2005 y 2016-2017, respectivamente) y el O75 (en Japón, 4,7% sobre un total de 401 cepas aisladas entre los años 2015-2017) (**Tabla 2**) (Mamani Huarani, 2015; Kallonen et al., 2017; Royer et al., 2022; Matsumoto et al., 2022; Weerdenburg et al., 2023; datos no publicados del LREC-USC).

De hecho, al comparar la cobertura teórica de dos vacunas en investigación (ExPEC4V y ExPEC10V) con nuestra colección lucense y la de otros países se observaron importantes variaciones. Mientras que las vacunas ExPEC4V y ExPEC10V cubrirían el 57% y el 74% de las infecciones causadas por *E. coli* de Inglaterra, en Lugo tan solo ofrecerían una cobertura del 33% y 57%, respectivamente (**Tabla 2**) (Lipworth et al., 2021). Es decir, una cobertura significativamente menos amplia contra las cepas causantes de infecciones en la población lucenses que contra las cepas causantes de infecciones en Inglaterra.

La mayoría de las cepas de los serogrupos O25 y O15 fueron de los grupos filogenéticos B2 y E, respectivamente. Estos resultados concuerdan con los resultados de otro estudio llevado a cabo sobre cepas causantes bacteriemias en la población lucense en un periodo que comprendió 12 años (del 2000 al 2011), en dicho trabajo se analizaron un total de 96 cepas *E. coli* ESBL observando que los grupos filogenéticos más frecuentes fueron B2, B1, A/E, F, C y D (por orden de mayor a menor prevalencia) (Mamani et al., 2019).

La gran mayoría de las cepas se clasificaron como ExPEC (81,3%) y UPEC (70,8%), mientras que solo el 29,2% resultó APEC, lo cual tiene sentido teniendo en cuenta el origen de las cepas. No obstante, se aprecian diferencias entre serogrupos, pues prácticamente el total de cepas O25 presentaron el estatus ExPEC (94,1%), mientras que en las cepas O15 solo la mitad, y la mayoría de cepas O25 resultaron UPEC (88,2%) frente al 28,6% en las cepas O15, mientras que el estatus APEC es más frecuente entre las cepas del serogrupo O15 (**Tabla 14, Figura 8**). Estos resultados son similares a los hallados en otros estudios previos en los que un 75% de las cepas de *E. coli* bacteriémicas analizadas y un 85% de las pertenecientes al serogrupo O25 cumplieron el estatus ExPEC; sin embargo, una mayor proporción de las cepas del serogrupo O15 (84%) cumplían el estatus ExPEC (Mamani Huarani, 2015).

La correlación existente entre los perfiles de genes codificantes de FV y los serogrupos asociados a infecciones extraintestinales también se ve confirmada en este trabajo (**Tabla 14**), destacando las cepas *E. coli* ExPEC pertenecientes al serogrupo O25. En las cepas del serogrupo O25 los genes más prevalentes fueron *ompT*, *chuA*, *fyuA*, *iucD*, *iutA* y *kpsMIII*, en cambio los genes de *hlyA*, *afa/dra* y *sfa/foc* apenas están presentes en las cepas de ninguno de los dos serogrupos O25 y O15. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el trabajo de investigación realizado por Mamani Huarani (2015).

Estudios recientes sobre *E. coli* bacteriémicos aislados en Europa, América del Norte, Asia-Pacífico y América del Sur, durante los años 2011 a 2017, demuestran que de las 3.217 cepas de ExPEC recolectadas, 345 (10,7%) fueron MDR y dentro de los aislamientos de MDR, O25 fue el serotipo O predominante (n = 218; 63,2%) seguido a una distancia considerable por los serogrupos O1, O101/O162, O8, O102, O20, O153, O9, O15 y O75, que tuvieron una prevalencia de entre 1,2-4,6 % (orden de prevalencia decreciente) (Weerdenburg et al., 2023). Sin embargo, en este estudio realizado con 348 cepas *E. coli* bacteriémicas aisladas de pacientes lucenses entre 2020-2022 se detectaron un mayor número de cepas MDR (30,2%), de las cuales una parte relevante se atribuye a las cepas O25 (19 de las 34 cepas resultaron MDR) representando así un 18,1% de las MDR totales; el 35,7% de las cepas O15 analizadas también resultaron ser MDR, lo que sugiere que, aunque el serogrupo O15 es menos predominante, es digno de atención pues una gran parte de sus cepas han adquirido multirresistencias (**Tablas 12 y 13**).

Se observa también una proporción relevante de cepas productoras de ESBL (6,9%). Es frecuente que las cepas ESBL muestren también resistencia a otras familias de antimicrobianos de amplio uso clínico como las quinolonas (además de a los betalactámicos, cefalosporinas y aztreonam) al igual que se observa en nuestros resultados (**Tabla 13**) (Becerra-Aparicio et al., 2023; Flament-Simon, 2021). De las 24 cepas detectadas como ESBL, la mitad de ellas pertenecen a cepas del serogrupo O25 y ninguna al serogrupo O15. En un estudio donde se analizaron cepas *E. coli* de los serogrupos O15, O25 y O22 aisladas en Lituania durante los años 2017 y 2018 se observó una alta tasa de resistencia antimicrobiana a antibióticos  $\beta$ -lactámicos y fluoroquinolonas, lo cual concuerda con nuestros resultados (Prakapaite et al., 2019). Además, observaron un aumento en el número de resistencias a los antimicrobianos en cepas de *E. coli* pertenecientes al serogrupo O15 observando que el 58,8% de los aislados presentaron resistencia a ciprofloxacino y el 70,6% a ampicilina; mientras que en nuestro análisis prácticamente todas las cepas O15 resultaron resistentes a penicilina y piperacilina (92,9%), pero solo 2 de ellas no fueron susceptibles a ciprofloxacino (14,3%) (**Tabla 13**).

### 5.1. CLON ST131

*E. coli* ST131 es uno de los clones ExPEC más prevalentes. Además, se considera responsable de la diseminación mundial de aislados MDR y es la principal secuencia tipo (ST) responsable del aumento global de ESBL (Merino et al., 2018; Nicolas-Chanoine et al., 2008, 2014; Peirano & Pitout, 2019; Flament-Simon, 2021).

En este trabajo se han detectado 27 cepas pertenecientes a la secuencia tipo ST131 entre las 48 cepas de *E. coli* bacteriémicas de los serogrupos O15 y O25 (56,3%) (**Tabla 16**) mediante un nuevo método de PCR multiplex que hemos adaptado y puesto a punto para su implementación en este TFG (Johnston et al., 2022). Combinando los resultados de la caracterización molecular de las 48 cepas de este estudio (PCR y secuenciación del alelo *fimH*) podemos deducir los clados y subclados a los que pertenecen las 27 cepas ST131 (**Figuras 11, 12 y 13**). Según la literatura, la mayoría de los aislados de origen animal pertenecen al clado B de ST131, mientras que entre las cepas *E. coli* ExPEC ST131 causantes de infecciones extraintestinales en humanos predomina el clado C y en particular el subclado C2 (Flament-Simon, 2021; García, et al., 2020; Mamani et al., 2019; Reid et al., 2019). En este trabajo, entre las 27 cepas del clon ST131 aisladas de bacteriemias se encontraron 19 cepas pertenecientes al clado C (70,4%), mientras que solo 2 de ellas resultaron ser del clado B (**Figura 11**), coincidiendo así con los resultados obtenidos en otras investigaciones. Además, dentro del clado C, el subclado C2 (también conocido como subclon H30Rx) asociado a la producción de la betalactamasa CTX-M-15, representa el sublinaje de ST131 más expandido entre las infecciones extraintestinales causadas por ST131 en seres humanos (Dahbi et al., 2014; Mamani Huarani, 2015; Peirano et al., 2014; Price et al., 2013). Recientemente se describió un nuevo linaje dentro del grupo clonal de ST131 denominado C1-M27, este linaje ha sido asociado a la producción de la betalactamasa CTX-M-27. La emergencia de estas cepas ST131 C1-M27 se describió primero en Japón (Matsumura et al., 2016, 2017) y después en otros países (Tailandia, Australia, Canadá, Estados Unidos, Francia, Italia, Alemania, Países Bajos y España) (Blanc et al., 2014; Birgy et al., 2016; Bevan et al., 2017; Merino et al., 2018; Peirano & Pitout, 2019). Nuestros resultados reflejan esta situación, pues la mayor parte de las cepas ST131 estudiadas pertenecen al clado C2 (12 de 19/ un 63,2% de las cepas del clado C) aunque también se han detectado 4 cepas C1-M27 (21,1% de las cepas del clado C) (**Figura 12**). Además, nuestros resultados coinciden con los obtenidos en un estudio reciente realizado en el año 2023 en España por Becerra-Aparicio y colaboradores en el cual analizan la estructura clonal de ST131 en cepas causantes de bacteriemia. En dicho estudio se describe que el subclon C2/H30-Rx representa a la mayoría de los aislados ST131 (44/66), mientras que del linaje C1-M27 solo se identificaron 4 de 10 aislados pertenecientes al subclado C1/H30-R1 (Becerra-Aparicio et al., 2023). Lo más llamativo de nuestro estudio es la detección de 5 cepas no tipables de las cuales 3 presentan una secuencia *fimH* atípica distinta a las recogidas en la literatura hasta el momento (*fimH16*, *fimH27-like* y *fimH260*), por lo que podrían tratarse de nuevas variantes genéticas del clon de alto riesgo ST131 (**Figura 11**).

Antiguamente, se suponía que las cepas que presentasen el mismo serotipo O:H tendrían más posibilidades de estar relacionadas en términos filogenéticos y por tanto en la descripción de clones *E. coli*. Sin embargo, estudios recientes han dejado en evidencia que cepas con el mismo serotipo O:H pueden pertenecer a diferentes grupos clonales y que cepas con distintos serotipos O:H pueden pertenecer al mismo grupo clonal (Colomer-Lluch et al., 2013; Mamani Huarani, 2015). Ejemplo de ello es la relación entre el grupo clonal ST131 y los serogrupos O15 y O25 estudiados en este trabajo (**Tabla 16 y Figura 9**). La gran mayoría de cepas identificadas como ST131 (92,6%) pertenecen al serogrupo O25, mostrando una asociación significativa ( $p < 0,001$ ), pero un pequeño porcentaje resultó ser del serogrupo O15, confirmando también que las cepas de un grupo clonal pueden presentar distintos serotipos. Es interesante destacar las 2 cepas O15 que han sido identificadas como ST131 en este trabajo; pues hasta el momento, la literatura siempre asociaba a las cepas ST131 con los serotipos O25b:H4 y O16:H5 y al serogrupo O15 con la secuencia tipo ST393 (Mora et al., 2011; Mamani Huarani, 2015; Riley, 2014; Vianello et al., 2021). Además, en otro trabajo se equipara al grupo clonal uropatogénico de *E. coli* O15:K52:H1 con

el complejo clonal ST31 según la tipificación de secuencia multilocus (MLST) (Platell et al., 2011). Finalmente, se asume que las cepas no identificadas como ST131, 12 en el caso de las O15 (85,7%) y 9 dentro de las O25 (26,5%) pertenecen a otra u otras secuencias tipo distintas.

Estudios previos establecen que las cepas del grupo clonal ST131 pertenecen al grupo filogenético B2 y que *E. coli* O25-B2-ST131 es un organismo multirresistente e hipervirulento que vehicula numerosos factores de virulencia, entre los que destacan: *fimH*, *papA*, *sat*, *iucD*, *kpsM II*, *traT*, *malX* y *usp* (J. R. Johnson et al., 2009; Mora et al., 2011; Karfunkel et al., 2013; Platell et al., 2011; Rodríguez-Baño et al., 2013). En este trabajo también observamos que los genes *yfcV*, *hlyF*, *vat*, *kpsM II-K2* fueron significativamente más prevalentes en cepas ST131 frente a las no-ST131 ( $p < 0,05$ ) y que los genes *iucD* y *KpsM II* se encuentra entre los 7 más frecuentes (**Tabla 19**). Por otra parte, la cápsula tipo II de *E. coli* está presente en el 79,2% de las cepas analizadas ( $n=38$ ) y es más frecuente en las ST131 frente a las no-ST131. Mientras que el tipo II-K1 fue más frecuente en las cepas del clado B, el tipo II-K2 predomina en las cepas del clado C (**Tabla 20**). Estos resultados son similares a otro estudio realizado por Flament-Simon, S.C. y colaboradores en 2020, en el cual se analizan un total de 196 cepas de *E. coli* aisladas de infecciones extraintestinales causadas en pacientes del HULA y de otro hospital de París. En dicho trabajo se describe la existencia de una fuerte correlación entre los FV y las secuencias tipo de las cepas, constatando que la media de genes de virulencia fue mayor en un subconjunto de ST dominantes pertenecientes al grupo filogenético B2 incluyendo a ST12, ST73, ST95, ST127, ST131 y ST141 (Flament-Simon et al., 2020).

En este trabajo observamos que determinados genes de virulencia están asociados a la ST131 y describimos mayores porcentajes de cepas categorizadas presuntivamente como ExPEC y UPEC entre las cepas pertenecientes a este grupo que las no-ST131 (diferencias estadísticamente significativas) (**Tabla 19**). El grupo de cepas no-ST131 pertenecen en su mayoría al serogrupo O15 (**Tabla 16 y Figura 9**). No obstante, la media de genes de virulencia calculada para cepas pertenecientes a las categorías ST131 y no-ST131, no varía significativamente. Podríamos concluir que los criterios establecidos para la asignación presuntiva del estatus ExPEC cuenta con un mayor poder predictivo para las cepas de *E. coli* productoras de bacteriemias pertenecientes al clon ST131 que para otros linajes altamente virulentos no-ST131 de los serogrupos O15 y O25. Es posible que estas cepas cuenten con otros genes que codifican FV distintos a los analizados en este trabajo, necesitaríamos realizar más investigaciones para poder responder a estas preguntas.

Así también, la prevalencia de cepas productoras de ESBL y MDR fue significativamente mayor en las cepas ST131 en comparación con las cepas no-ST131 ( $p < 0,001$  y  $p = 0,006$ , respectivamente), pues el 74% pertenecientes a la secuencia tipo ST131 de nuestro estudio son MDR frente a un 19% de las cepas no-ST131, y de las 12 cepas que resultaron ser productoras de ESBL 11 resultaron ser ST131, pertenecientes todas ellas al clado C (**Tabla 17 y 18**). Por otra parte, para la mayoría de los antimicrobianos estudiados se observa una mayor prevalencia de cepas ST131 resistentes con respecto a las no-ST131. Por el contrario, la sensibilidad de nuestras cepas fue total frente a otros antimicrobianos como son la tigeclina o los carbapenémicos coincidiendo con los resultados del estudio realizado en España (Becerra-Aparicio et al., 2023). En dicho trabajo se sugiere el uso de nuevas combinaciones de  $\beta$ -lactámico/inhibidor de  $\beta$ -lactamasas, como el ceftolozano/tazobactam como una alternativa terapéutica para el tratamiento de infecciones causadas por cepas productoras de ESBL con el fin de evitar el uso excesivo de carbapenémicos y en particular para el tratamiento de cepas de *E. coli* ST131-MDR, cuyos subclados constituyen poblaciones enriquecidas en genes de resistencia y virulencia.

En conjunto, estos datos muestran la alta prevalencia de infecciones causadas por cepas ExPEC de los serogrupos O15 y O25 en la población lucense entre los años 2020-2022. Además de un incremento de cepas MDR, en parte debido al incremento de la prevalencia de cepas pertenecientes al grupo clonal ST131. Una vacuna profiláctica contra las cepas ExPEC que se dirija a los serotipos O prevalentes y sea eficaz en adultos podría tener un impacto clínicamente significativo en la prevención de infecciones causadas por ExPEC, incluidas la bacteriemia y la sepsis. No obstante, teniendo en cuenta las variaciones epidemiológicas existentes a nivel global, las nuevas formulaciones planteadas para el diseño de vacunas deberían estar lo más adaptadas posibles y esto requiere de una vigilancia epidemiológica constante para garantizar una cobertura óptima.

---

## 6. CONCLUSIONES

---

- Numerosos estudios identifican que un conjunto de serogrupos de *E. coli* se encuentran entre los más prevalentes causantes de infecciones extraintestinales, entre ellos los serogrupos O25 (ocupando la primera posición) y O15. Los estudios de vigilancia epidemiológica confirman que los serogrupos prevalentes asociados a ExPEC sufren ligeras variaciones a nivel global, lo que supone un impedimento para el diseño de una vacuna universal y sugiere la necesidad de diseñar formulaciones más adaptadas a la epidemiología local para poder garantizar una cobertura óptima.
- Una parte importante de las cepas *E. coli* bacteriémicas estudiadas fueron MDR (30,2%), de las cuales el O25 fue el serogrupo predominante. Sin embargo, un número destacable de cepas O15 también resultaron ser MDR, lo que sugiere que, aunque el serogrupo O15 es menos predominante, es digno de atención pues una gran parte de sus cepas han adquirido multirresistencia. Además, se observó una proporción relevante de cepas productoras de ESBL (24 cepas), muchas de ellas O25.
- La relación existente entre determinados genes codificantes de FV y los serogrupos asociados a infecciones extraintestinales se ve confirmada en este trabajo, destacando las cepas ExPEC pertenecientes al serogrupo O25. La gran mayoría de las cepas resultaron ser ExPEC, lo que concuerda con el origen de las cepas; aunque se aprecian diferencias significativas entre serogrupos, pues prácticamente el total de cepas O25 se clasificaron como ExPEC, mientras que en las cepas O15 solo la mitad. Aunque las cepas O15 no presentaron los genes de virulencia necesarios para poder ser clasificadas dentro del estatus ExPEC, es posible que las cepas de este serogrupo posean otro conjunto de genes que jueguen un papel esencial en su virulencia.
- De las 48 cepas de los serogrupos O15 y O25 de *E. coli* bacteriémicas aisladas de pacientes lucenses analizadas en este estudio, 27 se asignaron al grupo clonal ST131 y se muestra una asociación significativa con el serogrupo O25, aunque se encontraron 2 cepas O15-ST131. Destaca la predominancia del subclado C2 (conocido por su asociación con la producción de la betalactamasa CTX-M-15) y la presencia del nuevo linaje C1-M27, vinculado con CTX-M-27. Además, se detectaron 3 cepas con una secuencia *fimH* atípica distinta a las recogidas en la literatura hasta el momento (*fimH16*, *fimH27-like* y *fimH260*), por lo que podrían tratarse de nuevas variantes genéticas emergentes del clon de alto riesgo ST131. Estas cepas vehiculan un importante conjunto de genes de virulencia de ExPEC y numerosas resistencias a antibióticos lo cual justifica su exitosa diseminación.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Becerra-Aparicio, F., Gómez-Zorrilla, S., Hernández-García, M., Gijón, D., Siverio, A., Berbel, D., Sánchez-Carrillo, C., Cercenado, E., Rivera, A., De Malet, A., Xercavins, M., Ruiz De Gopegui, E., Canoura-Fernández, L., Martínez, J. A., Seral, C., Del Pozo, J. L., Cotarelo, M., Díaz-Regañón, J., Cantón, R., ... Ruiz-Garbajosa, P. (2023). Significant increase of CTX-M-15-ST131 and emergence of CTX-M-27-ST131 *Escherichia coli* high-risk clones causing healthcare-associated bacteraemia of urinary origin in Spain (ITUBRAS-2 project). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 78(9), 2291–2296. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKAD234>
- Bevan, E. R., Jones, A. M., & Hawkey, P. M. (2017). Global epidemiology of CTX-M  $\beta$ -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(8), 2145–2155. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKX146>
- Birgy, A., Bidet, P., Levy, C., Sobral, E., Cohen, R., & Bonacorsi, S. (2017). CTX-M-27–Producing *Escherichia coli* of Sequence Type 131 and Clade C1-M27, France - Volume 23, Number 5—May 2017 - *Emerging Infectious Diseases journal* - CDC. *Emerging Infectious Diseases*, 23(5), 885. <https://doi.org/10.3201/EID2305.161865>
- Birgy, A., Levy, C., Bidet, P., Thollot, F., Derkx, V., Béchet, S., Mariani-Kurkdjian, P., Cohen, R., & Bonacorsi, S. (2016). ESBL-producing *Escherichia coli* ST131 versus non-ST131: evolution and risk factors of carriage among French children in the community between 2010 and 2015. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(10), 2949–2956. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKW219>
- Blanc, V., Leflon-Guibout, V., Blanco, J., Haenni, M., Madec, J. Y., Rafignon, G., Bruno, P., Mora, A., Lopez, C., Dahbi, G., Dunais, B., Anastay, M., Branger, C., Moreau, R., Pradier, C., & Nicolas-Chanoine, M. H. (2014). Prevalence of day-care centre children (France) with faecal CTX-M-producing *Escherichia coli* comprising O25b:H4 and O16:H5 ST131 strains. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(5), 1231–1237. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKT519>
- Blanco, M., Blanco, J. E., Alonso, M. P., & Blanco, J. (1996). Virulence factors and O groups of *Escherichia coli* isolates from patients with acute pyelonephritis, cystitis and asymptomatic bacteriuria. *European Journal of Epidemiology*, 12(2), 191–198. <https://doi.org/10.1007/BF00145506>
- Chroma, M., & Kolar, M. (2010). Genetic methods for detection of antibiotic resistance: Focus on extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. 154(4), 289–296.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., & Bingen, E. (2000). Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4555. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000>
- Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., & Gordon, D. M. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1), 58–65. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12019>
- Clermont, O., Lavollay, M., Vimont, S., Deschamps, C., Forestier, C., Branger, C., Denamur, E., & Arlet, G. (2008). The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(5), 1024–1028. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKN084>
- Colomer-Lluch, M., Mora, A., López, C., Mamani, R., Dahbi, G., Marzoa, J., Herrera, A., Viso, S., Blanco, J. E., Blanco, M., Alonso, M. P., Jofre, J., Muniesa, M., & Blanco, J. (2013). Detection of quinolone-resistant *Escherichia coli* isolates belonging to clonal groups O25b:H4-B2-ST131 and O25b:H4-D-ST69 in raw sewage and river water in Barcelona, Spain. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(4), 758–765. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKS477>
- Dahbi, G., Mora, A., Mamani, R., López, C., Alonso, M. P., Marzoa, J., Blanco, M., Herrera, A., Viso, S., García-Garrote, F., Tchesnokova, V., Billig, M., de la Cruz, F., de Toro, M., González-López, J. J., Prats, G., Chaves, F., Martínez-Martínez, L., López-Cerezo, L., ... Blanco, J. (2014). Molecular epidemiology and virulence of *Escherichia coli* O16:H5-ST131: Comparison with H30 and H30-Rx subclones of O25b:H4-ST131. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(8), 1247–1257. <https://doi.org/10.1016/J.IJMM.2014.10.002>
- Dahbi Zbiti, G. (2015). Epidemiología molecular y virulencia de cepas de *Escherichia coli* del grupo clonal ST131: comparación de los subclones O16:H5 H41 y O25b:H4 H30/H30-Rx. <http://hdl.handle.net/10347/13771>
- Dale, A. P., & Woodford, N. (2015). Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): Disease, carriage and clones. *Journal of Infection*, 71(6), 615–626. <https://doi.org/10.1016/J.JINF.2015.09.009>
- Denamur, E., Clermont, O., Bonacorsi, S., & Gordon, D. (2020). The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 2020 19:1, 19(1), 37–54. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0416-x>
- Dobrindt, U., Agerer, F., Michaelis, K., Janka, A., Buchrieser, C., Samuelson, M., Svanborg, C., Gottschalk, G., Karch, H., & Hacker, J. (2003). Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* isolates by use of DNA arrays. *Journal of Bacteriology*, 185(6), 1831–1840. <https://doi.org/10.1128/JB.185.6.1831-1840.2003>/ASSET/550F8F54-48D6-466A-9311-143BADCC15DE/ASSETS/GRAPHIC/JB0631055002.JPEG
- Dozois, C. M., Dho-Moulin, M., Brée, A., Fairbrother, J. M., Desautels, C., & Curtiss, R. (2000). Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the tsh genetic region. *Infection and Immunity*, 68(7), 4145–4154. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.7.4145-4154.2000>/ASSET/66B7737E-B947-4B16-A6CF-CA5B0F4AD874/ASSETS/GRAPHIC/II0701936004.JPEG
- Duprilot, M., Baron, A., Blanquart, F., Dion, S., Lettéron, P., Flament-Simon, S.-C., Clermont, O., Denamur, E., & Nicolas-Chanoine, M.-H. (2019). Success of *Escherichia coli* O25b:H4

- ST131 clade C associated with a decrease in virulence. *BioRxiv*, 786350. <https://doi.org/10.1101/786350>
- E. coli. (n.d.). Retrieved June 17, 2024, from <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., & Relman, D. A. (2005). Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5728), 1635. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1110591>
- Enrique, I., Logroño, N., Alfonso, A., Coronel, N., Carolina, A., Macías, C., Alberto, C., & Pozo, Z. (2021). Intestinal Dysbiosis and Premature Delivery: Relationship Between Gestation, Type of Delivery and Maturation of the Neonatal Intestinal Flora. *ESPOCH Congresses: The Ecuadorian Journal of S.T.E.A.M.*, 1514-1523–1514–1523. <https://doi.org/10.18502/ESPOCH.V1I6.9639>
- Escherich, T. (1885). Die darmbakterien des neugeborenen und säuglings. *Fortschr. Med.* 3, 515–522.
- Flament Simon, S. C., & 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. 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.*
- Flament-Simon, S. C., García, V., Duprilot, M., Mayer, N., Alonso, M. P., García-Meniño, I., Blanco, J. E., Blanco, M., Nicolas-Chanoine, M. H., & Blanco, J. (2020). High Prevalence of ST131 Subclades C2-H30Rx and C1-M27 Among Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Causing Human Extraintestinal Infections in Patients From Two Hospitals of Spain and France During 2015. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 125. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2020.00125/FULL>
- Flament-Simon, S. C., Nicolas-Chanoine, M. H., García, V., Duprilot, M., Mayer, N., Alonso, M. P., García-Meniño, I., Blanco, J. E., Blanco, M., & Blanco, J. (2020). Clonal Structure, Virulence Factor-encoding Genes and Antibiotic Resistance of *Escherichia coli*, Causing Urinary Tract Infections and Other Extraintestinal Infections in Humans in Spain and France during 2016. *Antibiotics* 2020, Vol. 9, Page 161, 9(4), 161. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS9040161>
- Fonseca-Martínez, S. A., Martínez-Vega, R. A., Farfán-García, A. E., Rugeles, C. I. G., & Criado-Guerrero, L. Y. (2023). Association Between Uropathogenic *Escherichia coli* Virulence Genes and Severity of Infection and Resistance to Antibiotics. *Infection and Drug Resistance*, 16, 3707–3718. <https://doi.org/10.2147/IDR.S391378>
- Frank, C., Werber, D., Cramer, J. P., Askar, M., Faber, M., an der Heiden, M., Bernard, H., Fruth, A., Prager, R., Spode, A., Wadl, M., Zoufaly, A., Jordan, S., Kemper, M. J., Follin, P., Müller, L., King, L. A., Rosner, B., Buchholz, U., ... Krause, G. (2011). Epidemic Profile of Shiga-Toxin–Producing *Escherichia coli* O104:H4 Outbreak in Germany . *New England Journal of Medicine*, 365(19), 1771–1780. [https://doi.org/10.1056/NEJMOA1106483/SUPPL\\_FILE/NEJMOA1106483\\_DISCLOSURES.PDF](https://doi.org/10.1056/NEJMOA1106483/SUPPL_FILE/NEJMOA1106483_DISCLOSURES.PDF)
- Frenc, R. W., Ervin, J., Chu, L., Abbanat, D., Spiessens, B., Go, O., Haazen, W., van den Dobbelen, 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. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30803-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30803-X)
- Gordon, D. M., & Cowling, A. (2003). The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: Host and geographic effects. *Microbiology*, 149(12), 3575–3586. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.26486-0/CITE/REFWORKS>
- Guinée, P. A. M., Jansen, W. H., Wadström, T., & Sellwood, R. (1981). *Escherichia Coli* Associated with Neonatal Diarrhoea in Piglets and Calves. *Laboratory Diagnosis in Neonatal Calf and Pig Diarrhoea*, 126–162. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-8328-1\\_18](https://doi.org/10.1007/978-94-009-8328-1_18)
- Horner, C., Fawley, W., Morris, K., Parnell, P., Denton, M., & Wilcox, M. (2014). *Escherichia coli* bacteraemia: 2 years of prospective regional surveillance (2010–12). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(1), 59–66. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKT333>
- Johnson, J. R. (1991). Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 4(1), 80. <https://doi.org/10.1128/CMR.4.1.80>
- Johnson, J. R., Menard, M., Johnston, B., Kuskowski, M. A., Nichol, K., & Zhanel, G. G. (2009). Epidemic clonal groups of *Escherichia coli* as a cause of antimicrobial-resistant urinary tract infections in Canada, 2002 to 2004. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(7), 2733–2739. <https://doi.org/10.1128/AAC.00297-09/ASSET/45821516-73C7-4E1E-90B2-8A178EC5FFD8/ASSETS/GRAPHIC/ZAC0070982000001.JPEG>
- Johnson, J. R., & 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. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(4), 1773. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.4.1773-1776.2004>
- Johnson, J. R., Porter, S., Johnston, B., Kuskowski, M. A., Spurbeck, R. R., Mobley, H. L. T., & Williamson, D. A. (2015). Host Characteristics and Bacterial Traits Predict Experimental Virulence for *Escherichia coli* Bloodstream Isolates from Patients With Urosepsis. *Open Forum Infectious Diseases*, 2(3). <https://doi.org/10.1093/OFID/OFV083>
- Johnson, J. R., Russo, T. A., Tarr, P. I., Carlino, U., Bilge, S. S., Vary, J. C., & Stell, A. L. (2000). Molecular Epidemiological and Phylogenetic Associations of Two Novel Putative Virulence Genes, *iha* and *iroNE*, among *Escherichia coli* Isolates from Patients with Urosepsis. *Infection and Immunity*, 68(5), 3040. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.5.3040-3047.2000>
- Johnson, J. R., Stapleton, A. E., Russo, T. A., Scheutz, F., Brown, J. J., & Maslow, J. N. (1997). Characteristics and prevalence within serogroup O4 of a J96-like clonal group of uropathogenic *Escherichia coli* O4:H5 containing the class I and class III alleles of *papG*. *Infection and Immunity*, 65(6),

- 2153–2159. <https://doi.org/10.1128/IAI.65.6.2153-2159.1997>
- Johnson, J. R., & Stell, A. L. (2000). Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(1), 261–272. <https://doi.org/10.1086/315217>
- Johnson, J. R., Tchesnokova, V., Johnston, B., Clabots, C., Roberts, P. L., Billig, M., Riddell, K., Rogers, P., Qin, X., Butler-Wu, S., Price, L. B., Aziz, M., Nicolas-Chanoine, M. H., Debroy, C., Robicsek, A., Hansen, G., Urban, C., Platell, J., Trott, D. J., ... Sokurenko, E. V. (2013). Abrupt Emergence of a Single Dominant Multidrug-Resistant Strain of *Escherichia coli*. *The Journal of Infectious Diseases*, 207(6), 919–928. <https://doi.org/10.1093/INFDIS/JIS933>
- Johnson, T. J., Wannemuehler, Y., Doetkott, C., Johnson, S. J., Rosenberger, S. C., & Nolan, L. K. (2008). Identification of Minimal Predictors of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Virulence for Use as a Rapid Diagnostic Tool. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(12), 3987. <https://doi.org/10.1128/JCM.00816-08>
- Johnson, T. J., Wannemuehler, Y. M., & Nolan, L. K. (2008). Evolution of the *iss* gene in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), 2360–2369. [https://doi.org/10.1128/AEM.02634-07/SUPPL\\_FILE/SUPPLEMENTARY\\_TABLE\\_1.XLS](https://doi.org/10.1128/AEM.02634-07/SUPPL_FILE/SUPPLEMENTARY_TABLE_1.XLS)
- Johnston, B. D., Gordon, D. M., Burn, S., Johnson, T. J., Weber, B. P., Miller, E. A., & Johnson, J. R. (2022). Novel Multiplex PCR Method and Genome Sequence-Based Analog for High-Resolution Subclonal Assignment and Characterization of *Escherichia coli* Sequence Type 131 Isolates. *Microbiology Spectrum*, 10(3). [https://doi.org/10.1128/SPECTRUM.01064-22/SUPPL\\_FILE/SPECTRUM.01064-22-S005.XLSX](https://doi.org/10.1128/SPECTRUM.01064-22/SUPPL_FILE/SPECTRUM.01064-22-S005.XLSX)
- Kallonen, T., Brodrick, H. J., Harris, S. R., Corander, J., Brown, N. M., Martin, V., Peacock, S. J., & Parkhill, J. (2017). Systematic longitudinal survey of invasive *Escherichia coli* in England demonstrates a stable population structure only transiently disturbed by the emergence of ST131. *Genome Research*, 27(8), 1437–1449. <https://doi.org/10.1101/GR.216606.116>
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 2004 2:2, 2(2), 123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- Karfunkel, D., Carmeli, Y., Chmelnitsky, I., Kotlovsky, T., & Navon-Venezia, S. (2013). The emergence and dissemination of CTX-M-producing *Escherichia coli* sequence type 131 causing community-onset bacteremia in Israel. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 32(4), 513–521. <https://doi.org/10.1007/S10096-012-1765-9/TABLES/3>
- Kline, K. A., Fälker, S., Dahlberg, S., Normark, S., & Henriques-Normark, B. (2009). Bacterial Adhesins in Host-Microbe Interactions. *Cell Host & Microbe*, 5(6), 580–592. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2009.05.011>
- Le Bouguenec, C., Archambaud, M., & Labigne, A. (1992). Rapid and specific detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(5), 1189–1193. <https://doi.org/10.1128/JCM.30.5.1189-1193.1992>
- Lescat, M., Clermont, O., Woerther, P. L., Glodt, J., Dion, S., Skurnik, D., Djossou, F., Dupont, C., Perroz, G., Picard, B., Catzeflis, F., Andremont, A., & Denamur, E. (2013). Commensal *Escherichia coli* strains in Guiana reveal a high genetic diversity with host-dependant population structure. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1), 49–57. <https://doi.org/10.1111/J.1758-2229.2012.00374.X>
- Lewis, K. (2006). Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature Reviews Microbiology* 2006 5:1, 5(1), 48–56. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1557>
- Lewis, K. (2008). Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 322, 107–131. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3_6)
- Lipworth, S., Vihta, K. D., Chau, K. K., Kavanagh, J., Davies, T., George, S., Barker, L., Vaughan, A., Andersson, M., Jeffery, K., Oakley, S., Morgan, M., Peto, T. E. A., Crook, D. W., Walker, A. S., & Stoesser, N. (2021). Ten Years of Population-Level Genomic *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Serotype Surveillance Informs Vaccine Development for Invasive Infections. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 73(12), 2276. <https://doi.org/10.1093/CID/CIAB006>
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Mamani Huarani, R. S. (2015). Caracterización molecular de cepas de *Escherichia coli* del grupo clonal O25b:H4-B2-ST131 y de otros clones causantes de infecciones extraintestinales en seres humanos. Genes de virulencia y de resistencia. <http://hdl.handle.net/10347/13047>
- Mamani, R., Flament-Simon, S. C., García, V., Mora, A., Alonso, M. P., López, C., García-Meniño, I., Díaz-Jiménez, D., Blanco, J. E., Blanco, M., & Blanco, J. (2019). Sequence types, clonotypes, serotypes, and virotypes of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* causing bacteraemia in a Spanish Hospital over a 12-Year Period (2000 to 2011). *Frontiers in Microbiology*, 10(JULY), 455236. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.01530/BIBTEX>
- Manges, A. R. (2016). *Escherichia coli* and urinary tract infections: the role of poultry-meat. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(2), 122–129. <https://doi.org/10.1016/J.CMI.2015.11.010>
- Mann, R., Mediati, D. G., Duggin, I. G., Harry, E. J., & Bottomley, A. L. (2017). Metabolic adaptations of Uropathogenic *E. coli* in the urinary tract. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(JUN), 270728. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.00241/BIBTEX>

- Martinez, J. L. (2014). General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discovery Today: Technologies*, 11(1), 33–39. <https://doi.org/10.1016/J.DDTEC.2014.02.001>
- Matsumoto, T., Mikamo, H., Ohge, H., Yanagihara, K., Weerdenburg, E., Go, O., Spiessens, B., van Geet, G., van den Hoven, T., Momose, A., Hagiwara, Y., Nakayama, Y., Poolman, J., Geurtsen, J., & Kaku, M. (2022). Distribution of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O-serotypes and antibiotic resistance in blood isolates collected from patients in a surveillance study in Japan. *Journal of Infection and Chemotherapy: Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 28(11), 1445–1451. <https://doi.org/10.1016/J.JIAC.2022.07.001>
- Matsumura, Y., Pitout, J. D. D., Gomi, R., Matsuda, T., Noguchi, T., Yamamoto, M., Peirano, G., De Vinney, R., Bradford, P. A., Motyl, M. R., Tanaka, M., Nagao, M., Takakura, S., & Ichiyama, S. (2016). Global *Escherichia coli* Sequence Type 131 Clade with blaCTX-M-27 Gene - Volume 22, Number 11—November 2016 - *Emerging Infectious Diseases journal - CDC. Emerging Infectious Diseases*, 22(11), 1900–1907. <https://doi.org/10.3201/EID2211.160519>
- Matsumura, Y., Pitout, J. D. D., Peirano, G., DeVinney, R., Noguchi, T., Yamamoto, M., Gomi, R., Matsuda, T., Nakano, S., Nagao, M., Tanaka, M., & Ichiyama, S. (2017). Rapid Identification of Different *Escherichia coli* Sequence Type 131 Clades. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(8). <https://doi.org/10.1128/AAC.00179-17>
- Meléndez, G., Antonio, M., García, C., Novales, M., Guadalupe, M., María, D., & Novales, G. M. (2018). Colonización intestinal en recién nacidos referidos a un hospital de tercer nivel de atención. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 38(4), 115–122.
- Merino, I., Hernández-García, M., Turrientes, M. C., Pérez-Viso, B., López-Fresneña, N., Diaz-Agero, C., Maechler, F., Fankhauser-Rodríguez, C., Kola, A., Schrenzel, J., Harbarth, S., Bonten, M., Gastmeier, P., Canton, R., & Ruiz-Garbajosa, P. (2018). Emergence of ESBL-producing *Escherichia coli* ST131-C1-M27 clade colonizing patients in Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(11), 2973–2980. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKY296>
- Mirsepasi-Lauridsen, H. C., Vallance, B. A., Krogfelt, K. A., & Petersen, A. M. (2019). *Escherichia coli* pathobionts associated with inflammatory bowel disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(2). <https://doi.org/10.1128/CMR.00060-18/ASSET/7DDC85AE-59D0-4FBD-AOF4-E96E90744CA4/ASSETS/GRAPHIC/CMR.00060-18-F0002.JPEG>
- Mitchell, N. M., Johnson, J. R., Johnston, B., Curtiss, R., & Mellata, M. (2015). Zoonotic Potential of *Escherichia coli* Isolates from Retail Chicken Meat Products and Eggs. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(3), 1177. <https://doi.org/10.1128/AEM.03524-14>
- Mora, A., Blanco, M., López, C., Mamani, R., Blanco, J. E., Alonso, M. P., García-Garrote, F., Dahbi, G., Herrera, A., Fernández, A., Fernández, B., Agulla, A., Bou, G., & Blanco, J. (2011). Emergence of clonal groups O1:HNM-D-ST59, O15:H1-D-ST393, O20:H34/HNM-D-ST354, O25b:H4-B2-ST131 and ONT:H21,42-B1-ST101 among CTX-M-14-producing *Escherichia coli* clinical isolates in Galicia, northwest Spain. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37(1), 16–21. <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2010.09.012>
- Morales, C., Lee, M. D., Hofacre, C., & Maurer, J. J. (2004). Detection of a Novel Virulence Gene and a Salmonella Virulence Homologue Among *Escherichia coli* Isolated from Broiler Chickens. <https://Home.Liebertpub.Com/Fpd>, 1(3), 160–165. <https://doi.org/10.1089/FPD.2004.1.160>
- Moulin-Schouleur, M., Schouleur, C., Tailliez, P., Kao, M. R., Brée, A., Germon, P., Oswald, E., Mainil, J., Blanco, M., & Blanco, J. (2006). Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(10), 3484–3492. <https://doi.org/10.1128/JCM.00548-06/ASSET/F46B4A3D-0775-4061-8EAE-CD9BFC30C647/ASSETS/GRAPHIC/ZJM0100667760003.JPEG>
- Mulvey, M. A. (2002). Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology*, 4(5), 257–271. <https://doi.org/10.1046/J.1462-5822.2002.00193.X>
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, 4(2). <https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.VMBF-0016-2015>
- Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet (London, England)*, 399(10325), 629. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Nicolas-Chanoine, M. H., Bertrand, X., & Madec, J. Y. (2014). *Escherichia coli* ST131, an Intriguing Clonal Group. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(3), 543. <https://doi.org/10.1128/CMR.00125-13>
- Nicolas-Chanoine, M. H., Blanco, J., Leflon-Guibout, V., Demarty, R., Alonso, M. P., Caniça, M. M., Park, Y. J., Lavigne, J. P., Pitout, J., & Johnson, J. R. (2008). Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(2), 273–281. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKM464>
- Peirano, G., Ahmed-Bentley, J., Fuller, J., Rubin, J. E., & Pitout, J. D. D. (2014). Travel-related carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Alberta, Canada: The first 3 years. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(5), 1575–1581. <https://doi.org/10.1128/JCM.00162-14>
- Peirano, G., & Pitout, J. D. D. (2019). Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: Update on Molecular Epidemiology and Treatment Options. *Drugs*, 79(14), 1529–1541. <https://doi.org/10.1007/S40265-019-01180-3/FIGURES/3>
- Perry, J. A., Westman, E. L., & Wright, G. D. (2014). The antibiotic resistome: what's new? *Current Opinion in Microbiology*, 21, 45–50. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2014.09.002>
- Phan, M. D., Peters, K. M., Sarkar, S., Lukowski, S. W., Allsopp, L. P., Moriel, D. G., Achard, M. E. S., Totsika, M., Marshall, V.

- M., Upton, M., Beatson, S. A., & Schembri, M. A. (2013). The Serum Resistome of a Globally Disseminated Multidrug Resistant Uropathogenic *Escherichia coli* Clone. *PLOS Genetics*, 9(10), e1003834. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1003834>
- Platell, J. L., Cobbold, R. N., Johnson, J. R., Heisig, A., Heisig, P., Clabots, C., Kuskowski, M. A., & Trott, D. J. (2011). Commonality among fluoroquinolone-resistant sequence type ST131 extraintestinal *Escherichia coli* isolates from humans and companion animals in Australia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(8), 3782–3787. [https://doi.org/10.1128/AAC.00306-11/SUPPL\\_FILE/SUPPLEMENTARY\\_TABLES\\_ST131\\_2904201.1.ZIP](https://doi.org/10.1128/AAC.00306-11/SUPPL_FILE/SUPPLEMENTARY_TABLES_ST131_2904201.1.ZIP)
- Prakapaite, R., Saab, F., Planciuniene, R., Petraitis, V., Walsh, T. J., Petraitiene, R., Semoskaite, R., Baneviciene, R., Kalediene, L., & Kavaliauskas, P. (2019). Molecular Characterization of Uropathogenic *Escherichia coli* Reveals Emergence of Drug Resistant O15, O22 and O25 Serogroups. *Medicina*, 55(11). <https://doi.org/10.3390/MEDICINA55110733>
- Price, L. B., Johnson, J. R., Aziz, M., Clabots, C., Johnston, B., Tchesnokova, V., Nordstrom, L., Billig, M., Chattopadhyay, S., Stegger, M., Andersen, P. S., Pearson, T., Riddell, K., Rogers, P., Scholes, D., Kahl, B., Keim, P., & Sokurenko, E. V. (2013). The epidemic of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 is driven by a single highly pathogenic subclone, H30-Rx. *MBio*, 4(6). [https://doi.org/10.1128/MBIO.00377-13/SUPPL\\_FILE/MBO006131683SD2.XLS](https://doi.org/10.1128/MBIO.00377-13/SUPPL_FILE/MBO006131683SD2.XLS)
- Reid, C. J., McKinnon, J., & Djordjevic, S. P. (2019). Clonal ST131- H 22 *Escherichia coli* strains from a healthy pig and a human urinary tract infection carry highly similar resistance and virulence plasmids. *Microbial Genomics*, 5(9). <https://doi.org/10.1099/MGEN.0.000295>
- Riley, L. W. (2014). Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(5), 380–390. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12646>
- Robinson, A. E., Heffernan, J. R., & Henderson, J. P. (2018). The iron hand of uropathogenic *Escherichia coli*: the role of transition metal control in virulence. *Future Microbiology*, 13(7), 745. <https://doi.org/10.2217/FMB-2017-0295>
- Rodríguez-Baño, J., Mingorance, J., Fernández-Romero, N., Serrano, L., López-Cerero, L., & Pascual, A. (2013). Outcome of bacteraemia due to extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli*: impact of microbiological determinants. *The Journal of Infection*, 67(1), 27–34. <https://doi.org/10.1016/J.JINF.2013.04.006>
- Royer, G., Clermont, O., Condamine, B., Mercier-Darty, M. D. S., Laouénan, C., Lefort, A., Denamur, E., De Lastours, V., Wolff, M., Alavoine, L., Duval, X., Skurnik, D., Woerther, P. L., Andremont, A., Carbonele, E., Lortholary, O., Nassif, X., Abgrall, S., Jaureguy, F., ... Basse, B. (2022). O-Antigen Targeted Vaccines Against *Escherichia coli* May Be Useful in Reducing Morbidity, Mortality, and Antimicrobial Resistance. *Clinical Infectious Diseases*, 74(2), 364–366. <https://doi.org/10.1093/CID/CIAB458>
- Rudd, K. E., Johnson, S. C., Agesa, K. M., Shackelford, K. A., Tsoi, D., Kievian, D. R., Colombara, D. V., Ikuta, K. S., Kisoorn, N., Finfer, S., Fleischmann-Struzek, C., Machado, F. R., Reinhart, K. K., Rowan, K., Seymour, C. W., Watson, R. S., West, T. E., Marinho, F., Hay, S. I., ... Naghavi, M. (2020). Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet*, 395(10219), 200–211. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32989-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32989-7)
- Sarkar, S., Ulett, G. C., Totsika, M., Phan, M. D., & Schembri, M. A. (2014). Role of Capsule and O Antigen in the Virulence of Uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 9(4), 94786. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0094786>
- Sarowska, J., Futoma-Koloch, B., Jama-Kmieciak, A., Frej-Madrzak, M., Ksiaczzyk, M., Bugla-Ploskonska, G., & Chorosz-Krol, I. (2019). Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: Recent reports. *Gut Pathogens*, 11(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/S13099-019-0290-0/TABLES/5>
- Smith, J. L., Fratamico, P. M., & Gunther, N. W. (2007). Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. <https://Home.Liebertpub.Com/Fpd>, 4(2), 134–163. <https://doi.org/10.1089/FPD.2007.0087>
- 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 *fyuA*, *chuA*, and *yfcV* Efficiently Colonize the Urinary Tract. *Infection and Immunity*, 80(12), 4115. <https://doi.org/10.1128/IAI.00752-12>
- Stoesser, N., Sheppard, A. E., Pankhurst, L., de Maio, N., Moore, C. E., Sebra, R., Turner, P., Anson, L. W., Kasarskis, A., Batty, E. M., Kos, V., Wilson, D. J., Phetsouvanh, R., Wyllie, D., Sokurenko, E., Manges, A. R., Johnson, T. J., Price, L. B., Peto, T. E. A., ... Crook, D. W. (2016). Evolutionary history of the global emergence of the *Escherichia coli* epidemic clone ST131. *MBio*, 7(2), 2162–2177. [https://doi.org/10.1128/MBIO.02162-15/SUPPL\\_FILE/MBO002162744SD3.TXT](https://doi.org/10.1128/MBIO.02162-15/SUPPL_FILE/MBO002162744SD3.TXT)
- Stoppe, N. de C., Silva, J. S., Carlos, C., Sato, M. I. Z., Saraiva, A. M., Ottoboni, L. M. M., & Torres, T. T. (2017). Worldwide Phylogenetic Group Patterns of *Escherichia coli* from Commensal Human and Wastewater Treatment Plant Isolates. *Frontiers in Microbiology*, 8(DEC). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.02512>
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., & Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 2010 8:3, 8(3), 207–217. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2298>
- Terlizzi, M. E., Gribaudo, G., & Maffei, M. E. (2017). Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) infections: Virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non-antibiotic antimicrobial strategies. *Frontiers in Microbiology*, 8(AUG), 280574. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.01566/BIBTEX>
- Vianello, M. A., Cardoso, B., Fuentes-Castillo, D., Moura, Q., Esposito, F., Fuga, B., Lincopan, N., & Egito, E. S. T. (2021). International high-risk clone of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* O15:H1-D-ST393 in remote communities of

Brazilian Amazon. *Infection, Genetics and Evolution*, 91, 104808. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2021.104808>

Weerdenburg, E., Davies, T., Morrow, B., Zomer, A. L., Hermans, P., Go, O., Spiessens, B., Van Den Hoven, T., Van Geet, G., Aitabi, M., Debroy, C., Dudley, E. G., Bonten, M., Poolman, J., & Geurtsen, J. (2023). Global Distribution of O Serotypes and Antibiotic Resistance in Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Collected From the Blood of Patients With Bacteremia Across Multiple Surveillance Studies. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 76(3), E1236–E1243. <https://doi.org/10.1093/CID/CIAC421>

Weissman, S. J., Johnson, J. R., Tchesnokova, V., Billig, M., Dykhuizen, D., Riddell, K., Rogers, P., Qin, X., Butler-Wu, S., Cookson, B. T., Fang, F. C., Scholes, D., Chattopadhyay, S., & Sokurenko, E. (2012). High-Resolution Two-Locus Clonal Typing of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(5), 1353. <https://doi.org/10.1128/AEM.06663-11>

Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L. H., Karch, H., Reeves, P. R., Maiden, M. C. J., Ochman, H., & Achtman, M. (2006). Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Molecular Microbiology*, 60(5), 1136–1151. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2006.05172.X>

Xing, Y., Clark, J. R., Chang, J. D., Chirman, D. M., Green, S., Zulk, J. J., Jelinski, J., Patras, K. A., & Maresso, A. W. (2023). Broad protective vaccination against systemic *Escherichia coli* with autotransporter antigens. *PLOS Pathogens*, 19(2). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1011082>

Yamamoto A-B, S., Terai, A., Yuri, K., Kurazono, H., Takeda B-D, Y., & Yoshida, O. (1995). Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 12(2), 85–90. <https://doi.org/10.1111/J.1574-695X.1995.TB00179.X>

## ANEXO

Para las distintas PCRs, se utilizó como control positivo un *pull* de ADN de las siguientes cepas de *E. coli* de la colección del LREC-USC:

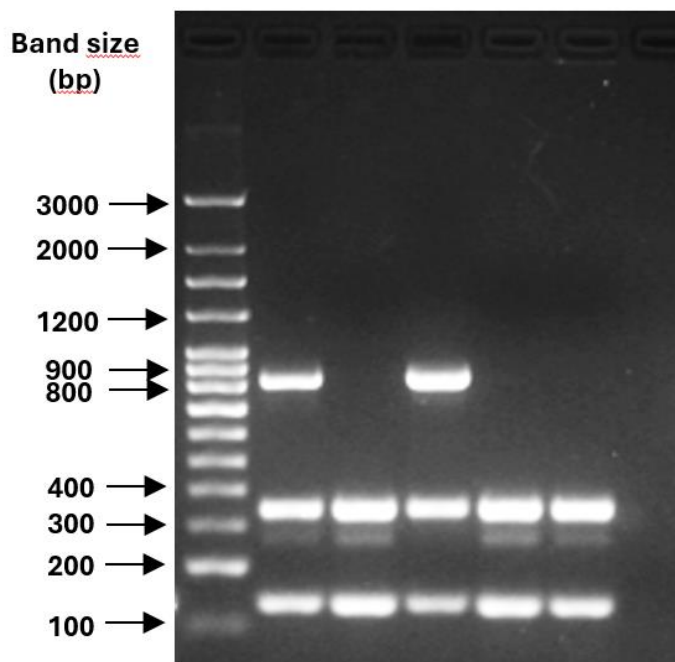
**Tabla 22. Cepas de control positivo utilizadas para caracterización molecular de la colección de cepas pertenecientes a los serogrupos O15 y O25**

PCR	Controles positivos
Multiplex Grupo Filogenético	FV14067, FV14087, O157.807, O157.1103
Grupo Filogenético E	O157.807, O157.1103
Multiplex ExPEC	FV17090 (CV15A), CV15D, FV17132, FV17133, FV17134 y FV17159.

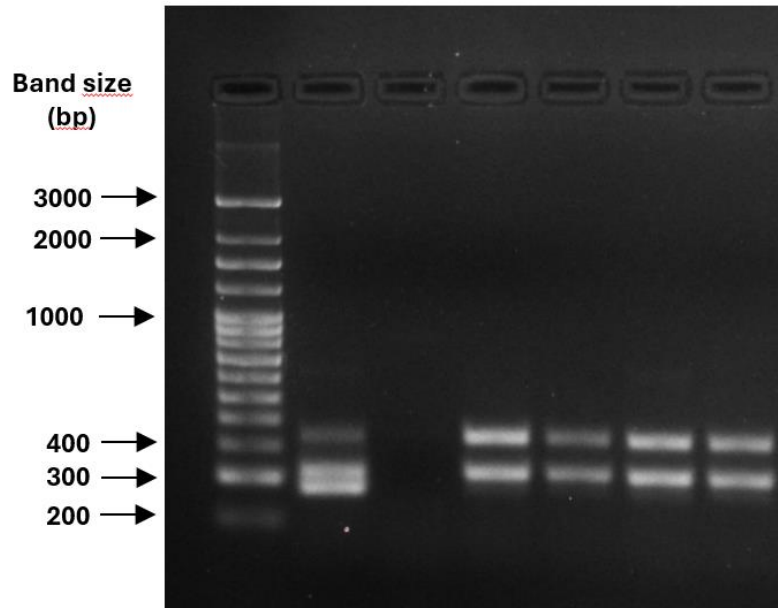
**Tabla 23. Cepas de control positivo utilizadas para la puesta a punto de la PCR multiplex para la identificación de clados y subclados ST131 (C, C1, C1-M27 Y C1-no-M27)**

CEPA	CLON	CLADO ST131
C18A	B2-CH40-30-ST131	C1
C3	B2-CH40-30-ST131	C1-M27
C49	B2-CH40-30-ST131	C1
C7	B2-CH40-30-ST131	C1

**Figura 16. Cepas control positivas enfrentadas a *prophage C1-M27*, *fimH30* allele, *mdh36* y *gyrB47***



Marcador de Peso Molecular, control positivo, cepas positivas (C18A, C3, C49 y C7) y blanco (control negativo).

Figura 17. Cepas control positivas enfrentadas a *rmuC* y *kefC*

Marcador de Peso Molecular, control positivo, blanco (control negativo) y cepas positivas (C18A, C3, C49 y C7).

En el control se observa una banda inferior a 200 bp debido a que se incluyó el *primer* YbbW (además de *rumC* y *kefC*) con el fin de identificar las cepas del clado C2, pero no fue posible.