



TESIS DOCTORAL

**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.**



Rosalía Seferina Mamani Huarani

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOXÍA E PARASITOLOXÍA
FACULTADE DE VETERINARIA**

LUGO, 2014



AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES

D. Jorge Blanco Álvarez

Catedrático del Departamento de Microbiología e Parasitología de la USC

D. Miguel Blanco Álvarez

Profesor Titular del Departamento de Microbiología e Parasitología de la USC

Como Directores de la Tesis Doctoral titulada “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.”

Presentada por Dñ. ROSALIA SEFERINA MAMANI HUARANI

Alumna del Programa de Doctorado: Microbiología e Parasitología

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

Lugo, 27 de Noviembre de 2014

Fdo. Jorge Blanco

Fdo. Miguel Blanco



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

Que la presente Memoria experimental de la Tesis Doctoral titulada “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”, elaborada por Dñ. ROSALIA SEFERINA MAMANI HUARANI, ha sido realizada bajo su dirección y la del profesor Miguel Blanco Álvarez en el LREC-USC de la Facultade de Veterinaria.

Lugo, 27 de Noviembre de 2014.

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



A toda mi familia, especialmente a mis padres Ernesto y Mercedes por apoyarme siempre

AGRADECIMIENTOS

Me siento muy afortunada por continuar mi aprendizaje en Microbiología y muy feliz por finalizar esta etapa y emprender nuevos objetivos.

Quiero agradecer a todos los investigadores que han colaborado en los estudios realizados.

Jorge Blanco Álvarez, director del laboratorio LREC, por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis, por acogerme en su laboratorio, por la dirección y coordinación del estudio, por su ayuda en la revisión crítica de esta memoria, por enseñarme a crecer profesionalmente, por todo su apoyo y paciencia durante todos estos años.

Miguel Blanco, por la dirección y por toda su paciencia durante la revisión de la presente tesis, por la dirección en la detección de genes de virulencia y cepas BLEE por PCR.

Azucena Mora, por la dirección de los estudios de tipado molecular por PFGE y MLST.

Jesús Blanco, por la dirección en la realización del serotipado, por escucharme y por todo su apoyo.

Cecilia López y Ghizlane Dahbi, por su ayuda en la realización de la parte experimental del presente estudio.

Monserrat Lamela, por su amistad y compañía y por toda su ayuda en la preparación de medios de cultivo.

A mis compañeros de laboratorio **Verónica Gómez, Alexandra Herrera, Juan Marzoa y Susana Viso**, por su compañía y amistad.

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

Marie-Hélène Nicolas-Chanoine (Service de Microbiologie, Hôpital AP-HP Beaujon, Clichy, France; Faculté de Médecine D. Diderot, Université Paris 7, Paris, Francia)

James R. Johnson y Brian Johnston (Veterans Affairs Medical Center and University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota, USA)

A Veronika Tchesnokova y Mariya Billig (Department of Microbiology, University of Washington School of Medicine, Seattle, WA, U.S.)

Juan José González-López, Alicia Coelho, María Nieves Larrosa, J. Natalia Quintero-Zarate, Guillermo Prats (Servei de Microbiologia, Hospital Vall d'Hebron ; Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona).

Lorena López-Cerezo, Álvaro Pascual, Jesús Rodríguez-Baño (Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas y Microbiología, Hospital Universitario Virgen Macarena; Departamento de Microbiología y Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla, Sevilla)

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

Fernando Chaves, María Ángeles Orellana (Servicio de Microbiología, Hospital 12 de Octubre, Madrid)

Fernando de la Cruz y Val Fernández (Instituto de Biomedicina y Biotecnología, Departamento de Biología Molecular, Universidad de Cantabria, Santander)

Germán Bou, Ana Fernández (Servicio de Microbiología, Complejo Hospitalario Universitario, A Coruña)

Begoña Fernández (Unidad de Microbiología, Complejo Hospitalario de Ourense)

Andrés Agulla (Servicio de Microbiología, Complejo Hospitalario Arquitecto Marcide-Prof. Novoa Santos, Ferrol)

Y al Grupo Español para Infecciones Nosocomiales (GEIH) formado por:

C. Martínez Peinado (Villajoyosa, Alicante), J. F. Ordás (Cangas de Nancea, Asturias), E. Garduño (Badajoz), M. A. Domínguez (Barcelona), F. Navarro (Barcelona), G. Prats (Barcelona), F. Marco (Barcelona), E. Ojeda (Burgos), P. Marín (Cádiz), R.I Carranza (Alcazar de S. Juan, Ciudad Real), F. Rodríguez (Córdoba), C. García Tejero (Figueras, Gerona), F. Artilés (Gran Canaria), B. Palop (Granada), I. Cuesta (Jaén), M. Cartelle (A Coruña), M. D. Rodríguez (Ferrol, A Coruña), I. Fernández (León), E. Ugalde (Logroño), R. Cantón (Madrid), E. Cercenado (Madrid), F. Chaves (Madrid), J. J. Picazo (Madrid), A. Delgado (Alcorcón, Madrid), C. Guerrero (Murcia), B. Fernández (Orense), A. Fleites (Oviedo), A. Oliver (Palma de Mallorca), J. J. García (Pamplona), M. García (Pontevedra), J. Elías (Salamanca), J. Calvo (Santander), M. Treviño (Santiago de Compostela), M. Ruiz (Sevilla), M. A. Díaz and J.R. Hernández-Bello (Sevilla), M. Lara (Tenerife), L. Torres (Teruel), E. García (Toledo), D. Navarro (Valencia), M. Gobernado (Valencia), A. Tenorio (Valladolid), I. Otero (Vigo), L. Michaus (Vitoria), J. Castillo (Zaragoza).

Cruzando el Atlántico, en mi querido país Bolivia, quiero agradecer a:

Volga Iñiguez, por todos sus consejos, apoyo y paciencia y sobre todo por enseñarme a ser mejor persona y profesional.

Rolando Sánchez, por ser mi profesor, mi tutor, por sus consejos, su apoyo incondicional, por creer en mí, por enseñarme a luchar y alcanzar mis objetivos.

Juan Pablo Torrico, por ser mi amigo, por ayudarme a encontrar mi camino, por hacer que encuentre mi gran pasión la MICROBIOLOGIA.

A mis amigos **Julia Barreta, Paola Romesin, Rosario Rivera, Rosenka Tejerina, Nataniel Mamani, Samantha Sánchez, Roció Pinto, Janeth Serrudo y Vicky Yujera**, por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas, por todos los momentos que pasamos y que recordaremos siempre, en el lugar donde estemos.

A mis amigos de España **Irene, Luz, María Luz, Teresa, Pepe, Ana, Marina y Guillermo**, por escucharme y apoyarme, por hacerme sentir como en casa.

A mis amigos internacionales **Lupe G., Asia, Amanda P., Carolina, David, Aida C., Santiago, Fabián R., Edgar, Carlos T. y Armando**, por cuidarme, por escuchar mis tristezas y alegrías, por su compañía durante mi recorrido por Europa, por todo su apoyo y amistad.

A la **Agencia Española de Cooperación Internacional para el desarrollo (EACID)** por concederme la beca doctoral.

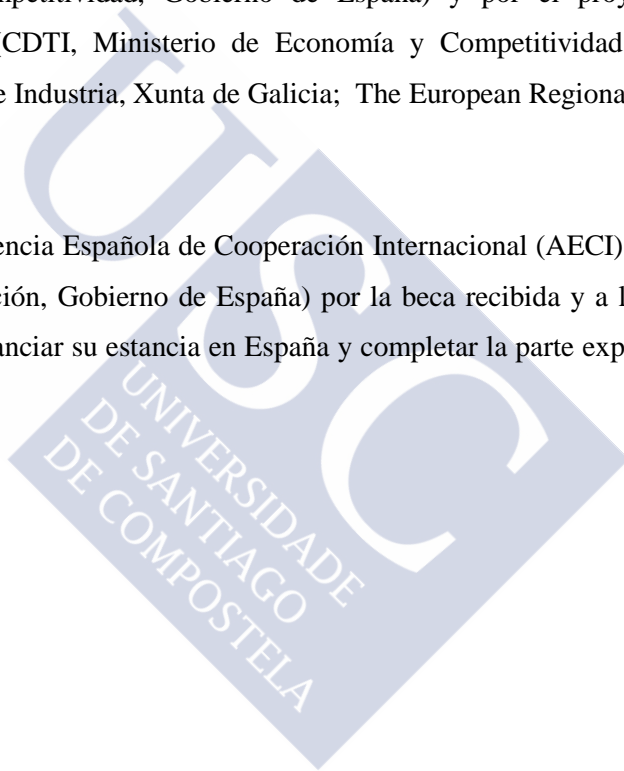
Finalmente, a Dios, al Apóstol Santiago y a la Virgen por cuidarme, por permitirme cumplir mis objetivos, a la vida por haberme dado tanto.



Esta tesis ha sido financiada por:

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

Rosalía Mamani agradece a la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI) (Ministerio de Asuntos Exteriores y de Cooperación, Gobierno de España) por la beca recibida y a la USC por los contratos que le han permitido financiar su estancia en España y completar la parte experimental de la Tesis Doctoral.



ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	I
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. <i>Escherichia coli</i>	1
1.2. Patogénesis.....	1
1.3. <i>E. coli</i> patógeno extraintestinal.....	1
1.3.1. Factores de virulencia.....	2
1.3.1.1. Adhesinas.....	3
1.3.1.2. Toxinas.....	11
1.3.1.3. Sideróforos.....	19
1.3.1.4. Antígeno capsular K.....	22
1.3.1.5. Antígeno somático O.....	24
1.3.1.6. Colicinas.....	27
1.3.1.7. Proteínas de la membrana externa (Iss y TraT).....	28
1.3.1.8. Hemaglutinina sensible a la temperatura (Tsh).....	29
1.3.1.9. Proteína específica uropatogénica (Usp).....	30
1.3.1.10. Invasina IbeA.....	31
1.3.2. Islas de patogenicidad.....	32
1.3.3. Tipado de las cepas.....	33
1.3.4. β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).....	35
1.3.4.1. Distribución de las BLEE a nivel mundial.....	37
1.3.4.2. Distribución de las BLEE en España.....	40
1.3.5. Grupo clonal ST131.....	41
1.3.5.1. Subclones del grupo clonal ST131.....	46
1.3.6. Grupo clonal O15:H1-D-ST393.....	47
1.3.7. Grupo clonal GCA-D-ST69.....	49
1.3.8. Resistencia a antibióticos.....	51
1.3.9. Epidemiología de la bacteriemia.....	56
2. OBJETIVOS	61
3. MATERIAL Y MÉTODOS	62
3.1. Cepas clínicas de <i>E. coli</i>	62
3.2. Cepas de referencia.....	64
3.3. Serotipado convencional y molecular.....	64
3.3.1. Serotipado convencional por aglutinación.....	64
3.3.2. Tipado molecular de los antígenos H.....	67
3.3.3. Tipado molecular de las variantes O25a y O25b por PCR.....	67
3.4. Detección molecular de los grupos clonales ST131, O15-D-ST393 y GCA-D-ST69 y los subclones H22, H30-Rx, H30 no-Rx y H41.....	69
3.5. Determinación de los grupos filogenéticos por PCR.....	70
3.6. Detección y tipado de BLEE por PCR y secuenciación.....	70
3.7. Detección de genes de virulencia por PCR.....	71
3.8. Protocolo de PCR.....	71
3.9. Determinación de secuencias tipo por MLST.....	73

3.10. Electroforesis en campo pulsante (PFGE).....	76
3.11. Determinación de resistencia a antimicrobianos.....	78
3.12. Análisis estadístico.....	79
4. RESULTADOS.....	80
4.1. ESTUDIO I.....	80
Emergencia de los grupos clonales O1:HNM-D-ST59, O15:H1-D-ST393, O20:H34/HNM-D-ST354, O25b:H4-B2-ST131 y ONT:H21, 42-B1-ST101 entre cepas de <i>E. coli</i> productoras de CTX-M-14 aisladas en Galicia (2005-2008).	
4.1.1. Breve introducción y objetivos.....	80
4.1.2. Aislados clínicos	80
4.1.3. Estudios realizados.....	80
4.1.4. Análisis molecular de las enzimas BLEE e identificación de grupos clonales	81
4.1.5. Genes de virulencia.....	81
4.1.6. Resistencia antimicrobiana.....	82
4.1.7. Tipado molecular por PFGE.....	82
4.1.8. Comparación de cepas del grupo clonal O25b:H4-B2-ST131 productoras de diferentes tipos de enzimas CTX-M.....	83
4.2. ESTUDIO II.....	87
Detección de cepas del grupo clonal O25b:H4-B2-ST131 productoras de SHV-12 con un elevado contenido de genes de virulencia e identificación de los grupos clonales ST101, ST162, ST369, ST393, ST410 entre cepas de <i>E. coli</i> productoras de BLEE (Barcelona, 2008).	
4.2.1. Breve introducción y objetivos.....	87
4.2.2. Aislados clínicos.....	87
4.2.3. Estudios realizados.....	87
4.2.4. Análisis molecular de las enzimas BLEE.....	87
4.2.5. Grupos filogenéticos.....	88
4.2.6. Serotipos y el grupo clonal O25b:H4-B2-ST131.....	88
4.2.7. Identificación de los grupos clonales ST101, ST162, ST393 y ST410.....	88
4.2.8. Genes de virulencia en cepas ST131 y no ST131.....	89
4.2.9. Tipado molecular por PFGE.....	89
4.3. ESTUDIO III.....	96
Prevalencia y caracterización de los grupos clonales O25b:H4-B2-ST131, O15:H1-D-ST393 y GCA-D-ST69 en infecciones extra-intestinales en España. Relación con la resistencia antimicrobiana y el contenido de genes de virulencia (estudio nacional, 2009).	
4.3.1. Breve introducción y objetivos.....	96
4.3.2. Aislados clínicos.....	96
4.3.3. Estudios realizados.....	96
4.3.4. Prevalencia de grupos clonales y de cepas productoras de BLEE.....	97
4.3.5. Resistencia antimicrobiana.....	97
4.3.6. Factores de virulencia.....	98
4.3.7. Tipado molecular por PFGE.....	98

4.4. ESTUDIO IV.....	106
Virotipos de cepas de <i>E. coli</i> O25b:H4-B2-ST131 productoras de enzimas BLEE. Estudio multicéntrico GEIH-BLEE-2006.	
4.4.1. Breve introducción y objetivos.....	106
4.4.2. Aislados clínicos.....	106
4.4.3. Estudios realizados.....	107
4.4.4. Prevalencia y distribución del grupo clonal O25b:H4-B2- ST131...	107
4.4.5. Enzimas BLEE producidas por las cepas O25b:H4-B2-ST131.....	107
4.4.6. Genes de virulencia y virotipos de las cepas O25b:H4-B2-ST131.....	108
4.4.7. Inserción de la secuencia <i>ISL3-like</i> transposasa en el gen <i>fimB</i>	109
4.4.8. Relación entre los alelos <i>fimH</i> y los virotipos.....	109
4.4.9. Virotipos versus tipo de BLEE y resistencia antimicrobiana.....	109
4.4.10. Relación entre los virotipos y los pulsotipos (PFGE).....	110
4.4.11. Asociaciones clínicas y epidemiológicas.....	111
4.4.12. Desarrollo de una PCR triple para el virotipado de las cepas O25-ST131.....	111
4.5. ESTUDIO V.....	125
Emergencia de los subclones H22, H30, H30-R, H30-Rx y H41 del grupo clonal O25:H4-ST131 entre cepas de <i>E. coli</i> bacteriémicas. Prevalencia con respecto a otros filoserogrupos y grupos clonales.	
4.5.1. Breve introducción y objetivos.....	125
4.5.2. Aislados clínicos.....	125
4.5.3. Estudios realizados.....	126
4.5.4. Grupos filogenéticos.....	126
4.5.5. Serogrupos O, filoserogrupos y estatus ExPEC.....	127
4.5.6. Comparación entre los períodos extremos 1989-1993 y 2010-2011..	128
4.5.6.1. Genes de virulencia y grupos filogenéticos.....	129
4.5.6.2. Genes de virulencia y serogrupos O.....	130
4.5.6.3. Genes de virulencia y filoserogrupos.....	132
4.5.7. Grupos clonales (O15-ST131, GCA-ST69 y ST131) y genes de virulencia.....	133
4.5.8. Virotipos de las cepas O25b:H4-ST131.....	135
4.5.8.1. Virotipos, genes de virulencia y estatus ExPEC.....	136
4.5.8.2. Virotipos y BLEE.....	137
4.5.8.3. Virotipos, alelos <i>fimH</i> y subclones H22, H30, H30-Rx y H41.....	138
4.5.8.4. Tipado Molecular por PFGE.....	140
4.5.9. Cepas de <i>E. coli</i> bacteriémicas productoras de BLEE.....	140
4.5.10. Resistencia de cepas del grupo clonal ST131.....	142
4.5.11. Resistencia en cepas de diferentes períodos, grupos filogenéticos y serogrupos.....	143
5. DISCUSIÓN.....	194
5.1. ESTUDIO I.....	194
5.1.1. Grupo clonal O1:HNM-D-ST59.....	194
5.1.2. Grupo clonal O15:H1-D-ST393.....	195
5.1.3. Grupo clonal O25b:H4-B2-ST131.....	195
5.1.4. Nuevos grupos clonales O20:H34/HNM-D-ST354 y ONT:H21, 42-B1-ST101.....	196

5.2. ESTUDIO II.....	198
5.2.1. Análisis molecular de las enzimas BLEE.....	198
5.2.2. Grupos filogenéticos.....	198
5.2.3. Serotipos, grupos clonales ST101, ST131, ST162, ST369, ST393, ST410.....	199
5.2.4. Genes de virulencia en cepas ST131 y no ST131.....	202
5.2.5. Tipado molecular por PFGE.....	203
5.3. ESTUDIO III.....	204
5.3.1. Prevalencia de los tres grupos clonales.....	204
5.3.2. Distribución de los tres grupos clonales entre las cepas resistentes....	204
5.3.3. Prevalencia de cepas productoras de BLEE.....	205
5.3.4. Factores de virulencia.....	205
5.3.5. Tipado molecular por PFGE de las cepas O25b:H4-B2-ST131.....	206
5.3.6. Tipado molecular de los grupos clonales O15:H1-D-ST393 y GCA-D-ST69.....	206
5.4. ESTUDIO IV.....	207
5.5. ESTUDIO V.....	211
5.5.1. Genes de virulencia.....	211
5.5.2. Grupos filogenéticos y potencial de virulencia.....	212
5.5.3. Serogrupos O y potencial de virulencia.....	215
5.5.4. Filoserogrupos y potencial de virulencia.....	219
5.5.5. Grupos clonales y potencial de virulencia.....	220
5.5.5.1. Grupo clonal O15-D-ST393.....	221
5.5.5.2. Grupo clonal A (GCA-D-ST69).....	222
5.5.5.3. Grupo clonal ST131.....	223
5.5.5.3.1. Virotipos y subclones de las cepas ST131.....	225
5.5.6. Cepas productoras de BLEE y otras resistencias.....	233
6. CONCLUSIONES.....	238
7. BIBLIOGRAFÍA.....	242

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

ABC	Del inglés “ <i>ATP binding cassette</i> ”
Akt	Del inglés “ <i>Protein kinase B</i> ”
APEC	Del inglés “ <i>Avian pathogenic E. coli</i> ”
AP-PCR	Del inglés “ <i>Arbitrarily primed polimerase chain reaction</i> ”
BLEE	β -lactamasas de espectro extendido
bp	Pares de bases
CEA	Del inglés “ <i>carcinoembryonic antigen</i> ”
CEACAMs	Molécula antígeno carcinoembrionico relacionado a la adhesión celular
CEACAM1	Del inglés “ <i>Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1</i> ”
CDT	Del inglés “ <i>cytolethal distending toxin</i> ”
CLSI	Del inglés “ <i>clinical and laboratory standards institute</i> ”
CMIs	Concentración mínima inhibitoria
CNF	Del inglés “ <i>cytotoxic necrotizing factor</i> ”
DAF	Del inglés “ <i>decay-accelerating-factor</i> ”
EARSS	Del inglés “ <i>European antimicrobial resistance surveillance system</i> ”
ERIC2	Del inglés “ <i>enterobacterial repeat intergenic consensus</i> ”
ExPEC	<i>E. coli</i> patógeno extraintestinal
FAK	Del inglés “ <i>kinasa adhesion focal</i> ”
GAP	Proteínas activadoras de GTPasas
GCA	Grupo clonal A
GDI _s	Inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina
GEF	Factor intercambiador de nucleótido de guanina
GEIH	Grupo de estudio de infección hospitalaria
GPI	fosfatidilinositol
HULA	Hospital Universitario Lucus Augusti
IbeA	Invación del endotelio cerebral
Iha	Del inglés “ <i>Iron-regulate gene homologue adhesin</i> ”
IMP	Del inglés “ <i>imipenemase</i> ”
IS	Del inglés “ <i>insertion sequences</i> ”
ITU	Infección del tracto urinario
kb	kilobase
KDO	Ácido 2-keto-3-deoximanno-octónico
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
LPS	Lipopolisacáridos
LREC-USC	Laboratorio de Referencia de <i>Escherichia coli</i> - Universidad Santiago de Compostela
MAPKs	Del inglés “ <i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i> ”
MLST	Del inglés “ <i>multilocus sequence typing</i> ”
MYSTIC	Del inglés “ <i>Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection</i> ”
NDM	Del inglés “ <i>New Delhi metallo-β-lactamase</i> ”
NeuNAc	Ácido N-acetilneuramínico
NMEC	Del inglés “ <i>neonatal meningitis associated E. coli</i> ”
NT	No tipable
ONT	Antígeno O no tipable
OXA-48	Del inglés “ <i>Carbapenem-hidrolizante oxacilina-48</i> ”
PAIs	Del inglés “ <i>pathogenicity islands</i> ”
PFGE	Del inglés “ <i>pulse field gel electrophoresis</i> ”

PI-3K	Fosfoinositol-3-quinasa
PLC γ	Fosfolipasa C gamma
RAPD	Del inglés “ <i>random amplified polymorphic DNA</i> ”
RFPL	Del inglés “ <i>restriction fragment length polymorphism</i> ”
RTX	Del inglés “ <i>repeat in toxin</i> ”
SAT	Del inglés “ <i>secreted autotransporter toxin</i> ”
SMART	Del inglés “ <i>Study for monitoring antimicrobial resistance trends</i> ”
SPATEs	Del inglés “ <i>serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae</i> ”
TSA	Agar de tripton-soja
Tsh	Del inglés “ <i>Temperature-sensitive hemagglutinin</i> ”
UPEC	Del inglés “ <i>uropathogenic Escherichia coli</i> ”
Usp	Del inglés “ <i>Uropathogenic-specific protein</i> ”
VIM	Del inglés “ <i>Verona integron-encoded metallo-β-lactamase</i> ”



RESUMEN

En los últimos años, las cepas de *Escherichia coli* del grupo clonal ST131 se han propagado rápidamente a nivel mundial. Por esa razón, nosotros nos planteamos estudiar las características de las cepas ST131 aisladas en los diferentes hospitales españoles y las comparamos con las cepas no-ST131. En el estudio I, al analizar 654 cepas de *E. coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) aisladas de pacientes entre 2005 y 2008 en 4 hospitales de Galicia, identificamos 5 grupos clonales productores de CTX-M-14 (O1:HNM-D-ST59, O15:H1-D-ST393, O20:H34/HNM-D-ST354, O25b:H4-B2-ST131 y ONT:H21,42-B1-ST101). Cada grupo clonal mostró un perfil de genes de virulencia y de resistencias específico. En el estudio II, al caracterizar 94 cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de pacientes de un Hospital de Barcelona en el año 2008, el grupo clonal O25b:H4-B-ST131 fue el más prevalente (32%), siendo el 63% de las cepas ST131 productoras de CTX-M-15 y el 27% de SHV-12. Las 30 cepas ST131 exhibieron un significativo mayor número de genes de virulencia (media 9,6) que las 64 cepas no ST131 (media 5,8). El estudio III es el primero europeo en el que se analizan conjuntamente los grupos clonales O25b:H4-B2-ST131, O15:H1-D-ST393 y GCA-D-ST69, y entre las 500 cepas de *E. coli* aisladas en 5 hospitales de España en el año 2009 (7% BLEE), observamos que el más prevalente fue el O25b:H4-B2-ST131 (12%). Las cepas ST131 presentaron el mayor número de genes de virulencia (media 8,1; rango 4 a 13 genes), comparado con las cepas ST393 (media 6,0; rango 3 a 7) y ST69 (media 5,4; rango 2 a 9). En el estudio IV, analizamos 1.021 cepas de *E. coli* productoras de BLEE que fueron aisladas en 44 hospitales españoles. Un total de 195 cepas (19%) fueron del grupo clonal O25b:H4-B2-ST131. Al caracterizar 130 cepas ST131 representativas, el 74% de ellas fueron productoras de CTX-M-15. Desarrollamos un sistema para clasificar las cepas ST131 atendiendo a sus genes de virulencia en virotipos y comprobamos que la mayoría de las cepas de un mismo virotipo se agrupaban *clusters* específicos generados por PFGE-XbaI implicando una base clonal. En el estudio V, analizamos 3.260 cepas de *E. coli* bacteriémicas aisladas en el Hospital Universitario Lucus Augusti (HULA) de Lugo entre los años 1989 y 2011. Entre estas cepas identificamos 9 filoserogrupos prevalentes (O1-D, O2-B2, O4-B2, O6-B2, O8-A, O9-A, O15-D, O18-B2 y O25-B2), siendo el O6-B2 el más prevalente en los períodos 1989-1998 y 1999-2008 y el O25-B2 en el período 2009-2011. Al analizar las 157 cepas ST131 bacteriémicas aisladas entre los años 1993 y 2011 de pacientes del HULA observamos que los 3 subclones mayoritarios (H30-Rx, H30 no-Rx y H22) son los mismos que predominaban en los estudios realizados recientemente en EE.UU. y Canadá. Como novedad concluimos que las cepas de los virotipos A, B, C, E y F pertenecen a los subclones H30-Rx y/o H30 no-Rx, mientras que las cepas del virotipo D pertenecen al subclón H22. Como en los estudios realizados en EE.UU. y Canadá observamos que durante los primeros años (1993-1999) las cepas H22 eran las más prevalentes, pero desde que emergieron en el 2001 las cepas H30 se fue incrementando continuamente su prevalencia siendo en la actualidad las predominantes. De especial interés clínico es la asociación del subclón H30-Rx con la producción de CTX-M-15. Además, nuestros resultados indican que las cepas del subclón H30-Rx poseen un mayor número de genes de virulencia que las cepas del subclón H30 no-Rx. No obstante, ambos subclones están expandiéndose en la actualidad, predominando el subclón H30-Rx entre las cepas productoras de BLEE y el H30 no-Rx entre las cepas resistentes a las quinolonas fluoradas no productoras de BLEE. Nuestros resultados también coinciden con los encontrados por otros autores en el sentido que a nivel internacional predominan las cepas O25b:H4-B2-ST131 H30 del virotipo C.

RESUMO

Nos últimos anos, as cepas de *Escherichia coli* do grupo clonal ST131 propagáronse rapidamente a nivel mundial. Por esa razón, nós formulámonos estudar as características das cepas ST131 illadas nos diferentes hospitais españois e comparámolos coas cepas non-ST131. No estudo I, ao analizar 654 cepas de *E. coli* produtoras de β -lactamasas de espectro estendido (BLEE) illadas de pacientes entre 2005 e 2008 en 4 hospitais de Galicia, identificamos 5 grupos clonais produtores de CTX-M-14 (O1:HNM-D-ST59, O15:H1-D-ST393, O20:H34/HNM-D-ST354, O25b:H4-B2-ST131 e ONT:H21,42-B1-ST101). Cada grupo clonal mostrou un perfil de xenes de virulencia e de resistencias específico. No estudo II, ao caracterizar 94 cepas de *E. coli* produtoras de BLEE illadas de pacientes dun Hospital de Barcelona no ano 2008, o grupo clonal O25b:H4-B-ST131 foi o máis prevalente (32%), sendo o 63% das cepas ST131 produtoras de CTX-M-15 e o 27% de SHV-12. As 30 cepas ST131 exhibiron un significativo maior número de xenes de virulencia (media 9,6) que as 64 cepas non ST131 (media 5,8). O estudo III é o primeiro europeo no que se analizan conxuntamente os grupos clonais O25b:H4-B2-ST131, O15:H1-D-ST393 e GCA-D-ST69, e entre as 500 cepas de *E. coli* illadas en 5 hospitais de España no ano 2009 (7% BLEE), observamos que o máis prevalente foi o O25b:H4-B2-ST131 (12%). As cepas ST131 presentaron o maior número de xenes de virulencia (media 8,1; rango 4 a 13 xenes), comparado coas cepas ST393 (media 6,0; rango 3 a 7) e ST69 (media 5,4; rango 2 a 9). No estudo IV, analizamos 1.021 cepas de *E. coli* produtoras de BLEE que foron illadas en 44 hospitais españois. Un total de 195 cepas (19%) foron do grupo clonal O25b:H4-B2-ST131. Ao caracterizar 130 cepas ST131 representativas, o 74% delas foron produtoras de CTX-M-15. Desenvolvemos un sistema para clasificar as cepas ST131 atendendo aos seus xenes de virulencia en virotipos e comprobamos que a maioría das cepas dun mesmo virotipo agrupábanse en clusters específicos xerados por PFGE-*Xba*I implicando unha base clonal. No estudo V, analizamos 3.260 cepas de *E. coli* bacteriémicas illadas no Hospital Universitario Lucus Augusti (HULA) de Lugo entre os anos 1989 e 2011. Entre estas cepas identificamos 9 filoserogrupos prevalentes (O1-D, O2-B2, O4-B2, O6-B2, O8-A, O9-A, O15-D, O18-B2 e O25-B2), sendo o O6-B2 o máis prevalente nos períodos 1989-1998 e 1999-2008 e o O25-B2 no período 2009-2011. Ao analizar as 157 cepas ST131 bacteriémicas illadas entre os anos 1993 e 2011 de pacientes do HULA observamos que os 3 subclons maioritarios (H30-Rx, H30 non-Rx e H22) son os mesmos que predominaban nos estudos realizados recentemente en EEUU e Canadá. Como novidade concluímos que as cepas dos virotipos A, B, C, E e F pertencen aos subclons H30-Rx e/ou H30 non-Rx, mentres que as cepas do virotipo D pertencen ao subclón H22. Como nos estudos realizados en EEUU e Canadá observamos que durante os primeiros anos (1993-1999) as cepas H22 eran as máis prevalentes, pero dende que emerxeron no 2001 as cepas H30 se foi incrementando continuamente a súa prevalencia sendo na actualidade as predominantes. De especial interese clínico é a asociación do subclón H30-Rx coa produción de CTX-M-15. Ademais, os nosos resultados indican que as cepas do subclón H30-Rx posúen un maior número de xenes de virulencia que as cepas do subclón H30 non-Rx. Non obstante, ambos os dous subclons están a expandirse na actualidade, predominando o subclón H30-Rx entre as cepas produtoras de BLEE e o H30 non-Rx entre as cepas resistentes ás quinolonas fluoradas non produtoras de BLEE. Os nosos resultados tamén coinciden cos encontrados por outros autores no sentido que a nivel internacional predominan as cepas O25b:H4-B2-ST131 H30 do virotipo C.

SUMMARY

In recent years, *Escherichia coli* strains of clonal group ST131 have rapidly spread worldwide. For that reason, the objectives of the present doctoral thesis were to analyze the characteristics of the ST131 *E. coli* strains isolated from different Spanish hospitals and to compare them with non-ST131 *E. coli* strains. In the first study (study I), 654 extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *E. coli* strains isolated from patients between 2005 and 2008 in 4 hospitals in Galicia were characterized with 5 CTX-M-14-producing clonal groups identified (O1:HNM-D-ST59, O15:H1-D-ST393, O20:H34/HNM-D-ST354, O25b:H4-B2-ST131 and ONT:H21,42-B1-ST101). Each clonal group showed a specific profile of virulence genes and resistance. In a second study (study II), 94 ESBL-producing *E. coli* strains isolated from patients in a hospital in Barcelona in 2008 showed that the O25b:H4-ST131-B clonal group was the most prevalent (32%), being 63% of the ST131 strains CTX-M-15 producers and 27% SHV-12. Furthermore, the 30 ST131 strains showed a significant larger number of virulence genes (mean 9.6) versus the 64 non-ST131 strains (mean 5.8). The study III was the first in Europe to analyze and compare together the three clonal groups O25b:H4-B2-ST131, O15:H1-D-ST393 and GCA-D-ST69. Among 500 *E. coli* strains isolated in 2009 in 5 Spanish hospitals (7% ESBL), the O25b:H4-B2-ST131 was the most prevalent (12%). Besides, ST131 strains showed the highest number of virulence genes (mean 8.1; range 4 to 13 genes) compared to ST393 (mean 6.0; range 3 to 7) or to ST69 strains (mean 5.4; range 2-9). In the study IV, 1,021 ESBL-producing *E. coli* strains were isolated in 44 Spanish hospitals. A total of 195 strains (19%) belonged to the clonal group O25b:H4-B2-ST131 and when a representative group of 130 ST131 strains were analyzed, 74% resulted positive for CTX-M-15. We developed a system to classify ST131 strains in virotypes based on the presence or absence of a group of distinctive virulence genes, showing that most strains of the same virotype grouped together in specific *Xba*I-PFGE clusters, suggesting a clonal basis for the virotypes. In the study V, 3,260 bacteremic *E. coli* strains isolated at the University Hospital Lucus Augusti (HULA) of Lugo between 1989 and 2011 were analyzed. Nine prevalent phylo-serogroups were identified (O1-D, O2-B2, O4-B2, O6-B2, O8-A, O9-A, O15-D, O18-B2 and O25-B2). Phylo-serogroup O6-B2 was the most prevalent in the periods from 1989 to 1998 and 1999 to 2008, and the O25-B2 in the period 2009-2011. By analyzing the 157 ST131 bacteremic strains isolated from 1993 to 2011, we detected the 3 major subclones (H30-Rx, H30 non-Rx and H22) are the same that those reported as the most prevalent in recent studies from USA and Canada. What we concluded as new is that ST131 strains of virotypes A, B, C, E and F belong to the H30-Rx and/or H30 non-Rx subclones, whereas strains of virotype D belong to H22 subclone. Like other studies from USA and Canada, we observed that the H22 strains were the most prevalent during the early years (1993-1999); however, H30 strains have been increasing since its emergence in 2001 being predominant at present. Of particular clinical interest is the association of the H30-Rx subclone with the production of CTX-M-15. Furthermore, our results indicate that the H30-Rx subclone carry more virulence genes than the H30 non-Rx. However, both subclones are spreading today, predominantly H30-Rx subclone among ESBL-producing strains and H30 non-Rx among non-ESBL strains resistant to fluoroquinolones. In agreement with other authors, our findings show that O25b: H4-B2-ST131 H30 strains of virotype C are globally predominant.

Esta tesis está basada en resultados no publicados y en los estudios

[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.](#)

Mora A, Blanco M, López C, **Mamani R**, Blanco JE, Alonso MP, García-Garrote F, Dahbi G, Herrera A, Fernández A, Fernández B, Agulla A, Bou G, Blanco J.
Int J Antimicrob Agents. 2011 Jan;37(1):16-21. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2010.09.012. Epub 2010 Nov 13.

[Spread of *Escherichia coli* O25b:H4-B2-ST131 producing CTX-M-15 and SHV-12 with high virulence gene content in Barcelona \(Spain\).](#)

Coelho A, Mora A, **Mamani R**, López C, González-López JJ, Larrosa MN, Quintero-Zarate JN, Dahbi G, Herrera A, Blanco JE, Blanco M, Alonso MP, Prats G, Blanco J.
J Antimicrob Chemother. 2011 Mar;66(3):517-26. doi: 10.1093/jac/dkq491. Epub 2010 Dec 21.

[National survey of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections reveals the spread of drug-resistant clonal groups O25b:H4-B2-ST131, O15:H1-D-ST393 and CGA-D-ST69 with high virulence gene content in Spain.](#)

Blanco J, Mora A, **Mamani R**, López C, Blanco M, Dahbi G, Herrera A, Blanco JE, Alonso MP, García-Garrote F, Chaves F, Orellana MÁ, Martínez-Martínez L, Calvo J, Prats G, Larrosa MN, González-López JJ, López-Cerero L, Rodríguez-Baño J, Pascual A.
J Antimicrob Chemother. 2011 Sep;66(9):2011-21. doi: 10.1093/jac/dkr235. Epub 2011 Jun 13.

[Four main virotypes among extended-spectrum- \$\beta\$ -lactamase-producing isolates of *Escherichia coli* O25b:H4-B2-ST131: bacterial, epidemiological, and clinical characteristics.](#)

Blanco J, Mora A, **Mamani R**, López C, Blanco M, Dahbi G, Herrera A, Marzoa J, Fernández V, de la Cruz F, Martínez-Martínez L, Alonso MP, Nicolas-Chanoine MH, Johnson JR, Johnston B, López-Cerero L, Pascual A, Rodríguez-Baño J; Spanish Group for Nosocomial Infections (GEIH).
J Clin Microbiol. 2013 Oct;51(10):3358-67. doi: 10.1128/JCM.01555-13. Epub 2013 Aug 7.

1. INTRODUCCION

1.1. *Escherichia coli* (*E. coli*)

La *E. coli* fue descubierta en 1885 por Theodor Escherich (1857-1911). Es una de las especies bacterianas más estudiadas, no solamente por sus capacidades patógenas, sino también como sustrato y modelo de investigaciones metabólicas, genéticas, poblacionales y de diversa índole (Escherich, 1885; Humbert *et al.*, 2000; Uzzau y Fasano, 2000).

Forma parte de la familia *Enterobacteriaceae*. Estas bacterias son de rápido crecimiento y amplia distribución en el suelo, agua, animales y vegetales. En conjunto, la importancia de las enterobacterias en patología humana puede cuantificarse constatándose que constituyen aproximadamente el 50% de todos los aislamientos clínicamente significativos (Donnenberg y Whittam, 2001; Fasano, 2001).

1.2. Patogénesis

La *E. coli* coloniza el tracto gastrointestinal y establece con el hospedador una relación estable de mutuo beneficio como integrante de la microbiota del hombre y de muchos animales. Su presencia en el agua y los alimentos es un indicador de contaminación fecal reciente (Humbert *et al.*, 2000). No obstante, hay muchas cepas de *E. coli* patógenas que pueden causar infecciones entéricas (diarrea, disentería, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico y enfermedad de los edemas) o extraintestinales (Domingue *et al.*, 1985; Alonso *et al.*, 1987; Blanco *et al.*, 1996; Blanco *et al.*, 1997; Donnenberg y Whittam, 2001; Fecteau *et al.*, 2001; Arbeloa *et al.*, 2009).

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

La *E. coli* es uno de los microorganismos que con mayor frecuencia se asocia con infecciones extraintestinales, tanto en seres humanos como en los animales. Dentro de las infecciones que provoca están las infecciones del tracto urinario (ITU), bacteriemias o septicemias, meningitis, peritonitis, infecciones pulmonares y de heridas (Domingue *et al.*, 1985; Blanco *et al.*, 1991;

Blanco *et al.*, 1996; Dalmau *et al.*, 1996; Blanco *et al.*, 1997; Abe *et al.*, 2008; Houdouin *et al.*, 2008; Manges *et al.*, 2008; Mora *et al.*, 2009).

Es responsable del 20% al 30% de las bacteriemias de la comunidad y del 20% de las nosocomiales. Estas infecciones se originan en el tracto urinario y en la cavidad intrabdominal. Comúnmente se dan en individuos con enfermedad de base o con enfermedades crónicas de larga evolución. Su pronóstico suele ser mejor que la infección por otros microorganismos bacilos gramnegativos, con una tasa de mortalidad de entre el 4% y el 18%, que se asocia principalmente a leucopenia, inmunodepresión y la adquisición nosocomial. No obstante, en los últimos 10 años las cepas de *E. coli* bacteriémicas han desarrollado un incremento progresivo de resistencia a antibióticos, lo cual dificulta su tratamiento (Javaloyas, 2003; Oteo *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2008; Naseer *et al.*, 2009).

Se han desarrollado 2 teorías para explicar la relación entre las cepas fecales de *E. coli* y las causantes de ITU: la teoría de la prevalencia y la teoría de la especial patogenicidad. La primera sostiene que la cepa presente en mayor abundancia en la flora normal intestinal es la que usualmente causa las ITU, mientras que la segunda apoya la idea de que sólo determinadas cepas con factores de virulencia son capaces de producir las infecciones extraintestinales. Los resultados obtenidos en las décadas de los ochenta y noventa del siglo pasado confirman la validez de la teoría de la especial patogenicidad, ya que se comprobó que las cepas causantes de ITU presentaban una serie de factores de virulencia que les permite invadir, colonizar y dañar el tracto urinario, provocando infecciones urinarias bajas y altas (Korhonen *et al.*, 1985; Orskov y Orskov, 1985; Blanco *et al.*, 1991; Johnson, 1991; Blanco *et al.*, 1996).

1.3.1. Factores de virulencia

Entre los factores de virulencia de las cepas ExPEC (*extraintestinal pathogenic Escherichia coli*), se encuentran las adhesinas (fimbrias P y S), la producción de toxinas (Hly y CNF), ciertos factores somáticos O (O1, O2, O4, O6, O7, O18, O25 y O75) y capsulares (K1, K2, K3, K12 y K13), la resistencia a la actividad bactericida del suero y a la fagocitosis, la producción de colicina V y la expresión de sideróforos. Todos estos factores de virulencia contribuyen conjuntamente a potenciar su patogenicidad (Blanco *et al.*, 1992a; Moulin-Schouleur *et al.*, 2006; Bidet *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 2008; Olesen *et al.*, 2009).

1.3.1.1. Adhesinas

Las fimbrias son apéndices filamentosos formados por subunidades de proteínas que están anclados en la membrana externa de las bacterias gramnegativas. Las fimbrias pueden ser rígidas o flexibles. La función principal de las fimbrias es servir como soporte de las adhesinas, encargadas de reconocer a su receptor en la célula hospedadora (**FIGURA 1**). Las adhesinas son, por lo general, proteínas que tienen afinidad por los azúcares y su función es la adherencia. Las cepas ExPEC poseen genes que codifican para varias clases de adhesinas, como las fimbrias tipo 1, tipo P, S y Afa/Dr (Schilling *et al.*, 2001; Smithson, 2008; Molina, 2014).

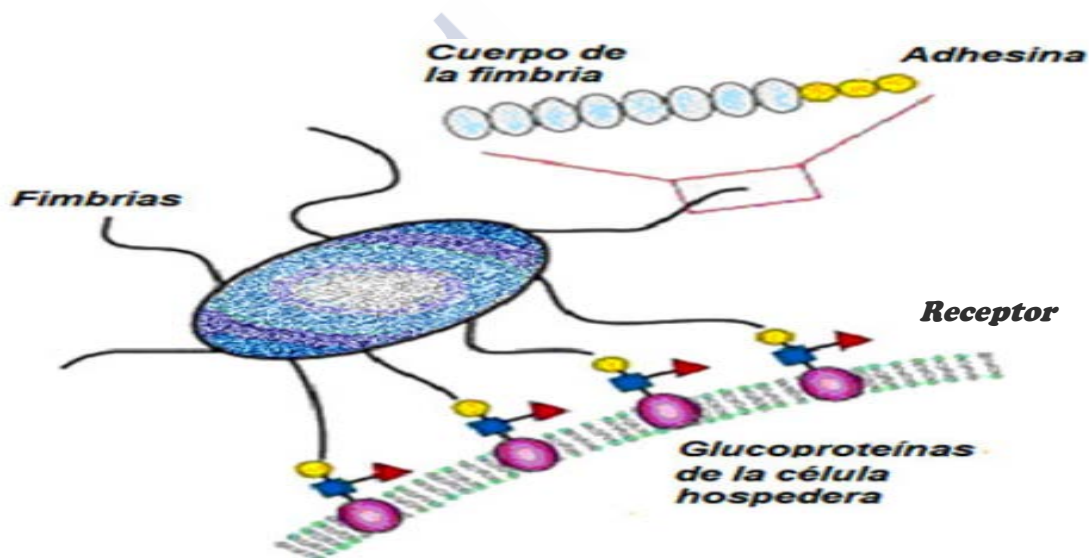


FIGURA 1. Las adhesinas fimbriales son parte constitutiva de una fimbria y las moléculas encargadas de asegurar la adhesión de esa estructura a su receptor en la célula hospedadora (<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/patogenicidad.html>).

Las fimbrias tipo 1 (fimbrias sensibles a la manosa) están presentes en la inmensa mayoría (99%) de las cepas de *E. coli*. Estas fimbrias se unen a los residuos de α -D-manosa presentes en los receptores glicoproteicos. Al principio la única función identificada para la fimbria tipo 1 era que mediaba la adherencia a la célula hospedadora, pero en otros estudios se mostró que esta fimbria está implicada en la invasión de las células epiteliales de la vejiga (Martínez *et al.*, 2000; Schilling *et al.*, 2001). El receptor integrina $\alpha 3\beta 1$ es expresado por muchos tipos de células hospedadoras, incluyendo las células epiteliales de la vejiga. A él se enlaza la adhesina FimH, localizada en la punta de la fimbria tipo 1, y media la internalización de la *E. coli* que posee esta fimbria. Las integrinas funcionan como moléculas de adhesión superficial o como receptores de adhesión. La manipulación de integrinas, y la posterior cascada de señalizaciones,

es un mecanismo común por el cual los patógenos consiguen entrar en las células hospedadoras (Lodish *et al.*, 2005; Wiles *et al.*, 2008).

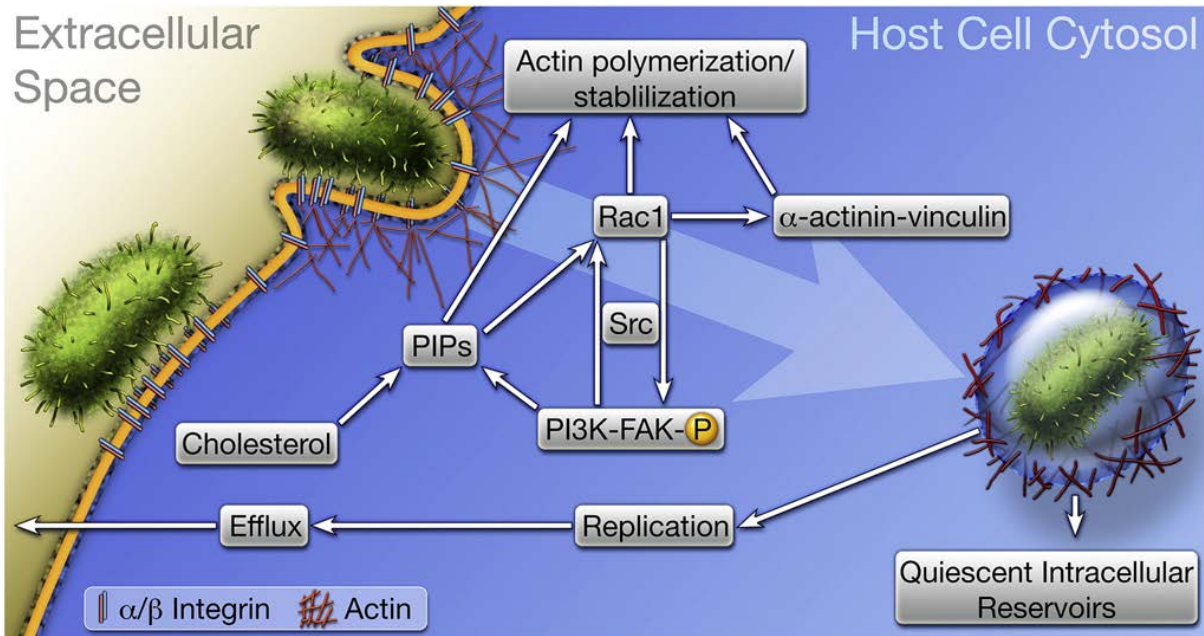


FIGURA 2. Invasión de la célula hospedadora por UPEC. La invasión bacteriana mediante FimH a la célula hospedadora requiere de la dinámica reorganización del citoesqueleto de actina del hospedador y un número de integrinas asociadas a factores de señalización y proteínas adaptadoras (α -actina y vinculina) que regulan el dinamismo de la actina que ha sido implicada en el proceso de invasión (Wiles *et al.*, 2008).

En la **FIGURA 2**, se muestra como la adhesina FimH se enlaza al receptor integrina $\alpha\beta 1$ y posiblemente a otros receptores, los cuales se agrupan dentro de las balsas lipídicas. Las balsas lipídicas son microdominios de la membrana plasmática ricos en colesterol, esfingolípidos, proteínas receptoras de la superficie celular y proteínas señalizadoras. La unión al receptor desencadena una cascada de señalizaciones relacionadas con la fosforilación de la “*kinasa adhesión focal*” (FAK), la formación transitoria entre FAK y fosfoinositol-3-quinasa (PI-3K), la activación de Rac1 (GTPasa de la familia Rho) y la formación transitoria compleja entre el citoesqueleto y el andamio de proteínas α -actina y vinculina. La vinculina es una proteína del citoesqueleto que está asociada a la adhesión focal e involucrada en el anclaje de las moléculas de integrina al citoesqueleto de actina. La vinculina cumple la función de proteína adaptadora. Todos estos eventos estimulan la reorganización de la actina, provocando que la membrana plasmática de la célula hospedadora se cierre alrededor y envuelva a la bacteria enlazada para la subsecuente internalización. Una vez internalizada, UPEC (*uropathogenic Escherichia coli*)

puede ser transferida a compartimientos similares al endosoma tardío, que a menudo se localizan dentro de una malla de filamentos de actina. La bacteria enlazada a la actina permanece inactiva dentro de estos compartimientos que pueden servir como reservorio para infecciones recurrentes del tracto urinario. La liberación de UPEC dentro del citosol de la célula hospedadora estimula el rápido crecimiento de la bacteria y la formación de comunidades intracelulares similares a una biopelícula. Las biopelículas son comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo. Permiten a los microorganismos sobrevivir en condiciones ambientales adversas incluyendo los que el sistema inmune y los antibióticos producen (Mulvey, 2002; Eto *et al.*, 2007; Wiles *et al.*, 2008).

Para la expresión y el ensamblaje de la fimbria tipo 1 se requiere de 8 genes; *fimB*, *fimE*, *fimA*, *fimC*, *fimD*, *fimF*, *fimG* y *fimH*, que están presentes en el operón que codifica para la fimbria, como se muestra en la **FIGURA 3** (Schilling *et al.*, 2001; Smithson, 2008).

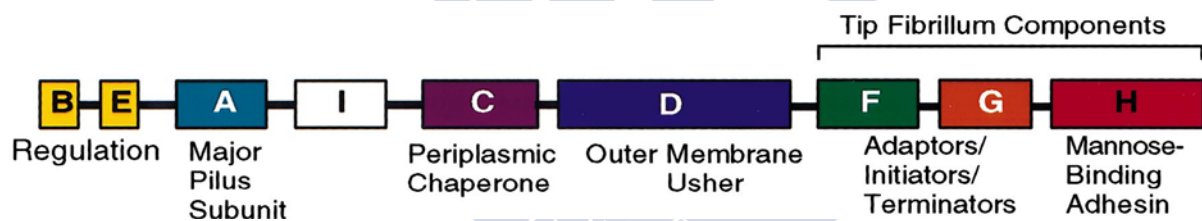


FIGURA 3. Organización genética del operón de la fimbria tipo 1. El gen *fimA* codifica la subunidad mayor y los genes *fimF*, *fimG* y *fimH* codifican para las proteínas que forman el extremo de la fimbria (Schilling *et al.*, 2001; Smithson, 2008).

Las fimbrias tipo P (fimbria Pap resistente a la manosa) son uno de los principales factores de virulencia presentes en la mayor parte de las cepas aisladas de pacientes con pielonefritis y urosepsis (septicemias de origen urinario), en el 40% al 50% de las cepas causantes de cistitis aguda y en un 20% de las cepas causantes de bacteriuria asintomática. Esta fimbria se une a un glucoesfingolípidos específico del grupo sanguíneo P, donde el receptor activo es el digalactósido α -D-Gal-(1-4)- β -D-Gal, que le permite a la bacteria fijarse y colonizar el epitelio urinario sin ser arrastrada por la orina (Lund *et al.*, 1987; Blanco *et al.*, 1990; Strömberg *et al.*,

1990; Blanco *et al.*, 1991; Blanco *et al.*, 1992a; Blanco *et al.*, 1996; Blanco *et al.*, 1997; Manning *et al.*, 2001; Smithson, 2008).

La producción de la fimbria P es regulada por el operón cromosomal *pap* que contiene 11 genes (*papIBAHC DJKEFG*) (FIGURA 4). La estructura de la fimbria P está constituida por una subunidad mayor PapA, que en un proceso de polimerización da lugar a la fimbrillina, proteína estructural de las fimbrias P (Smithson, 2008; Hung *et al.*, 2009). La adhesina de la fimbria P es codificada por el gen *papG* y se localiza en la punta de la fimbria para adherirse directamente a la célula hospedadora. Hasta el momento se conocen 4 clases de adhesinas de PapG (clase I, II, III y IV), que fueron caracterizadas en base a su capacidad de unión al receptor (Blanco *et al.*, 1991; Manning *et al.*, 2001). Por otra parte, para que se produzca la adhesión, la proteína G tiene que estar asociada con la proteína F. Esta proteína parece ser altamente repetitiva en todas las clases de fimbrias P, lo cual tiene importancia para la elaboración de vacunas contra la pielonefritis (Blanco *et al.*, 1992a).

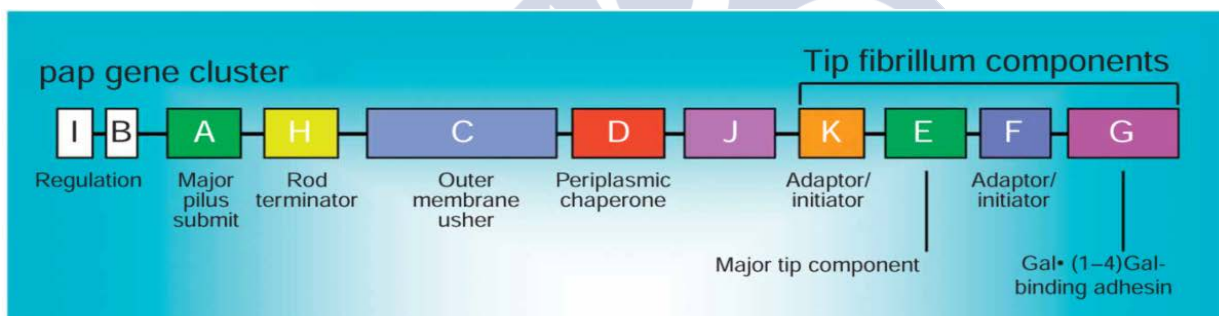


FIGURA 4. Esquema del operón *pap*. El gen *papA* codifica para la subunidad mayor, mientras que los genes *papK*, *papE*, *papF* y *papG* codifican el complejo que forma el extremo de la fimbria (Hung *et al.*, 2009).

Las fimbrias S son morfológicamente idénticas a las fimbrias tipo 1 y fimbrias P, también participan en el proceso de adhesión bacteriana a las superficies epiteliales y están asociadas especialmente con cepas de *E. coli* causantes de septicemias y meningitis. Muchas cepas uropatógenicas y septicémicas humanas expresan conjuntamente las fimbrias P y S. Ambas fimbrias tienen un patrón similar de unión en el tracto urinario, pero en la orina humana existen inhibidores (principalmente la glucoproteína de Tamm-Horsfall) que impiden la adhesión mediada por las fimbrias S. Estas fimbrias se unen a receptores celulares compuestos por

glucoconjugados que contienen ácido siálico, interaccionando con proteínas de superficie con α -sialil- β -D-(2-3)-D-galactosa (Blanco *et al.*, 1991; Stins *et al.*, 1994; Blanco *et al.*, 1997).

El operón *sfa*, que codifica para la fimbria S, consta de 9 genes (C, B, A, D, E, F, G, S y H) (FIGURA 5), de los cuales el gen *sfaA* codifica para una fimbrillina de 16 kDa, mientras que el gen *sfaS* codifica para la adhesina que ha sido localizada en la punta de la fimbria S. En el estudio realizado por Prasadarao *et al.* (1993) en células endoteliales de cerebro bovino se determinó que los glucolípidos sulfatados pueden servir como receptores para la fimbrillina, por lo que parece que al menos 2 sitios distintos de enlace en las células endoteliales del cerebro estarían relacionados en el enlace de la fimbria S: las sialo-glucoproteínas para la adhesina SfaS y los glucolípidos sulfatados para la proteína SfaA. Se especula con que la adherencia inicial de la bacteria a las células endoteliales ocurre vía receptores que contienen ácido siálico y está mediada por la adhesina SfaS. Este evento es seguido por una asociación de la bacteria a glucolípidos sulfatados expresados en la superficie celular, posiblemente para un contacto más íntimo del organismo para satisfacer los requerimientos nutricionales, lo cual puede permitir el cruce de la barrera hemato-encefálica (Moch *et al.*, 1987; Blanco *et al.*, 1992a; Prasadarao *et al.*, 1993; Stins *et al.*, 1994; Balsalobre *et al.*, 2003).

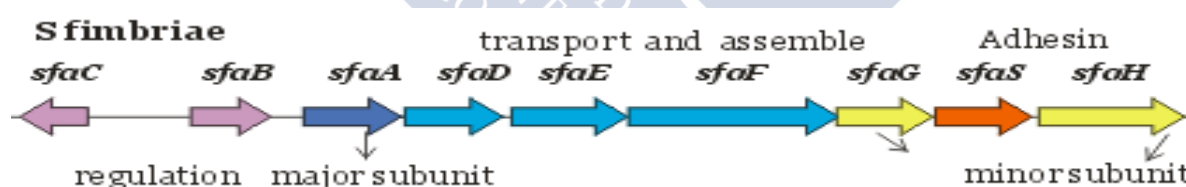


FIGURA 5. Esquema del operón *sfa*. La fimbria S está compuesta de una subunidad mayor codificada por el gen *sfaA* y 3 subunidades menores codificadas por los genes *sfaG*, *sfaS* y *sfaH*. La regulación del operón *sfa* está mediada por los genes *sfaC* y *sfaB* (Stins *et al.*, 1994; Balsalobre *et al.*, 2003).

Dentro de las adhesinas resistentes a la manosa se encuentra **la familia de adhesinas Afa/Dr**. El receptor específico de enlace no ha sido determinado para todas estas adhesinas. La mayoría de las adhesinas Afa/Dr reconocen el factor DAF (*decay-accelerating-factor*) o CD55 como receptor, el cual está expresado sobre los eritrocitos y otros tejidos como el uroepitelio. DAF es una glicoproteína reguladora del complemento que está anclada a la membrana celular mediante el fosfatidilinositol (GPI). Como se observa en la **TABLA 1**, la familia de adhesinas Afa/Dr

contiene una representativa variedad de adhesinas (Nowicki *et al.*, 1988; Blanco *et al.*, 1991; Servin, 2005).

TABLA 1. Características de la familia de adhesinas Afa/Dr.

Factor de Adhesión	Tipo	Adhesina	Hospedador	Receptores		
				Colágeno Tipo IV	DAF	CEACAMs
Afa-I	Afimbrial	AfaE1	Humana	negativo	positivo	negativo
Afa-II	Afimbrial	AfaE2	Humana	desconocido	positivo	desconocido
Afa-III	Afimbrial	AfaE3	Humana	positivo	positivo	positivo
Afa-V	Afimbrial	AfaE5	Humana	positivo	positivo	desconocido
Afa-VII	Afimbrial	AfaE7	Bovina	negativo	negativo	desconocido
Afa-VIII	Afimbrial	AfaE8	Humana, Animal	negativo	negativo	desconocido
Dr	Fimbrial	DraE	Humana	positivo	positivo	positivo
Dr-II	No Fimbrial	DraE2	Humana	positivo	positivo	negativo
F1845	Fimbrial	DaaE	Humana	positivo	positivo	positivo
Nfa-I	No Fimbrial	NfaA	Humana	positivo	positivo	desconocido
Aaf-I	Fimbrial	AggA	Humana	desconocido	desconocido	desconocido
Aaf-II	Fimbrial	AaFA	Humana	desconocido	desconocido	desconocido
Aaf-III	Fimbrial	-	Humana	desconocido	desconocido	desconocido

CEACAMs: Molécula antígeno carcinoembrionario relacionado a la adhesión celular.

Fuente: Nowicki *et al.*, 2001; Servin, 2005.

El ensamblaje estructural de los genes que codifican para la familia de adhesinas Afa/Dr tiene una organización similar, que consiste en operones que contienen al menos 5 genes (**FIGURA 6**). Los genes *afaA*, *afaB*, *afaC* y *afaD* están altamente conservados en los diferentes miembros de la familia, mientras que el gen *afaE*, que codifica para la adhesina, es más diverso. Las adhesinas AfaE-I, AfaE-III, Dr, y F1845, codificadas por los operones *afa-1*, *afa-3*, *dra* y *daa*, respectivamente, han sido las más estudiadas con respecto a su organización genética, receptor y su participación en la patogénesis (Bouguéneq *et al.*, 2001; Servin, 2005).

Estudios epidemiológicos indican que cerca del 50% de los niños con infección del tracto urinario y sobre el 30% de las mujeres embarazadas con pielonefritis son colonizadas por cepas UPEC que expresan la adhesina Dr. También se sabe que estas cepas pueden sobrevivir más de 1 año dentro del tejido renal. Esta contribución de la adhesina Dr como un factor de virulencia

capaz de promover la persistencia bacteriana dentro del tracto urinario puede ser importante (Goluszko *et al.*, 1997a; Nowicki *et al.*, 2001; Mulvey, 2002). Por otra parte, Goluszko *et al.* (1997b) propusieron la hipótesis de que el enlace de *E. coli* al intersticio renal mediante la adhesina Dr es importante para el desarrollo de la pielonefritis ascendente crónica en ratón. Encontraron en la región del parénquima dañado cantidades sustanciales del antígeno fimbrial y cambios histológicos significativos correspondientes a nefritis tubulointersticiales, incluyendo inflamación intersticial, fibrosis y atrofia tubular en el tejido renal de los ratones infectados (Goluszko *et al.*, 1997b).

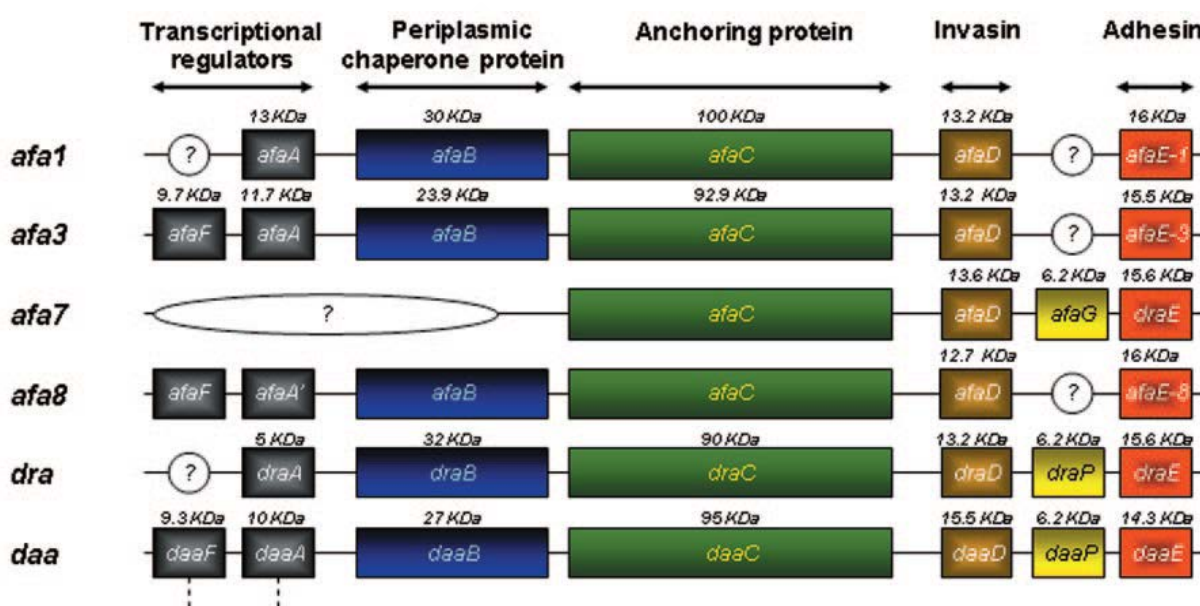


FIGURA 6. Organización genética de los operones *afa1*, *afa3*, *afa7*, *afa8*, *dra* y *daa* (Servin, 2005).

También se ha mostrado que las cepas de *E. coli* Dr positivas utilizan las balsas lipídicas para la internalización (Goluszko *et al.*, 1997a; Guignot *et al.*, 2001; Kansau *et al.*, 2004). Además del enriquecimiento en colesterol y esfingolípidos, las balsas lipídicas están enriquecidas en muchos tipos de proteínas receptoras de la superficie celular, así como en muchas proteínas señalizadoras que se unen a los receptores y son activadas por ellos (Lodish *et al.*, 2005).

Como se observa en la FIGURA 7, la *E. coli* Afa/Dr positiva se adhiere a su receptor DAF, el cual está asociado con las balsas lipídicas que actúan como plataforma para las moléculas de señalización. Una vez que la bacteria se adhiere, se da el reclutamiento de moléculas asociadas

con las balsas lipídicas como del gangliósido GM1, la proteína VIP21/caveolin y la integrina $\alpha 5 \beta 1$ receptor de la invasina Afa/Dr, que está asociada con la internalización. Posteriormente, la *E. coli* Afa/Dr entra en las células uroepiteliales mediante un mecanismo de cierre (*zipper-like*), que es dependiente del dinamismo de los microtúbulos y la activación de la fosfolipasa $C\gamma$ (PLC γ), el fosfatidilinositol 3-quinasa (PI $_3$ K), la proteína quinasa C y un aumento en la concentración de Ca^{2+} , que llevan a la reorganización de la actina, lo cual provoca que la membrana plasmática de la célula hospedadora se cierre alrededor y envuelva a la bacteria enlazada para la subsecuente internalización. La señalización en relación a Cdc42 (GTPasa-Rho) lleva a la elongación de pseudópodos (extensiones de la membrana plasmática). Las señalizaciones relacionadas a MAPKs (proteínas quinasas activadas por mitogenos) llevan a respuestas proinflamatorias, incluyendo la producción de interleucina 8 y la trans migración de los polimorfonucleares (Servin, 2005).

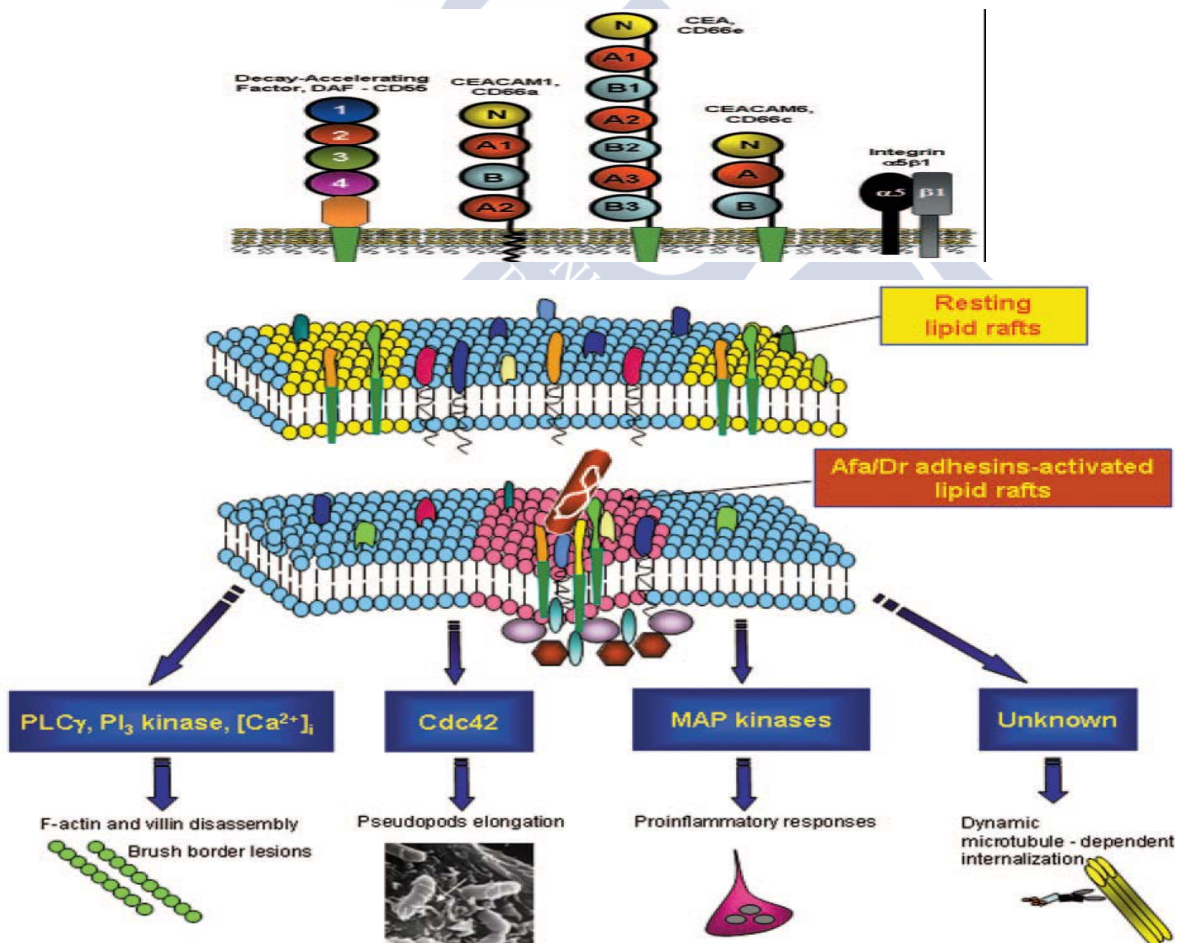


FIGURA 7. Funciones de las balsas lipídicas y vías de señalización en la patogenicidad de las cepas Afa/Dr. Los receptores de las adhesinas Afa/Dr se encuentran asociados a las balsas lipídicas. DAF actúa como receptor para todas las adhesinas Afa/Dr. La CEACAM1, CEA y CEACAM6 actúan como receptores para AfaE-III, Dr y F1845, respectivamente y la integrina $\alpha 5 \beta 1$ actúa como receptor para la Afa/Dr invasina. La internalización vía balsas lipídicas desencadena eventos que involucran complejas señalizaciones como la reorganización del citoesqueleto, la formación de pseudópodos y las respuestas proinflamatorias (Servin, 2005).

1.3.1.2. Toxinas

Muchas cepas ExPEC producen toxinas tales como la α -hemolisina, CNF (*cytotoxic necrotizing factor*), SAT (*secreted autotransporter toxin*) y CDT (*cytolethal distending toxin*), siendo frecuentes las que producen conjuntamente α -hemolisina y CNF (Blanco *et al.*, 1990; Blanco *et al.*, 1991; Blanco *et al.*, 1992b).

La α -hemolisina (HlyA) es una citotoxina calcio dependiente. Se considera un importante factor de virulencia de las *E.coli* que causan ITU, sepsis, apendicitis, peritonitis y otras infecciones extraintestinales. Para actuar sobre las células blanco la α -hemolisina no requiere de la presencia de receptores específicos. Actúa insertándose como monómero en la membrana citoplasmática, provocando la aparición de poros hidrofílicos de aproximadamente 2 nm de diámetro. Varios estudios han demostrado que la α -hemolisina contribuye a la virulencia al facilitar el crecimiento de los microorganismos en los tejidos corporales gracias al suministro de iones Fe^{+3} , mediante la lisis de las células hospedadoras en presencia de niveles elevados de α -hemolisina (Linggood y Ingram, 1982; Waalwijk *et al.*, 1983; Wiles *et al.*, 2008).

En la **FIGURA 8**, se muestra que la α -hemolisina en concentraciones sublétricas puede modular una variedad de vías de señalizaciones del hospedador, incluyendo la estimulación transitoria de la oscilación de calcio, la activación de la señalización de MAPKs y la alteración de la fosforilación de histonas (Ratner *et al.*, 2006; Hamon *et al.*, 2007). También media la estimulación de las vías de la inflamación, de la apoptosis y potencialmente estimula la inactivación de la quinasa serina/treonina (Akt), la cual juega un papel central en la progresión del ciclo celular del hospedador, metabolismo, tráfico vesicular, supervivencia y vías de señalización de la inflamación (Wiles *et al.*, 2008). Por otra parte, el estudio *in vitro* realizado por Hilbert *et al.* (2012) muestra que la *E. coli* utiliza la α -hemolisina para inhibir la producción de citoquinas por las células epiteliales de la vejiga. Estos autores encontraron que la citotoxicidad, la supresión de citoquinas y la producción de α -hemolisina estaban fuertemente relacionados en los aislados clínicos.

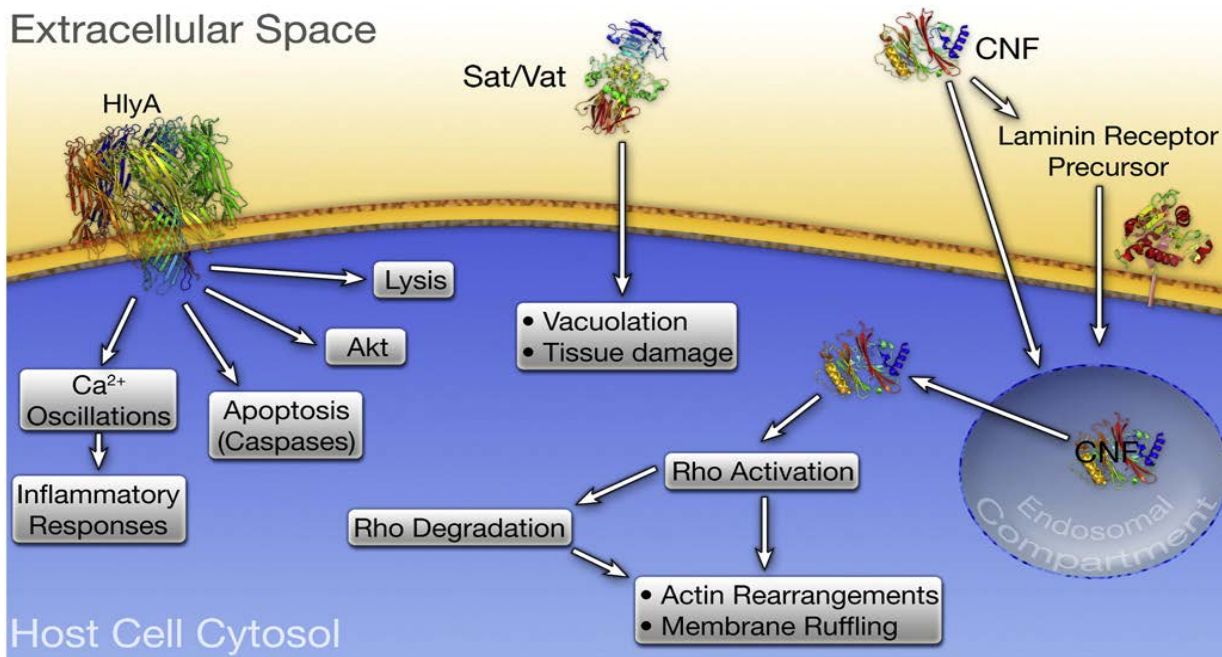


FIGURA 8. Toxinas asociadas a UPEC. (izquierda) La α -hemolisina a altas concentraciones promueve la lisis celular del hospedador, mientras que a concentraciones sublétricas puede modular cascadas de señalización afectando la supervivencia de la célula hospedadora y la respuesta inflamatoria. (medio) La toxina SAT induce la vacuolización y otros efectos citopáticos, dañando principalmente el tejido del hospedador. (derecha) La endocitosis de CNF ocurre a través del receptor precursor laminina (glucoproteína que forma parte de la lámina basal). Las condiciones dentro del compartimiento del endosoma estimulan la translocación del dominio catalítico de CNF dentro del citosol del hospedador, donde activa la GTPasa-Rho (Wiles *et al.*, 2008).

Las proteínas responsables de la síntesis y secreción de la α -hemolisina están codificadas por el operón *hly*, que está formado por 4 genes (*hlyA*, *hlyB*, *hlyC* y *hlyD*) que pueden estar localizados en el cromosoma bacteriano o en plásmidos. El gen *hlyA* codifica para una proteína precursora (pre-hemolisina) de 110 kDa. El gen *hlyC* codifica una proteína de 170 aminoácidos de localización citoplasmática y responsable de la activación de la proteína HlyA mediante acilación. Los genes *hlyB* y *hlyD* codifican para las proteínas que intervienen en la secreción de la toxina activa y conforman, junto con la proteína TolC, el sistema de secreción de proteínas tipo I (Blanco *et al.*, 1992a; Pons, 2006).

Se han descrito 3 tipos de factores necrotizantes citotóxicos (CNFs): CNF1, CNF2 y CNF3. CNF1 es producido por cepas de *E. coli* que causan infecciones extraintestinales en humanos y animales. Fue descubierto por Caprioli *et al.* (1983). Es una proteína de cerca de 115 kDa que causa necrosis en la piel de conejo cuando se inyecta por vía intradérmica. También provoca multinucleación de las células HeLa, Vero y CHO (Caprioli *et al.*, 1984; De Rycke *et al.*, 1990;

Falbo *et al.*, 1992; Boquet, 2001). CNF2 es una proteína de 110 kDa descubierta por De Rycke *et al.* (1987). Esta toxina es producida por cepas aisladas de terneros y corderos con diarrea (Oswald *et al.*, 1989). Induce una multinucleación celular ligeramente diferente a la que produce CNF1 (De Rycke *et al.*, 1990; Falbo *et al.*, 1992). CNF3 fue descrita por Orden *et al.* (2007). La toxina fue detectada en cepas aisladas de corderos y cabras sanas, pero también se aislaron esporádicamente cepas CNF3⁺ de terneros, corderos y cabras con diarrea. Mientras CNF1 y CNF3 están codificados en el cromosoma bacteriano, los genes que codifican CNF2 se localizan en un plásmido (Orden *et al.*, 2007; Knust y Schmidt, 2010).



FIGURA 9. Estructura esquemática de CNF1. Los números indican los residuos de aminoácidos delimitando los diferentes dominios de la toxina (Boquet, 2001).

Los CNFs pertenecen al tipo de toxinas A-B, como se observa en la **FIGURA 9**, donde B es el dominio amino-terminal que se enlaza al receptor celular. Este dominio ha sido delimitado a los primeros 190 residuos de la toxina, en el cual una extensión de 53 a 75 aminoácidos juegan un papel importante en el enlace de CNF a la célula. El dominio central se extiende desde el residuo 190 hasta el 720. Contiene estructuras hidrofóbicas que juegan un papel en la translocación de la toxina a través de la membrana en el endosoma tardío. El dominio catalítico “A” está localizado en el extremo carboxi-terminal de la toxina, el cual tiene la actividad de desaminación (Boquet, 2001).

En las **FIGURAS 8 y 10** observamos que la toxina CNF1 se enlaza a su receptor de la superficie celular, y posteriormente es endocitada y transportada dentro de un endosoma precoz. Luego este endosoma es acidificado, lo que lleva a un cambio conformacional de la toxina, y mediante las estructuras hidrofóbicas del dominio central, se inserta dentro de la membrana de la vesícula. De esta manera facilita la translocación del dominio catalítico de la toxina hacia el

citósol, donde los CNFs cumplen la función de desaminación de las proteínas GTPasas-Rho (Fabbri *et al.*, 1999; Boquet, 2001; Knust *et al.*, 2009; Knust y Schmidt, 2010).

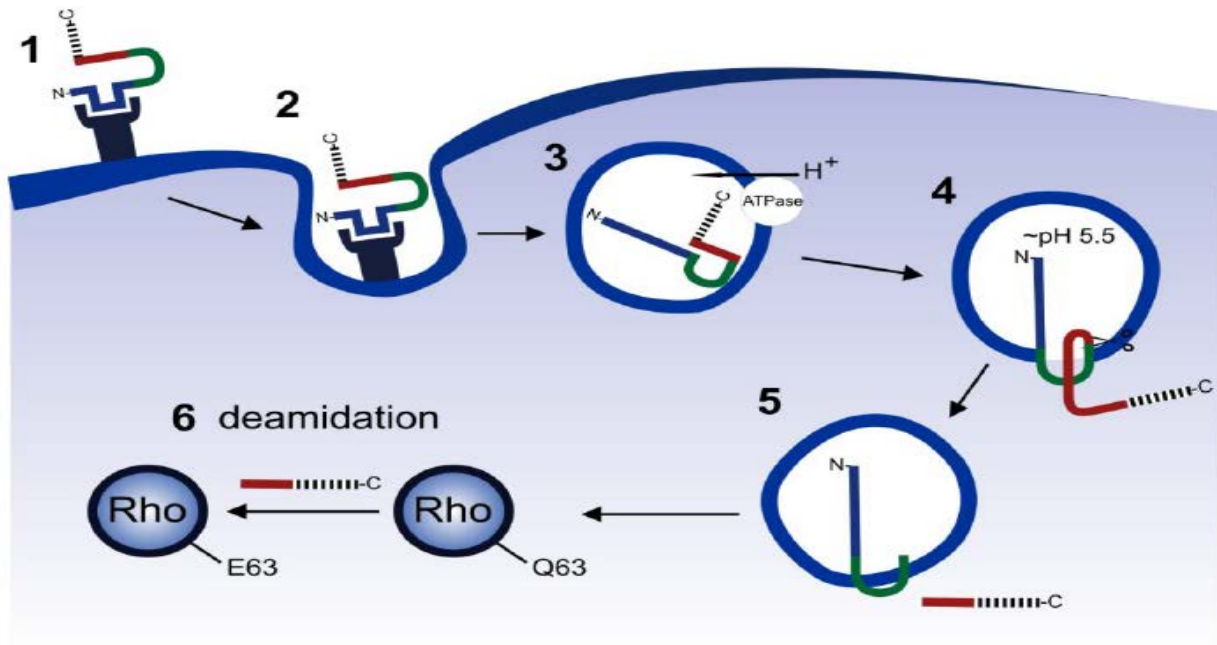


FIGURA 10. Internalización celular de CNF1. 1) Enlace al receptor laminina de CNF1 mediante el dominio amino-terminal. 2) El receptor media la endocitosis. 3) Acidificación del endosoma precoz. 4) Cambio conformacional de CNF1 debido al medio ácido e inserción en la membrana vesicular mediante el dominio de translocación. 5) Fragmentación de la toxina por una serina proteasa y liberación del dominio catalítico. 6) Desaminación de la proteína Rho (Knust y Schmidt, 2010).

La desaminación lleva a la activación constitutiva de las GTPasas-Rho. Las GTPasas de la familia Rho (Cdc42, Rac y RhoA) han sido identificadas como un blanco común de las toxinas bacterianas. Estas GTPasas son reguladoras de las vías de señalización que unen los estímulos extracelulares o intracelulares al ensamblaje y organización de la actina del citoesqueleto. También participan en las vías de señalización que activan cascadas de quinasas que regulan la expresión génica, la endo y exocitosis, la proliferación celular y la apoptosis (Boquet, 2001; Knust *et al.*, 2009; Knust y Schmidt, 2010).

Como se observa en la **FIGURA 11**, las proteínas Rho funcionan como interruptores moleculares en las diversas vías de señalización, activas en su forma unida a GTP e inactivas en la forma unida a GDP. La conversión del estado inactivo al activo está mediada por GEF (*Guanine-nucleotide Exchange Factor*, factor intercambiador de nucleótido de guanina), que

cataliza la liberación del nucleótido enlazado (GDP), y se da el cambio por GTP. Las proteínas Rho retornan al estado inactivo por medio de la actividad intrínseca de la misma GTPasa o por la hidrólisis de GTP, que es catalizada por GAP (*GTPase Activating Protein*, proteínas activadoras de GTPasas). Otro factor adicional regulador de la actividad de las GTPasas-Rho son los GDIs (*GDP-dissociation Inhibitors*, inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina), que secuestran las proteínas Rho unidas a GDP en el citoplasma o median el transporte de las GTPasas activadas a otras localizaciones celulares. Los CNFs catalizan la desaminación de la glutamina 63 de las GTPasas-Rho (o la glutamina 61 en Rac y Cdc42) generando ácido glutámico y como estas glutaminas son cruciales para la actividad intrínseca de las GTPasas y de GAP, el retorno al estado inactivo es bloqueado, lo cual provoca un continuo efecto de activación de las GTPasas (Boquet, 2001; Knust *et al.*, 2009; Knust y Schmidt, 2010).

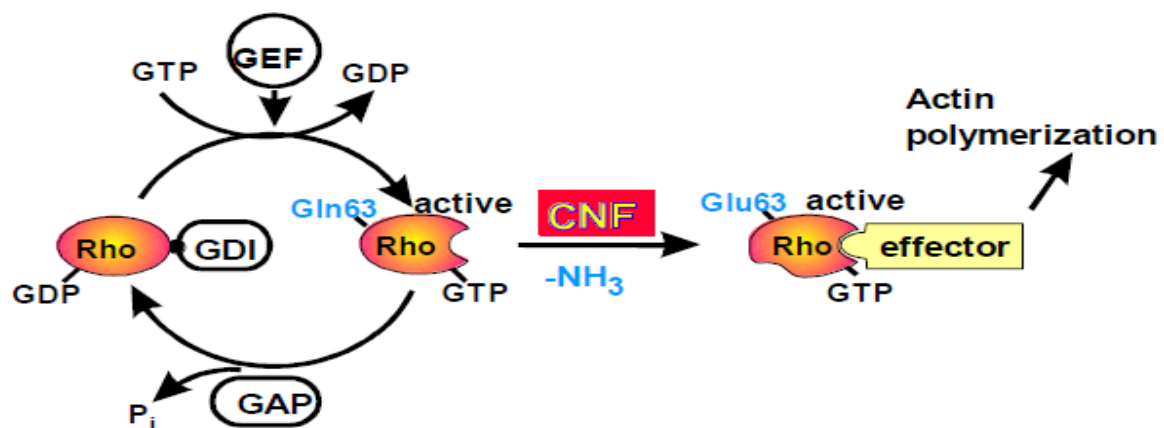


FIGURA 11. Activación de la GTPasa-Rho por CNFs. Los CNFs desaminan la glutamina 63 de RhoA, generando ácido glutámico. Esto lleva al bloqueo de la hidrólisis de GTP y la activación constitutiva de la proteína G (Knust y Schmidt, 2010).

La activación constitutiva de RhoA lleva a la formación de fibras de estrés, las cuales son haces contráctiles de filamentos paralelos de actina y miosina. La activación de Rac lleva a la formación de lamelipodios (prolongaciones transitorias de la membrana celular), los cuales requieren una organización similar a una red de los filamentos de actina. La toxina también induce la formación de filopodios (proyecciones citoplasmáticas delgadas) debido a la activación de la vía dependiente de Cdc42 (Knust y Schmidt, 2010). Por otra parte, CNF1, mediante la activación de las proteínas GTPasas-Rho en los leucocitos polimorfonucleares, afecta drásticamente a la arquitectura del citoesqueleto, induciendo un incremento en el contenido de la actina F, lo cual provoca alteraciones en las características funcionales de los

polimorfonucleares, como la generación de superóxidos, pero significativamente decrece su función fagocítica (Hofman *et al.*, 2000). El sustrato específico difiere entre los CNFs: CNF2 preferentemente modifica RhoA y Rac, mientras que CNF1 y CNF3 desaminan RhoA, Rac y Cdc42. CNF3 activa RhoA más fuerte que CNF1 (Sugai *et al.*, 1999; Stoll *et al.*, 2009).

La toxina SAT fue descrita por Guyer *et al.* (2000). Identificaron una proteína autotransportadora de 107 kDa que era expresada más significativamente por cepas de *E. coli* asociadas con los síntomas clínicos de pielonefritis aguda que por cepas fecales (Maroncle *et al.*, 2006). La proteína Sat, de acuerdo a sus características, pertenece a uno de los subgrupos de la familia de autotransportadores SPATEs (*serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae*). Estas proteínas utilizan el sistema de secreción de proteínas tipo V para dirigir su propia exportación (FIGURA 12). Una vez transportada a la superficie celular bacteriana, el dominio pasajero (proteína madura) puede permanecer adherido a la membrana externa o ser liberado por fragmentación proteolítica. Se ha demostrado que la proteína madura Sat tiene un efecto citopático en varias líneas celulares, que provoca daño glomerular y una fuerte respuesta de anticuerpos en ratones infectados transuretralmente con la cepa de *E. coli* CFT073 (Guyer *et al.*, 2000; Guyer *et al.*, 2002).

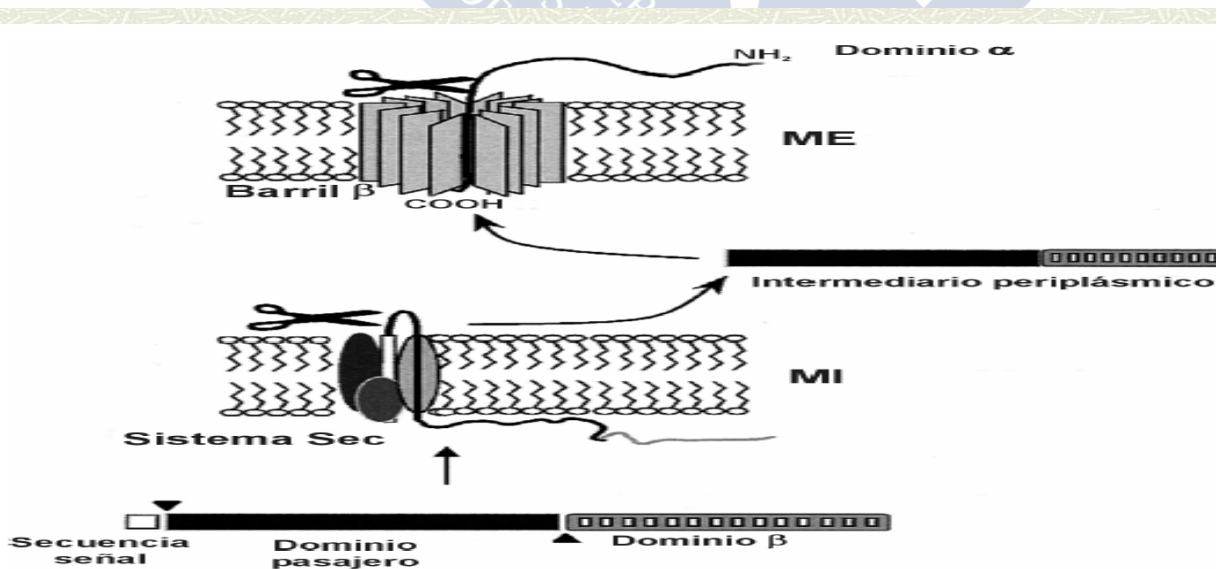


FIGURA 12. Sistema de secreción de proteínas tipo V. La proteína a secretarse presenta 3 regiones: 1) Una secuencia señal localizada en el extremo amino-terminal, que permite atravesar la membrana interna. 2) Un dominio pasajero (proteína madura) en el cual el fenotipo de cada proteína está distribuida. 3) Un dominio autotransportador β en el extremo carboxi-terminal, que permite la secreción a través de la membrana externa formando una estructura de barril-β con 10 a 18 hebras antiparalelas, a través del cual se transporta el dominio pasajero. Una vez que la proteína se localiza en la superficie celular, es liberada por proteólisis (González-Pedrajo y Dreyfus, 2003).

El estudio realizado por Maroncle *et al.* (2006) muestra que el sitio activo de Sat (actividad serina proteasa) es necesario para la actividad citotóxica y proteasa, contracción del citoesqueleto y alteración del citoesqueleto de actina o de proteínas asociadas al citoesqueleto en cultivos de células de vejiga y riñón, pero no para el procesamiento o la liberación de la toxina desde la superficie bacteriana. Demostraron que la toxina Sat es internalizada y localizada específicamente en la fracción del citoesqueleto de las células epiteliales de la vejiga y riñón, donde Sat probablemente está asociada con la degradación de fodrina (proteína del citoesqueleto). Las proteínas fodrina/espectrina están relacionadas con la estabilización de la estructura de la membrana, manteniendo de esta manera la forma de la célula y enlazan los filamentos de actina con la membrana plasmática. Sat es capaz de degradar las cadenas α y β de espectrina y la α -fodrina. De esta forma altera el citoesqueleto, lo cual puede explicar el elongamiento, el erizamiento y desprendimiento de la membrana en células urinarias (Maroncle *et al.*, 2006). Por otra parte, en cultivos de células epiteliales de vejiga y riñón, la incubación con Sat provoca dramáticas vacuolizaciones dentro del citoplasma, así como daños histológicos, particularmente en el glomérulo y túbulo proximales. Aunque Sat no es requerida para la colonización del tracto urinario, por su actividad citopática que daña el tejido del hospedador, puede incrementar la habilidad de *E. coli* para propagarse. Se podría especular que el daño específico del glomérulo y túbulo proximal pueden facilitar la entrada de cepas en el torrente sanguíneo (Guyer *et al.*, 2002). El gen *sat* está localizado en la isla de patogenicidad PAI II de la cepa de *E. coli* CFT073 (Guyer *et al.*, 2000; Phillips *et al.*, 2000).

La toxina CDT, fue descrita por primera vez por Johnson y Lior en 1987, como una toxina que es activa sobre las células HeLa, Hep-2, CHO y Vero, en las cuales causa un distintivo y progresivo alargamiento nuclear y citoplasmático, provocando posteriormente la muerte celular (Johnson y Lior, 1987; Johnson y Lior, 1988; Pickett y Whitehouse, 1999; Jinadasa *et al.*, 2011). En cepas de *E. coli* asociadas con infecciones intestinales y extraintestinales, la producción de CDT ha sido relacionada con varios serotipos (Tóth *et al.*, 2003; Pickett *et al.*, 2004; Asakura *et al.*, 2007; Dubois *et al.*, 2010).

Los genes de la toxina CDT han sido clonados y secuenciados por Scott y Kaper (1994), encontrando que la actividad de CDT es codificada por 3 genes relacionados y designados como *cdtA*, *cdtB* y *cdtC*, los cuales codifican para las correspondientes subunidades proteicas CdtA, CdtB y CdtC, con pesos moleculares aproximados de 23-30 kDa, 28-29 kDa y 19-21 kDa,

respectivamente. Se han encontrado al menos 5 variantes diferentes de CdtB (Cdt-I, II, III, IV y V) en cepas de *E. coli* asociadas con diferentes síndromes (Pickett y Whitehouse, 1999; Tóth *et al.*, 2003; McSweeney y Dreyfus, 2004; Asakura *et al.*, 2007). Las toxinas Cdt-I, Cdt-II y Cdt-IV han sido detectadas en cepas de *E. coli* que causan infecciones gastrointestinales y urinarias en humanos (Tóth *et al.*, 2003; Pickett *et al.*, 2004; Asakura *et al.*, 2007; Dubois *et al.*, 2010), mientras Cdt-III fue detectada en cepas aisladas de humanos con diarrea y de animales con diarrea o septicemia (Pickett y Whitehouse, 1999; Tóth *et al.*, 2003; Bielaszewska *et al.*, 2004; Jinadasa *et al.*, 2011). La Cdt-V fue detectada en cepas de *E. coli* O157 aisladas de humanos con diarrea o síndrome hemolítico urémico (Bielaszewska *et al.*, 2004). Las Cdts I, II, IV y V son codificadas por genes cromosómicos (Asakura *et al.*, 2007; Jinadasa *et al.*, 2011), mientras que el operón que codifica para Cdt-III se localiza en un plásmido conjugativo llamado pVir (Jinadasa *et al.*, 2011).

Como se muestra en la **FIGURA 13**, la toxina CDT está compuesta por 3 subunidades, CdtA, CdtB y CdtC. A la subunidad CdtB se le atribuye la función de actividad catalítica, actividad de DNasa, debido a que el ADN cromosómico es el blanco de acción de la toxina. Las subunidades CdtA y CdtC son responsables del enlace y/o internalización de la toxina CDT (McSweeney y Dreyfus, 2004; McSweeney y Dreyfus, 2005; Jinadasa *et al.*, 2011). Después del enlace al receptor, el cual está localizado dentro de las balsas lipídicas de la membrana celular, la subunidad CdtB es internalizada por endocitosis en una vesícula recubierta por clatrina (proteína que recubre las vesículas en el proceso de transporte entre membranas) y dirigida por transporte retrógrado hacia el retículo endoplasmático vía complejo Golgi. Posteriormente, mediante una secuencia señal de localización nuclear, llega al núcleo y rompe la doble cadena de ADN, lo cual inicia la cascada de eventos que lleva a la muerte celular (McSweeney y Dreyfus, 2004; Jinadasa *et al.*, 2011).

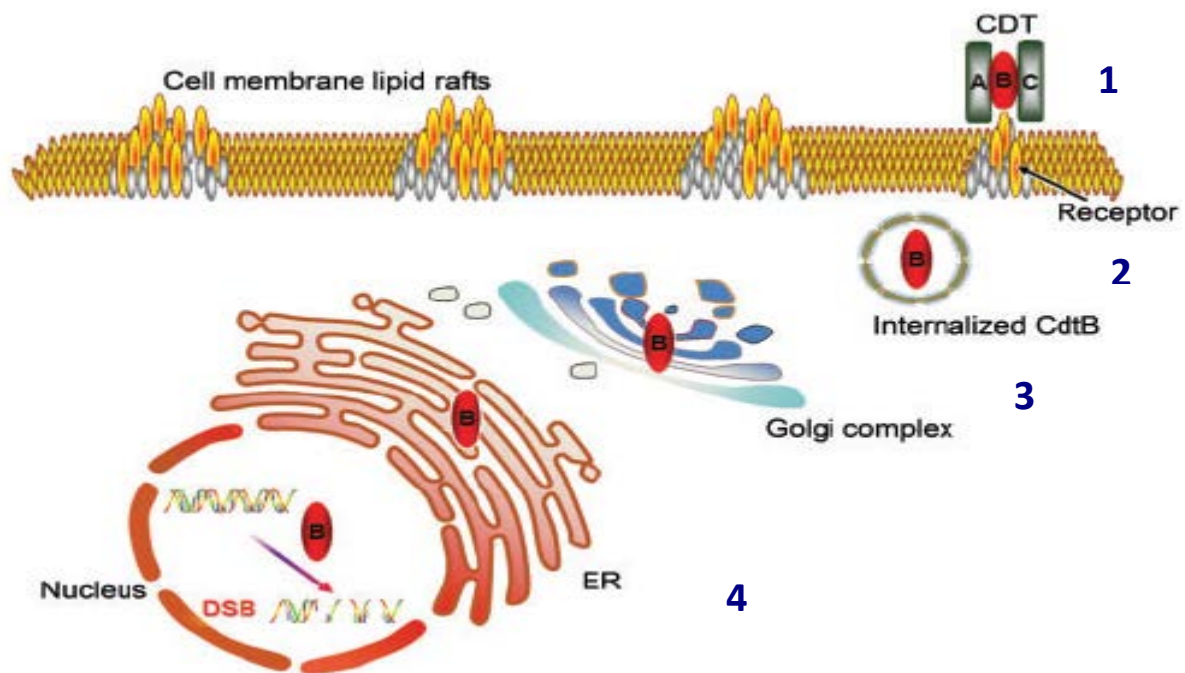


FIGURA 13. Internalización y transporte intracelular de CDT en células de mamíferos. 1) Enlace de la toxina heterotrimérica al receptor localizado dentro de las balsas lipídicas de la membrana celular. 2) Endocitosis de la subunidad activa. 3) Transporte retrogrado vía complejo Golgi y retículo endoplásmico. 4) La señal de localización nuclear media el transporte activo hacia el núcleo (Jinadasa *et al.*, 2011).

1.3.1.3. Sideróforos

El hierro es un compuesto esencial para la mayoría de los organismos vivos. En los vertebrados superiores el hierro se asimila desde la dieta y se transporta en la sangre unido a la transferrina (Pattus y Abdallah, 2000; Balado, 2009). La limitación de la disponibilidad de hierro afecta al crecimiento de prácticamente cualquier especie bacteriana. Es por ello que en el caso de las bacterias patógenas la adquisición de hierro es uno de los principales pasos en su desarrollo dentro del hospedador. Los sistemas de captación de hierro presentes en los microorganismos patógenos juegan un papel clave en el establecimiento de la infección, por lo que la capacidad de obtención de hierro es uno de sus principales factores de virulencia. Las cepas ExPEC, como las cepas de *E. coli* en general, poseen múltiples mecanismos de adquisición de hierro, que incluyen sideróforos y receptores de sideróforos (Raymond *et al.*, 2003). Uno de los más utilizados es la secreción de sideróforos. La elevada afinidad de los

sideróforos por el Fe^{+3} le permite competir no solo por el hierro libre sino también arrebatarlo de fuentes de reserva del hospedador tales como la ferritina (Balado, 2009).

En las bacterias gramnegativas, el hierro biodisponible debe atravesar la membrana externa hasta el periplasma y de ahí ser internalizado al citoplasma a través de la membrana celular. Para ello, la célula posee receptores de membrana externa y un complejo Ton que le suministra la energía necesaria para el transporte del hierro al periplasma. El complejo Ton es una unidad funcional integrada por 3 proteínas (TonB, ExbB y ExbD) anclado en la membrana citoplasmática. El paso del hierro a través de la membrana citoplasmática se realiza a través de un mecanismo de tipo *ATP binding cassette* (ABC). El transportador de este tipo mejor caracterizado es el sistema fhuBCD de *E. coli* (Garrido, 2005).

Las cepas UPEC producen hasta 4 diferentes sideróforos: enterobactina y salmoquelina (sideróforos catecolates), aerobactina y yersiniabactina (sideróforos de tipo hidroxamato). Para la adquisición de hierro mediante sideróforos se requiere de 5 pasos: 1) síntesis del sideróforo en el citoplasma, 2) exportación del sideróforo, 3) recepción del complejo sideróforo-hierro, 4) internalización y 5) liberación del hierro en el citoplasma (Garenaux *et al.*, 2011). **La aerobactina** es un sideróforo producido por algunas cepas de *E. coli*. Como se observa en la **FIGURA 14**, el sistema para la biosíntesis de la aerobactina lo componen 5 genes: 4 (*iucA*, *iucB*, *incC* y *iucD*) están relacionados con la síntesis y el gen *iutA* codifica para el receptor de la membrana externa (de Lorenzo *et al.*, 1986; de Lorenzo y Neilands, 1986; Garenaux *et al.*, 2011).

Hasta el momento se desconoce el mecanismo por el cual la aerobactina es exportada. Una vez en el medio extracelular el sideróforo se une al Fe^{+3} . Luego, cuando el complejo hierro-sideróforo se enlaza al receptor, TonB es reclutado para transferir energía al receptor e inducir un cambio conformacional que permite la internalización de hierro-sideróforo en el espacio periplasmático. Posteriormente la proteína transportadora FhuD transfiere el complejo hierro-sideróforo desde el receptor IutA hasta el sistema de transporte de la membrana interna FhuBCD (**FIGURA 15**). Una vez en el citoplasma el Fe^{+3} debe ser liberado del complejo hierro-sideróforo. Los mecanismos básicos para liberar el metal consisten en la reducción del ión (Fe^{+3} a Fe^{+2}) mediante reductasas o la hidrólisis del sideróforo (Neilands, 1995; Balado, 2009; Garenaux *et al.*, 2011).

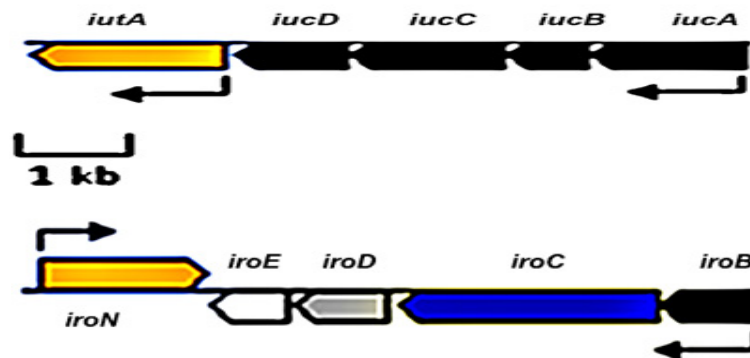


FIGURA 14. Grupo de genes que codifican para aerobactina y salmoquelina. Genes que codifican para la biosíntesis (flecha negra), exportación (flecha azul), recepción (flecha amarilla) y degradación (flecha gris) (Garenaux *et al.*, 2011).

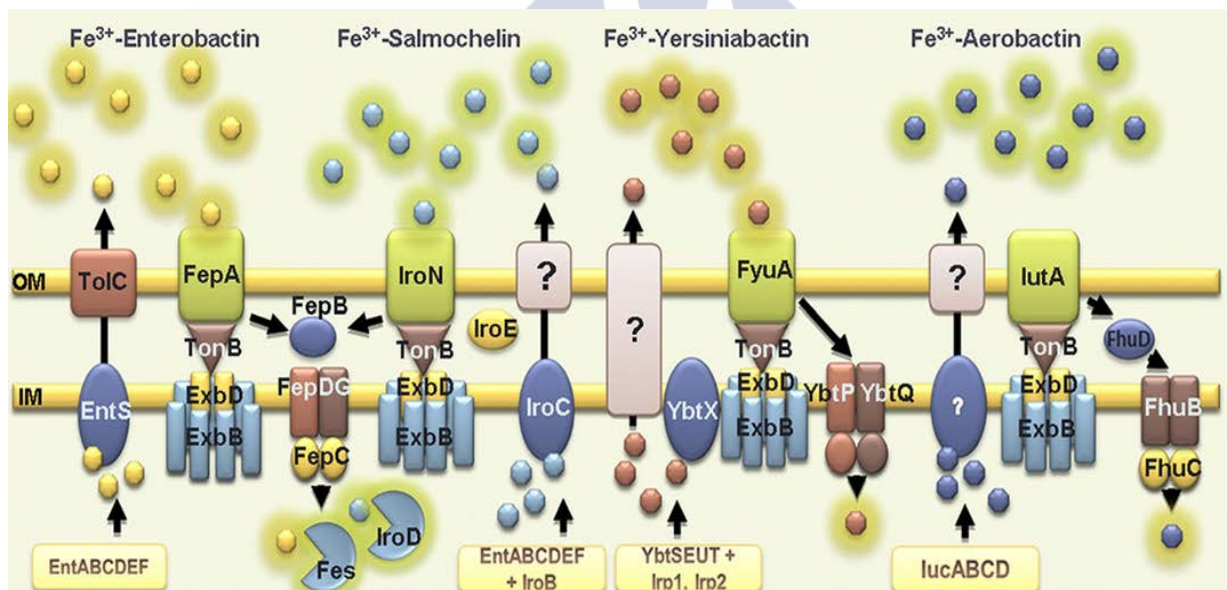


FIGURA 15. Modelo de diferentes sistemas que contribuyen a la captación de hierro mediante sideróforos en *E. coli*. En el rectángulo amarillo se indican las proteínas relacionadas con la síntesis de cada uno de los 4 tipos de sideróforos. Los exportadores de membrana son indicados en azul oscuro. Los receptores de membrana externa son indicados en verde claro y están asociados con el complejo TonBExbDB requeridos para la transducción de energía y la subsecuente internalización de sideróforos dentro del espacio periplásmico. El transportador (ABC) es mostrado en la membrana interna. Los signos de interrogación indican los pasos donde aún no se han determinado los mecanismos (Garenaux *et al.*, 2011).

En la mayoría de las cepas de *E. coli*, los genes responsables para la biosíntesis y transporte de aerobactina están localizados en el plásmido pColV-K30, pero excepcionalmente también pueden estar localizados en el cromosoma bacteriano (de Lorenzo *et al.*, 1986; de Lorenzo y Neilands, 1986; Garenaux *et al.*, 2011). Por otra parte, en el estudio realizado por García *et al.* (2011) en ratones, en un modelo de infección del tracto urinario, se muestra que la aerobactina es más importante en UPEC para colonizar el tracto urinario que la utilización de enterobactina o salmoquelina. En otro estudio, la aerobactina muestra ser más efectiva que la enterobactina en la entrega de hierro a *E. coli* a bajas concentraciones del sideróforo (Williams y Carbonetti *et al.*, 1986).

La salmoquelina es un sideróforo que está relacionado con la virulencia de cepas ExPEC. Los genes responsables para la biosíntesis y transporte de salmoquelina son generalmente codificados en los plásmidos ColV o ColBM, aunque también pueden ser codificados en PAIs (*pathogenicity islands*) en algunas cepas. Una región contiene los genes *iroB*, *iroC*, *iroD* e *iroE*, y la otra contiene el gen *iroN* que codifica para el receptor de salmoquelina (**FIGURAS 14 y 15**) (Sorsa *et al.*, 2003; Garenaux *et al.*, 2011). El gen *iroN*, descrito en 1999, codifica la síntesis de la proteína IroN, un receptor de sideróforo catecolate y significativamente más prevalente en cepas de *E. coli* aisladas del tracto urinario y sangre que en cepas aisladas de heces (Russo *et al.*, 1999; Russo *et al.*, 2002). El estudio realizado por Feldmann *et al.* (2007) muestra que IroN, como receptor del sideróforo salmoquelina, también contribuye a la invasión de las células uroepiteliales por cepas ExPEC. Finalmente, de acuerdo a las demostraciones previas del papel de IroN en la virulencia, su expresión en fluidos biológicos humanos y su prevalencia entre cepas ExPEC, se le considera como un candidato potencial para la elaboración de vacunas (Russo *et al.*, 1999; Russo *et al.*, 2003; Sorsa *et al.*, 2003; Feldmann *et al.*, 2007; Garenaux *et al.*, 2011).

1.3.1.4. Antígeno capsular K

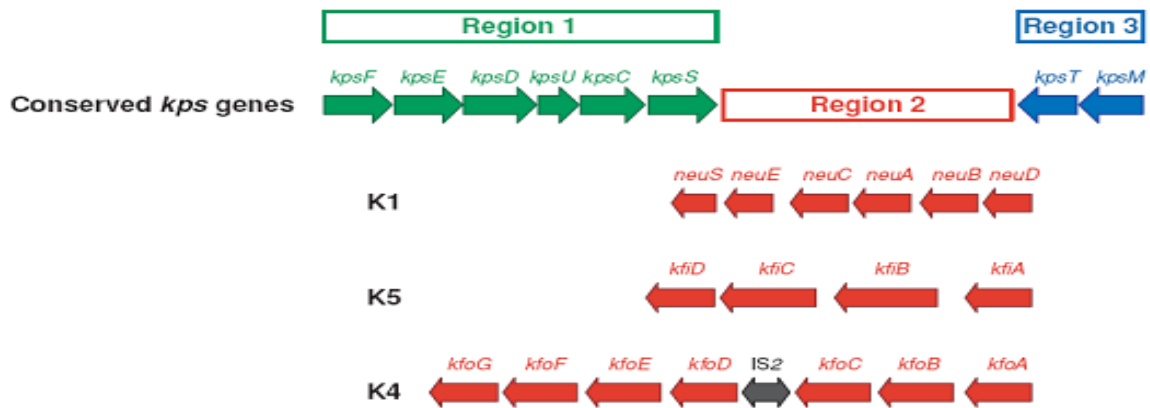
Los polisacáridos capsulares son estructuras que se encuentran sobre la superficie celular de un amplio rango de especies bacterianas. Los polisacáridos capsulares a menudo constituyen la capa más externa de la célula, por lo cual pueden directamente mediar interacciones entre la bacteria y su entorno inmediato, y han sido implicados como un importante factor de virulencia de muchos patógenos. Entre las funciones de los polisacáridos capsulares se

encuentran la prevención a la desecación, la adherencia y la resistencia al sistema inmune no específico y específico. Están compuestos de unidades repetidas de monosacáridos unidos por enlaces glucosídicos. También pueden ser homo o heteropolímeros, y pueden ser sustituidos por moléculas orgánicas e inorgánicas. Como resultado los polisacáridos capsulares pueden ser increíblemente diversos no solo por las diferentes unidades de monosacáridos, sino también en como estas unidades están unidas. En el caso de la *E. coli* se han descrito casi 80 variedades del antígeno K de acuerdo a sus propiedades serológicas, de los cuales una pequeña fracción están asociados con infecciones invasivas (Roberts, 1996; Whitfield, 2006).

Los antígenos K de *E. coli* se han dividido en 4 grupos (IA, IB, II y III) en base a sus propiedades biológicas, químicas y genéticas. Los grupos IA y IB se encuentran en aislados de *E. coli* que causan infecciones intestinales (EPEC, ETEC y EHEC) y las cápsulas de los grupos II y III se encuentran en cepas que causan infecciones extraintestinales. Las cápsulas del grupo II y III son termolábiles, tienen una carga de densidad alta, tienen menor peso molecular que las del grupo I y contienen ácido hexurónico, ácido N-acetilneuramínico (NeuNAc) o ácido 2-keto-3-deoximanno-octónico (KDO) como componentes ácidos (Roberts, 1996; Clarke *et al.*, 1999; Whitfield, 2006).

Los genes que codifican para la cápsula de los grupos II y III son denominados *kps* y han sido localizados cerca del gen *serA* (codifica la biosíntesis de serina) en el cromosoma de *E. coli*. El detallado análisis molecular del *cluster* de genes del antígeno K del grupo II revela que tienen una organización genética conservada que consta de 3 regiones funcionales como se observa en la **FIGURA 16**. El *cluster* de genes de las regiones 1 y 3 son conservados entre los diferentes antígenos K del grupo II y participan en un rango de actividades relacionadas con la exportación y ensamblaje de la cápsula en la superficie celular. La región central 2 es serotipo específica. La mutación en la región 2 anula la biosíntesis de polisacáridos, lo cual sugiere que esta región codifica enzimas para la síntesis de un antígeno K en particular (K1, K2, K4, K5, K12, K13, K92, K100). En el caso del antígeno K1, la región 2 codifica 3 enzimas que están relacionadas en la biosíntesis y activación de NeuNAc. La región 1 contiene 6 genes que son *kpsFEDUCS*; y la región 3 contiene los genes *kpsM* y *kpsT* (Roberts, 1996; Whitfield, 2006).

GRUPO II



GRUPO III



FIGURA 16. Organización de los genes requeridos para la expresión de las cápsulas de los grupos II y III. En el grupo II, los genes de la región 3 codifican para el transportador (ABC). Los productos de los genes de la región 1 están relacionados en la exportación y translocación de polímeros. Los genes de la región 2, codifican enzimas para la biosíntesis de polímeros. En el grupo III la organización genómica es diferente al del grupo II, pero sus estructuras y funciones son similares. Los genes *kpsM* y *kpsT* codifican para las proteínas KpsM y KpsT que son componentes del transportador (ABC) y el gen *kpsE* codifica para la proteína KpsE que posee características similares a las proteínas de fusión de la membrana, que facilitan el paso de grandes moléculas a través del periplasma (Whitfield, 2006).

El análisis genético preliminar del *cluster* de genes de la cápsula K10 y K54 sugiere que las cápsulas del grupo III tienen una organización genética conservada. La organización genómica de estos genes es diferente a la del grupo II. Contiene una región central serotipo específica (K3, K10, K54), denominada región 2, que está flanqueada por la región 1, que contiene 4 genes *kpsD*, *kpsM*, *kpsT* y *kpsE*, y la región 3, que contiene los genes *kpsC* y *kpsS* (**FIGURA 16**) (Roberts, 1996; Russo *et al.*, 1998; Clarke *et al.*, 1999; Whitfield, 2006).

1.3.1.5. Antígeno somático O

La membrana externa de las bacterias gramnegativas se encuentra en contacto con el medio exterior, por lo que sus características son cruciales para la supervivencia de la bacteria en diferentes ambientes. Esta membrana está formada por una bicapa lipídica asimétrica en la cual la cara interna está compuesta por fosfolípidos mientras que la cara externa está compuesta en

su mayor parte por moléculas de lipopolisacáridos (LPS) (Kita y Nikaido, 1973; Funahara y Nikaido, 1980; Llompart, 2009).

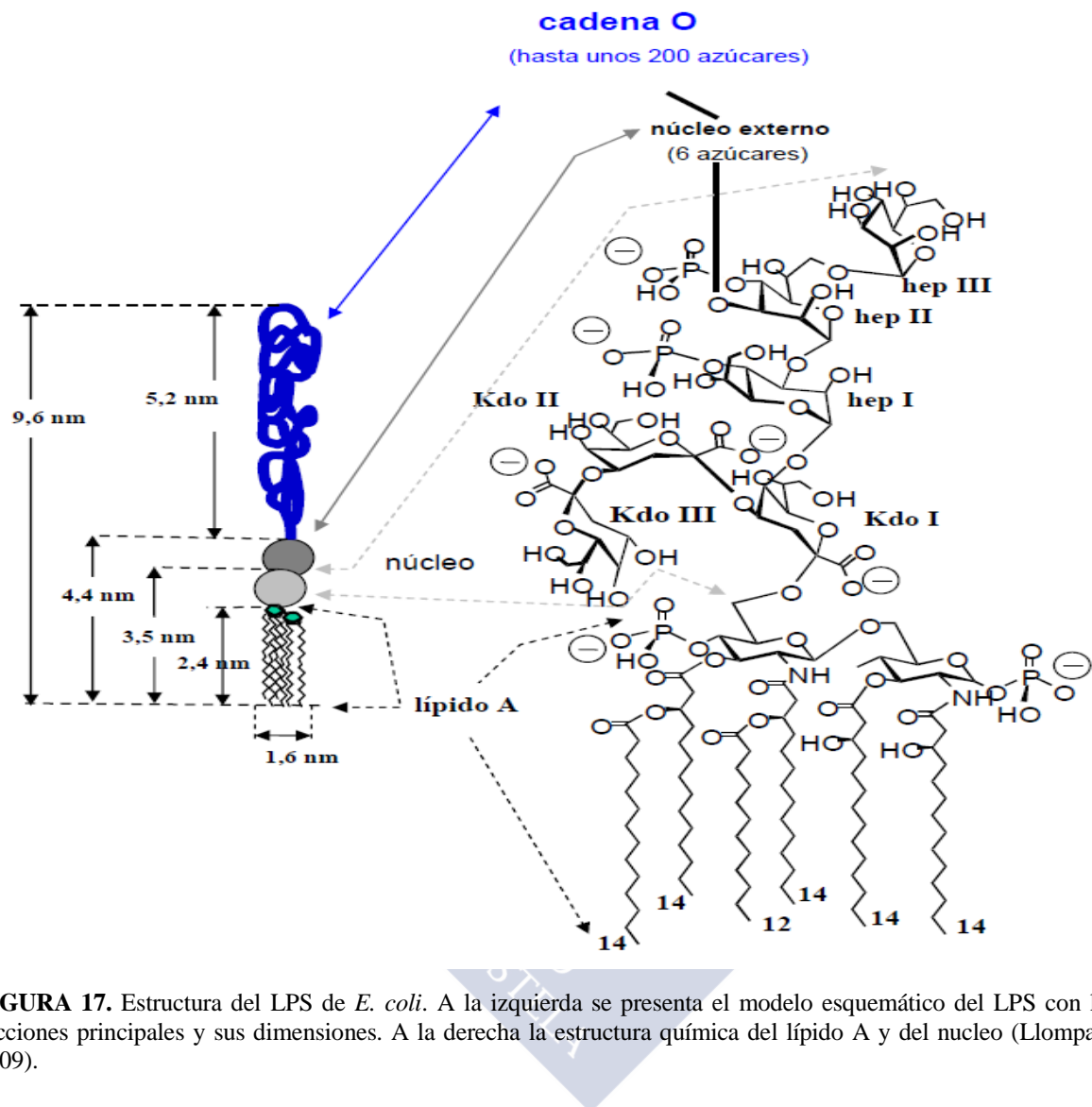


FIGURA 17. Estructura del LPS de *E. coli*. A la izquierda se presenta el modelo esquemático del LPS con las secciones principales y sus dimensiones. A la derecha la estructura química del lípido A y del núcleo (Llompart, 2009).

Los LPS juegan un papel muy importante en la patogénesis de las infecciones bacterianas, así como en la interacción con el hospedador y su sistema de defensa. Básicamente el LPS se compone de 3 partes: el lípido A, el núcleo y la cadena O (**FIGURA 17**). El lípido A posee la actividad endotóxica del LPS; se trata de un disacárido (glucosamina) unido a ácidos grasos que están insertados en la membrana externa de la bacteria. El núcleo es un oligosacárido que a su vez se divide en núcleo interno y núcleo externo. La cadena O, es la región del LPS más expuesta al medio externo, por lo que sus características son esenciales para la supervivencia de la bacteria en diferentes ambientes. Es un polisacárido de gran variabilidad en cuanto a la

longitud y tipos de azúcar presentes, y contiene los determinantes antigénicos responsables de la especificidad serológica del microorganismo (Llompart, 2009).

Desde su descubrimiento, el LPS fue reconocido como una molécula con una potente acción endotóxica hasta ser identificada como uno de los principales responsables del *shock* inducido por bacterias gramnegativas. En la actualidad se les atribuyen otras funciones entre las que se incluyen: mantenimiento y organización de la membrana externa, inhibición de anticuerpos, variaciones antigénicas, activador del sistema inmune y mediación en la adherencia a las células y tejidos del hospedador (Jaques, 1996; Harvill *et al.*, 2000; Raetz y Whitfield, 2002; Romero y Iregui, 2010).

Sarkar *et al.* (2014) mostraron que el antígeno O es el polisacárido principal responsable de la resistencia al suero en cepas UPEC analizadas. Demostraron que los antígenos O1, O6 y O18 son importantes para la supervivencia de la bacteria en el suero humano. Otros estudios comprobaron que las cepas de los serogrupos O6, O7, O18 y O75 son más resistentes al suero que las cepas con otros antígenos O (Taylor, 1974; McCabe *et al.*, 1978; Hughes *et al.*, 1982; Blanco *et al.*, 1992a). Además, es bien conocido el hecho de que las cepas lisas que se transforman en rugosas (por pérdida de parte del lipopolisacárido O) por mutación, suelen pasar de ser resistentes a ser sensibles al suero (Blanco *et al.*, 1992a). Por otra parte, Pluschke *et al.* (1983), estudiando cepas de los serotipos O1:K1, O7:K1 y O18:K1, vieron que el antígeno K1 impedía la activación del complemento por la vía alternativa. No obstante, en contraste con las cepas de los serotipos O7:K1 y O18:K1, las cepas del serotipo O1:K1 eran destruidas por la vía clásica sin la intervención de anticuerpos. Probablemente estas diferencias fueron debidas a las distintas estructuras de los antígenos O. Confirmando estos encuentros, Pluschke *et al.* (1983) comprobaron que, mientras las cepas de los serotipos O7:K1 y O18:K1 eran capaces de provocar bacteriemias en ratones recién nacidos, las cepas del serotipo O1:K1 no lo hacían.

Hagberg *et al.* (1984), trabajando con cepas isogénicas O75⁺K5⁺ y O75⁻K5⁺, llegaron a la conclusión de que el antígeno O facilitaba la persistencia del microorganismo en la vejiga y riñones de los ratones. No obstante, cuando se comparó la toxicidad de los serogrupos O típicos de *E. coli* extraintestinales con los antígenos O de *E. coli* de la flora normal, no se detectaron diferencias.

La mayor parte de las cepas de *E. coli* causantes de ITU y bacteriemias pertenecen a los serogrupos O1, O2, O4, O6, O7, O16, O18 y O75. Entre los *E. coli* de meningitis predominan las cepas de los serogrupos O1, O6, O7, O16, O18 y O83 (**TABLA 2**). Se ha observado que, aun cuando los mismos serogrupos O parece que predominan en todo el mundo, existen diferencias entre las distintas regiones geográficas y que puede haber variaciones a lo largo del tiempo en el predominio relativo de los serogrupos O más importantes (Blanco *et al.*, 1992a).

Numerosos serogrupos están representados en las cepas de *E. coli* extraintestinales, lo cual hace que exista una gran variedad antigénica que permite la evasión inmunitaria y la infección recurrente con cepas de la misma especie. También dificulta el diseño de una vacuna eficaz (Van den Bosch *et al.*, 1982; Korhonen *et al.*, 1985; Orskov y Orskov 1985; Blanco *et al.*, 1996; Blum-Oehler *et al.*, 1997; Johnson *et al.*, 2000a; Prats *et al.*, 2000).

TABLA 2. Serogrupos O más frecuentes entre los *E.coli* que causan infecciones extraintestinales en humanos.

Infecciones de tracto urinario		Bacteriemias		Meningitis
O1	O17	O1	O17	O1
O2	O18	O2	O18	O6
O4	O21	O4	O21	O7
O6	O22	O6	O22	O16
O7	O25	O7	O25	O18
O8	O50	O8	O75	O83
O9	O75	O9		
O11	O77	O11		
O12	O83	O12		
O15	O86	O15		
O16		O16		

En negrilla figuran los serogrupos más prevalentes.
Fuente: Blanco *et al.*, 1992a

1.3.1.6. Colicinas

Las colicinas son proteínas antibacterianas producidas por algunas cepas de *E. coli* y ciertos miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Entre las colicinas descritas están las colicinas V, A, B, Ia, Ib, K, N y E1. Han sido clasificadas de acuerdo a su efecto sobre un determinado número de cepas, las cuales son resistentes a una colicina en particular (Davies *et al.*, 1981;

Waters y Crosa, 1991). La colicina V fue la primera en ser descrita en 1925 por Gratia. Desde el inicio fue considerada como un antibiótico con actividad letal contra ciertos organismos entéricos y por su posible papel de aumentar la supervivencia de las bacterias que producen esta colicina (Gratia, 1925). Por otra parte, se encontró que las cepas productoras de colicina V son más comunes entre cepas aisladas de orina, sangre y otras superficies extraintestinales que entre los aislados de heces de personas sanas (Minshew *et al.*, 1978). La producción de colicina V es codificada por el plásmido ColV. Son requeridos 4 genes para la síntesis, la exportación y la inmunidad de la colicina V. Los genes requeridos para la exportación son *cvaA* y *cvaB* y el gen estructural es el *cvaC* (Waters y Crosa, 1991).

1.3.1.7. Proteínas de la membrana externa (Iss y TraT)

Se han relacionado varios componentes de la membrana externa con la resistencia al suero en *E. coli*, incluyendo el antígeno capsular K1 y ciertas proteínas de la membrana externa, como Iss y TraT. Iss es una lipoproteína de 10-11 kDa. Se cree que hay cerca de 2000 moléculas de Iss por célula (Barondess y Beckwith, 1990; Nolan *et al.*, 2003; Sampaio *et al.*, 2010). El gen *iss*, cuya presencia en las cepas incrementa la supervivencia en suero, fue descrito por primera vez por Binns *et al.* (1979). Este gen fue localizado en el plásmido ColV en cepas de *E. coli* aisladas de humanos (Binns *et al.*, 1979; Chuba *et al.*, 1986; Barondess y Beckwith, 1990). El estudio realizado por Johnson T.J. *et al.* (2008) revela 3 alelos genéticamente distintos de *iss*, los cuales fueron designados como *iss* tipo 1, 2 y 3. El *iss* tipo 1 fue localizado en el plásmido ColV y es muy frecuente en cepas APEC (*avian pathogenic E. coli*) y cepas NMEC (*neonatal meningitis-associated E. coli*). El *iss* tipo 2 fue encontrado en el genoma secuenciado de las cepas enteroagregativa 101-1 y enterotoxigénica B7a. Su incidencia es baja entre las cepas ExPEC y fecales. El *iss* tipo 3 fue localizado en un profago en el cromosoma de las cepas ExPEC secuenciadas (UPEC CFT073, UPEC 536 y UPEC UT189). Su incidencia resultó ser alta entre las cepas ExPEC humanas y baja entre cepas APEC y fecales (Johnson T.J. *et al.*, 2008). La resistencia al suero parece ser una característica de virulencia de *E. coli* ampliamente propagada, y se cree que la proteína *iss* puede ser un factor de virulencia importante que promueve la supervivencia en suero y puede ser útil en la discriminación entre cepas virulentas y avirulentas (Nolan *et al.*, 2003).

El gen *traT* se ha asociado a la resistencia al suero en enterobacterias. Este gen se ha encontrado en los plásmidos R6-5 y R100. Codifica la síntesis de la proteína TraT que tiene un peso molecular de 25 kDa (Binns *et al.*, 1982; Kanukollu *et al.*, 1985; Sukupolvi y O'Connor, 1990). Aunque el mecanismo de acción y su papel preciso en la virulencia aún se desconocen, se sugiere que la lipoproteína TraT incrementa la resistencia de la bacteria a la acción lítica del complemento (Sukupolvi y O'Connor, 1990). TraT es más prevalente en cepas de *E. coli* aisladas de infecciones extraintestinales que en cepas aisladas de heces (Kanukollu *et al.*, 1985).

1.3.1.8. Hemaglutinina sensible a la temperatura (*temperature-sensitive hemagglutinin*, Tsh)

Las bacterias gramnegativas han desarrollado varios sistemas de transporte para la translocación de sus proteínas a la superficie celular o al medio extracelular. Entre ellos, el sistema de secreción de proteínas tipo V o autotransportadores (**FIGURA 12**), que dirigen su propia secreción a través de la membrana interna y externa (Kostakioti y Stathopoulos, 2004). Los SPATEs son buenos ejemplos de la familia de autotransportadores. La Tsh fue la primera SPATE en ser descrita (Provence y Curtiss III, 1994). Es una proteína de superficie termosensible que posee la capacidad de aglutinar los eritrocitos a 26 °C. La maduración de Tsh produce 2 proteínas, una proteína extracelular de 106 kDa y una proteína de la membrana externa de 33 kDa que corresponde al dominio β , el cual se inserta dentro de la membrana externa para mediar la translocación del dominio pasajero (proteína madura) al exterior de la célula. Una vez localizada sobre la superficie, la proteína secretada de 106 kDa permanece temporalmente enlazada a la membrana externa de la bacteria, donde desempeña un papel de adhesión en la fase inicial de la infección (Kostakioti y Stathopoulos, 2004). La proteína de 106 kDa contiene un sitio activo (actividad serina-proteasa) dentro de su secuencia, haciendo de ella una proteína bifuncional con ambas actividades, adhesiva y proteolítica (Kostakioti y Stathopoulos, 2004; Simoes, *et al.*, 2006; Kobayashi *et al.*, 2010).

Los experimentos de hibridación y conjugación revelan que el gen *tsh* está localizado en un plásmido ColV en muchas cepas APEC estudiadas (Dozois *et al.*, 2000). También se ha mostrado que la prevalencia de Tsh entre cepas aisladas de heces de pacientes sanos es

significativamente más baja que entre los aislados uropatogénicos, sugiriendo que Tsh está más asociada con cepas causantes de ITU que con *E. coli* comensales (Heimer *et al.*, 2004).

1.3.1.9. Proteína específica uropatogénica (*uropathogenic-specific protein*, Usp)

En el año 2000, Kurazono *et al.* (2000) identificaron una supuesta isla de patogenicidad (PAI) de 4.167 bp, de la cual una longitud de 1.038 bp codifica para una proteína de 346 aminoácidos que fue denominada como proteína específica uropatogénica debido a su predominio en cepas aisladas de ITU. A continuación de *usp* fueron identificados 3 fragmentos de lectura abierta (ORFs; *orfU1*, *orfU2*, *orfU3*). El análisis de secuenciación de las PAIs de 7 cepas representativas (6 UPEC y 1 de individuo sano) mostró que el gen *usp* presenta 2 variantes (*uspI* y *uspII*), con diferentes secuencias en la región 3'-terminal (Nakano *et al.*, 2001; Parret y De Mot, 2002). Por otra parte, las PAI*usp* pueden ser clasificadas en 4 subtipos (Ia, Ib, IIa y IIb) de acuerdo a la secuencia de ADN de las variantes de *uspI*, *uspII* y los diferentes arreglos de *orfU1*, *orfU2* y *orfU3*. El subtipo Ia fue asociado más significativamente con los aislados de prostatitis (Kanamaru *et al.*, 2006a).

Para determinar la virulencia de la proteína Usp en cepas UPEC, se realizaron experimentos en ratones en los que se observó que las cepas de *E. coli* que poseían el gen *usp* aumentaban su infectividad (Yamamoto *et al.*, 2001).

Posteriormente, Parret y De Mot (2002) demostraron que la proteína Usp puede actuar como una bacteriocina, debido a la gran homología de la región carboxi-terminal de Usp con la piocina tipo S producida por las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Las piocinas pertenecen a un grupo grande y heterogéneo de proteínas conocidas como bacteriocinas. Moléculas antimicrobianas producidas por ciertas cepas virulentas, capaces de lisar otras cepas no virulentas de estos mismos gérmes, lo que permitiría que la cepa de *E. coli* que posee la proteína Usp compita contra otras cepas de *E. coli* que ocupan el mismo nicho, lo cual aumentaría su infectividad en el tracto urinario.

1.3.1.10. Invasina IbeA (Invación del endotelio cerebral, *invación of brain endothelium*)

Las cepas ExPEC han sido asociadas con las infecciones de meningitis neonatal. Las cepas que causan meningitis poseen diferentes factores de virulencia que permiten que la bacteria atraviese la barrera hemato-encefálica y entre en el sistema nervioso central. El gen *ibeA*, que codifica para una proteína de 50 kDa, es uno de los factores de virulencia que contribuye en esta invasión. Este gen ha sido encontrado en cepas de *E. coli* K1 aisladas de líquido céfalo-raquídeo (Huang *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2001).

Como se muestra en la **FIGURA 18**, el gen *ibeA* está localizado en una isla de patogenicidad denominada GimA, de 20,3 kb, que consta de 4 operones: *ptnIPKC*, *cglDTEC*, *gcxKRCI* e *ibeRAT*. El análisis secuencial sugiere que esta isla codifica para 10 enzimas, 3 transportadores, una proteína regulatoria y una invasina (IbeA). Muchas de estas proteínas codificadas por GimA participan en el transporte y metabolismo de fuentes de carbono, como la glucosa y el glicerol. Se ha demostrado que la glucosa es la fuente de carbono preferido por las cepas de *E. coli* K1, observándose que en el líquido céfalo-raquídeo la glucosa disminuye significativamente durante la meningitis (Huang *et al.*, 2001; Zou *et al.*, 2008). También se ha determinado que la vimentina es el receptor de IbeA que induce la señalización e invasión del endotelio cerebral. La vimentina es una de las proteínas fibrosas que forman los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular, en particular de células embrionarias, ciertas células endoteliales, así como de células sanguíneas (Chi *et al.*, 2010).

La producción de biopelículas ayuda a la bacteria a sobrevivir y aumenta su habilidad para causar la enfermedad. En un estudio realizado por Wang *et al.* (2011) se ha encontrado que *ibeA* era más prevalente en cepas que forman biopelículas. Por eso se cree que *ibeA* está relacionada con la formación de biopelículas, aunque la función exacta de la proteína IbeA aún no está clara.

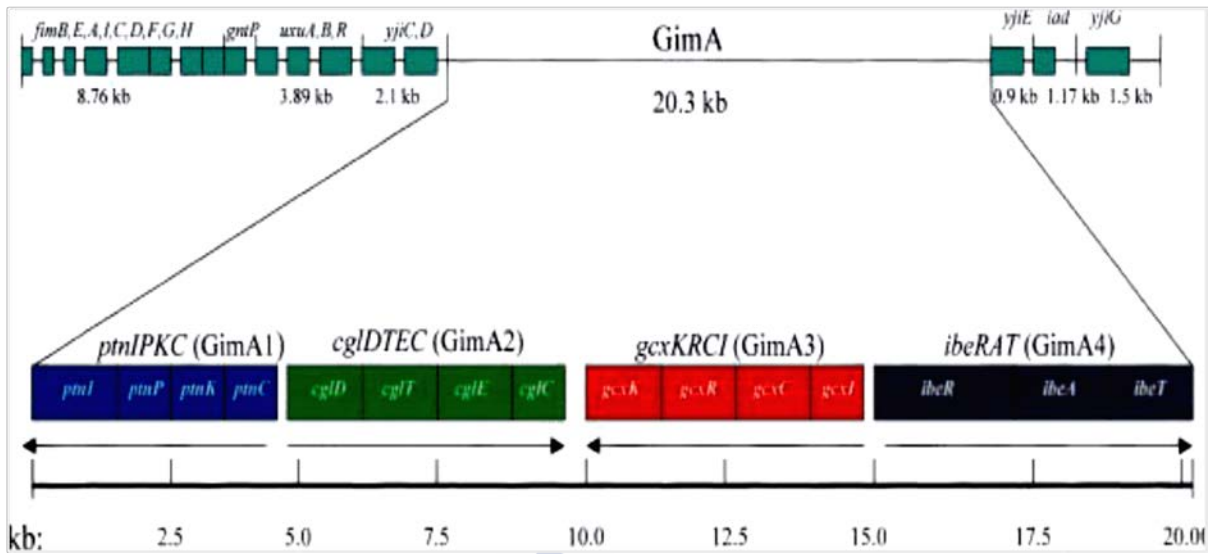


FIGURA 18. Localización genética y estructura de los operones de la isla de patogenicidad GimA. Este locus está situado entre *yjiD* y *yjiE*, adyacente al operon *fim* y ausente en las cepas de *E. coli* K12 no patogénicas. Los 4 rectángulos indican los operones (GimA1, GimA2, GimA3 y GimA4) y las flechas indican la orientación de la transcripción (Huang *et al.*, 2001).

1.3.2. Islas de patogenicidad

Los genes de virulencia de *E. coli* pueden estar localizados en el cromosoma, plásmidos, transposones, bacteriófagos y/o islas de patogenicidad. Los genes para HlyA se han localizado en el cromosoma y en plásmidos. Lo mismo pasa con los genes del sideróforo aerobactina, que pueden ser cromosómicos ó encontrarse en un plásmido que suele codificar también para la producción de colicina V (Smith y Huggings, 1976; Vidotto *et al.*, 1991).

En ocasiones los genes de virulencia se encuentran agrupados formando islas (10 a 200 Kb) o islotes (1 a 10 Kb) de patogenicidad (PAIs). Dichos fragmentos pueden llevar también sistemas de secreción de proteínas de tipo III ó IV. Poseen un contenido G+C diferente al resto del cromosoma bacteriano, lo que sugiere que se han adquirido recientemente y de forma horizontal. Las PAIs están flanqueadas por secuencias repetitivas que se generan después de la integración del ADN foráneo por recombinación y se encuentran situadas cerca de genes que codifican para ARNt. Los genes de ARNt suelen actuar como secuencias diana para la integración del ADN foráneo en muchos organismos procariontes y en algunos eucariotes. Las PAIs llevan también genes que codifican para factores de movilización, tales como integrasas, transposasas, o partes de elementos de inserción (*insertion sequences*, IS).

Por ello a menudo representan regiones de ADN inestables. Las PAIs pueden proceder de antiguos profagos ó derivar incluso de plásmidos. Se han caracterizado varias islas de patogenicidad cromosómicas en *E. coli* causantes de infecciones extraintestinales que contienen los genes que codifican para la fimbria P (Pap), fimbrias Prs (*P-related sequence*), CNF1 y/ó Hly (Hacker *et al.*, 1999; Bingen-Bidois *et al.*, 2002).

Ciertas cepas pueden contener múltiples islas de patogenicidad, cada una con factores de virulencia que pueden llegar a ser diferentes o iguales. De la misma manera, algunas cepas de *E. coli* causantes de infecciones extraintestinales también son portadoras de genes de resistencia a antibióticos, tales como las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), en elementos móviles como los plásmidos (Branger *et al.*, 2005; Cagnacci *et al.*, 2008; Coque *et al.*, 2008b; Jones *et al.*, 2008; Leflon-Guibout *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2009).

1.3.3. Tipado de las cepas

En los laboratorios de microbiología clínica los microorganismos suelen identificarse a nivel de especie, porque este nivel de identificación, junto con los datos de sensibilidad a los antibióticos, resulta suficiente en la mayoría de los casos para orientar el tratamiento de la infección y establecer las medidas de profilaxis. Sin embargo, en algunas situaciones es importante subdividir una especie en grupos infraespecíficos porque cada grupo puede presentar características diferenciales muy importantes (Prats, 2007).

Existen diversos métodos que permiten subdividir (*tipar*) una especie en grupos infraespecíficos (tipos o variedades). Estos métodos pueden basarse en el estudio de características fenotípicas o genotípicas. Los caracteres más utilizados para el fenotipado han sido los bioquímicos (biotipo), los antigénicos (serotipo), la lisis por bacteriófagos (fagotipo) y el patrón de sensibilidad a los antibióticos (antibiotipo).

Las características antigénicas desempeñan un papel importante en el tipado de *E. coli*. Para diferenciar las cepas patógenas de las cepas comensales, presentes en la flora microbiana normal, Kauffmann (1947) desarrolló un esquema de serotipificación que actualmente tiene 174 antígenos somáticos (O1 a O181), 53 flagelares (H1 a H56) y 72 capsulares (K1 a K103). El antígeno O es un polisacárido termoestable (estable tras calentar a 121°C/2 h) que forma

parte del lipopolisacárido (LPS) presente en la membrana externa de la pared celular. El antígeno K es un polisacárido capsular que envuelve la pared celular y puede bloquear la reacción del antígeno O inhibiendo su aglutinación. Existen 2 grupos de antígenos K (I y II) que se corresponden con las variedades K(A) y K(L). Los antígenos K(L) se inactivan al ser expuestos a 100°C/1 h, mientras que para la inactivación de los antígenos K(A) se requiere de una temperatura de 121°C/2 h. Los antígenos H son proteínas termolábiles que se inactivan al ser calentados a 100°C/30 min. La determinación de los antígenos O y H se realiza por técnicas de aglutinación, mientras que la identificación del antígeno K se realiza por contraelectroforesis. Debido a las reacciones cruzadas entre los antígenos O y H de las diferentes cepas de *E. coli* y los otros géneros de las enterobacterias, se recomienda utilizar antiseros absorbidos para evitar falsas reacciones de aglutinación (Guinée *et al.*, 1972; Guinée *et al.*, 1981; Orskov y Orskov, 1984; Murray *et al.*, 1999; Rodríguez-Angeles, 2002).

La introducción en los últimos años de las técnicas de genotipado, basadas en el estudio de las diferencias del genoma, ha facilitado el desarrollo de pruebas que utilizan los mismos o parecidos reactivos, que permiten identificar los diferentes clones o grupos clonales: perfil plasmídico, análisis del ADN cromosómico mediante enzimas de restricción (*restriction fragment length polymorphism*, RFPL y *pulse field gel electrophoresis*, PFGE), ribotipado (análisis de los genes de ADN que codifican para ARNr 16S y 23S), tipado mediante técnicas de PCR (*arbitrarily primed polymerase chain reaction*, AP-PCR y *Random-PCR*) y secuenciación del ADN (Sussman, 1997; Hilali *et al.*, 2000; Bidet *et al.*, 2007; Gordon *et al.*, 2008; Clermont *et al.*, 2009).

Desde el punto de vista filogenético, las cepas de *E. coli* se pueden englobar en 4 grupos: A, B1, B2 y D. Mientras que los grupos B2 y D predominan entre las cepas ExPEC, los grupos A y B1 son más frecuentes entre las cepas comensales intestinales (Clermont *et al.*, 2000; Gordon *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2008; Mora *et al.*, 2009).

El esquema de MLST (*multilocus sequence typing*) de Achtman (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>) utiliza las secuencias de fragmentos internos amplificados por PCR de 583 a 932 pb de 7 genes altamente conservados (*adhA*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, y *recA*) que definen el perfil alélico o secuencia tipo (ST) para cada cepa. Existe un segundo esquema que ha sido desarrollado por el Instituto Pasteur basándose en la

secuenciación de 8 genes altamente conservados (*dinB*, *icdA*, *pabB*, *polB*, *putP*, *trpA*, *trpB* y *uidA*) (www.pasteur.fr/mlst). El MLST se ha revelado como una herramienta de tipado filogenético poderosa, tanto para estudios de evolución como epidemiológicos.

Con la PFGE se puede lograr una mayor resolución de las relaciones clonales entre cepas de la misma secuencia tipo de MLST. Se trata de una herramienta de subtipado con mayor poder de discriminación que el MLST y que se utiliza en varias redes internacionales de salud (p.e. PulseNet, FoodNet y VetNet) para estudios epidemiológicos locales en los que interesa detectar cepas implicadas en brotes.

Recientemente se ha descrito otro método de genotipado de cepas de *E. coli* en base a la secuenciación del gen *fimH* que codifica para la adhesina FimH, localizada en la punta de la fimbria tipo 1. El tipado de la región *fimH* (*fimH_{TR}*) lleva a un abanico sumamente diverso de alelos (Tartof *et al.*, 2007; Weissman *et al.*, 2012; Adams-Sapper *et al.*, 2013; Nicolas-Chanoine *et al.*, 2014). Este método de tipado fue aplicado en las cepas del grupo clonal ST131, entre las cuales identificaron varios tipos de *fimH*, si bien los más prevalentes fueron *fimH30*, *fimH22* y *fimH41* (Johnson *et al.*, 2013). El tipado de las cepas ST131 ha llevado a la identificación de múltiples subclones con distintos perfiles de resistencia a antibióticos. El subclón H30-R está representado por las cepas que tienen el alelo *fimH30* y son resistentes a la ciprofloxacina. Por otra parte, en los últimos años ha emergido un importante subclón llamado H30-Rx entre las cepas H30-R. Estas cepas fueron denominadas de esta manera por su extensiva resistencia antimicrobiana, además la gran mayoría de sus cepas son productoras de CTX-M-15 (Price *et al.*, 2013; Banerjee *et al.*, 2013c; Banerjee y Johnson, 2014).

El tipado de las cepas tiene como objetivos fundamentales el distinguir las cepas patógenas de las inocuas y determinar si las cepas pertenecen al mismo clon o a grupos clonales relacionados epidemiológicamente.

1.3.4. β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)

Las β -lactamasas son enzimas proteicas que catalizan la hidrólisis del anillo betalactámico separando el enlace amida, impidiendo al antibiótico inhibir la síntesis de la pared celular. Las β -lactamasas están codificadas en genes que pueden localizarse tanto en el cromosoma

bacteriano como en plásmidos. El grado de resistencia conferida por este tipo de enzimas depende fundamentalmente de la cantidad de enzima producida y está modulada por factores de permeabilidad. Su hiperproducción puede conferir resistencia a las combinaciones de amoxicilina-clavulánico e incluso piperacilina-tazobactam. En el caso de la enzima SHV-1 puede además conferir resistencia de bajo nivel a ceftazidima (cefalosporina de tercera generación) (Coira, 2008; Navarro, 2009).

Las β -lactamasas de espectro extendido se definen como enzimas capaces de hidrolizar las cefalosporinas de amplio espectro (cefalosporinas de primera, segunda, tercera y cuarta generación) y los monobactámicos (aztreonam), pero no las cefamicinas (cefexitina) o los carbapenemes (imipenem y meropenem). Se caracterizan por ser inhibidas por los inhibidores de β -lactamasas de clase A (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam). Sus determinantes genéticos se encuentran generalmente en plásmidos y derivan por mutaciones puntuales de otras β -lactamasas con menor espectro como TEM-1, TEM-2 y SHV-1. Las primeras BLEE descritas fueron las BLEE de tipo SHV, localizadas en cepas de *Klebsiella pneumoniae* en Alemania el año 1983, seguidas del aislamiento de las BLEE de tipo TEM en 1984. Actualmente están distribuidas por todo el mundo y se reconocen más de 180 variantes de SHV y más de 200 variantes de TEM con espectro extendido (<http://www.lahey.org/Studies/>) (Barrera *et al.*, 2005; Cantón *et al.*, 2007; Coque *et al.*, 2008a).

En 1989, casi simultáneamente en Alemania y Argentina y después en Francia e Italia, fue descrita un nuevo tipo de BLEE. Estas enzimas fueron llamadas CTX-M porque poseen mayor poder hidrolítico frente a cefotaxima. Las BLEE de tipo CTX-M han sido detectadas en muchas especies de la familia *Enterobacteriaceae* y en los últimos años se están expandiendo de forma espectacular. En la actualidad se conocen al menos 130 variantes de β -lactamasas de tipo CTX-M agrupadas en torno a 5 familias de enzimas diferentes según su secuencia de aminoácidos (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25) (**TABLA 3**) (Bauernfeind *et al.*, 1990; Pitout *et al.*, 2005a; Cantón y Coque, 2006; Karisik *et al.*, 2006; Cantón *et al.*, 2007; Livermore *et al.*, 2007; Cantón *et al.*, 2008; Clermon *et al.*, 2008; Coque *et al.*, 2008a; Arpin *et al.*, 2009; Literacka *et al.*, 2009; Oteo *et al.*, 2009; Lau *et al.*, 2010). Cada uno de estos grupos están relacionados con β -lactamasas cromosómicas de diferentes especies del genero *Kluyvera* que podrían haberse movilizado a través de secuencias de inserción (ISCR1, ISEcp1) o por bacteriófagos (Oliver *et al.*, 2005; Cantón y Coque, 2006; Cantón *et al.*, 2007).

TABLA 3. Diferentes grupos y orígenes de enzimas BLEE tipo CTX-M.

	Grupos/Familias				
	CTX-M-1	CTX-M-2	CTX-M-8	CTX-M-9	CTX-M-25
Año de aparición	1989	1986	1996	1994	2000
Enzima	CTX-M-1	FEC-1	CTX-M8	CTX-M-9	CTX-M-25
País	Alemania	Japón	Brasil	España	Canadá
Enzimas	CTX-M-1, 3, 10, 11, 12, 15, 22, 23, 28, 29, 30, 32, 33, 36, 54 UOE-1	CTX-M-2, 4, 6, 7, 20, 31, 44 (TOHO-1), FEC-1	CTX-M-40	CTX-M-9, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 24, 27, 45 (TOHO-2), 46, 47, 48, 49, 50	CTX-M-26, 25, 39, 41
Origen	<i>Kluyvera ascorbata</i>	<i>Kluyvera ascorbata</i>	<i>Kluyvera georgiana</i>	<i>Kluyvera georgiana</i>	No definido

Fuente: Cantón y Coque, 2006.

1.3.4.1. Distribución de las BLEE a nivel mundial

Los diferentes estudios de vigilancia realizados en Europa y otras áreas geográficas han mostrado un incremento de la prevalencia y dispersión de las cepas productoras de BLEE. Los últimos datos disponibles de EARSS (*European Antimicrobial Resistance Surveillance System*) (<http://www.rivm.nl/earss/about/>) reflejan el incremento de las cepas de *E. coli* invasivas, resistentes a las cefalosporinas de tercera generación, recuperadas de cultivos de sangre. Como se muestra en la **TABLA 4**, entre las cepas resistentes a cefalosporinas de tercera generación, una gran proporción fueron identificadas como productoras de BLEE por los laboratorios participantes en el estudio realizado en el año 2012. Dieciséis de 23 países informaron entre 85% y 100% de cepas BLEE (EARSS-NET, 2012).

De la misma manera, el programa de vigilancia MYSTIC (*Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection*) en países europeos muestra un incremento de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE desde el año 1997 (2,1%) hasta el 2004 (10,8%). Esta situación era diferente en los EE.UU., donde los aislados productores de BLEE eran menos prevalentes que en Europa (Goossens y Grabein, 2005; Cantón *et al.*, 2008). No obstante, la situación cambió en los últimos años también en EE.UU. con la emergencia y expansión espectacular del clon

ST131 productor de CTX-M-15 (Banerjee y Johnson, 2014; Nicolas-Chanoine *et al.*, 2014). Otro programa de vigilancia denominado SMART (*Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends*), realizó en el 2004 un estudio a nivel mundial en el cual el 10% de las cepas de *E. coli* eran productoras de BLEE; cepas que fueron aisladas de infecciones intra-abdominales (Rossi *et al.*, 2006; Cantón *et al.*, 2008). El estudio SMART realizado en el 2007, en el cual participaron varios países de la región Asia-Pacífico, muestra que el 42% de las cepas de *E. coli* eran BLEE positivas (Hawser *et al.*, 2009). El estudio multicéntrico realizado en Canadá desde el año 2005 hasta el 2009 muestra un incremento de la incidencia de *E. coli* productora de BLEE desde 0,12 a 0,47 por cada 1.000 pacientes por día (Lowe *et al.*, 2012).

TABLA 4. Cepas de *E. coli* invasivas resistentes a cefalosporinas de tercera generación y porcentaje de cepas BLEE positivas, determinados por los laboratorios participantes de 23 países europeos en 2012.

País	Nº de Laboratorios	Nº de cepas de <i>E. coli</i> resistentes a cefalosporinas de tercera generación	% de cepas BLEE
Austria	29	233	92,7
Bulgaria	14	69	94,2
Croacia	12	79	89,9
República Checa	40	322	81,4
Dinamarca	3	45	91,1
Estonia	6	24	83,3
Finlandia	17	196	91,8
Francia	52	915	70,5
Alemania	15	260	81,9
Hungría	5	27	100
Irlanda	30	198	82,3
Italia	3	63	95,2
Letonia	8	23	87,0
Lituania	10	22	100
Luxemburgo	5	38	92,1
Holanda	8	79	96,2
Polonia	33	134	85,8
Portugal	16	269	95,9
Rumania	6	31	100
Eslovaquia	14	213	68,1
Eslovenia	10	111	91,0
España	38	764	82,2
Suecia	17	241	97,1

Fuente: EARSS-NET, 2012.

En la actualidad la mayoría de las cepas BLEE expresan enzimas de tipo CTX-M y son más frecuentemente encontradas en cepas de *E. coli* que en el resto de las enterobacterias. La mayoría de estos aislados son ahora recuperados de pacientes de la comunidad y muchos de ellos con infecciones del tracto urinario (Cantón *et al.*, 2007; Cantón *et al.*, 2008; Coque *et al.*, 2008b). Los trabajos multicéntricos realizados en diferentes laboratorios, utilizando diferentes sistemas de vigilancia en cada país, han contribuido a entender mejor la epidemiología de estas enzimas a nivel local, nacional e internacional. Se han identificado situaciones que difieren en distintas áreas geográficas y reflejan una dispersión local y específica de algunas enzimas. Las BLEE de tipo CTX-M constituyen las β -lactamasas más diseminadas en todo el mundo, como se observa en la **FIGURA 19**, considerándose endémicas en muchos países de Europa, Asia y América Latina. En Europa occidental inicialmente se describieron brotes en países como Grecia o Francia (Cantón *et al.*, 2007; Cantón *et al.*, 2008). Algunas de las enzimas CTX-M están ampliamente distribuidas en países específicos, como el grupo CTX-M-9 en España (Hernández *et al.*, 2003; Rodríguez-Baño *et al.*, 2004; Cantón *et al.*, 2007; Diestra *et al.*, 2008). Las cepas productoras de CTX-M-14 también son prevalentes en Canadá y Japón (Pitout *et al.*, 2005a; Suzuki *et al.*, 2009).

El CTX-M-1 y el CTX-M-32 inicialmente eran prevalentes en áreas del Mediterráneo pero hoy en día son prevalentes en casi todos los países Europeos (Livermore *et al.*, 2007; Cantón *et al.*, 2008; Fang *et al.*, 2008). CTX-M-15 se encuentra en casi todo el mundo. La exitosa dispersión de CTX-M-15 ha sido asociada con clones específicos y la transferencia de plásmidos que contienen el gen *bla*_{CTXM-15} (Bonnet, 2004; Boyd *et al.*, 2004; Woodford *et al.*, 2004; Brigante *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2005; Lartigue *et al.*, 2005; Paterson y Bonomo, 2005; Romero *et al.*, 2005; Ben-Ami *et al.*, 2006; Cantón y Coque, 2006; Lavollay *et al.*, 2006; Novais *et al.*, 2006; Cantón *et al.*, 2007; Cantón *et al.*, 2008; Lau *et al.*, 2008).

A diferencia de América Latina y Asia, el grupo CTX-M-2 está representado desigualmente en Europa, con la aparición de diferentes variantes en distintas áreas, particularmente en Rusia y países del Este (Edelstein *et al.*, 2003; Chmelnitsky *et al.*, 2005; Cantón *et al.*, 2008).

En Europa, el grupo CTX-M-8 está representado solo en el Reino Unido por la variante CTX-M-40. De la misma manera, el grupo CTX-M-25 también ha sido detectado en el Reino Unido,

identificándose su variante CTX-M-26 (Munday *et al.*, 2004; Hopkins *et al.*, 2006; Cantón *et al.*, 2008).

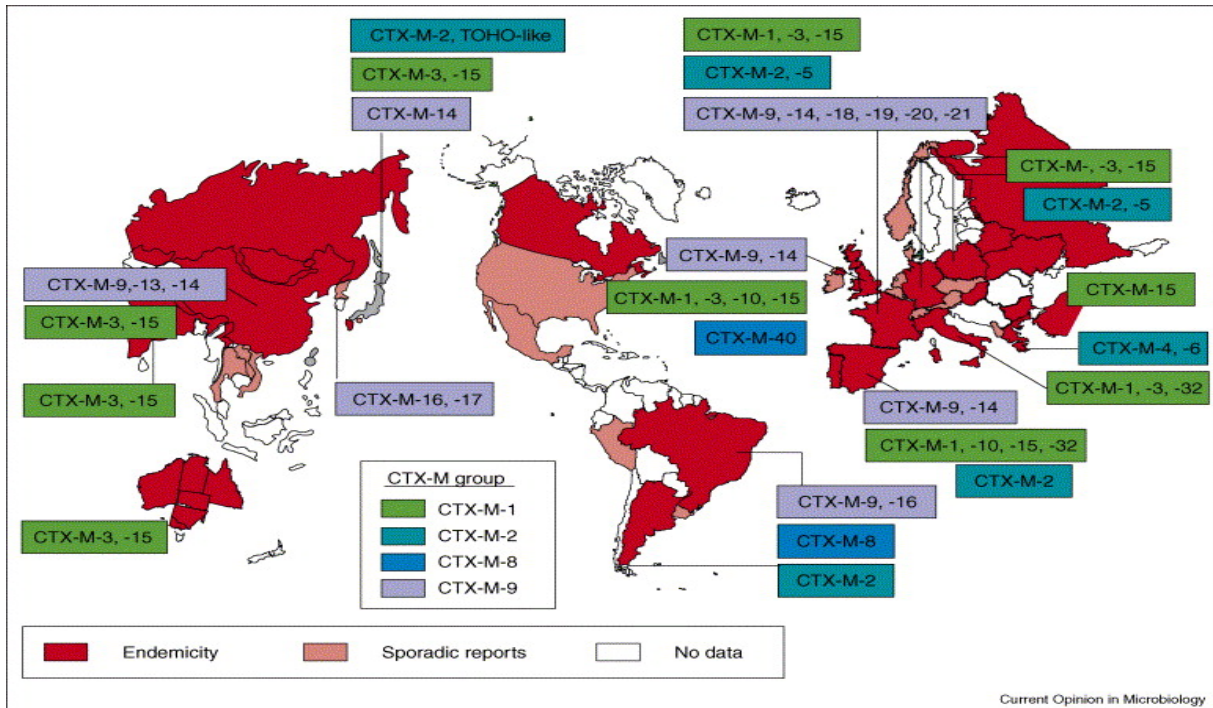


FIGURA 19. Distribución mundial de las enzimas CTX-M (Cantón y Coque, 2006).

1.3.4.2. Distribución de las BLEE en España

En 1988, casi simultáneamente, se detectaron en 2 hospitales de Madrid (Hospital Universitario Ramón y Cajal y Hospital Clínico) las primeras cepas productoras de BLEE en España. Se trataba de cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* que producían la enzima SHV-2 (Baquero *et al.*, 1988). A partir de finales de los años 90 se ha incrementado de manera importante el número de cepas productoras de CTX-M (Rodríguez-Baño *et al.*, 2004; Romero *et al.*, 2005; Valverde-Romero *et al.*, 2005; Cantón *et al.*, 2006; Cantón *et al.*, 2007; Coque *et al.*, 2008a,b; Leflon-Guibout *et al.*, 2008; Blanco *et al.*, 2009). La primera publicación en España en la que se hace referencia a estas enzimas se corresponde con cepas de *E. coli* y *Salmonella spp.* productoras de CTX-M-9 detectadas entre 1996 y 2000 en Barcelona y Murcia (Sabaté *et al.*, 2000; Simarro *et al.*, 2000; Cantón *et al.*, 2007). Posteriormente, el grupo GEIH (Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria) realizó un amplio estudio multicéntrico en España entre marzo y junio del año 2000 que incluía 40 hospitales distribuidos por todo el territorio nacional. Dicho estudio mostró

una prevalencia de cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli* con BLEE del 2,7% y 0,5%, respectivamente. Se observó que estas cepas estaban presentes en el 90% de los centros que participaron en el estudio y que el 51% de los aislados de *E. coli* procedían de pacientes extrahospitalarios. En este trabajo, las BLEE más prevalentes en *E. coli* fueron CTX-M-9 (27,3%), SHV-12 (23,9%), CTX-M-14 (16,7%) y CTX-M-10 (4,5%) (Hernández *et al.*, 2003; Cantón *et al.*, 2007).

En el primer trimestre del año 2004 se recogieron los 15 primeros aislamientos de *E. coli* con sospecha fenotípica de ser portadores de BLEE en 11 hospitales españoles. De la caracterización genética de las BLEE se obtuvo que el 80,4% de las 92 cepas de *E. coli* que finalmente se caracterizaron fueron productoras de CTX-M, de las cuales se encontró un predominio de CTX-M-14 (45,7%), CTX-M-9 (20,6%) y SHV-12 (21,7%). Únicamente 3 cepas resultaron ser productoras de la enzima CTX-M-15. El análisis de los patrones de restricción obtenidos por PFGE mostró una gran diversidad clonal entre los aislamientos de *E. coli* (Diestra *et al.*, 2008).

En el año 2006 se llevó a cabo el segundo estudio multicéntrico a nivel de todo el territorio español realizado por el grupo GEIH. Entre febrero y marzo se recogieron 1.021 cepas de *E. coli* productoras de BLEE en 44 hospitales. El porcentaje de cepas productoras de BLEE fue del 4,04% (rango 0,4% a 20,3%, dependiendo del hospital). Por lo tanto, desde el año 2000 el porcentaje de *E. coli* productoras de BLEE en España se ha multiplicado por 8 (Díaz *et al.*, 2009). Posteriormente se realizó la caracterización de 254 cepas, de las cuales las más prevalentes fueron el grupo CTX-M-14 (119 aislados), el SHV-12 (68 aislados), el CTX-M-15 (37 aislados) y el CTX-M-9 (21 aislados) (**FIGURA 20**) (Díaz *et al.*, 2010).

1.3.5. Grupo clonal ST131

Los primeros estudios indicaban una ausencia de clonalidad entre las cepas productoras de los distintos tipos de BLEE, pero recientemente un consorcio de investigadores internacionales liderado por Nicolas-Chanoine, con la participación del LREC de la USC, puso en evidencia la emergencia intercontinental del grupo clonal O25:H4-ST131 productor de CTX-M-15, tras comprobar que 36 cepas de *E. coli* productoras de CTX-M-15 aisladas de 7 países (Francia, España, Portugal, Suiza, Corea, Líbano y Canadá) de 3 continentes

presentaban características similares: grupo filogenético B2, el mismo perfil en ERIC2 PCR (*enterobacterial repeat intergenic consensus*), serotipo O25:H4, resistencia a ciprofloxacina y la secuencia tipo ST131. Todas las cepas de dicho clon eran ExPEC, ya que tenían de 7 a 14 genes de virulencia, presentando 5 comunes (*fimH*, *sat*, *fyuA*, *usp*, *malX*). Aunque presentaban similares perfiles de restricción, las cepas de este grupo clonal se agruparon en varios *clusters* relacionados. Las 6 cepas españolas incluidas en el estudio procedían del Hospital Universitario Lucus Augusti (HULA) de Lugo y se englobaron en un mismo *cluster* (FIGURA 21) (Nicolas-Chanoine *et al.*, 2008).

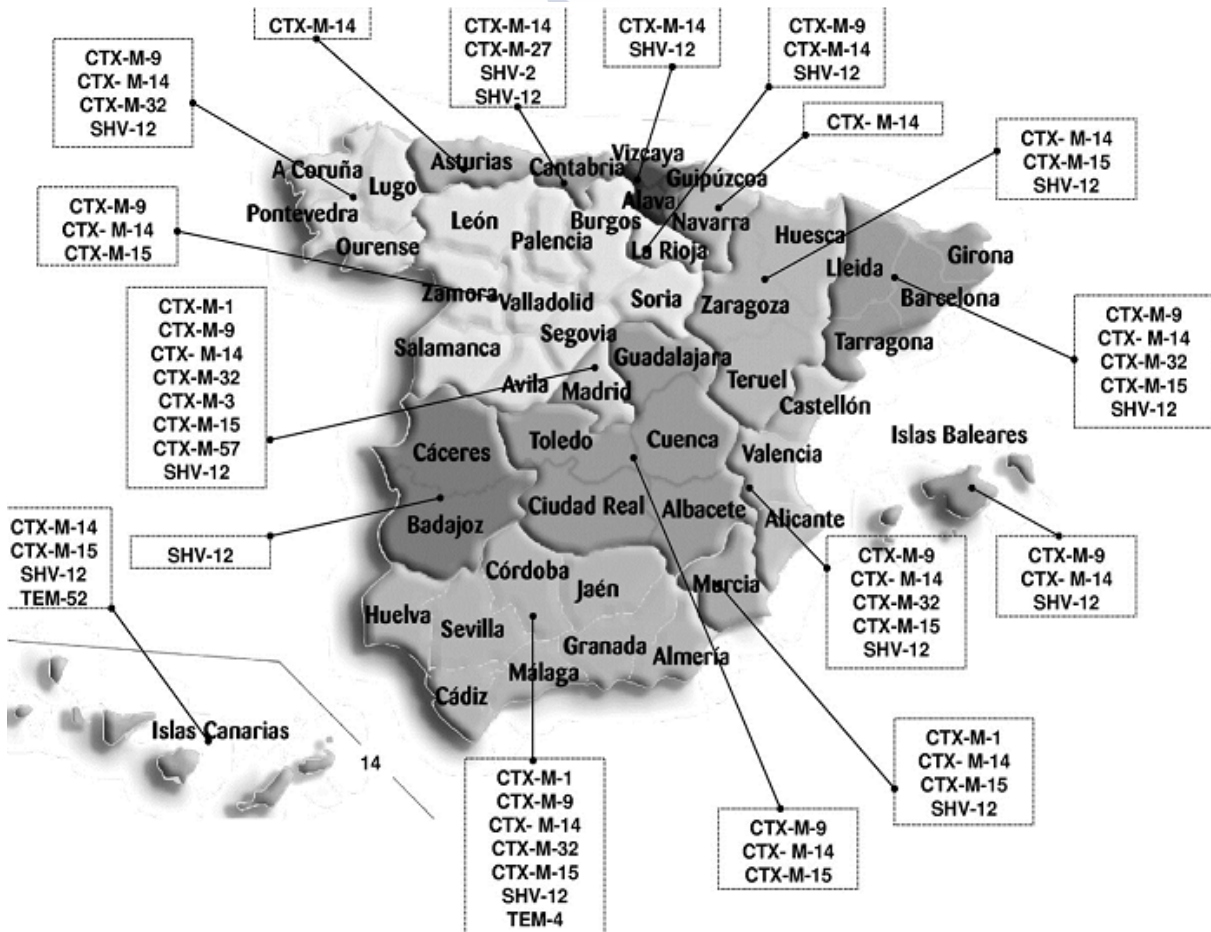


FIGURA 20. Distribución de *E. coli* productoras de BLEE, aisladas en España en 2006 (Díaz *et al.*, 2010).

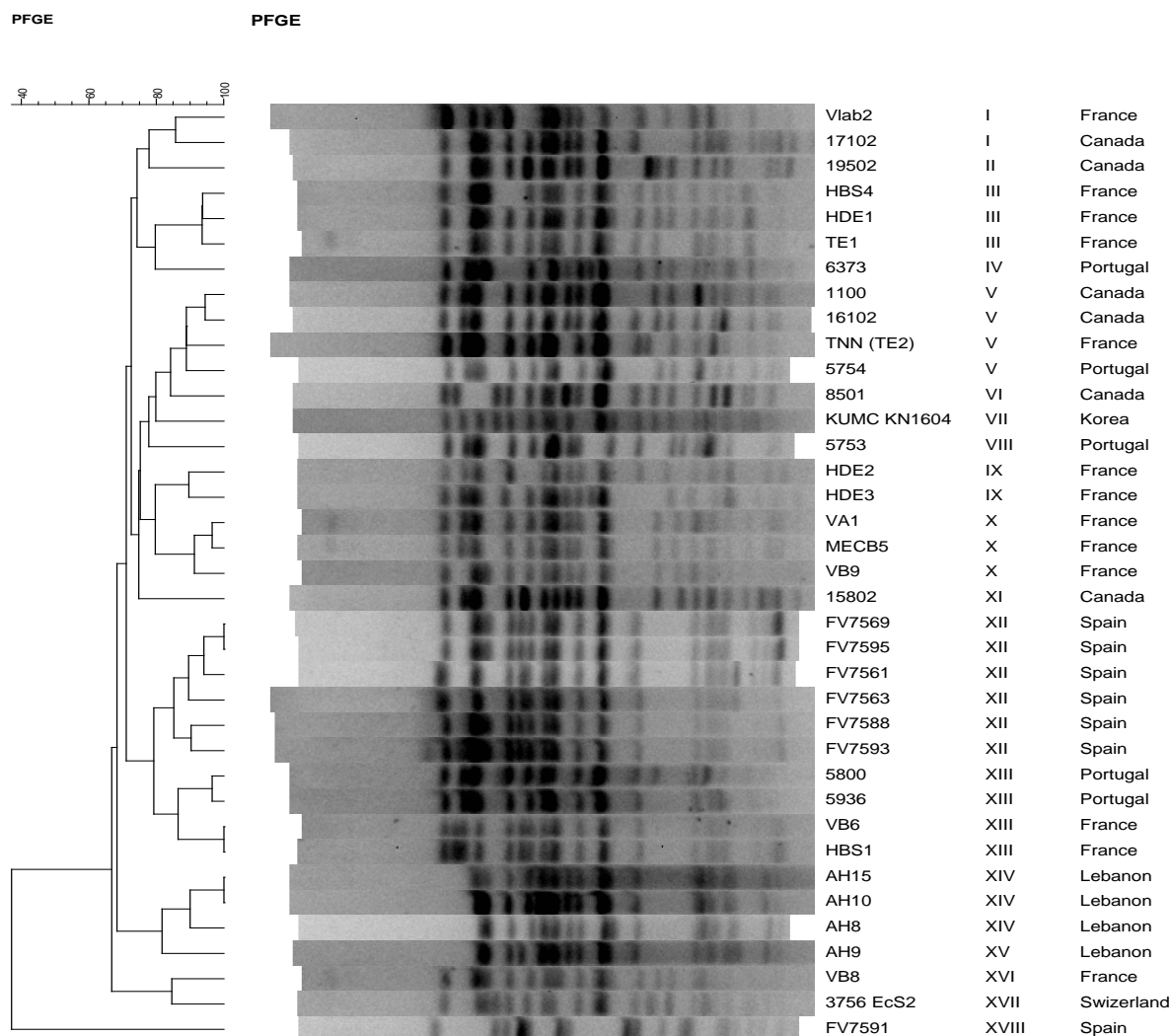


FIGURA 21. Dendrograma por PFGE-XbaI de las 36 cepas O25b:H4-ST131 productoras de CTX-M-15. Se incluye la cepa FV7591 O25a-ST648 productora de CTX-M-1 no perteneciente al grupo clonal ST131 (Nicolas-Chanoine *et al.*, 2008).

Otro consorcio internacional liderado por Coque *et al.* (2008b) analizó 43 cepas de *E. coli* productoras de CTX-M-15 y 6 plásmidos con el gen *bla*_{CTXM-15} de Canadá, India, Kuwait, Francia, Suiza, Portugal y España. Detectaron cepas del grupo filogenético B2 y la secuencia tipo ST131 en todos los países. Todos los plásmidos CTX-M-15 correspondían al grupo de incompatibilidad IncFII. Un plásmido (B) estaba presente únicamente en las cepas ST131 expandidas a nivel mundial. La mayoría de los plásmidos de CTX-M-15 codifican además para *bla*_{OXA-1}, *aac(6')-Ib-cr*, y *bla*_{TEM-1} (Coque *et al.*, 2008b; Jones *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2009; Pomba *et al.*, 2009).

Clermont *et al.* (2008) comprobaron que las cepas del clon ST131 tienen una variante del antígeno O25 a la que denominaron O25b, para cuya detección desarrollaron una PCR de alelo específico para el gen *pabB*, específico para el subgrupo B2 I/O25b, el cual corresponde al clon ST131. Utilizando esta prueba se analizaron un total de 627 cepas de *E. coli* que fueron recolectadas de 4 continentes (Europa, Asia, África y América), de las cuales fueron positivas 143 cepas productoras de BLEE. Todos estos aislados fueron del tipo O25b-ST131 (Clermont *et al.*, 2009). Estudios publicados recientemente indican que el clon O25b-ST131 se está expandiendo de forma espectacular por todo el mundo y aunque la mayoría de las cepas productoras de BLEE son CTX-M-15, también se han identificado cepas CTX-M-2, -3, -9, -14, -27, -32, -35 y -61, siendo las productoras de CTX-M-14 las más prevalentes en un estudio realizado en Japón, mientras que en otro realizado en Belfast predominaban las CTX-M-3 (Woodford *et al.*, 2004; López-Cerero y Pascual, 2007; Leflon-Guibout *et al.*, 2008; Yumuk *et al.*, 2008; Arpin *et al.*, 2009; Clermont *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2009; Literacka *et al.*, 2009).

La emergencia y la propagación a nivel mundial de CTX-M-15 ha cambiado la epidemiología de la *E. coli* productora de BLEE. La distribución de este tipo de BLEE varía entre los diferentes países de Norteamérica. En Canadá, se observó un incremento significativo de *E. coli* productora de BLEE desde el 2005 hasta el 2007, principalmente debido a la diseminación del clon ST131, el cual produce CTX-M-15 y CTX-M-14 (Pitout *et al.*, 2009; Oteo *et al.*, 2010a). En otro estudio multicéntrico realizado en Canadá, de 209 cepas de *E. coli* productoras de BLEE, el 71% fueron CTX-M-15. En total, el 46% de las cepas productoras de BLEE fueron identificadas como miembros del grupo clonal ST131 (Peirano *et al.*, 2010). En EE.UU., si bien las cepas de *E. coli* productoras de CTX-M-15 fueron aisladas con una prevalencia muy baja, recientemente se ha observado un incremento muy importante, hasta el punto de que este grupo ha sido descrito como el predominante en algunas áreas de los EE.UU. En Pensilvania se analizaron 70 cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas entre 2007 y 2008. El 81% de las cepas BLEE positivas eran productoras de CTX-M, de las cuales la más predominante fue la CTX-M-15 (46 cepas). Todas estas cepas productoras de CTX-M-15, así como 3 cepas productoras de CTX-M-14, 2 productoras de SHV-5 y una productora de SHV-7, correspondían al grupo clonal O25b:H4-ST131 (Sidjabat *et al.*, 2009). Johnson *et al.* (2012a) analizaron 351 cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas en 15 centros

estadounidenses que fueron recolectadas desde el 2000 al 2009, demostrando que el 57% de las cepas de *E. coli* eran productoras de CTX-M-15, siendo el 47% de ellas ST131 positivas.

En el Reino Unido se analizaron un total de 291 cepas de *E. coli* productoras de CTX-M que fueron recolectadas desde 42 centros británicos. De estas, 279 cepas (95,9%) contenían genes que codifican para enzimas del grupo CTX-M-1. En este estudio lo más notable fue que 110 cepas formaban un *cluster* que representaba a una simple cepa epidémica, que fue designada como cepa A. Por otra parte, otros 4 *clusters* fueron también observados. Estos fueron designados como cepa B, C, D y E. En total, 188 cepas de 291 productoras de CTX-M pertenecían a 1 de estos 5 *clusters*. De estos *clusters*, 56 cepas estudiadas fueron serotipadas como O25. A la vez, una cantidad representativa de estas cepas fueron secuenciadas como productoras de CTX-M-15 (Woodford *et al.*, 2004). En Francia, en un estudio realizado durante el 2006, se analizaron 72 cepas productoras de BLEE, muchas de las cuales expresaban enzimas CTX-M; 40 cepas de *E. coli* eran productoras de CTX-M-15, 10 de ellas correspondían al grupo clonal O25b:H4-ST131 (Arpin *et al.*, 2009). Cagnacci *et al.* (2008) analizaron un total de 148 cepas de *E. coli* que fueron aisladas durante el 2003 al 2006 en 32 centros distribuidos en 8 países diferentes (España, Rusia, Italia, Alemania, Polonia, Francia, Hungría y Austria). La producción de BLEE fue detectada en 12 cepas, la más común fue la enzima CTX-M-15. Un total de 35 cepas pertenecían al grupo clonal O25:H4-ST131.

En España, nuestro grupo de investigación ha realizado, en colaboración con la Unidad de Microbiología del Hospital Universitario Lucus Augusti de Lugo, un estudio en el que determinamos la prevalencia y el tipo de BLEE producido por las cepas de *E. coli* aisladas entre febrero de 2006 y mayo de 2008. La prevalencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEE se incrementó del 3,8% en el año 2006 a un 7,4% en el 2008. Las enzimas más frecuentemente encontradas fueron: CTX-M-14 (57,1%), CTX-M-15 (21,9%), SHV-12 (9,5%) y CTX-M-32 (6,7%). Las cepas que producían CTX-M-14, CTX-M-32 y SHV-12 pertenecían a una amplia variedad de serotipos O:H y presentaban una amplia diversidad genética por PFGE. En contraste, observamos que las cepas productoras de CTX-M-15 se englobaban en el grupo clonal O25b-ST131 y pertenecían a un mismo *cluster* de PFGE. Las cepas de *E. coli* del grupo clonal O25b-ST131 productoras de CTX-M-15 se aislaron en 24 de los 29 meses del período de estudio. La primera en febrero de 2006 y la última en mayo del año 2008 (Blanco *et al.*, 2009).

1.3.5.1. Subclones del grupo clonal ST131

Los estudios recientes de epidemiología molecular y el estudio filogenético de todo el genoma de las cepas ST131 han contribuido a esclarecer la fina estructura clonal de ST131, que consta de múltiples subclones con distintos perfiles de resistencia, incluyendo los subclones H22, H30, H30-Rx y H41 (Banerjee *et al.*, 2013c; Price *et al.*, 2013; Banerjee *et al.*, 2014; Banerjee y Johnson, 2014; Nicolas-Chanoine *et al.*, 2014; Peirano y Pitout, 2014; Peirano *et al.*, 2014a; Petty *et al.*, 2014). Las primeras cepas aisladas del grupo clonal ST131 presentaban el alelo *fimH22* y eran sensibles a la ciprofloxacina. La resistencia a la ciprofloxacina asociada con el alelo *fimH30* parece que fue esencial en la expansión de las cepas ST131, ya que el subclón H30 emergió con mucha fuerza a partir del año 2000, expandiéndose rápidamente hasta convertirse en la actualidad en el más dominante a nivel mundial entre las cepas de *E. coli* extraintestinales.

En los estudios de Price *et al.* (2013) y Petty *et al.* (2014), al secuenciar el genoma completo de las cepas ST131, entre las cepas *fimH30* resistentes a la ciprofloxacina, se identificó un importante subclón denominado H30-Rx por su extensiva resistencia a los antibióticos. La gran mayoría de las cepas de este subclón eran productoras de CTX-M-15. Las recientes publicaciones revelan que el subclón H30-Rx es el que se está expandiendo rápidamente a nivel mundial entre las cepas productoras de BLEE (Banerjee *et al.*, 2013c; Banerjee y Johnson, 2014; Peirano y Pitout, 2014; Peirano *et al.*, 2014a). No obstante, la mayoría de los estudios se han realizado en EE.UU. y Canadá, y hay muy pocos datos sobre los subclones de ST131 en Europa. Concretamente Peirano y Pitout (2014) analizaron 4.698 cepas de *E. coli* bacteriémicas aisladas en Canadá entre los años 2000 y 2010. La prevalencia de cepas resistentes a las quinolonas fluoradas (R-QF) pasó del 6% (2000) al 26% (2010). De las 197 (4%) productoras de BLEE, 194 fueron R-QF. El 46% de las cepas R-QF eran del grupo clonal ST131. Un total de 299 (6%) cepas bacteriémicas pertenecían al subclón H30 y 97 (2%) eran del subclón H30-Rx. Entre las cepas R-QF se incrementó el porcentaje de cepas ST131 pasando de un 42% (2000-2007) a un 50% (2008-2010), y dicho incremento fue debido al subclón H30-Rx.

Banerjee *et al.* (2013c), al analizar una colección de 71 cepas ST131, mostraron que las cepas H30-R y las cepas de subclón H30-Rx tienen distintos perfiles de virulencia que las cepas no-

H30. Curiosamente, varios genes de virulencia fueron específicos de un determinado subclón. Los genes *iha*, *sat* y *iutA* fueron prevalentes entre las cepas H30, pero los genes *iron*, *K1* y *ibeA* fueron más prevalentes entre las cepas no-H30.

Recientemente también se han identificado cepas del grupo clonal ST131 pertenecientes al serotipo O16:H5 (Johnson *et al.* 2014) que pertenecen al subclón H41 y poseen un perfil de genes de virulencia similar al de las cepas del serotipo O25b:H4. Aunque la media de genes de virulencia de las cepas del serotipo O16:H5 ha resultado ser inferior al de las cepas O25b:H4, en los ensayos de virulencia *in vivo* realizados en un modelo de sepsis murino resultaron ser en algunos casos tan letales como las cepas O25b:H4 del subclón H30-Rx (Mora *et al.* 2014). Los estudios realizados por Matsumura *et al.* (2012b, 2013) en Japón, Kudinha *et al.* (2013) en Australia y Johnson *et al.* (2014) en EE.UU., Olesen *et al.* (2013) en Dinamarca y Dahbi *et al.* (2013) en España indican que las cepas ST131 del serotipo O16:H5 son mucho menos prevalentes que las del serotipo O25b:H4, que la resistencia a ciprofloxacina entre estas cepas no es tan frecuente y que las que son productoras de BLEE suelen ser positivas para CTX-M-14.

1.3.6. Grupo clonal O15:H1-D-ST393

En Inglaterra, en el sudeste de Londres, una cepa de *E. coli* no común fue responsable de un brote comunitario entre octubre de 1986 y octubre de 1987. Muchos pacientes tenían infección del tracto urinario y algunos septicemia, 3 de estos pacientes murieron. Al principio la cepa fue reconocida debido a su inusual patrón antimicrobiano, el cual incluye resistencia a la ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, sulfonamida, tetraciclina y trimetoprim. Posteriormente se comprobó que la cepa de *E. coli* que fue responsable de 29 casos de septicemia durante el brote pertenecía al serotipo O15:K52:H1, mientras que en los 17 años anteriores esta cepa había causado solo 16 de los 674 casos analizados (Phillips *et al.*, 1988; George y Manges, 2010). Resultados similares fueron obtenidos por O'Neill *et al.* (1990) en Inglaterra en un estudio realizado durante los meses de noviembre y diciembre de 1986. Caracterizaron un total de 123 cepas de *E. coli* aisladas de sangre, observando un marcado incremento de la prevalencia del serogrupo O15. Durante este período, 25 cepas (20%) fueron de este serogrupo, de las cuales 20 cepas expresaban el mismo patrón de multirresistencia.

También estudiaron 195 cepas aisladas de orina, recolectadas entre enero y junio de 1987; 26 cepas pertenecieron al serogrupo O15 y, de ellas, 20 fueron multirresistentes.

En un estudio realizado en Dinamarca, el O15:K52:H1 fue el segundo serotipo más común entre las cepas de *E. coli* aisladas de sangre en el hospital de Copenhague. Caracterizaron 377 cepas de *E. coli* que fueron recolectadas desde 1986 hasta 1990. Diecisiete cepas fueron O15:K52:H1 y todas mostraban el mismo perfil de factores de virulencia que las cepas del brote de Londres (Olesen *et al.*, 1995; Prats *et al.*, 2000).

Hasta ese momento el grupo clonal O15:K52:H1 había sido descrito solo en Europa. Con el objetivo de detectar este grupo clonal fuera de Europa, se analizaron 75 cepas de *E. coli* del serogrupo O15 que fueron recolectadas en EE.UU., Canadá y otros países. Estas cepas fueron comparadas con 5 cepas del grupo clonal O15:K52:H1 de Barcelona, de acuerdo con el *background* genómico, los factores de virulencia y el perfil de resistencia antimicrobiana. El análisis de *clusters* de acuerdo al perfil de RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) y ERIC2 PCR mostró 4 grandes *clusters*. El *subcluster* predominante contenía las 5 cepas españolas y 16 cepas no europeas que corresponderían al grupo clonal O15:K52:H1. Ciertos factores de virulencia fueron significativamente más prevalentes entre las 5 cepas españolas y las 16 cepas no europeas del grupo clonal O15:K52:H1 que entre las restantes 59 cepas del serogrupo O15. Los factores de virulencia asociados al serotipo O15:K52:H1 fueron el *papG* alelo II (fimbria P), *iha* (*iron-regulate gene homologue adhesin*), *kpsMTII* (cápsula grupo II), *fyuA* (receptor de yersiniabactina) y *iutA* (receptor de aerobactina). El perfil de resistencia antimicrobiano fue variable. Este estudio indica que el grupo clonal O15:K52:H1 está ampliamente distribuido a nivel mundial (Johnson *et al.*, 2002a).

Debido a la emergencia de grupos clonales multirresistentes, como el grupo clonal O15:K52:H1 de *E. coli*, y que este grupo clonal con el tiempo había comenzado a incrementar su virulencia y su resistencia a antibióticos, Olesen *et al.* (2009) analizaron una colección internacional de 100 cepas de *E. coli* O15:K52:H1 que fueron recolectadas entre 1975 y 2006. Del total de cepas, 57 fueron aisladas de sangre, 27 de orina, 5 de heces y 11 eran de origen desconocido. Las 100 cepas pertenecieron al grupo filogenético D. El MLST fue realizado a 12 cepas del estudio que presentaron la secuencia tipo ST393 y que llevaban los factores de virulencia *papG* alelo II, *iha*, *fimH*, *fyuA*, *iutA* y *kpsM* tipo II. El 55% de las cepas mostraba resistencia de 1 a 9

antimicrobianos y el 16% exhibía multiresistencia. En este estudio demostraron que en las 3 primeras décadas desde su aparición el grupo clonal O15:K52:H1 había mantenido un perfil de virulencia bastante estable, a diferencia de su perfil de resistencia antimicrobiana que se había vuelto progresivamente más amplio (Olesen *et al.*, 2009).

En España, para clarificar la clínica y la correlación bacteriológica de las infecciones urinarias debidas a la *E. coli* O15:K52:H1, se realizó el análisis de 1.871 cepas de *E. coli* aisladas de orina en el hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona que fueron recolectadas durante un año (junio de 1994 a mayo de 1995). En total, 25 cepas de *E. coli* fueron del serotipo O15:K52:H1, las cuales fueron comparadas con 22 cepas O15:K52:H1 que fueron aisladas de otros lugares de España e Inglaterra y 23 cepas control (8 cepas de referencia colección ECOR y 15 cepas de serotipos O:K:H no patógenos). Se analizaron las características fenotípicas y genotípicas de todas ellas. Los resultados obtenidos demostraron que aunque las cepas O15:K52:H1 causan solo una pequeña fracción de todas las ITU, cuando éstas causan ITU adquiridas en la comunidad son mucho más agresivas que las otras cepas de *E. coli*. También encontraron que las cepas O15:K52:H1 de las diversas áreas geográficas fueron similares, pero diferentes de las cepas control de otros serotipos en lo que respecta al perfil de factores de virulencia (Dalmau *et al.*, 1996; Prats *et al.*, 2000).

1.3.7. Grupo clonal GCA-D-ST69

El incremento de la resistencia a antibióticos de primera generación, particularmente al cotrimoxazol, ha complicado el control de las infecciones del tracto urinario. Casi a finales de los años 90 en los EE.UU., otro grupo clonal de cepas ExPEC, designadas provisionalmente como grupo clonal A (GCA), se había demostrado que era responsable de entre el 33% y el 57% de los episodios de cistitis aguda no complicada y pielonefritis debidas a cepas de *E. coli* resistentes a cotrimoxazol (Johnson *et al.*, 2002b; Burman *et al.*, 2003; Manges *et al.*, 2004). En el estudio realizado por Manges *et al.* (2001) se analizaron 255 cepas de *E. coli* aisladas en California: 55 cepas fueron resistentes a cotrimoxazol, de ellas, 28 exhibían el mismo patrón de 4 bandas de acuerdo a ERIC2 PCR y fueron identificadas como del grupo clonal A. A este grupo clonal también pertenecieron las 7 cepas que fueron aisladas en Minnesota y 11 cepas en Michigan. Muchas de las cepas del grupo clonal A pertenecían a los serotipos O11:HNT y O77:HNT, y presentaban similares patrones de factores de virulencia (*papG* II, *iutA*, *kpsMTII* y

traT), de susceptibilidad antimicrobiana y características electroforéticas. En otro estudio, entre mayo de 2001 y mayo de 2003 en el Hospital General de San Francisco se aislaron de sangre un total de 127 cepas de *E. coli* de las cuales 48 cepas (39%) fueron resistentes a cotrimoxazol. Diecinueve cepas (15%) de los serogrupos O11, O77, O17 y O73 fueron definidas como del GCA por ERIC2 PCR, (Manges *et al.*, 2006).

Hasta ese momento, el grupo clonal A había sido estudiado solo dentro de los EE.UU. En el año 2005 Johnson *et al.* (2005) realizaron un estudio más amplio en el que participaron 20 laboratorios de microbiología clínica (10 de EE.UU. y 10 de otros países), cada laboratorio proporcionó aproximadamente entre 24 y 100 cepas consecutivas de *E. coli* resistentes y sensibles a cotrimoxazol. De un total de 1.102 cepas analizadas, 68 cepas (6%) fueron del grupo clonal A y del grupo filogenético D. Las cepas del GCA estaban asociadas fuertemente con la resistencia a cotrimoxazol, y el 15% de estas cepas fueron aisladas en EE.UU. y solo el 5% de otros países. Estas cepas fueron de los serogrupos O11, O17 y O77. De acuerdo con este estudio, el GCA está heterogéneamente distribuido pero es más prevalente en los EE.UU. Afecta a diversas poblaciones y exhibe un contundente perfil de genes de virulencia (*papGII*, *iha*, *iutA*, *kpsM II*, *traT* y *ompT*) (Johnson *et al.*, 2005).

En otro estudio se analizaron 196 cepas de *E. coli* aisladas de sangre que fueron recolectadas entre enero de 2003 y mayo de 2005 en 4 hospitales de Copenhague, Dinamarca. Treinta cepas (15%) de los serogrupos O11, O15, O17, O44, O73, O77 y O86 pertenecieron al grupo clonal A. El GCA fue responsable del 17% de las bacteriemias adquiridas en la comunidad y del 5% de las adquiridas en hospital (Skjot-Rasmussen *et al.*, 2013).

Como el GCA tenía implicaciones considerables para la salud pública, Johnson *et al.* (2011) examinaron la tendencia de su distribución global, la asociación clínica y la prevalencia temporal durante los años 1998 a 2007. Caracterizaron 2.210 cepas ExPEC que fueron aisladas en 32 laboratorios de microbiología clínica de los 5 continentes. Cada centro proporcionó una media de 54 aislados (rango 24-320). Todos los centros, excepto 1, proporcionaron aproximadamente un número similar de cepas sensibles y resistentes a cotrimoxazol. En este estudio, 144 cepas fueron del GCA de acuerdo al tipado molecular, encontrándose claramente asociado con la resistencia a cotrimoxazol: el 10,1% de las cepas resistentes a cotrimoxazol perteneció al GCA frente a tan sólo el 2,8% de las cepas sensibles. La prevalencia del GCA por

centro osciló entre el 0% y el 34%. En 5 centros (2 de EE.UU. y 3 de otros países) la prevalencia del GCA fue superior al 20%. Por otra parte, no se encontró asociación del GCA con otras variables epidemiológicas (tipo de muestra, edad del paciente, condición del paciente interno/externo). La prevalencia del GCA se mantuvo estable a lo largo del período de estudio, sugiriendo que el GCA había emergido completamente a finales de los años 90 y hoy en día es una amenaza endémica de salud pública a nivel mundial (Johnson *et al.*, 2011).

Para determinar la prevalencia de los 3 grupos clonales mayoritariamente diseminados a nivel mundial se realizaron algunos estudios como el de Johnson *et al.* (2009) en el cual se analizaron 199 cepas de *E. coli* que fueron recolectadas en Canadá entre el 2002 y el 2004. De acuerdo al tipado molecular, las más prevalentes fueron las cepas de *E. coli* del grupo clonal ST131 (23,1%), 19 cepas (9,5%) correspondían al grupo clonal O15:K52:H1 y 9 cepas (4,5%) correspondían al GCA. Así, el 37,2% del total de las cepas analizadas pertenecían a alguno de estos 3 grupos clonales. En otro estudio, realizado en Australia, se analizaron 582 cepas de *E. coli* aisladas de humanos y 125 cepas aisladas de animales que fueron recolectadas entre octubre de 2007 y octubre de 2009. Del total de las cepas analizadas, 205 cepas (35%) aisladas de humanos y 9 cepas (7,2%) aisladas de animales fueron del grupo clonal ST131. En contraste, el GCA y el O15:K52:H1 no fueron tan comunes entre los aislados humanos: solo 8 cepas (1,4%) fueron del GCA y 33 cepas (5,7%) fueron del grupo clonal O15:K52:H1. Solo una cepa de los aislados de animales fue positiva para el O15:K52:H1 (Platell *et al.*, 2010).

1.3.8. Resistencia a antibióticos

Las cepas BLEE suponen un grave problema terapéutico porque además de ser resistentes a la gran mayoría de los β -lactámicos, también llevan frecuentemente resistencia cotransferida a quinolonas, aminoglucósidos, cloranfenicol, tetraciclinas y trimetoprim- sulfametoxazol (Barrera *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2005; Paterson y Bonomo, 2005; Schwaber *et al.*, 2005; Baquero *et al.*, 2006; Martínez-Martínez, 2007). Las causas de estas altas tasas de resistencia son múltiples, tanto desde el punto de vista bioquímico como genético. Los mecanismos implicados pueden ser consecuencia de mutaciones o de reorganizaciones cromosómicas (alteraciones de la permeabilidad, producción de enzimas de codificación cromosómica) o de la presencia de otros genes de resistencia incluidos en los plásmidos que codifican la BLEE, o

incluso en otros plásmidos que se encuentran en el mismo microorganismo (Martínez-Martínez, 2007).

La aparición de cepas de *E. coli* bacteriémicas resistentes a antibióticos continua incrementándose a nivel europeo, tanto de las multirresistentes como de las resistentes a un solo antibiótico, tal como se observa en los informes anuales de EARSS (<http://www.rivm.nl/earss/about/>).

En el informe anual de EARSS-2012 se presentaron los resultados de treinta países europeos. Del total de 70.857 cepas de *E. coli* aisladas de hemocultivos, el 11,8% fueron resistentes a las cefalosporinas de tercera generación y el rango de la proporción de los aislados resistentes osciló entre el 4,4% (Suecia) y el 38,1% (Bulgaria). Tres países mostraron porcentajes de resistencia menor al 5%, 11 países entre el 5% y 10%, otros 11 entre el 10% y 25% y 5 países mostraron los valores más altos arriba del 25% (**FIGURA 22**) (EARSS, 2012).

En el informe anual de 2007, España, con 3.678 cepas de *E. coli* invasivas y una tasa de resistencia del 7%, figuraba en una posición menos alarmante, pero en el informe de 2012 la situación empeoró. España, con 5.672 cepas, presenta un porcentaje de 13,5% de resistencia a cefalosporinas de tercera generación (**FIGURA 22**) (EARSS, 2007; EARSS, 2012).

De acuerdo al informe anual de EARSS-2012, la resistencia a las fluoroquinolonas se ha incrementado (**FIGURA 23**). Del total de 71.800 cepas de *E. coli* invasivas proporcionadas por los treinta países implicados en el estudio, el 22,3% de las cepas fueron resistentes a fluoroquinolonas. La proporción de las cepas resistentes en los diferentes países varía entre el 9,7% y el 42,0%. La mayoría de los países (18 de 30) detectaron porcentajes superiores al 20%, en 11 países osciló entre 10% y 20% y solo Islandia mostró un porcentaje inferior al 10%.

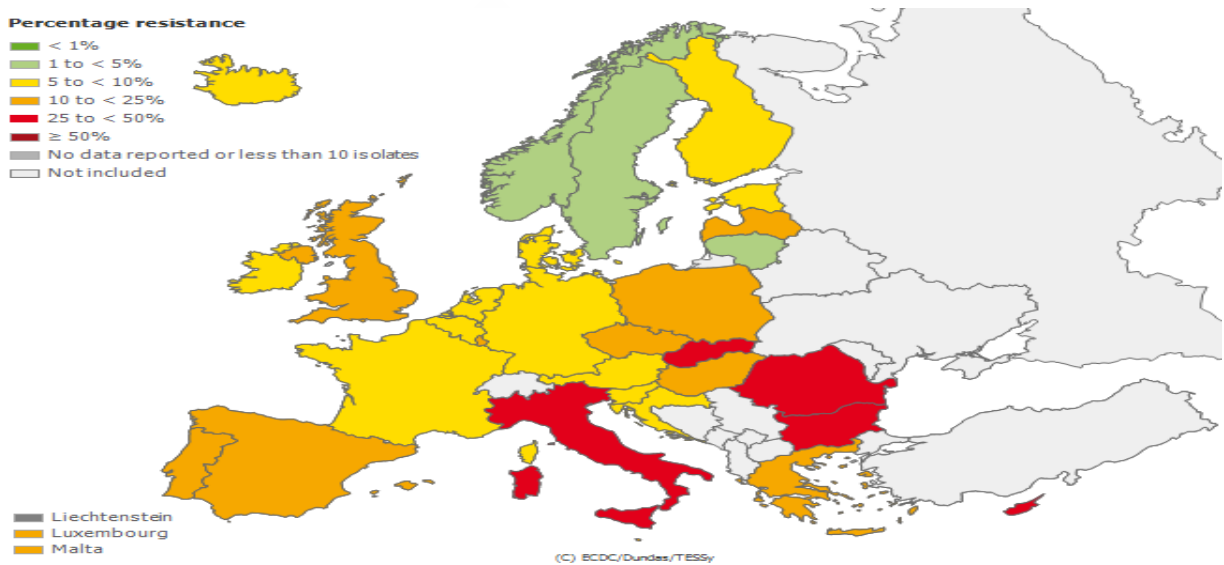
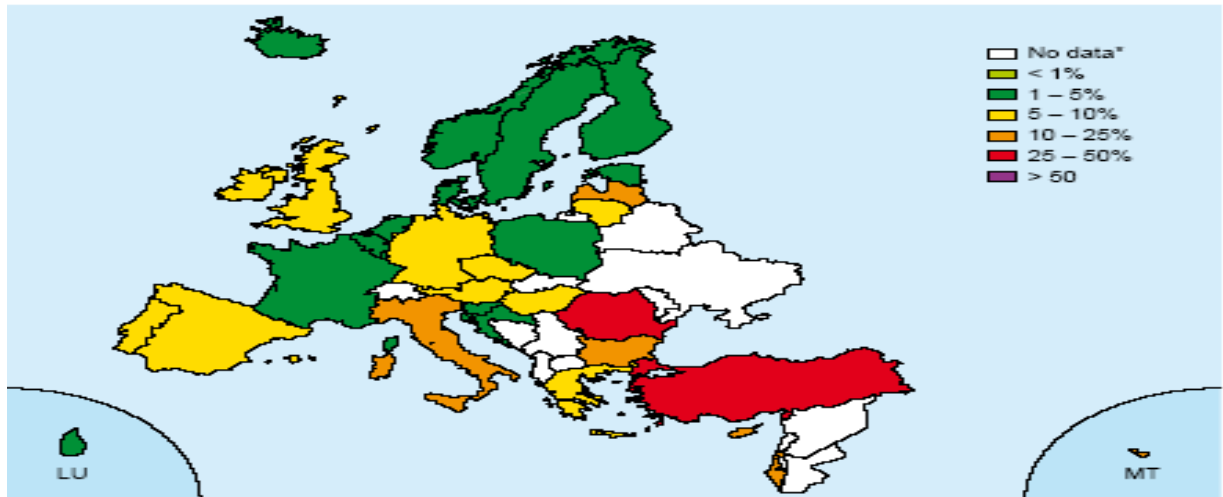


FIGURA 22. Porcentaje de cepas de *E. coli* invasivas resistentes a cefalosporinas de tercera generación (arriba) 2007, (abajo) 2012 (EARSS, 2007; 2012).

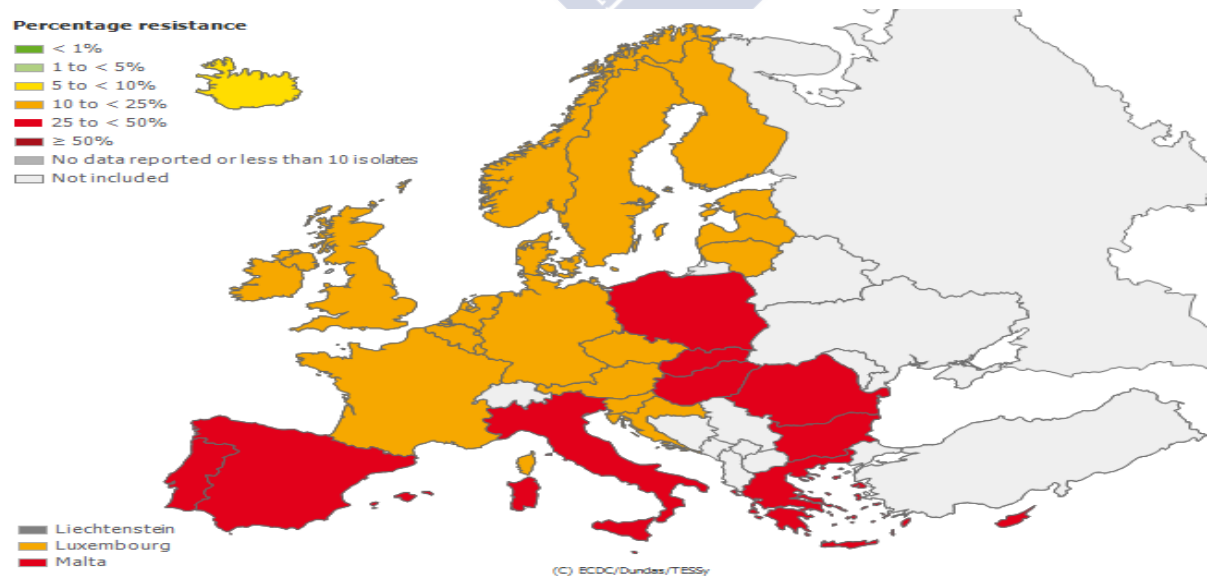


FIGURA 23. Porcentaje de cepas de *E. coli* invasivas resistentes a fluoroquinolonas (EARSS, 2012).

En España, como se observa en la **TABLA 5**, desde el 2001 se ha incrementado la resistencia a fluoroquinolonas de las cepas de *E. coli* invasivas. En ese año, de un total de 1.652 cepas estudiadas el 17,3% fueron resistentes. Con el transcurso de los años, el porcentaje de resistencia fue aumentando y alcanzó el 33,9% en el año 2012 (EARSS, 2012).

TABLA 5. Porcentaje de cepas de *E. coli* invasivas resistentes a fluoroquinolonas y a aminoglucósidos en España, 2001-2012.

Año	Susceptibilidad a fluoroquinolonas		Susceptibilidad a aminoglucósidos	
	Nº de cepas	% de Resistencia	Nº de cepas	% de Resistencia
2001	1.652	17,3	1.656	6,8
2002	2.478	19,3	2.480	7,5
2003	2.639	21,0	2.649	7,3
2004	3.466	25,4	3.467	7,5
2005	2.993	28,2	2.996	9,9
2006	3.360	28,0	3.363	9,3
2007	3.659	30,4	3.678	10,1
2008	3.610	32,5	3.622	11,2
2009	3.810	31,5	3.820	13,0
2010	5.696	32,8	5.696	14,2
2011	5.597	34,5	5.603	14,8
2012	5.654	33,9	5.675	15,6

Fuente: EARSS, 2012.

Los aminoglucósidos (gentamicina, tobramicina, amikacina, etc.) son otro grupo de antibióticos que ha incrementado su porcentaje de resistencia entre las cepas de *E.coli*. Los treinta países participantes informaron de los resultados de 68.567 cepas de *E.coli* invasivas, de las cuales el 10,3% fueron resistentes a aminoglucósidos. La proporción de cepas resistentes entre los diferentes países oscilaron entre el 3,6% y el 26,5%. Trece de los treinta países presentaron porcentajes de cepas resistentes superiores al 10% y dieciséis países se situaron entre el 5% y 10%. Únicamente, Islandia mostró una prevalencia inferior al 5% (**FIGURA 24**) (EARSS, 2012).

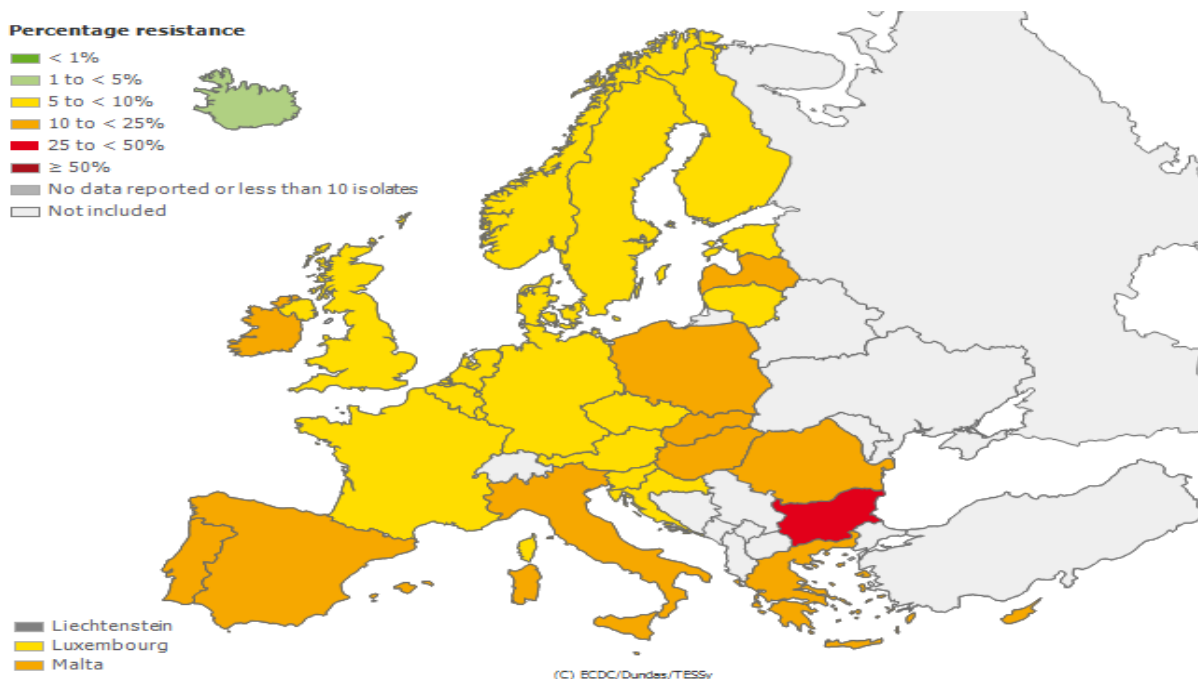


FIGURA 24. Porcentaje de cepas de *E. coli* invasivas resistentes a aminoglucósidos (EARS-2012).

En España el porcentaje de cepas de *E. coli* invasivas resistentes a aminoglucósidos se fue incrementando con el transcurso de los años, pasando del 6,8% en el año 2001 al 15,6% en el 2012 (**TABLA 5**) (EARSS, 2012).

Para determinar la resistencia combinada a cefalosporinas de tercera generación, fluoroquinolonas y aminoglucósidos, se analizaron un total de 64.861 cepas de *E. coli*. De estas cepas, el 4,4% fueron resistentes a los 3 grupos de antibióticos. El porcentaje de cepas multirresistentes (resistencia a cefalosporinas de tercera generación, fluoroquinolonas y aminoglucósidos) fue superior al 10% en 7 países (Bulgaria, Chipre, Grecia, Italia, Rumania, Eslovaquia y Hungría), en 6 países osciló entre 5% y 10%, y en los restantes 17 países el porcentaje fue inferior al 5% (**TABLA 6**) (EARSS, 2012).

TABLA 6. Porcentaje de cepas de *E. coli* invasivas multirresistentes a fluoroquinolonas, cefalosporinas de tercera generación y aminoglucósidos, aisladas en treinta países europeos, EARS-2012.

País	Nº de cepas	% de resistencia combinada a fluoroquinolonas, cefalosporina de tercera generación y aminoglucósidos
Austria	3.579	2,5
Belgica	3.330	1,8
Bulgaria	223	16,1
Croacia	902	2,1
Chipre	176	14,8
República Checa	2.809	4,5
Dinamarca	2.285	2,6
Estonia	303	1,7
Finlandia	2.993	3,1
Francia	5.655	3,3
Alemania	4.179	3,2
Grecia	1.368	10,7
Hungria	1.387	10,5
Islandia	130	0,7
Irlanda	2.283	4,0
Italia	2.684	14,5
Letonia	152	6,6
Lituania	455	1,3
Luxemburgo	334	2,7
Malta	214	7,9
Holanda	4.675	1,8
Noruega	2.835	1,9
Polonia	1.011	5,8
Portugal	2.152	9,2
Rumania	127	14,2
Eslovaquia	692	13,6
Eslovenia	1.168	5,1
España	5.651	5,9
Suecia	5.532	1,8
Reino Unido	5.577	4,1
Total	64.861	4,4

Nota: solo se incluyeron las cepas analizadas para los 3 grupos de antimicrobianos.

1.3.9. Epidemiología de la bacteriemia

La bacteriemia es una de las causas principales de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, por lo que se han realizado numerosos estudios, tanto en las de origen hospitalario como

comunitario, y la *E. coli* es uno de los microorganismos que más frecuentemente causa bacteriemia (Busselo *et al.*, 1997; Jackson *et al.*, 2005; Jauréguy *et al.*, 2007; Laupland *et al.*, 2007; Rodríguez-Baño *et al.*, 2010a; Lefort *et al.*, 2011; Salvador *et al.*, 2011; Ballot *et al.*, 2012).

En los EE.UU. se realizaron algunos estudios sobre la epidemiología de la bacteriemia para determinar la incidencia de diferentes factores asociados con la mortalidad (Martin *et al.*, 2003; Uslan *et al.*, 2007). En el estudio realizado por Diekema *et al.* (2003) se analizaron 929 episodios consecutivos de bacteriemias que se presentaron entre febrero de 1999 y julio de 2000 en 2 centros de salud. La *E. coli* fue responsable de 154 episodios de bacteriemias, siendo la causa más común de bacteriemia de origen comunitario. Ciento tres episodios fueron de origen comunitario, provocando la muerte de 12 pacientes, y 51 de origen hospitalario, causando 19 fallecimientos. En Canadá se realizó un estudio de vigilancia de la bacteriemia por *E. coli* durante el período 2000-2006. En total se analizaron 2.368 episodios de bacteriemias por *E. coli*: el 15% fue nosocomial, el 32% fue asociado a centros de salud con inicio comunitario y el 53% fueron bacteriemias adquiridas en la comunidad. Los niños y los pacientes mayores de edad fueron los grupos de mayor riesgo para la bacteriemia por *E. coli*. El 60% de los episodios ocurrió en mujeres. Durante los 7 años del estudio se observó una incidencia relativamente estable (Laupland *et al.*, 2008).

En Taiwán, Chung *et al.* (2012) describieron la epidemiología molecular, las características clínicas y la evolución de la bacteriemia por *E. coli* productora de BLEE desde el 2005 al 2010. Durante el período de estudio, se recolectaron 122 cepas de *E. coli* productoras de BLEE, de las cuales 36 cepas (29,5%) fueron de la secuencia tipo ST131 y 9 de ellas fueron productoras de CTX-M-15. El 52,5% de los pacientes fueron masculinos, el 46,7% de los casos fueron clasificados como infección adquirida en hospital y el 53,3% como adquirida en la comunidad. En el estudio realizado en Corea, fueron identificados un total de 929 episodios de bacteriemia por *E. coli*. Veinticuatro pacientes de 38 (63,2%) presentaban bacteriemia asociada a hospitales y 14 pacientes (36,8%) presentaron bacteriemia adquirida en la comunidad. Ocho de los pacientes que tenían bacteriemia por *E. coli* productoras de BLEE fallecieron (Kang *et al.*, 2008). En la India se analizaron un total de 13.153 hemocultivos positivos desde el 2000 al 2009. De estas muestras positivas, la *E. coli* fue responsable de 1.103 casos de bacteriemias

(19,06%). Las cepas de *E. coli* productoras de BLEE se incrementaron desde el 40% en el 2002 al 61% en el 2009 (Datta *et al.*, 2012).

En Australia examinaron todos los episodios de bacteriemias por *E. coli* desde enero de 2000 a diciembre de 2004. Durante los 5 años del período de estudio, 511 episodios de bacteriemias por *E. coli* fueron identificadas, de los cuales 347 (68%) estaban asociados a la comunidad y 163 a centros de salud. En este estudio, 26 pacientes murieron. El mayor foco de infección fue de origen genitourinario, tanto en hombres como en mujeres (Kennedy *et al.*, 2008).

En Dinamarca, en el estudio realizado por Olesen *et al.* (1995), compararon 205 cepas de *E. coli* bacteriémicas de origen hospitalario con 172 cepas de origen comunitario. Los serogrupos más frecuentes fueron el O18ac, O6, O1, O2, O15 y O75, los cuales comprendían el 48% del total de las cepas analizadas. Además, también se observó que la tasa de mortalidad fue significativamente superior entre pacientes hospitalizados que entre pacientes de origen comunitario. En el Reino Unido se realizó un estudio en el Hospital King George en Essex, desde junio de 2003 a noviembre de 2005. De 354 pacientes con bacteriemia por *E. coli*, el 13% de las mismas fueron productoras de BLEE, de las cuales el 34,8% fueron bacteriemias adquiridas en la comunidad y el 65,2% fueron adquiridas en hospital. La tasa de mortalidad provocada por la *E. coli* productora de BLEE fue significativamente más alta de 60,9% (28/46) que la tasa de mortalidad provocada por la *E. coli* no productora de BLEE que fue de 23,7% (73/308) (Melzer y Petersen, 2007).

En España, en el estudio realizado por Vázquez *et al.* (1992) desde 1981 a 1986, la *E. coli* fue la especie más frecuentemente aislada de hemocultivos en el Hospital Covadonga de Oviedo, siendo la responsable de 474 episodios de septicemia. El porcentaje de mortalidad global fue del 18%, y el 8,3% fue asociado directamente con la septicemia. También se encontró que las cepas de *E. coli* eran poco resistentes a los antimicrobianos. Los serogrupos más frecuentes fueron el O18 (13,9%), seguido por el O16 (6,9%). En otro estudio realizado durante un período de 4 años, la *E. coli* fue responsable de 160 episodios de bacteriemia. El origen más común de la bacteriemia fue la ITU (56%). Los serogrupos más frecuentes fueron el O6 (16%), O83 (11%), O2 (8%), O1 (6%), O18 (6%), O4 (4%), O9 (4%) y O15 (4%) (Dalmau *et al.*, 1996). Javaloyas *et al.* (2003) realizaron un estudio prospectivo de episodios consecutivos de bacteriemias por *E. coli* en el Hospital de Viladecans de Barcelona, desde enero de 1989 a diciembre de 1998.

Durante el período de estudio se recogieron 1.476 hemocultivos clínicamente significativos, que correspondieron a 798 pacientes con bacteriemia. Se aisló la *E. coli* en 335 pacientes. El 53,6% de las bacteriemias por *E. coli* ocurrió en mujeres. La edad fue superior a 71 años en el 51% de los pacientes, y el origen más frecuente de la bacteriemia fue la ITU (66%).

La bacteriemia causada por cepas de *E. coli* productoras de BLEE representa un desafío clínico porque estos microorganismos son frecuentemente resistentes a antimicrobianos recomendados para el tratamiento de pacientes con sepsis. De hecho, algunos estudios que se realizaron en España indican que entre el 12% y el 16% de las infecciones son debidas a la *E. coli* productoras de BLEE (Rodríguez-Baño *et al.*, 2004; Rodríguez-Baño *et al.*, 2006a,b). En el estudio realizado por Rodríguez-Baño *et al.* (2006b) se analizaron las bacteriemias causadas por cepas de *E. coli* productoras de BLEE entre enero de 2001 y marzo de 2005 en el Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla. Durante el período de estudio, 43 casos de bacteriemias fueron causadas por *E. coli* productora de BLEE. El número de casos se incrementó por año, pasando de 6 casos en el 2001 a 16 casos en el 2004. Veintiún casos fueron de adquisición nosocomial, 14 casos fueron asociados a centros de salud y 8 casos fueron de adquisición comunitaria. Treinta y siete cepas fueron caracterizadas para establecer el tipo de BLEE que producían, de las cuales 24 fueron productoras de CTX-M-14 y una fue CTX-M-9. Doce cepas fueron productoras de SHV (10 cepas de SHV-12 y 2 de SHV-4) (Rodríguez-Baño *et al.*, 2006b). Por otra parte, se realizaron también estudios para investigar los factores de riesgo para bacteriemias causadas por cepas de *E. coli* productoras de BLEE, lo que puede ayudar en la identificación de pacientes que presentan un alto riesgo de padecer bacteriemias por este tipo de cepas en áreas endémicas (Rodríguez-Baño *et al.*, 2008; Rodríguez-Baño *et al.*, 2010b).

Rodríguez-Baño *et al.* (2012) realizaron un estudio, en el cual analizaron 191 casos de bacteriemias causadas por cepas de *E. coli* productoras de BLEE que fueron recolectadas en 13 hospitales españoles entre octubre de 2004 y enero de 2006. Entre las 191 cepas aisladas, 55 cepas correspondían al grupo filogenético A, 55 cepas al B1, 51 cepas al D y 30 cepas al B2. El 70% de los aislados del grupo filogenético B2 y el 10,9% de los otros grupos filogenéticos fueron del grupo clonal O25b:ST131. Entre los grupos filogenéticos B1 y A, el tipo de BLEE predominante fue el CTX-M-14 y el CTX-M-15 entre las cepas del grupo filogenético B2.

En España, de acuerdo a las revisiones bibliográficas, no se han realizado análisis consecutivos de la bacteriemia por *E. coli* durante períodos largos. Además, existen escasos datos sobre la epidemiología molecular de estas cepas tanto productoras como no productoras de BLEE y también sobre los 3 grupos clonales (O25:H4-ST131, O15:K52:H1 y grupo clonal A). Tal es así, que en el presente estudio estos serán algunos de nuestros objetivos.



2. OBJETIVOS

- 1) Comparar los genes de virulencia y de resistencia a antibióticos de las cepas del grupo clonal ST131 que actualmente están causando sepsis en seres humanos con los de las cepas de dicho grupo clonal aisladas a lo largo de los 23 últimos años en los hemocultivos de pacientes del Hospital Universitario Lucus Augusti (HULA) de Lugo, con el objetivo de conocer cuándo apareció por primera vez dicho grupo clonal y los diferentes subclones, y establecer cómo se han ido expandiendo.
- 2) Estudiar los genes de virulencia y de resistencia a antibióticos y el grado de clonalidad de las distintas cepas por PFGE y clonotipado para conocer si las cepas del grupo clonal O25b:H4-ST131 aisladas en los diferentes hospitales españoles pertenecen a los mismos clusters y clonotipos, saber si existe una cepa predominante expandida a nivel nacional como es el caso de la cepa epidémica A en el Reino Unido y evaluar la diseminación de los diferentes subclones.
- 3) Comparar los genes de virulencia, de resistencia a antibióticos y el grado de clonalidad por PFGE y clonotipado de las cepas del grupo clonal O25b:H4-ST131 aisladas en diferentes hospitales españoles con las cepas aisladas en otros países y continentes con el objetivo de establecer si existe un cluster/clonotipo/subclón con una amplia difusión mundial o varios clusters/clonotipos/subclones con difusión únicamente en determinados países.
- 4) Determinar si durante la expansión de las cepas del grupo clonal O25b:H4-ST131 entre *E. coli* causantes de sepsis en los últimos 23 años en el HULA de Lugo se han desplazado otros clones de *E. coli* patógenos extraintestinales predominantes en las últimas décadas, dedicando especial atención a los grupos clonales O15:H1-D-ST393 y GCA-D-ST69.
- 5) Establecer si están emergiendo otros clones de ExPEC especialmente entre las cepas resistentes a los antibióticos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Cepas clínicas de *E. coli*

En el ESTUDIO I caracterizamos 654 cepas de *E. coli* productoras de BLEE que fueron aisladas de pacientes internos y externos entre los años 2005 y 2008 en 4 hospitales de Galicia: Complejo Hospitalario Xeral-Calde de Lugo (actual Hospital Universitario Lucus Augusti) (325 cepas), Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (150 cepas), Complejo Hospitalario de Ourense (100 cepas) y Complejo Hospitalario Arquitecto Marcide-Prof. Novoa Santos de Ferrol (79 cepas). Solo fue incluida una cepa por paciente y la mayoría fueron obtenidas de muestras de orina. Posteriormente las cepas fueron remitidas al LREC de la USC, donde se realizó la identificación del tipo de enzimas BLEE, serotipos, genes de virulencia, grupos filogenéticos, perfiles de PFGE y las secuencias tipo por MLST siguiendo el esquema de Achtman.

En el ESTUDIO II analizamos 94 cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de pacientes internos y externos del Hospital Vall d'Hebron de Barcelona en el año 2008. Se incluyó una sola cepa por paciente. Las cepas se aislaron de orina (69), sangre (10), del aparato respiratorio (6), de la piel (5) y de otros orígenes (4). Después de su recolección, las cepas fueron remitidas al LREC de la USC, donde se realizó la caracterización fenotípica (serotipo, genes de virulencia, grupos filogenéticos, tipo de enzimas BLEE, PFGE y MLST).

En el ESTUDIO III se analizaron un total de 500 cepas de *E. coli* causantes de infecciones extraintestinales, que fueron recolectadas durante el mes de febrero 2009 de pacientes internos y externos en 5 hospitales de diferentes regiones de España (Hospital Universitario Lucus Augusti de Lugo, Hospital Vall d'Hebron de Barcelona, Hospital Marqués de Valdecilla de Santander, Hospital 12 de Octubre de Madrid y Hospital Virgen de Macarena de Sevilla). En cada hospital se recogieron 100 cepas consecutivas de diferentes pacientes, responsables de infecciones extraintestinales. El 71% procedían de pacientes atendidos en ambulatorios (infecciones comunitarias y asociadas con cuidados sanitarios) y el 29% de pacientes hospitalizados (infecciones nosocomiales). El origen clínico era: 421 cepas de orina, 25 de sangre, 14 de herida quirúrgica, 5 de muestras del tracto respiratorio, 5 de bilis y 30 de otras muestras. Las 500 cepas fueron remitidas al LREC de la USC donde se realizó la detección de

los grupos clonales ST131, ST393 y ST69 y se identificaron las cepas productoras de CTX-M. Posteriormente, solo en las cepas de los 3 grupos clonales y en las productoras de CTX-M se realizó el serotipado y la caracterización genotípica (genes de virulencia, grupos filogenéticos, tipo de enzimas BLEE, PFGE, MLST).

En el ESTUDIO IV caracterizamos 1.021 cepas de *E. coli* productoras de BLEE que fueron aisladas de pacientes internos y externos en Febrero y Marzo del año 2006 en 44 hospitales (proyecto GEIH-BLEE-2006) distribuidos por todas las comunidades autónomas de España. Las cepas fueron remitidas al LREC de la USC donde se realizó la identificación del grupo clonal O25b:H4-B2-ST131 mediante la triple PCR que fue desarrollada en el LREC-USC (Blanco *et al.*, 2009). La triple PCR se basa en la detección de los genes *afa* FM955459, *rfbO25b* y *bla*_{CTX-M15}. Tras identificar las cepas pertenecientes al grupo clonal O25b:H4-B2-ST131, solo en estas cepas realizamos la caracterización genotípica (tipo de enzimas BLEE, genes de virulencia, grupo filogenético, PFGE, MLST) y el serotipado. También analizamos 52 cepas ST131 aisladas en 8 países de 3 continentes y que pertenecen a las colecciones de referencia de Nicolas-Chanoine *et al.* (2008) y Johnson *et al.* (2012b). Se trata de 50 cepas de origen humano y 2 aviares que incluyen representantes de los pulsotipos más prevalentes (800, 812, 905 y 968) y otros menos frecuentes (699, 788, 797, 806, 903, 904, 909, 910, 911, 913, 915, 916, 917, 919, 979, 981, 1160, 1201 y 1202) descritos por Johnson *et al.* (2012b) recientemente entre cepas ST131 aisladas especialmente en EE.UU.

En el ESTUDIO V caracterizamos un total de 3.260 cepas de *E. coli* aisladas de hemocultivos de 3.008 pacientes internos y externos en la Unidad de Microbiología del Hospital Universitario Lucus Augusti de Lugo, desde el año 1989 hasta el 2011. Las cepas fueron identificadas como *E. coli* por pruebas bioquímicas y tras realizar el correspondiente antibiograma, se inocularon en medios de conservación, para luego ser remitidos al LREC de la USC, donde se realizó el serotipado, la detección de 3 grupos clonales (O25:H4-B2-ST131, GCA-D-ST69 y O15:H1-D-ST393) asociados con resistencia a antibióticos, la identificación de las cepas productoras de CTX-M y de los grupos filogenéticos. Posteriormente, en las cepas de los 3 grupos clonales y en las productoras de CTX-M, se identificaron los genes de virulencia, el tipo de BLEE producido y el tipado molecular por PFGE y MLST. Además se estableció el serogrupo O y el grupo filogenético de las 3.260 cepas y se estableció el perfil de genes de virulencia de un grupo representativo de cepas históricas y recientes.

3.2. Cepas de referencia

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

3.3. Serotipado convencional (fenotípico) y molecular (genotípico)

La determinación de los antígeno O y H de las cepas fue realizada por aglutinación siguiendo la metodología originalmente descrita por Guinée *et al.* (1972, 1981) y modificada por Blanco *et al.* (1996). Además, se realizó el tipado molecular de las variantes O25a y O25b siguiendo el método descrito por Clermont *et al.* (2007, 2008) y el tipado molecular de algunos antígenos H.

3.3.1. Serotipado convencional por aglutinación

Determinación del antígeno O

Se emplearon los 173 antisueros O capaces de reaccionar específicamente con los antígenos O1 a O181 de *E. coli*. Dichos antisueros se obtuvieron en el LREC inmunizando a conejos y fueron absorbidos para eliminar las reacciones cruzadas causantes de falsos positivos.

Los 173 antisueros O monovalentes se repartieron en 25 antisueros polivalentes formados por 6 ó 7 antisueros monovalentes. La dilución final de los antisueros individuales en el polivalente coincide con la dilución de ensayo (1/40 ó 1/80).

A. Preparación de las suspensiones bacterianas

- Cultivar las cepas en agar de triptona-soja (TSA) (Oxoid) (37°C/18h).
- Suspender las bacterias en 2 ml de solución salina (0,85% ClNa, p/v) y ajustar la concentración bacteriana ($1,8 \times 10^9$ bacterias/ml) por comparación con el tubo número 6 de la escala de Mc Farland.
- Calentar la suspensión bacteriana a 100°C/1 hora para eliminar el antígeno K y desenmascarar el antígeno O.

- Una vez enfriado, añadir 2 ml de solución salina formalinizada (0,5%, v/v) conteniendo violeta de genciana (0,005%, p/v). Conservar las suspensiones bacterianas a 4°C durante un máximo de 2 semanas.

B. Determinación presuntiva del serogrupo O (FIGURA 25A)

- Enfrentar las suspensiones calentadas a 100°C/1 h con los 25 antisueros polivalentes a la dilución de ensayo. Para ello, añadir a 50 µl de cada antisuero, y 50 µl de la suspensión bacteriana calentada, formalinizada y teñida. Tapar la placa e incubar (37°C/18 h).
- Si la cepa bacteriana da aglutinación con alguno de los antisueros polivalentes empleados, se realiza a continuación el mismo proceso con los antisueros O monovalentes incluidos en el polivalente correspondiente. Realizar la confirmación del serogrupo O con las cepas que hayan sido aglutinadas por 1 o más antisueros O monovalentes. Si la cepa es negativa con todos los antisueros se considera no tipable (ONT).

C. Confirmación del serogrupo O (FIGURA 25B)

- Colocar 50 µl de solución salina en todos los pocillos de cada fila, excepto en el nº1.
- Añadir a los pocillos nº 1 y nº 2 de cada fila 50 µl de la dilución de ensayo del antisuero O correspondiente. Hacer diluciones seriadas (1/2) transfiriendo 50 µl de la mezcla del pocillo nº 2 al nº 3, mezclando y repitiendo la operación hasta llegar al pocillo nº 10. Utilizar los pocillos 11 y 12 como controles negativos, desechando los 50 µl que sobran después de mezclar en el pocillo nº 10.
- Añadir 50 µl de la suspensión bacteriana calentada, formalinizada y teñida a los 12 pocillos de cada fila, empezando por el nº 12 y avanzando hasta el nº 1. Tapar las placas e incubar (37°C/18 h) y realizar la lectura de los resultados determinando los títulos.

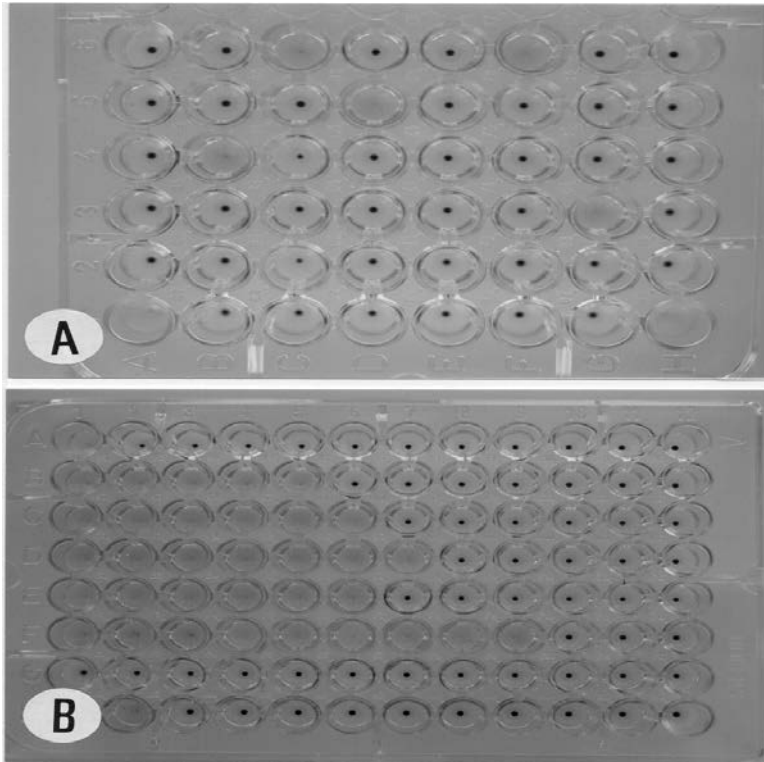


FIGURA 25. Serotipado de *E. coli*
A: Determinación presuntiva del serogrupo O
B: Titulación para la confirmación

Determinación del antígeno H

Se emplearon 53 antisueros (H1 a H56) que se obtuvieron en el LREC inmunizando a conejos. Estos antisueros fueron absorbidos para eliminar las reacciones cruzadas causantes de falsos positivos. Los 53 antisueros H monovalentes se repartieron en 10 antisueros polivalentes formados por 5 ó 6 antisueros monovalentes. La dilución final de los antisueros individuales en el polivalente coincide con la dilución de ensayo (1/200).

- Dar a las cepas 3 pases consecutivos (37°C/48 h) en tubos en forma de "U" con medio para movilidad (medio semisólido MIL, Difco) con objeto de potenciar la expresión de los flagelos. Si la cepa es móvil continuar el proceso. En caso contrario, dar 3 nuevos pases y, si continúa siendo inmóvil, se considerará H-.
- Sembrar en 7 ml de infusión de cerebro-corazón (Difco) e incubar (37°C/6-8 h/80 rpm). Añadir 7 ml de solución salina formalinizada sin violeta de genciana y dejar los tubos a

temperatura ambiente una noche. La turbidez de los tubos tratados con solución salina formalinizada debe ser comparable a la del tubo nº 2 de la escala de Mc Farland.

- En tubos de vidrio tipo Kahn, añadir 0,5 ml de la suspensión bacteriana formalinizada y 0,5 ml de antisuero polivalente H diluido a 1/200 e incubar (45°C/2 h/ en baño de agua). Realizar este proceso con cada uno de los antisueros H monovalentes incluidos en los antisueros polivalentes positivos.

La aglutinación se traduce en la formación de una película en el fondo del tubo, con el sobrenadante transparente. En los cultivos negativos la falta de aglutinación supone que el sobrenadante continua turbio. Si hay aglutinación con alguno de los antisueros se establece el antígeno H. Si no hay aglutinación con ninguno de los antisueros, se considera que tiene un antígeno H no tipable (H? o HNT).

3.3.2. Tipado molecular de los antígenos H

También se identificaron algunos antígenos H por PCR empleando los siguientes *primers* (TABLA 7). Esto resulta particularmente importante en las cepas que no expresan los flagelos al cultivarlas en el laboratorio y que pasarían a ser consideradas no móviles (H- ó HNM). Amplificando el gen *fliC* con *primers* específicos podemos determinar el antígeno H que dichas cepas podrían teóricamente expresar durante la infección *in vivo*.

3.3.3. Tipado molecular de las variantes O25a y O25b por PCR

La determinación de las variantes O25a y O25b se realizó por PCR empleando los *primers* descritos por Clermont *et al.* (2007, 2008) (TABLA 8).

TABLA 7. *Primers* para la identificación de algunos antígenos H.

Genes	Primers	Secuencia oligonucleótida 5' - 3'	Tamaño (bp)	T° de hibridación	Referencia
<i>fliC</i> -H1	H1-F2 H1-R2	TATCCGGTCAGACCCAGTTC TTGCGGATGTATCACCGTTA	828	60°C	LREC-USC
<i>fliC</i> -H2	H2-F H2-R	AACGACGGCGAAACAATTAC AGAACGCAACGAGTCAACCT	828	58°C	LREC-USC
<i>fliC</i> -H4	H4-F H4-R	GCAGCGTATTCGTGAACTGA GCTGGATAATCTGCGCTTTC	713	66°C	Mora <i>et al.</i> , 2011b
<i>fliC</i> -H7	H7-F H7-R	GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC	625	55°C	Gannon <i>et al.</i> ,1997
<i>fliC</i> -H8	H8-F H8-R	TAACAGCGCAAAAAGACGATG CCGAGAGTTTTCGCATCAAT	393	58°C	Mora <i>et al.</i> , 2012
<i>fliC</i> -H9	H9-F H9-R	ACGAAATCAAATCCCGTCTG GCGGTATCGTTACCTGCATT	649	62°C	LREC-USC
<i>fliC</i> -H10	H10-F H10-R	AGCAAAGTGGCAGTAGGTGCT GCTGGATAATCTGCGCTTTC	624	62°C	LREC-USC
<i>fliC</i> -H11	H11-F H11-R	ACTGTTAACGTAGATAGC TCAATTTCTGCAGAATATAC	248	52°C	Durso <i>et al.</i> , 2005
<i>fliC</i> -H18	H18-F1 H18-R1	TTCTGACCTGGACTCCATCC CGTTAGCAAACGTTGAAGCA	827	60°C	LREC-USC
<i>fliC</i> -H21	H21-F H21-R3	GGCGATTGCTAACCGTTTTA CGTAAAGTGAACCATCCGCAG	549-556	58°C	Mora <i>et al.</i> , 2012
<i>fliC</i> -H25	H25-F H25-R	ATGAAATTGACCGGTATCC TTGCGGGATAGATGTGATAGC	212	58°C	LREC-USC
<i>fliC</i> -H28	H28-F H28-R	ACGAAATCAAATCCCGTCTC GCCGATTGAAGAGACTCAGC	856	58°C	Mora <i>et al.</i> , 2012

TABLA 8. *Primers* para la identificación de las variantes O25a y O25b.

	Primers	Secuencia oligonucleótida 5' - 3'	Tamaño (bp)	T° de hibridación
<i>rfbO25a</i>	O25-AR O25-F	GAGATCCAAAAACAGTTTGTG ATACCGACGACGCCGATCTG	313	54°C
<i>rfbO25b</i>	rfb.1bis rfbO25b.r	ATACCGACGACGCCGATCTG TGCTATTCATTATGCGCAGC	300	55°C

3.4. Detección molecular de los grupos clonales ST131, O15:H1-D-ST393 y GCA-D-ST69 y los subclones H22, H30-Rx, H30 no-Rx y H41.

La identificación de los grupos clonales ST131, O15:H1-D-ST393 y GCA-D-ST69 se realizó mediante la técnica de PCR de acuerdo a lo descrito por Johnson *et al.* (2004a,b, 2009). Por su parte la identificación del subclón H30-Rx se estableció con una PCR de un SNP específico del gen *ybbW* desarrollada por Banerjee *et al.* (2013c) y el tipo de alelo *fimH* secuenciando dicho gen siguiendo el método de clonotipado desarrollado por Weissman *et al.* (2012) (TABLA 9). Finalmente el tipo de alelo *fimH* es el que permite identificar los clonotipos y los subclones dentro del grupo clonal ST131.

TABLA 9. *Primers* para la identificación de los grupos clonales ST131, O15:H1-D-ST393 y GCA-D-ST69, y los subclones H22, H30-Rx, H30 no-Rx y H41.

	<i>Primers</i>	Secuencia oligonucleótida 5' - 3'	Tamaño (bp)	T° de hibridación
ST131 SNPs-gen <i>mdh</i>	mdh36-F mdh36-R	GTTTAACGTTAACGCCGGT GGTAACACCAGAGTGACCA	275	58°C
ST131 SNPs-gen <i>gyrB</i>	gyrb47-F gyrb47-R	CGCGATAAGCGCGAC ACCGTCTTTTTTCGGTGGAA	132	54°C
ST131 Subclón H30-Rx SNP-gen <i>ybbW</i>	^b APfor63 ^b APrev66	GGTTGCGGTCTGGGCA CAATATCCAGCACGTTCCAGGTG	194	64-66°C
ST131 Secuenciación <i>fimH_{TR}</i> Alelos <i>fimH</i>	^a fimH-w-F ^a fimH-w-R	CACTCAGGGAACCATTTCAGGCA CTTATTGATAAAACAAAAGTCAC	955	54°C
<i>rfbO15</i>	gndbis.f rfbO15r	ATACCGACGACGCCGATCTG TGATAATGACCAACTCGACG	536	54°C
Grupo clonal O15	fumC O15f fumC O15r	GCTGCTGGCGCTGCGCAAGCAA CCGGAAATCTCCTGT	153	54°C
GCA	gyrB27f gyrB27r	GGTGCGTTTCTGGCCA GACGCCGATACCATC	259	52°C
Confirmación del GCA	fumC.CGA.f fumC.CGA.r	GCTATCTGGCAGACT CGTGCATCGCCGTTGGAAAG	175	52°C

^a *Primers* utilizados para PCR y secuenciación del gen *fimH*.

^b *Primers* utilizados para identificar el subclón H30-Rx.

3.5. Determinación de los grupos filogenéticos por PCR

La identificación de los grupos filogenéticos A, B1, B2 y D se realizó por PCR siguiendo el método descrito por Clermont *et al.* (2000) (TABLA 10 y 11).

TABLA 10. Tipado de los grupos filogenéticos.

Grupo filogenético	Genes		
	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	<i>tspE</i>
A	-	+ ó -	-
B1	-	+ ó -	+
B2	+	+	+ ó -
D	+	-	+ ó -

TABLA 11. *Primers* para la identificación de los grupos filogenéticos.

Genes	<i>Primers</i>	Secuencia oligonucleótida 5'-3'	Tamaño (bp)	Tº de hibridación
<i>chuA</i>	ChuA.1	GACGAACCAACGGTCAGGAT	279	62°C
	ChuA.2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA		
<i>yjaA</i>	YjaA.1	TGAAGTGTCAGGAGACGCTG	211	54°C
	YjaA.2	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC		
<i>tspE</i>	TspE4.C2.1	GAGTAATGTCTGGGGCATTCA	152	54°C
	TspE4.C2.2	CGCGCCAACAAAGTATTACG		

3.6. Detección y tipado de BLEE por PCR y secuenciación

La detección de los genes *bla* que codifican para BLEE de tipo TEM, SHV y CTX-M se realizó por PCR siguiendo el protocolo descrito por Leflon-Guibout *et al.* (2004, 2008). Los amplificadores de las cepas positivas posteriormente se secuenciaron para poder determinar el tipo concreto de enzima producido por la cepa. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con los correspondientes genes disponibles en el GenBank usando *Blast sequence software* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). La secuenciación se realizó en el Departamento de Genética

de la Facultad de Veterinaria. Para ello se utilizó el método de Sanger, empleando el analizador genético ABI 3100 (*Applied Bio-Systems*) y un BigDye Terminador v3.1 *cycle sequencing kit*. Se secuenciaron las 2 hebras complementarias del fragmento de ADN amplificado en la reacción de PCR. En la **TABLA 12**, se listan los *primers* usados en las pruebas de PCR, sus secuencias nucleotídicas, y el tamaño en pares de bases.

TABLA 12. *Primers* para el tipado de BLEE por PCR y secuenciación.

Genes	Primers	Secuencia oligonucleótida 5' a 3'	Tamaño (bp)	T° de hibridación	Referencia
<i>bla</i> _{CTX-M}	CTX-C3 CTX-C4	ATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATG ACCGCGATATCGTTGGTGGTGCC	542	58 °C	Mora <i>et al.</i> , 2013
<i>bla</i> _{CTX-M} Grupo 9 CTX-M-9, 14, 14b	^a CTX-M9-F ^a CTX-M9-R	GTGACAAAGAGAGTGCAACGG ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC	856	56 °C	Simarro <i>et al.</i> , 2000
<i>bla</i> _{CTX-M} Grupo 1 CTX-M-1, 15, 32	CTX-M-F1 CTX-M-F2	ATAAAACCGGCAGCGGTG GAATTTTGACGATCGGGG	483	55 °C	Leflon-Guibout <i>et al.</i> , 2004
	CTX-M13-U CTX-M13-L	GGTAAAAAATCACTGCGTC TTGGTGACGATTTAGCCGC	863	52 °C	Saladin <i>et al.</i> , 2002
	^b CTX-15-F1 ^b CTX-15-R	GAAGCTAATAAAAAACACCGTGG GTATGCGCAAGCGCAGGTGG	1044- 1123	52 °C	Mora <i>et al.</i> , 2013
<i>bla</i> _{SHV}	^b SHV-1 ^b SHV-2	GGGTTATTCTTATTTGTCGC TTAGCGTTGCCAGTGCTC	930	48 °C	Rasheed <i>et al.</i> , 1997
<i>bla</i> _{SHV}	SHV-F2 SHV-R2	TTGTCGCTTCTTTACTCGCC CCCGCGATTTGCTGATTTTCGC	879	58 °C	Mora <i>et al.</i> , 2013
<i>bla</i> _{TEM}	^a TEM-1-F ^a TEM-1-R	ATGAGTATTCAACATTTCCG CTGACAGTTACCAATGCTTA	868	50 °C	Rasheed <i>et al.</i> , 1997

^a *Primers* utilizados para PCR y secuenciación.

^b *Primers* utilizados para secuenciación.

3.7. Detección de genes de virulencia por PCR

Se investigaron los genes de virulencia empleando los *primers* que figuran en la **TABLA 13**.

3.8. Protocolo de PCR

Preparación de las muestras: extracción del ADN

Tomar una colonia y suspenderla en 300 μ l de agua bidestilada estéril contenidos en un tubo eppendorf.

- Calentar la suspensión 100°C/3-5 minutos.
- Centrifugar la suspensión calentada (11.000 rpm/2 min).
- Del sobrenadante se toman 7 μ l para la prueba.

Preparación de la mezcla de reacción

La mezcla de reacción se prepara para un volumen final de 30 μ l. Contiene:

- El ADN extraído de la muestra problema (7 μ l).
- Los *primers*
- Los 4 nucleótidos dATP, dGTP, dCTP y dTTP a una concentración final de 0,2 mM de cada uno de ellos.
- Tris HCl 10 mM (pH 8.8), Cl₂Mg 1,5 mM, ClK 50 mM.
- Una unidad de polimerasa (Promega, EE.UU.).
- Agua bidestilada estéril hasta completar los 30 μ l del volumen final.

Amplificación

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

- 1 ciclo de desnaturalización inicial (94°C/3 min).
- 35 ciclos de 94°C/1 min (desnaturalización), entre 52-66°C/40seg (acoplamiento-hibridación) y 72°C/2min (extensión/elongación) (**TABLA 13**).
- 1 ciclo de elongación final de (72°C/3 min).

Revelado de los resultados de la PCR

Los productos amplificados en las pruebas de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Seakem LE agarose, BMA, EE.UU.) al 2% en tampón TBE (89 mM Tris, 89mM ácido bórico, 2.5 mM EDTA), siguiendo las instrucciones generales de Maniatis *et al.* (1990). Previamente a la electroforesis, a la muestra a cargar en el gel (habitualmente 10-12 μ l) se le adicionó 1/5 del volumen de tampón de muestra. Como marcador de pesos moleculares se usó el ADN del bacteriófago ϕ X174 cortado con *Hae*III (fragmentos de 1353,

1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 y 72 pares de bases) (Promega). La electroforesis se realizó con fuente y cubetas de electroforesis de Bio-Rad. El voltaje aplicado a los geles fue de 130 v durante 20 a 40 minutos, dependiendo del tamaño del gel. Los geles de agarosa se tiñeron en un baño con bromuro de etidio (10 µg/ml) (Merck) y se observaron bajo luz ultravioleta (transiluminador modelo 2010 Macrovue, LKB).

3.9. Determinación de secuencias tipo por MLST

La técnica de MLST según el esquema de Achtman, utiliza las secuencias de fragmentos internos amplificados por PCR de 7 genes altamente conservados (*adhA*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*) que definen el perfil alélico o secuencia tipo para cada cepa. Para la amplificación genética y secuenciación se usaron *primers* especificados para MLST en *E. coli* de la website (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>) (TABLA 14). Las secuencias obtenidas se analizaron empleando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor (versión 7.0.9; Ibis Biosciences) y fueron alineadas con el programa ClustalW2. El perfil alélico de las 7 secuencias correspondientes a los 7 genes, las secuencias tipo, y los complejos de secuencia (ST complex, definidos como STs relacionados con una distancia máxima de 1 o 2 alelos de diferencia) se obtuvieron a través de la base de datos electrónica de la página web MLST para *E. coli*.

TABLA 13. Primers para la detección de los genes de virulencia por PCR.

Genes	Primers	Secuencia Oligonucleótida 5' - 3'	Tamaño (bp)	Tº de hibridación	Referencia
<i>fimH</i>	fimH f fimH r	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	508	66°C	Johnson y Stell, 2000
ISL3-like in <i>fimB</i>	fimB-IS-F fimB-IS-R	TCCTGACCCATAGTGAAATCG GCTCTATCCCAGATGCCGTA	1914	58°C	Totsika <i>et al.</i> , 2011
<i>fimA</i> _{VM78}	fimA201 fimA215	TCTGGCTGATACTACACC ACTTTAGGATGAGTACTG	266	52°C	Marc y Dho- Moulin, 1996
F10 <i>papA</i>	Ff F10r	GGCAGTGGTGTCTTTTGGTG CTCCTCATTATGACCAGAAACCCT	312	56-58°C	Johnson <i>et al.</i> , 2000b
<i>papAH</i>	papA-f papA-r	ATGGCAGTGGTGTCTTTTGGTG CGTCCCACCATACGTGCTCTTC	720	56-58°C	Johnson y Stell, 2000
<i>papC</i>	papC-f papC-r	GTGGCAGTATGAGTAATGACCGTTA ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	200	56°C	Johnson y Stell, 2000
<i>papEF</i>	PapEF f PapEF r	GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA	336	64°C	Yamamoto <i>et al.</i> , 1995
<i>papG I</i>	Pap-I-f Pap-I-r	TTAGCTGGATGGCACAATG TTGTCCATGTATCCCATTTCAT	335	54°C	Mora <i>et al.</i> , 2013
<i>papG II</i>	Pap-II-f Pap-II-r	GGGCATTGCTACGGTAACCTG CGCTATTAATAGACAGATCACC	545	54°C	Mora <i>et al.</i> , 2013
<i>papG III</i>	Pap-III-f Pap-III-r	CGGCACTTTAAGCTATGTG TGACCATCTCATCGTTGTCTC	720	56°C	Mora <i>et al.</i> , 2013
<i>papG IV</i>	Pap-IV-f Pap-IV-r	TCCGAGAAGTACCCAAACCAC GTCACAATAAATGGTAACAGCT	493	58°C	LREC-USC
<i>sfa/focDE</i>	sfa1 sfa2	CTCCGGAGAAGTGGGTGCATCTTAC CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	410	64°C	Le Bouguenec <i>et al.</i> , 1992
<i>sfaS</i>	SfaS f SfaS r	GTGGATACGACGATTACTGTG CCGCCAGCATTCCCTGTATTC	240	56°C	Johnson y Stell, 2000
<i>focG</i>	FocG f FocG r	CAGCACAGGCAGTGGATACGA GAATGTCGCCTGCCATTGCT	360	64°C	Johnson y Stell, 2000
<i>afa/draBC</i>	afa1 afa2	GCTGGGCAGCAAAGTATAACTCTC CATCAAGCTGTTTGTTCGTCGCCG	750	58°C	Le Bouguenec <i>et al.</i> , 1992
<i>afa</i> FM955459	Afa-O25F Afa-O25R	GAGTCACGGCAGTGCGGCGG TTCACCGGCGACCAGCCATCTCC	207	55°C	Blanco <i>et al.</i> , 2009
<i>iha</i>	IHA-F IHA-R	CTGGCGGAGGCTCTGAGATCA TCCTTAAGCTCCCGGGCTGA	827	56°C	Johnson <i>et al.</i> , 2000a
<i>bmaE</i>	bmaE-f bmaE-r	ATGGCGCTAAGTCCATGCTG AGGGGGACATATAGCCCCCTTC	507	56°C	Johnson y Stell, 2000
<i>gafD</i>	gafD-f gafD-r	TGTTGGACCGTCTCAGGGCTC CTCCCGGAAGTCTGTTACT	952	56°C	Johnson y Stell, 2000
<i>cnf1</i>	cnf1-f2 cnf1-rc	CAGGAGGTACTTAGCAGCGT TAATTTTGGGTTTGTATC	468	50°C	Mora <i>et al.</i> , 2013
<i>cnf2</i>	cnf2-f2 cnf2-rc	CAGAAGATACTTAGTAGATA TAGTTTTGGGGTCCGAATT	468	48°C	LREC-USC
<i>cnf3</i>	CNF3-F2 CNF3-RC	AAGGTGATACTTAGTCAGAC TAATCTTGAGTCCACATA	468	48°C	LREC-USC
<i>cdtB</i>	cdt-S1 cdt-AS1 cdt-S2 cdt-AS2	GAAAGTAAATGGAATATAAATGTCCG AAATCACCAAGAATCATCCAGTTA GAAAATAAATGGAACACACATGTCCG AAATCTCCTGCAATCATCCAGTTA	466	58°C	Tóth <i>et al.</i> , 2003
<i>cdtB I</i>	cdt1F cdt1R	GGCAGTACCAGCTTCTGCAACGT TGAATCCACGCCCGGATTC	298	58°C	LREC-USC

Continuación de la TABLA 13

Genes	Primers	Secuencia Oligonucleótida 5' - 3'	Tamaño (bp)	Tº de hibridación	Referencia
<i>cdtB</i> III	cdt2-3F cdt3R	TCAACGGCTGTAGATACAGGTA GACTGGGTCTCGGCTGTCACGA	542	58°C	LREC-USC
<i>cdtB</i> IV	cdt4F cdt4R	TTCAATACCATCTTCAGCTACAC AGAATCTATACCTCGGTTG	255	52°C	LREC-USC
<i>sat</i>	SatF SatR	GCAGCTACCGCAATAGGAGGT CATTACAGAGTACCGGGGCTA	937	58°C	Johnson <i>et al.</i> , 2003
<i>hlyA</i>	hly F hly r	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT ACCATATAAGCGGTATTCCCGTCA	1177	58°C	Yamamoto <i>et al.</i> , 1995
<i>iucD</i>	Aer f Aer r	TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT AATATCTTCTCCAGTCCGGAGAAG	602	60°C	Yamamoto <i>et al.</i> , 1995
<i>iutA</i>	aer-851f aer-1152r	GGCTGGACATCATGGGAAGTGG CGTCGGGAACGGGTAGAAATCG	301	58-62°C	Johnson <i>et al.</i> , 1997
<i>iroN</i>	Ironec-f Ironec-r	AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG GACGCCGACATTAAGACGCAG	665	54°C	Johnson <i>et al.</i> , 2000a
<i>fyuA</i>	FyuA-F FyuA-R	TGATTAACCCCGCGACGGGAA CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	785	52°C	Johnson y Stell, 2000; Schubert <i>et al.</i> , 1998
<i>chuA</i>	ChuA.1 ChuA.2	GCAGAACCAACGGTCAGGAT TGCCGCCAGTACCAAAGACA	279	62°C	Clermont <i>et al.</i> , 2000
<i>kpsMT</i> II	KpsII f KpsII r	GCGCATTTGCTGATACTGTTG CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	272	56°C	Johnson y Stell, 2000
<i>kpsMTII-K2</i>	KpsII f KpsII-K2r	GCGCATTTGCTGATACTGTTG AGGTAGTTCAGACTCACACCT	570	56°C	Johnson y O'Bryan, 2004
<i>kpsMT</i> II-K5	K5-f KpsII r	CAGTATCAGCAATCGTTCTGTA CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	159	56°C	Johnson y Stell, 2000
<i>neuC-K1</i>	neu1 neu2	AGGTGAAAAGCCTGGTAGTGTG GGTGGTACATCCCGGGATGTC	676	52°C	Moulin- Schouleur <i>et al.</i> , 2006
<i>kpsMT</i> III	KpsIII f KpsIII r	TCCTCTTGCTACTATTCCCCCT AGGCGTATCCATCCCTCCTAAC	392	56°C	Johnson y Stell, 2000
<i>cvaC</i>	ColV-Cf ColV-Cr	CACACACAAACGGGAGCTGTT CTTCCCGCAGCATAGTTCCAT	680	55°C	Johnson y Stell, 2000
<i>iss</i>	Is-f Is-r	CAGCAACCCGAACCACTTGATG AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA	323	66°C	Rodriguez-Siek <i>et al.</i> , 2005
<i>traT</i>	TraT f TraT r	GGTGTGGTGCGATGAGCACAG CACGGTTCAGCCATCCCTGAG	290	66°C	Johnson y Stell, 2000
<i>ibeA</i>	ibe10 f ibe10 r	AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC TGGTGCTCCGGCAAACCATGC	170	52°C	Johnson y Stell, 2000
<i>malX</i> (PAI)	MALX-F MALX-R	GCATGAGCAGTGCATACATCGC AGGGCTGGGAAGTGGTTTAGCC	828	56°C	Mora <i>et al.</i> , 2013
<i>usp</i>	usp-f usp-r	ACATTCACGGCAAGCCTCAG AGCGAGTTCCTGGTAAAAGC	440	66°C	Bauer <i>et al.</i> , 2002
<i>tsh</i>	tsh03 tsh15	GGTGGTGCCTGGAGTGG AGTCCAGCGTGATAGTGG	640	64°C	Dozois <i>et al.</i> , 2000
<i>ompT</i>	OmpT-F OmpT-R	ATCTAGCCGAAGAAGGAGGC CCCGGTCATAGTGTTTCATC	559	50°C	Rodriguez-Siek <i>et al.</i> , 2005

TABLA 14. *Primers* utilizados en la técnica de MLST según el esquema de Achtman.

Genes	Primers	Secuencia oligonucleótida 5' - 3'	Tamaño (bp)	T° de hibridación
<i>adk</i> (adenylate kinase)	adkF adkR	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG CCGTCAACTTTCGCGTATTT	583	56°C
<i>fumC</i> (fumarate hydratase)	fumCF fumCR	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC GTACGCAGCGAAAAAGATTC	806	56°C
<i>gyrB</i> (DNA gyrase)	gyrBF gyrBR	TCGGCGACACGGATGACGGC ATCAGGCCTTCACGCGCATC	911	56°C
<i>icd</i> (isocitrate/ isopropylmalate dehydrogenase)	icdF icdR	ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA GGACGCAGCAGGATCTGTT	878	56°C
<i>mdh</i> (malate dehydrogenase)	mdhF mdhR	ATGAAAGTCGCAGTCCTCGGCGCTGCTGGCGG TAACGAACTCCTGCCCCAGAGCGATATCTTTCTT	932	64°C
<i>purA</i> (adenylosuccinate dehydrogenase)	purAF purAR	CGCGCTGATGAAAGAGATGA CATACGGTAAGCCACGCAGA	816	56°C
<i>recA</i> (ATP/GTP binding motif)	recAF1 recAR1	ACCTTTGTAGCTGTACCACG AGCGTGAAGGTAAAACCTGTG	780	56°C

3.10. Electroforesis en campo pulsante (PFGE)

En esta técnica se usan enzimas de restricción (en nuestro caso *XbaI*) que cortan de manera infrecuente el ADN cromosómico para generar fragmentos muy grandes que son separados por electroforesis. Los fragmentos de ADN generados son mayores de 40 kb y se pueden separar si se alterna cíclicamente la orientación del campo eléctrico durante la electroforesis.

El análisis de los perfiles de macrorrestricción obtenidos con la endonucleasa *XbaI* se realizó con el programa BioNumerics version 5.0. (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Se llevó a cabo utilizando el índice estadístico Dice, con un valor de tolerancia de posición de 1,0%, basado en el método de UPGMA para la construcción de dendrogramas que reflejan la distribución de las cepas en *clusters* con más de un 84% de homología.

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

Lisis celular

1. Suspensión en 2 ml de CSB (100mM Tris:100mM EDTA; pH 8) de las cepas bacterianas crecidas en TSA 18-24h a 37°C
2. Medir absorbancia a 420 nm
3. Preparar 400 µl de la suspensión a una concentración de 0,9 (ajustar con CSB)
4. Añadir a cada suspensión 20 µl de proteinasa K (de una concentración de 20 mg/ml)
5. Mezclar los 400 µl de la suspensión bacteriana anterior con 400 µl de agarosa al 1% previamente atemperada a 55°C (agarosa para bloques = 0,50 g de agarosa SeakemGold, 45 ml de TE, 5 ml de SDS 10%) y preparar los bloques (2 bloques por muestra). Dejar solidificar unos 15 minutos a temperatura ambiente ó 5 minutos a 4°C
6. En tubos de 10 ml añadir 5 ml de buffer de lisis (50mM Tris: 50 mM EDTA + 1% Sarkosyl; pH8) y 25 µl de proteinasa K (20 mg/ml). Depositar los bloques en los tubos correspondientes
7. Incubar 3 horas a 55°C en agitación
8. Retirar el buffer de lisis. Lavar con 5 ml de agua bidestilada previamente atemperada a 50°C; 20 minutos en agitación a 50°C
9. Realizar otro lavado con agua en las mismas condiciones
10. Retirar el agua y realizar 3 lavados con 5 ml de buffer TE (10 mM Tris: 1 mM EDTA; pH8) previamente atemperado a 50°C; cada lavado será de 20 minutos a 50°C en agitación
11. Retirar el TE y añadir 5 ml de TE fresco. Conservar así los bloques a 4°C hasta el día siguiente

Digestión del ADN

12. Cortar una porción del bloque de agarosa del grosor de un porta, y lo introducimos en el tubo correspondiente. Realizamos 2 pasos:

- a. Preincubación: termobloque a 37°C, 15 minutos en 200 µl del buffer H 10X diluido en agua bidestilada. Pasado ese tiempo retiramos el buffer de preincubación y añadimos la enzima
- b. Incubación: termobloque a 37°C, 180 minutos en 200 µl de la enzima *XbaI* (10U/µl por muestra) diluida en buffer H

Electroforesis

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

- Auto Algorithm
- 30 kb-low MW 600 kb-high MW
- Pulso inicial: 2.16s Pulso final: 54.17s Tiempo: 21.30h

3.11. Determinación de resistencia a antimicrobianos

El estudio de la susceptibilidad de las cepas a los antimicrobianos se realizó en el laboratorio de Microbiología del Hospital donde se aislaron. Concretamente, en la Unidad de Microbiología del Hospital Universitario Lucus Augusti, se utilizó el Sistema MicroScan WalkAway® plus (Siemens) que determina la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos y la concentración mínima inhibitoria (CMIs) según las normas descritas por el CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). En los otros hospitales se empleó este mismo sistema u otros similares. Se analizó la sensibilidad para Sulfa-trimetoprim, ácido nalidixico, ciprofloxacina, gentamicina, tobramicina, amikacina, fosfomicina, nitrofurantoina, amoxicilina/ácido clavulánico, piperacilina/tazobactam, cefepima, ceftazidima, aztreonam y cefotaxima. La producción de BLEE se definía si se observaba sinergia entre amoxicilina/ácido clavulánico y al menos uno de los siguientes antimicrobianos: cefotaxima, ceftazidima, aztreonam o cefepima.

3.12. Análisis estadístico

Las proporciones entre grupos fueron comparadas usando normalmente la prueba exacta de Fisher o Chi-cuadrado. $P < 0,05$ implica diferencias estadísticamente significativas.



4. RESULTADOS

4.1. ESTUDIO I: Emergencia de los grupos clonales O1:HNM-D-ST59, O15:H1-D-ST393, O20:H34/HNM-D-ST354, O25b:H4-B2-ST131 y ONT:H21,42-B1-ST101 entre cepas de *E. coli* productoras de CTX-M-14 aisladas en Galicia (2005-2008).

4.1.1. Breve introducción y objetivos

En un estudio previo (Blanco *et al.*, 2009), realizado con cepas de *E. coli* productoras de enzimas BLEE aisladas de pacientes con infecciones extraintestinales del Complejo Hospitalario Xeral-Calde de Lugo, observamos que las enzimas más frecuentemente producidas eran CTX-M-14 y CTX-M-15, y que casi todas las cepas CTX-M-15 pertenecían al grupo clonal emergente O25b:H4-B2-ST131. En contraste, en dicho estudio, como en los estudios previos, se observó una altísima diversidad clonal entre las cepas productoras de CTX-M-14.

En el presente estudio se caracterizó un mayor número de cepas BLEE procedentes de varios hospitales de Galicia con el objetivo de identificar y caracterizar grupos clonales emergentes entre cepas de *E. coli* CTX-M-14.

4.1.2. Aislados clínicos (cepas)

Se caracterizaron un total de 654 cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de pacientes internos y externos entre 2005 y 2008 en 4 hospitales de Galicia: Complejo Hospitalario Xeral-Calde de Lugo (325 cepas), Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (150 cepas), Complejo Hospitalario de Ourense (100 cepas) y Complejo Hospitalario Arquitecto Marcide-Prof. Novoa Santos de Ferrol (79 cepas).

4.1.3. Estudios realizados

Se determinó el tipo de enzimas BLEE, serotipos, genes de virulencia, grupos filogenéticos, perfiles de PFGE, las secuencias tipo por MLST siguiendo el esquema de Achtman y las resistencias a antibióticos.

4.1.4. Análisis molecular de las enzimas BLEE e identificación de grupos clonales

De las 654 cepas de *E. coli* productoras de BLEE, 334 (51%) fueron positivas para CTX-M-14 y 119 (18%) para CTX-M-15, siendo estas 2 enzimas BLEE las más prevalentes. Hay que destacar que la cepa FV10827 presentó los genes *bla*_{CTX-M-14} y *bla*_{CTX-M-15}.

Entre las 119 cepas productoras de CTX-M-15, 103 (87%) pertenecieron al grupo clonal O25b:H4-B2-ST131, el cual también resultó positivo para otros tipos de BLEE (CTX-M-1, CTX-M-9, CTX-M-14 y CTX-M-32).

En contraste con las cepas CTX-M-15, las cepas productoras de CTX-M-14 pertenecieron a un amplio número de serotipos. Pero al analizar las cepas que compartían los mismos serotipos y grupos filogenéticos pudimos identificar 32 cepas CTX-M-14 (25 de ITU), englobadas en 5 grupos clonales, que han sido caracterizadas con detalle en el presente estudio.

Los 5 grupos clonales emergentes identificados fueron los siguientes: O1:HNM-D-ST59, O15:H1-D-ST393, O20:H34/HNM-D-ST354, O25b:H4-B2-ST131 y ONT:H21,42-B1-ST101. La cepa FV10856 (ST1394) presentó un único nucleótido de diferencia en el gen *purA* con las 4 cepas del grupo clonal O15:H1-D-ST393 por lo que consideramos que las 5 cepas deben incluirse en el mismo grupo clonal.

4.1.5. Genes de Virulencia

Las 32 cepas de *E. coli* CTX-M-14 pertenecientes a los 5 grupos clonales emergentes fueron analizadas por PCR para la presencia de genes que codifican para factores de virulencia de cepas ExPEC (**TABLA 15**).

Como era de esperar, las cepas pertenecientes al mismo grupo clonal mostraron similares perfiles de genes de virulencia (**FIGURA 26**).

Las 32 cepas de *E. coli* cumplen el criterio de estatus ExPEC, ya que presentan 2 o más de los 5 genes de virulencia (*papEF*, *sfa/focDE*, *afa/draBC*, *iucD* y *kpsM II*) de acuerdo a la

definición de Johnson *et al.* (2003). Las cepas pertenecientes a los grupos clonales ONT:H21,42-B1-ST101 y O1:HNM-D-ST59 acumulaban el mayor número de factores de virulencia (≥ 8). Las 2 cepas *afa/draBC* del grupo clonal O25b:H4-B2-ST131 eran *afaE1*.

4.1.6. Resistencia antimicrobiana

Las 32 cepas de *E. coli* CTX-M-14 pertenecientes a los 5 grupos clonales emergentes se analizaron para la resistencia a carbapenemes, aminoglucósidos, fluoroquinolonas, trimetoprim-sulfametoxazol y fosfomicina.

Las cepas del grupo clonal O1:HNM-D-ST59 fueron sensibles a estos antibióticos, mientras que la mayoría de las cepas de los restantes 4 grupos clonales fueron resistentes a la ciprofloxacina y al trimetoprim-sulfametoxazol. Las del grupo clonal O20:H34/HNM-D-ST354 también fueron resistentes a la gentamicina y algunos a la tobramicina. Las 32 cepas productoras de CTX-M-14 fueron sensibles a imipenem, amikacina y fosfomicina (**FIGURA 26**).

4.1.7. Tipado molecular por PFGE

Como se observa en la **FIGURA 26**, el análisis de los perfiles de macrorestricción de las 32 cepas de *E. coli* CTX-M-14 pertenecientes a los 5 grupos clonales formaron 5 *clusters* (I a V) que se corresponden con los grupos clonales O15:H1-D-ST393/ST1394, ONT:H21,42-B1-ST101, O1:HNM-D-ST59, O20:H34/HNM-D-ST354 y O25b:H4-B2-ST131, respectivamente.

Las cepas (O15:H1, O1:HNM y O25b:H4) de los *clusters* I, III y V que fueron aisladas en diferentes años y hospitales mostraron una alta diversidad genética, mientras que las cepas (ONT:H21,42 y O20:H34/HNM) agrupadas en los *clusters* II y IV aisladas en el Hospital Lucus Augusti de Lugo en 2008 y 2007, respectivamente, presentaron como era de esperar, una más baja variabilidad genética.

Las cepas del grupo clonal O15:H1-D-ST393/ST1394 (*cluster* I con un 73,2% de similitud) mostraron un *subcluster* con un 87,6% de similitud formado por 4 cepas con idéntico patrón de genes de virulencia (*fimH*, *fimAV_{MT78}*, *papGII*, *sat*, *iucD* y *kpsMII-K5*).

Las cepas del grupo clonal ONT:H21,42-B1-ST101 (*cluster* II y 93,3% de similitud) resultaron ser las más homogéneas, presentando las 5 cepas el mismo patrón de genes de virulencia (*fimH*, *papGIII*, *focG*, *iucD*, *iroN*, *iss*, *traT* y *tsh*) y de resistencias (ciprofloxacina y trimetoprim-sulfametoxazol).

Las cepas del grupo clonal O1:HNM-D-ST59 (*cluster* III y 76,5% de similitud) mostraron 3 *subclusters* con diferentes patrones de genes de virulencia.

Un dato interesante es que las cepas del grupo clonal O20:H34-D-ST354 (*cluster* IV y 79,9% de similitud) formaron 2 *subclusters* con las cepas móviles (H34) e inmóviles (HNM), respectivamente.

Las cepas del grupo clonal O25b:H4-B2-ST131 (*cluster* V y 64,7% de similitud) también formaron 2 *subclusters* con las cepas *fimH* y *afa/draBC* positivas respectivamente.

4.1.8. Comparación de cepas del grupo clonal O25b:H4-B2-ST131 productoras de diferentes tipos de enzimas CTX-M

Por último, en este estudio hemos comparado las 5 cepas CTX-M-14 pertenecientes al grupo clonal O25b:H4-B2-ST131 con otras 9 cepas del mismo grupo clonal productoras de otros tipos de enzimas CTX-M, comprobando que las cepas que producen el mismo tipo de enzima BLEE y poseen el mismo patrón de genes de virulencia se incluyen dentro del mismo *cluster*, y que las cepas productoras de CTX-M-14 pertenecen a diferentes *clusters* que las CTX-M-15 (**FIGURA 27**).

Resultados

TABLA 15. Caracterización de los genes de virulencia en las 32 cepas de *E. coli* productoras de CTX-M-14 pertenecientes a los 5 grupos clonales.

Genes	O1:HNM-D-ST59 n=10	O15:H1-D-ST393/ST1394 n=5	O20:H34/HNM-D-ST354 n=7	O25b:H4-B2-ST131 n=5	ONT:H21,42-B1-ST101 n=5
Adhesinas					
<i>fimH</i>	10	5	7	3	5
<i>fimA</i> _{VM78}	7	5	0	0	0
<i>papEF</i>	9	5	0	0	5
<i>papG</i>	9	5	0	0	5
<i>papG</i> I	6	0	0	0	0
<i>papG</i> II	5	5	0	0	0
<i>papG</i> III	0	0	0	0	5
<i>sfa/focDE</i>	0	0	0	0	5
<i>sfaS</i>	0	0	0	0	0
<i>focG</i>	0	0	0	0	5
<i>afa/draBC</i>	0	0	0	2	0
<i>bmaE</i>	0	0	0	0	0
<i>gafD</i>	0	0	0	0	0
Toxinas					
<i>cnf1</i>	0	0	0	0	0
<i>cdtB</i>	0	0	0	0	0
<i>sat</i>	10	5	0	5	0
<i>hlyA</i>	0	0	0	0	0
Sideróforos					
<i>iucD</i>	10	5	6	5	5
<i>iroN</i>	0	0	0	0	5
Cápsula					
<i>kpsM</i> II	10	5	7	5	0
<i>kpsM</i> II-K2	0	0	0	0	0
<i>kpsM</i> II-K5	0	5	7	5	0
<i>neuC</i> -K1	10	0	0	0	0
<i>kpsM</i> III	0	0	0	0	0
Varios					
<i>cvaC</i>	0	0	0	0	0
<i>iss</i>	0	0	0	0	5
<i>trat</i>	9	0	0	4	5
<i>ibeA</i>	0	1	7	0	0
<i>malX</i>	10	0	0	5	0
<i>usp</i>	10	0	7	5	0
<i>tsh</i>	0	0	0	0	5

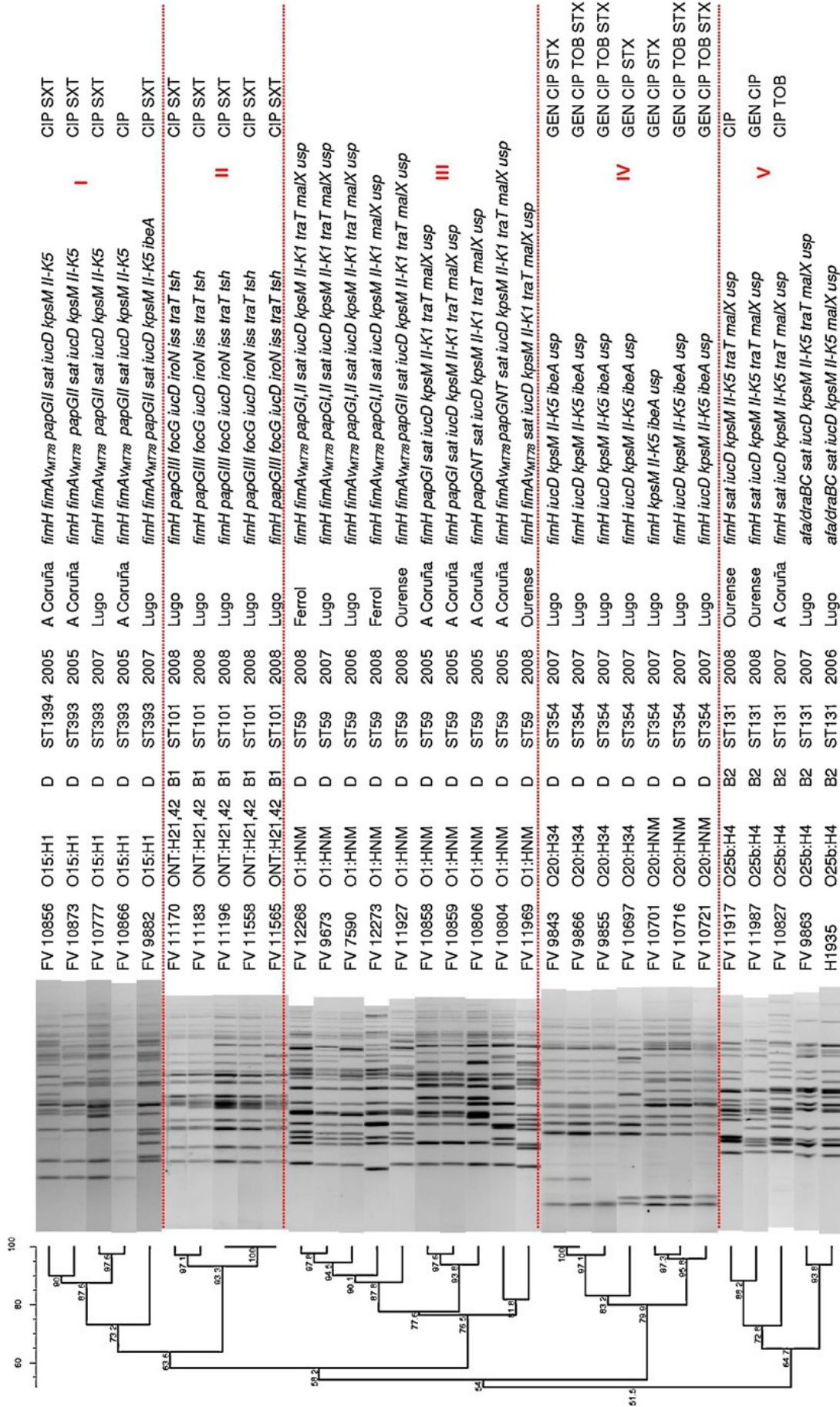


FIGURA 26. Dendrograma del análisis de los perfiles de PFGE-*Xba*I de las 32 cepas de *E. coli* CTX-M-14 pertenecientes a los 5 grupos clonales. A la derecha de la imagen se indica la designación de la cepa, serotipo, grupo filogenético, secuencia tipo (ST), año, localidad del hospital, genes de virulencia y resistencia antimicrobiana. La cepa FV 10827 (O25b:H4) produce CTX-M-14 y CTX-M-15. CIP, ciprofloxacina; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina.

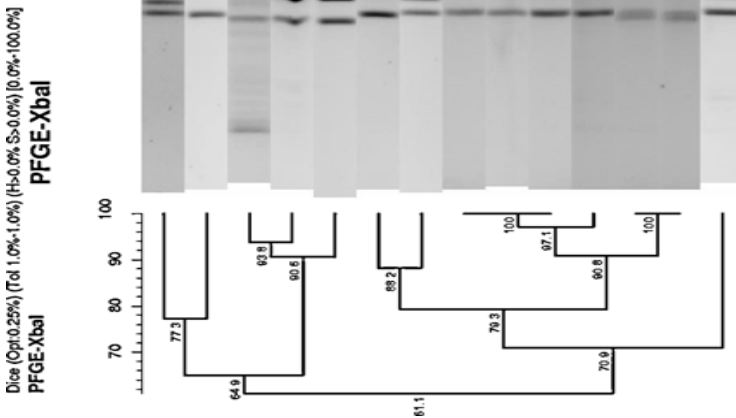


FIGURA 27. Dendrograma del análisis de los perfiles de PFGE-*XbaI* de las 14 cepas del grupo clonal O25b:H4-B2-ST131. Comparación entre las cepas productoras de CTX-M-14 y de otras enzimas CTX-M. A la derecha de la imagen se indica la designación de la cepa, el tipo de CTX-M, el patrón de genes de virulencia y la resistencia antimicrobiana. La cepa FV 10827 (O25b:H4) produce CTX-M-14 y CTX-M-15. CIP, ciprofloxacina; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina.

4.2. ESTUDIO II: Detección de cepas del grupo clonal O25b:H4-B2-ST131 productoras de SHV-12 con un elevado contenido de genes de virulencia e identificación de los grupos clonales ST101, ST162, ST369, ST393 y ST410 entre cepas de *E. coli* productoras de BLEE (Barcelona, 2008).

4.2.1. Breve introducción y objetivos

Después de investigar cepas de *E. coli* productoras de enzimas BLEE aisladas de pacientes con infecciones extraintestinales del Complejo Hospitalario Xeral-Calde de Lugo entre los años 2006 y 2008 (Blanco *et al.*, 2009) y asociar el grupo clonal O25b:H4-B2-ST131 con la emergencia de la enzima CTX-M-15, nos planteamos el presente estudio con el objetivo de evaluar la presencia del grupo clonal ST131 en un hospital de otra Comunidad Autónoma situada a una distancia (1020 Km) considerable, comparar las cepas aisladas en ambos hospitales y detectar la posible emergencia de nuevos grupos clonales productores de enzimas BLEE.

4.2.2. Aislados clínicos (cepas)

Se caracterizaron un total de 94 cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de pacientes internos y externos del Hospital Vall d'Hebron de Barcelona en el año 2008. El 72% de las cepas procedían de pacientes con ITU y el resto de otras infecciones extraintestinales.

4.2.3. Estudios realizados

Se determinó el tipo de enzimas BLEE, serotipos, genes de virulencia, grupos filogenéticos, perfiles de PFGE, las secuencias tipo por MLST siguiendo el esquema de Achtman y las resistencias a antibióticos.

4.2.4. Análisis molecular de las enzimas BLEE

Las enzimas BLEE más frecuentemente producidas por las 94 cepas de *E. coli* investigadas fueron: CTX-M-14 (46%), CTX-M-15 (26%) y SHV-12 (18%). Entre un 1% y un 4% de las

cepas resultaron positivas para las enzimas TEM-12, CTX-M-2, CTX-M-9, CTX-M-27 y CTX-M-61 (**TABLA 16**).

4.2.5. Grupos filogenéticos

El grupo filogenético B2 fue el más prevalente (38%), seguido por el B1 (23%), el A y el D (19% cada uno).

Cabe destacar que el 88% de las cepas productoras de CTX-M-15 y el 56% de las cepas productoras de SHV-12 pertenecieron al grupo B2, frente a tan solo el 5% de las cepas CTX-M-14 ($P < 0,001$) (**TABLA 16**).

4.2.6. Serotipos y el grupo clonal O25b:H4-B2-ST131

Las 94 cepas productoras de BLEE pertenecieron a un total de 27 serogrupos O y 48 serotipos O:H diferentes.

El serotipo más común fue el O25b:H4 asociado con el grupo filogenético B2 y ST131, e identificado en 19 (79%) de las 24 cepas CTX-M-15, en 8 (44%) de las 18 cepas SHV-12, en 1 (33%) de las 3 cepas CTX-M-9, en 1 (2%) de las 44 cepas CTX-M-14, y en la única cepa productora de CTX-M-27. Por lo tanto, 30 (32%) de las 94 cepas productoras de BLEE eran del grupo clonal O25b:H4-B2-ST131 (**TABLAS 16 y 17**). En contraste con CTX-M-15 y SHV-12, entre las cepas productoras de CTX-M-14 se encontró una amplísima variedad de serotipos.

4.2.7. Identificación de los grupos clonales ST101, ST162, ST369, ST393 y ST410

Aunque entre las 64 cepas BLEE no pertenecientes al grupo clonal O25b:H4-B2-ST131 se encontró una amplia variedad de diferentes serotipos, se pudieron identificar 5 grupos clonales representados por al menos 2 cepas: O15/O25a:H1/HNM-D-ST393, O78:HNM-A-ST369, ONT:H21,42/HNM-B1-ST101, O9:H4-A-ST410 y O8:H19-B1-ST162.

4.2.8. Genes de virulencia en cepas ST131 y no ST131

Las 94 cepas de *E. coli* productoras de BLEE fueron analizadas por PCR para la presencia de 30 genes que codifican para factores de virulencia típicos de cepas ExPEC que causan infecciones del tracto urinario, sepsis y meningitis (**TABLA 18**). Once genes de virulencia fueron de manera significativa asociados con las cepas ST131 (*papGIII*, *afaFM955459*, *cnf1*, *sat*, *hlyA*, *kpsMII-K2*, *kpsMII-K5*, *traT*, *ibeA*, *malX* y *usp*), mientras que *papGII* y *tsh* fueron significativamente asociados con las cepas no ST131.

Un total de 57 (61%) de las 94 cepas productoras de BLEE cumplieron el criterio para el estatus ExPEC de acuerdo a la definición de Johnson *et al.* (2003).

Las cepas de los grupos filogenéticos B2 (92%) y D (89%) se asociaron más frecuentemente con el estatus ExPEC que las cepas de los grupos filogenéticos A (22%) y B1 (23%) ($P < 0,001$).

El estatus ExPEC entre las cepas del grupo clonal ST131 fue más frecuente (87%) que entre las cepas no-ST131 (48%) ($P < 0,001$).

Además, las 30 cepas ST131 exhibieron un significativo mayor número de genes de virulencia (media 9,6) que las 64 cepas no ST131 (media 5,8). En particular, las cepas ST131 SHV-12 fueron las que presentaron más genes de virulencia (media 11,8).

Un dato interesante es que las 12 cepas de los grupos clonales O15/O25a:H1/HNM-D-ST393, O78:HNM-A-369 y ONT:H21,42/HNM-B1-ST101 también presentaron el estatus ExPEC.

4.2.9. Tipado molecular por PFGE

En la **FIGURA 28** se muestra el dendrograma obtenido tras realizar el análisis de los perfiles de macrorrestricción con la enzima *XbaI* de las 30 cepas ST131 que presentaron una similitud del 66,7%. Las cepas se distribuyeron en 5 *clusters* (I – V) con unas identidades del 78,1%, 85,7%, 83,3%, 89,8% y 75,7%, respectivamente. Las cepas de estos 5 grupos presentaban patrones de genes de virulencia y resistencia antimicrobiana característicos.

El *cluster* I incluye 10 cepas CTX-M-15 resistentes a ciprofloxacina, tobramicina y trimetoprim-sulfametoxazol, con el mismo perfil de virulencia que comúnmente contienen el operon *afa/draBC* (todas fueron positivas para el operon *afa* FM955459), el gen *sat* y la cápsula tipo K2.

El grupo III incluye 8 cepas productoras de CTX-M-15 que fueron positivas para los genes *sat*, *iroN*, *iss* y *kpsM* II-K5, con 2 *subclusters* (> 85% de similitud) que difieren en la resistencia a gentamicina y el gen *papGII*.

El grupo IV formó un *cluster* (> 85% de similitud) que incluye 7 cepas (5 SHV-12, 1 CTX-M-15 y 1 CTX-M-14) con el mismo perfil de factores de virulencia (*papGIII*, *cnfI*, *hlyA*, *iroN*, *kpsM* II-K5, *cvaC*, *iss* e *ibeA*).

El grupo V incluye 3 cepas (2 SHV-12 y 1 CTX-M-9) que fueron positivas para los genes *iroN*, *neuC*-K1, *iss* e *ibeA* (**FIGURA 28**).

Las cepas de los grupos clonales O15/O25a:H1/HNM-D-ST393, O78:HNM-A-369, ONT:H21,42/HNM-B1-ST101, O9:H4-A-ST410 y O8:H19-B1-ST162 también presentaron patrones de genes de virulencia característicos y formaron 5 *clusters* diferentes cuando se analizaron sus perfiles obtenidos por PFGE-*XbaI* (**FIGURA 29**).

TABLA 16. Tipo de enzima BLEE en relación al grupo filogenético y los grupos clonales (Barcelona, 2008).

Tipo de BLEE	Nº total de cepas n=94	Grupo Filogenético				Cepas ST131 n=30	Cepas no-ST131 n=64	Valor de P ^c ST131 vs no-ST131
		A n=18	B1 n=22	B2 n=36	D n=18			
TEM-12	1 (1%)	0	0	1	0	0	1 (2%)	
CTX-M-2	1 (1%)	0	1	0	0	0	1 (2%)	
CTX-M-9	3 (3%)	0	1	1	1	1 (3%)	2 (3%)	
CTX-M-14 ^a	41 (44%)	11	16	2	12	1 (3%)	40 (63%)	<0,001
CTX-M-14 ^b	2 (2%)	0	0	0	2	0	2 (3%)	
CTX-M-15	24 (26%)	1	0	21	2	19 (63%)	5 (8%)	<0,001
CTX-M-27	1 (1%)	0	0	1	0	1 (3%)	0	
CTX-M-61	2 (2%)	0	1	0	1	0	2 (3%)	
CTX-M-61 y CTX-M-14 ^a	1 (1%)	0	1	0	0	0	1 (2%)	
CTX-M-61 y SHV-12	1 (1%)	1	0	0	0	0	1 (2%)	
SHV-12	17 (18%)	5	2	10	0	8 (27%)	9 (14%)	

^aEnzima CTX-M-14 codificada por el gen *bla*_{CTX-M-14a} (GenBank número de acceso AF252622).

^bEnzima CTX-M-14 codificada por el gen *bla*_{CTX-M-14b} (GenBank número de acceso DK359215).

^cEl valor de P fue obtenido mediante la prueba exacta de Fisher. Únicamente se muestran si son estadísticamente significativos (P<0,05).

TABLA 17. Serotipos O:H de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE (Barcelona, 2008).

Tipo de BLEE	Nº de cepas	Serotipos (Nº de cepas)
TEM-12	1	O18:HNM (1)
CTX-M-2	1	O118:H25 (1)
CTX-M-9	3	O25b:H4 (1), O112:HNT (1), ONT:H11,21 (1)
CTX-M-14 ^a	41	O1:H6 (1), O8:H19 (1), O9:HNM (1), O11:H40 (1), O15:H1 (3), O15:HNM (1), O20:H30 (1), O20:H34 (1), O20:H42 (1), O20:HNM (1), O23:H21 (1), O25a:H1 (1), O25a:HNM (1), O25b:H4 (1), O29:HNT (1), O55:H9 (1), O78:H4 (1), O78:HNM (1), O100:H25 (1), O101:H10 (1), O115:H25 (1), O141:H21 (1), O141:HNM (1), O154:HNM (1), O161:HNT (1), ONT:H6 (1), ONT:H16 (1), ONT:H21,42 (2), ONT:H26 (1), ONT:H28 (1), ONT:H40 (1), ONT:HNM (6), ONT:HNT (1)
CTX-M-14 ^b	2	O20:HNM (1), ONT:H25 (1).
CTX-M-15	24	O4:HNT (1), O6:H31 (1), O25b:H4 (19), O105:HNM (1), O118:HNM (1), ONT:H6 (1)
CTX-M-27	1	O25b:H4 (1)
CTX-M-61	2	O91:H28 (1), O153:HNT (1)
CTX-M-61 y CTX-M-14 ^a	1	O103:H23 (1)
CTX-M-61 y SHV-12	1	O78:HNT (1)
SHV-12	17	O1:H16 (1), O2:H4 (1), O8:H19 (2), O9:H4 (2), O25b:H4 (8), O78:H9 (1), O78:HNM (2)

^aEnzima CTX-M-14 codificada por el gen *bla*_{CTX-M-14a} (GenBank número de acceso AF252622)

^bEnzima CTX-M-14 codificada por el gen *bla*_{CTX-M-14b} (GenBank número de acceso DK359215)

TABLA 18. Genes de virulencia de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE (Barcelona, 2008).

Genes	Nº Total de cepas n=94	Cepas O25b:H4- B2-ST131 n= 30	Cepas no-ST131 n= 64	Valor de P ^a ST131 vs no-ST131
Adhesinas				
<i>fimH</i>	89 (95%)	30 (100%)	59 (92%)	
<i>fimAv_{MT78}</i>	8 (9%)	1 (3%)	7 (11%)	
<i>papEF</i>	36 (38%)	9 (30%)	27 (42%)	
<i>papG I</i>	2 (2%)	0	2 (3%)	
<i>papG II</i>	18 (19%)	2 (7%)	16 (25%)	0,024
<i>papG III</i>	12 (13%)	7 (23%)	5 (8%)	0,042
<i>sfa/focDE</i>	7 (7%)	0	7 (11%)	
<i>sfaS</i>	1 (1%)	0	1 (2%)	
<i>focG</i>	6 (6%)	0	6 (9%)	
<i>afa/draBC</i>	12 (13%)	10 (33%)	2 (3%)	<0,001
<i>AfaFM955459</i>	10 (11%)	10 (33%)	0	<0,001
<i>bmaE</i>	4 (4%)	0	4 (4%)	
<i>gafD</i>	2 (2%)	0	2 (3%)	
Toxinas				
<i>cnfI</i>	9 (10%)	7 (23%)	2 (3%)	0,004
<i>cdtB</i>	1 (1%)	0	1 (2%)	
<i>sat</i>	29 (31%)	19 (63%)	10 (16%)	<0,001
<i>hlyA</i>	12 (13%)	7 (23%)	5 (8%)	0,042
Sideróforos				
<i>iucD</i>	81 (86%)	28 (93%)	53 (83%)	
<i>iroN</i>	58 (62%)	19 (63%)	39 (61%)	
Cápsula				
<i>kpsM II</i>	46 (49%)	29 (97%)	17 (27%)	<0,001
<i>kpsM II-K2</i>	12 (13%)	10 (33%)	2 (3%)	<0,001
<i>kpsM II-K5</i>	28 (30%)	16 (53%)	12 (19%)	<0,001
<i>neuC-K1</i>	6 (6%)	3 (10%)	3 (5%)	
<i>kpsM III</i>	1 (1%)	0	1 (2%)	
Varios				
<i>cvaC</i>	29 (31%)	10 (33%)	19 (30%)	
<i>iss</i>	56 (60%)	19 (63%)	37 (58%)	
<i>traT</i>	73 (78%)	28 (93%)	45 (70%)	0,009
<i>ibeA</i>	12 (13%)	10 (33%)	2 (3%)	<0,001
<i>malX</i> (PAI)	41 (44%)	30 (100%)	11 (17%)	<0,001
<i>usp</i>	37 (39%)	30 (100%)	7 (11%)	<0,001
<i>tsh</i>	20 (21%)	2 (7%)	18 (28%)	0,012

^aEl valor de P fue obtenido mediante la prueba exacta de Fisher. Únicamente se muestran si son estadísticamente significativos (P<0,05).

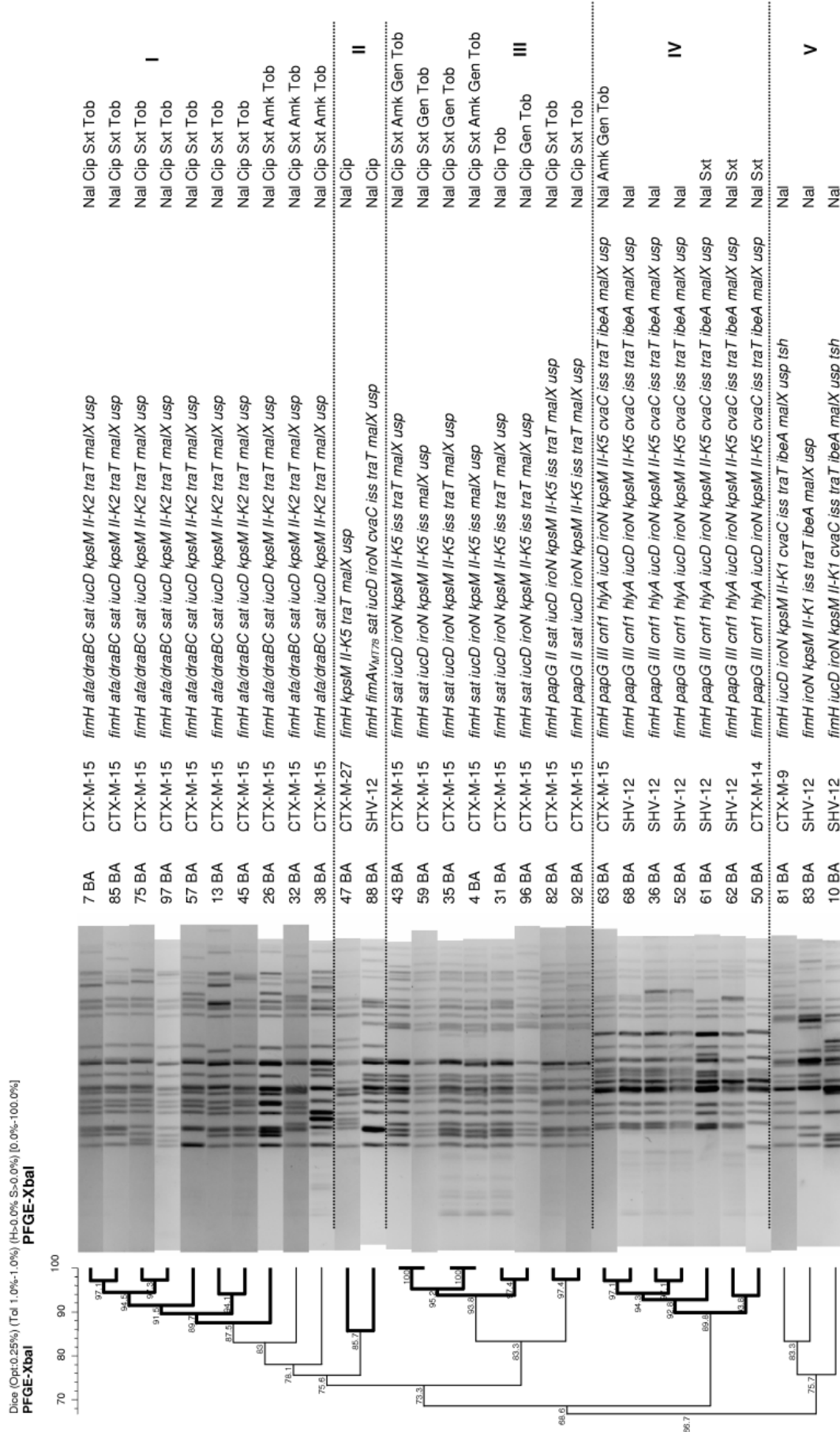


FIGURA 28. Dendrograma de las 30 cepas de *E. coli* O25b:H4-B2-ST131 productoras de BLEE (Barcelona, 2008). Los *clusters* que presentan una similitud $\geq 85\%$ son indicados en negrilla. A la derecha de la imagen se indica la designación de la cepa, tipo de enzima BLEE, los genes de virulencia y la resistencia antimicrobiana. NAL, ácido nalidixico; CIP, ciprofloxacina; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina, AMK, amikacina.

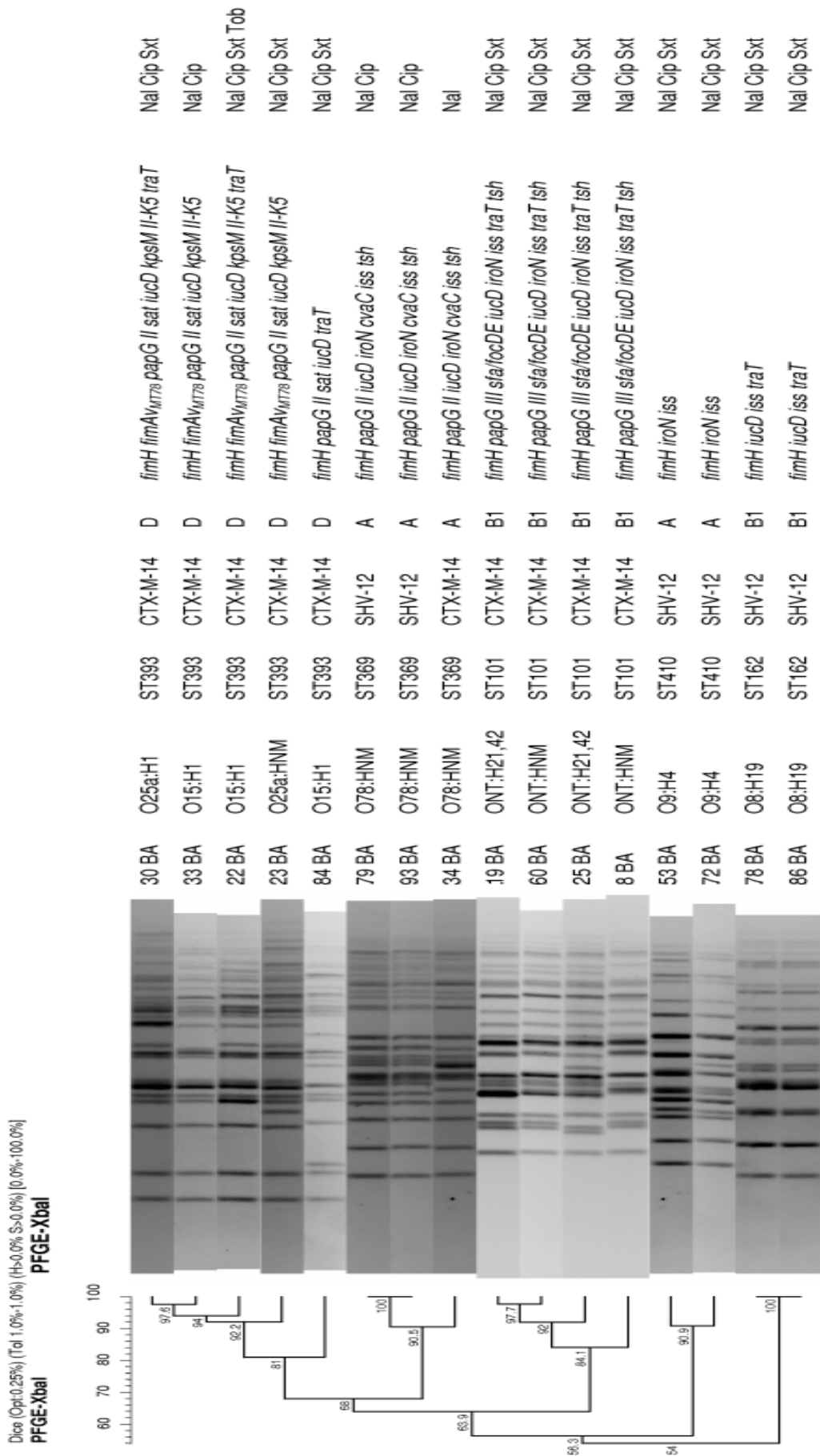


FIGURA 29. Dendrograma de las 16 cepas de *E. coli* productoras de BLEE pertenecientes a los grupos clonales ST101, ST162, ST369, ST393 y ST410 (Barcelona, 2008). A la derecha de la imagen se indica la designación de la cepa, el serotipo, la secuencia tipo, el tipo de enzima BLEE, el grupo filogenético, los genes de virulencia y la resistencia antimicrobiana. NAL, ácido nalidixico; CIP, ciprofloxacina; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol; TOB, tobramicina.

4.3. ESTUDIO III: Prevalencia y caracterización de los grupos clonales O25b:H4-B2-ST131, O15:H1-D-ST393 y GCA-D-ST69 en infecciones extraintestinales en España. Relación con la resistencia antimicrobiana y el contenido de genes de virulencia (Estudio Nacional año 2009).

4.3.1 Breve introducción y objetivos

Los grupos clonales O25b:H4-B2-ST131, O15:H1-D-ST393 y CGA-D-ST69 se han asociado en numerosos estudios con la resistencia a antibióticos, pero únicamente en un estudio realizado en Canadá entre los años 2004 y 2006 se habían analizado conjuntamente (Johnson *et al.*, 2009). Por ello nos propusimos realizar el primer estudio en Europa en el que además de analizar la prevalencia de estos grupos clonales estudiásemos el potencial de virulencia de las cepas y su papel como responsables de las elevadas tasas de resistencia a antimicrobianos observadas en cepas de *E. coli* causantes de infecciones extraintestinales.

4.3.2. Aislados clínicos (cepas)

Se analizaron un total de 500 cepas de *E. coli* causantes de infecciones extraintestinales que fueron recolectadas durante el mes de febrero 2009 de pacientes internos y externos en 5 hospitales de España (Hospital Universitario Lucus Augusti de Lugo, Hospital Vall d'Hebron de Barcelona, Hospital Marqués de Valdecilla de Santander, Hospital 12 de Octubre de Madrid y Hospital Virgen de Macarena de Sevilla). En cada hospital se recogieron 100 cepas consecutivas de diferentes pacientes. El 84% de las cepas procedían de pacientes con ITU y el resto de otras infecciones extraintestinales.

4.3.3. Estudios realizados

Se realizó la detección de los 3 grupos clonales y la determinación del tipo de enzimas BLEE en las 500 cepas incluidas en el estudio. Posteriormente se establecieron los serotipos, genes de virulencia, grupos filogenéticos, perfiles de PFGE, las secuencias tipo por MLST siguiendo el esquema de Achtman y las resistencias a antibióticos de las cepas pertenecientes a los 3 grupos clonales y de las cepas productoras de enzimas BLEE.

4.3.4. Prevalencia de grupos clonales y de cepas productoras de BLEE

De acuerdo con los estudios de tipado molecular realizados entre las 500 cepas de *E.coli* analizadas, 59 (12%) eran del grupo clonal O25b:H4-B2-ST131, 16 (3%) del grupo clonal O15:H1-D-ST393 y 22 (4%) del GCA-D-ST69. Por lo tanto, los 3 grupos clonales representaron colectivamente el 19% del total de las cepas. La mayor prevalencia de los 3 grupos clonales (30%) se observó en el Hospital Vall d'Hebron de Barcelona y la menor en el Hospital Marqués de Valdecilla de Santander (13%) (TABLA 19).

Los grupos clonales ST131 y ST69 se encontraron en los 5 hospitales y el ST393 en 4. El ST131 fue significativamente más prevalente que los otros 2 grupos en los 5 hospitales ($P < 0,001$).

Los 3 grupos clonales presentaron una prevalencia similar entre las cepas aisladas de pacientes ambulatorios y hospitalizados: ST131 (12% *versus* 12%), ST393 (3% *versus* 4%) y ST69 (4% *versus* 4%).

Por otra parte, la prevalencia de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE fue de 7% (35 de las 500 cepas). De las 59 cepas ST131, 6 cepas (10%) (55SA, 167LU, 6MA, 99SE, 85MA y 29BA) fueron positivas para CTX-M-15. De las 16 cepas ST393, solo 1 cepa (6%) fue positiva para CTX-M-14, y ninguna de las cepas ST69 fue productora de BLEE.

4.3.5. Resistencia antimicrobiana

Como se observa en la TABLA 20, los 3 grupos clonales conjuntamente representaron el 37% de las cepas resistentes a trimetoprim-sulfametoxazol y ciprofloxacina, el 34% de las cepas resistentes a aminoglucósidos y el 30% de las cepas multirresistentes.

Las cepas del grupo clonal GCA-D-ST69 supusieron el 12% de las resistentes a trimetoprim-sulfametoxazol y sensibles a ciprofloxacina, mientras que las cepas de los grupos clonales O25b:H4-B2-ST131 y O15:H1-D-ST393 representaron el 23% y el 10%, respectivamente, de las resistentes a trimetoprim-sulfametoxazol y ciprofloxacina. Es de destacar que el grupo

clonal ST131 fue el más prevalente entre las cepas multirresistentes, suponiendo el 23% de las mismas.

4.3.6. Factores de virulencia

Las cepas pertenecientes a los 3 grupos clonales (O25b:H4-B2-ST131, O15:H1-D-ST393 y GCA-D-ST69) y las 28 cepas productoras de BLEE de los otros grupos clonales fueron analizadas por PCR para la presencia de 30 genes que codifican para factores de virulencia típicos de cepas ExPEC (**TABLA 21**).

Las cepas ST131 presentaron el mayor número de genes de virulencia (media 8,1; rango 4 a 13 genes), comparado con las cepas ST393 (media 6,0; rango 3 a 7), ST69 (media 5,4; rango 2 a 9) y las cepas productoras de BLEE de los otros grupos clonales (media 4,0; rango 1 a 7) ($P<0,001$).

El mayor número de genes de virulencia se observó en las cepas ST131 que tienen el gen *ibeA*, que presentaron una media de 11,4 genes y un rango de 8 a 13 genes.

De las 97 cepas pertenecientes a los 3 grupos clonales, 67 cepas (69%) cumplieron los criterios para cepas ExPEC.

Los patrones de combinaciones de genes de virulencia fueron diferentes en cada uno de los grupos clonales. Entre las 59 cepas ST131 se identificaron 24 patrones (P1– P24) (**FIGURA 30**), 4 patrones entre las 16 cepas ST393 (P25 – P28) (**FIGURA 31**) y 16 patrones entre las 22 cepas ST69 (P29 – P44) (**FIGURA 32**). Aunque se encontraron diferentes combinaciones de genes de virulencia entre las cepas pertenecientes a un mismo grupo clonal, la mayoría de las cepas compartían muchos genes de virulencia. En contraste, entre las 28 cepas de *E. coli* productoras de BLEE pertenecientes a otros grupos clonales se encontraron numerosos y heterogéneos patrones de genes de virulencia (P45 – P62) (**FIGURA 33**).

4.3.7. Tipado molecular por PFGE

En la **FIGURA 30** se muestra el dendrograma obtenido tras realizar el análisis de los perfiles

de macrorrestricción con la enzima *XbaI* de las 59 cepas ST131 que presentaron una similitud del 58,5%. Las cepas se distribuyeron en 4 *clusters* (I – IV) con unas identidades del 67,6%, 71,5%, 72,6% y 75,0%, respectivamente. Las cepas de estos 4 grupos presentaban patrones de genes de virulencia y resistencia antimicrobiana característicos. La mayoría de las cepas ST131 se incluyeron en el *cluster* II. Casi todas las cepas de este *cluster* poseen el gen *sat* y carecen del gen *ibeA*.

Es interesante destacar que las cepas ST131 con el gen de virulencia *ibeA* formaron 2 *clusters* (I y III), que se pueden diferenciar claramente por el distinto patrón de genes de virulencia. El *cluster* I incluye 8 cepas aisladas en los 5 hospitales participantes en este estudio, que presentaron idéntica combinación de genes de virulencia (*cnfI*, *hlyA* e *iroN*) y que son resistentes al trimetoprim-sulfametoxazol. Las cepas del *cluster* III presentaron un perfil de genes de virulencia bastante diferente incluyendo el gen *cdtB* que está ausente en las cepas del *cluster* I.

En cualquier caso la diversidad genética observada entre las 59 cepas ST131 ha sido muy elevada, y se identificó un total de 11 *clusters* con una similitud $\geq 85\%$.

La **FIGURA 31** muestra el dendrograma de las 16 cepas O15:H1-D-ST393 que presentaron una similitud del 72,2% y un *cluster* con una similitud $\geq 85\%$ que incluyó 13 cepas. Las cepas incluidas en este grupo clonal presentan también un homogéneo patrón de genes de virulencia, incluyendo los genes *fimH*, *fimA*_{MT78}, *papGII*, *sat*, *iucD* y *kpsM* II-K5.

En la **FIGURA 32**, se observa el dendrograma de las 22 cepas GCA-D-ST69, las cuales muestran una similitud del 68,2%, con 4 *clusters* que muestran una similitud $\geq 85\%$. Se observó una gran diversidad tanto en los perfiles de PFGE como en los patrones de genes de virulencia.

Como era de esperar la diversidad de los perfiles de PFGE y de los patrones de virulencia de las 28 cepas productoras de BLEE que no pertenecieron a ninguno de los 3 grupos clonales fue muy elevada, observándose una similitud de tan sólo el 48,2% y únicamente 2 *clusters* con una similitud $\geq 85\%$ (**FIGURA 33**).

Resultados

TABLA 19. Prevalencia de los 3 grupos clonales entre las 500 cepas de *E. coli* aisladas en 5 hospitales españoles.

Hospital	Ciudad	Nº total de cepas	Prevalencia de los grupos clonales		
			O25b-B2-ST131	O15-D-ST393	GCA-D-ST69
Hospital Lucas Augusti	Lugo	100	8	4	5
Hospital Vall d'Hebron	Barcelona	100	16	5	9
Marqués de Valdecilla	Santander	100	9	2	2
12 de Octubre	Madrid	100	15	0	3
Virgen Macarena	Sevilla	100	11	5	3
Total		500	59 (12%)	16 (3%)	22 (4%)

TABLA 20. Distribución de los 3 grupos clonales por categorías de resistencia antimicrobiana.

Fenotipos de resistencia	Nº Total de cepas	Prevalencia de los grupos clonales			
		O25b-B2-ST131	O15-D-ST393	GCA-D-ST69	Total
Trimetoprim-sulfametoxazol	174	31 (18%)	10 (6%)	14 (8%)	55 (32%)
Fluoroquinolonas	155	41 (26%)	14 (9%)	4 (3%)	59 (38%)
Trimetoprim-sulfametoxazol y fluoroquinolonas	93	21 (23%)	9 (10%)	4 (4%)	34 (37%)
Aminoglucósidos	61	17 (28%)	0	4 (7%)	21 (34%)
Amoxicilina/ácido clavulánico	39	6 (15%)	0	0	6 (15%)
Cefalosporinas de espectro extendido	38	6 (16%)	1 (3%)	0	7 (19%)
Ninguno de los indicados anteriormente	256	51 (20%)	14 (5%)	14 (5%)	79 (31%)
Multirresistencia (a 3 o más clases de antimicrobianos)	61	14 (23%)	1 (2%)	3 (5%)	18 (30%)

Fluoroquinolonas: resistencia a ciprofloxacina; aminoglucosidos: resistencia a gentamicina, tobramicina y/o amikacina; cefalosporinas de espectro extendido: resistencia a cefepima, ceftazidima y/o cefotaxima.

TABLA 21. Genes de virulencia de las 97 cepas de los 3 grupos clonales.

Genes	Grupos clonales			Valor de P ^a		
	O25b-B2-ST131 (n = 59)	O15-D-ST393 (n =16)	GCA-D-ST69 (n = 22)	ST131 vs ST393	ST131 vs ST69	ST393 vs ST69
Adhesinas						
<i>fimH</i>	58 (98%)	16 (100%)	22 (100%)			
<i>fimAv_{MT78}</i>	0	16 (100%)	0	<0,001		<0,001
<i>papEF</i>	15 (25%)	14 (88%)	12 (55%)	<0,001	0,011	0,029
<i>papG I</i>	0	0	0			
<i>papG II</i>	3 (5%)	14 (88%)	8 (36%)	<0,001	0,005	<0,001
<i>papG III</i>	12 (20%)	0	0	0,043	0,016	
<i>papG IV</i>	0	0	3 (14%)		0,018	
<i>sfa/focDE</i>	0	0	0			
<i>afa/draBC</i>	7 (12%)	0	1 (5%)			
<i>afaFM955459</i>	4 (7%)	0	0			
<i>bmaE</i>	0	0	1 (5%)			
<i>gafD</i>	0	0	1 (5%)			
Toxinas						
<i>cnfI</i>	10 (17%)	0	0		0,033	
<i>cdtB</i>	6 (10%)	0	0			
<i>sat</i>	39 (66%)	15 (94%)	11 (50%)	<0,001		0,004
<i>hlyA</i>	10 (17%)	0	0		0,033	
Sideróforos						
<i>iucD</i>	52 (88%)	15 (94%)	19 (86%)			
<i>iroN</i>	22 (37%)	0	5 (23%)	0,002		
Cápsula						
<i>kpsM II</i>	43 (73%)	16 (100%)	11 (50%)	0,013	0,034	0,001
<i>kpsM II-K2</i>	6 (10%)	0	1 (5%)			
<i>kpsM II-K5</i>	36 (61%)	16 (100%)	10 (45%)	0,001		<0,001
<i>neuC-K1</i>	1 (2%)	0	0			
<i>kpsM III</i>	0	0	6 (27%)		<0,001	0,027
Varios						
<i>cvaC</i>	14 (24%)	0	5 (23%)	0,024		
<i>iss</i>	21 (36%)	0	5 (23%)	0,002		
<i>traT</i>	51 (86%)	3 (19%)	19 (86%)	<0,001		<0,001
<i>ibeA</i>	16 (27%)	0	0	0,013	0,003	
<i>malX</i> (PAI)	58 (98%)	0	0	<0,001	<0,001	
<i>usp</i>	59 (100%)	0	0	<0,001	<0,001	
<i>tsh</i>	1 (2%)	0	2 (9%)			
Estatus ExPEC	38 (64%)	16 (100%)	13 (59%)	0,002		0,003
Cepas con ≥8 genes de virulencia	25 (42%)	0	1 (5%)	<0,001	<0,001	

^aEl valor de P fue obtenido mediante la prueba exacta de Fisher. Únicamente se muestran si son estadísticamente significativos (P<0,05).

Resultados

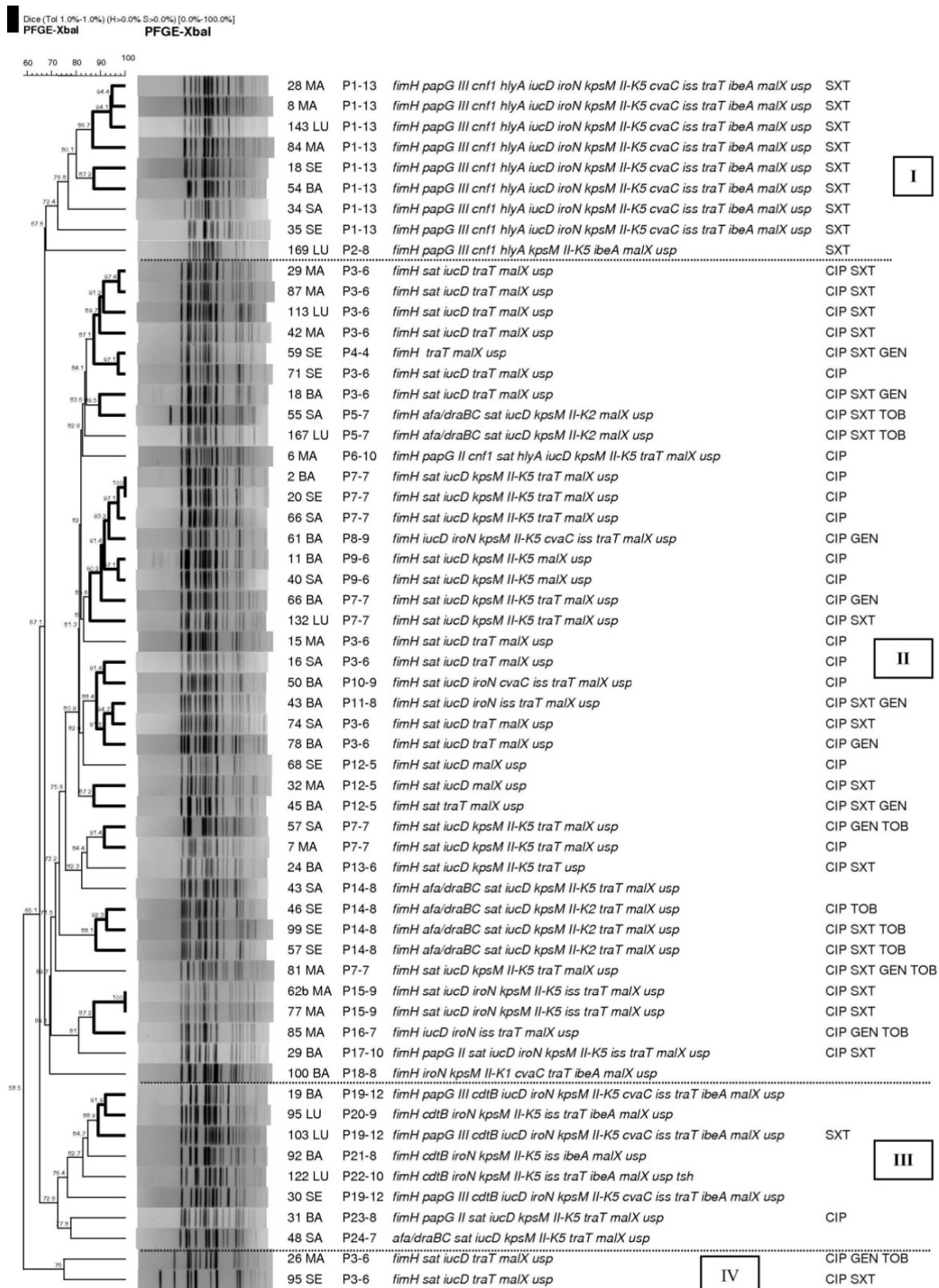


FIGURA 30. Dendrograma del análisis de los perfiles de PFGE-XbaI de las 59 cepas de *E. coli* O25b:H4-B2-ST131 aisladas de infecciones extraintestinales (2009). Los clusters que presentan una similitud $\geq 85\%$ son indicados en negrilla. A la derecha de la imagen se indica la designación de la cepa, el patrón de genes de virulencia, los genes de virulencia y la resistencia antimicrobiana. Las cepas 55SA, 167LU, 6MA, 99SE, 85MA y 29BA del grupo II eran productoras de CTX-M-15. CIP, ciprofloxacina; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina.



FIGURA 31. Dendrograma del análisis de los perfiles de PFGE-*XbaI* de las 16 cepas de *E. coli* O15:H1-D-ST393 aisladas de infecciones extraintestinales (2009). Los *clusters* que presentan una similitud $\geq 85\%$ son indicados en negrilla. A la derecha de la imagen se indica la designación de la cepa, el serotipo, el patrón de genes de virulencia, los genes de virulencia y la resistencia antimicrobiana. La cepa 114LU fue productora de CTX-M-14. CIP, ciprofloxacina; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol.

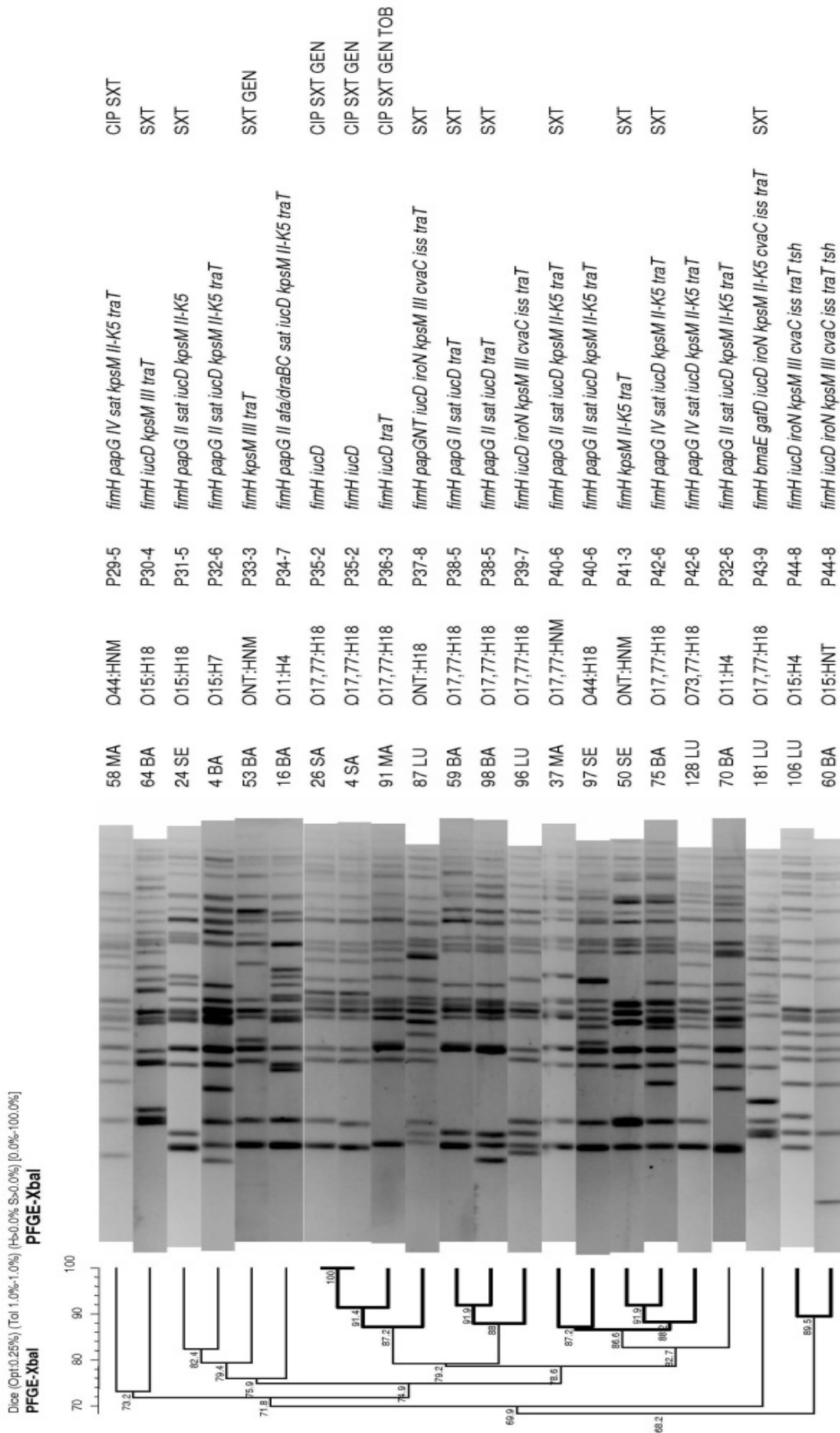


FIGURA 32. Dendrograma del análisis de los perfiles de PFGE-*XbaI* de las 22 cepas de *E. coli* GCA-D-ST69 aisladas de infecciones extraintestinales (2009). Los *clusters* que presentan una similitud $\geq 85\%$ son indicados en negrilla. A la derecha de la imagen se indica la designación de la cepa, el serotipo, el patrón de genes de virulencia, los genes de virulencia y la resistencia antimicrobiana. CIP, ciprofloxacina; SXT, ciprofloxacina; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina.

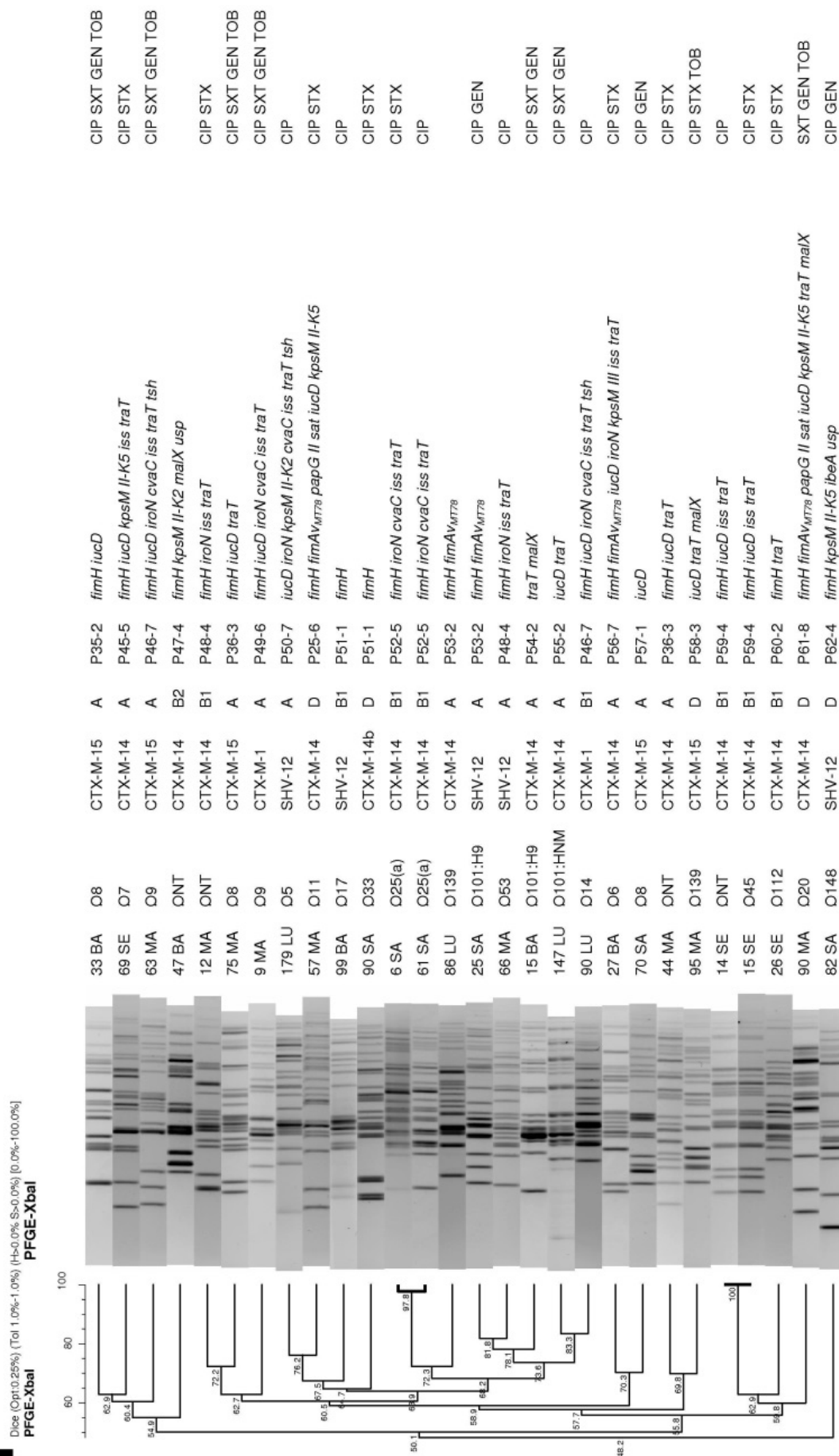


FIGURA 33. Dendrograma del análisis de los perfiles de PFGE-XbaI de las 28 cepas de *E. coli* productoras BLEE que no eran de los 3 grupos clonales aisladas de infecciones extraintestinales (2009). Los *clusters* que presentan una similitud $\geq 85\%$ son indicados en negrilla. A la derecha de la imagen se indica la designación de la cepa, el serotipo, el tipo de enzima BLEE, el grupo filogenético, el patrón de genes de virulencia, los genes de virulencia y la resistencia antimicrobiana. CIP, ciprofloxacina; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina.

4.4. ESTUDIO IV: Virotipos de cepas de *E. coli* O25b:H4-B2-ST131 productoras de enzimas BLEE. Estudio multicéntrico GEIH-BLEE-2006.

4.4.1 Breve introducción y objetivos

En los últimos años la prevalencia de *E. coli* productora de BLEE se ha incrementado en todo el mundo y también en España. En el año 2000 se efectuó el primer estudio a nivel nacional llevado a cabo por el Grupo Español de Infecciones Hospitalarias (GEIH-BLEE-2000) en el que la prevalencia de cepas BLEE detectada fue de tan solo 0,5%. Las enzimas más frecuentes fueron CTX-M-9, SHV-12 y CTX-M-14. Ninguna de las cepas resultó positiva para la enzima CTX-M15 (Hernández *et al.*, 2005). Un estudio similar se realizó 6 años más tarde detectándose una prevalencia 8 veces superior (4%). En el estudio GEIH-BLEE-2006 la enzima CTX-M-15 es una de las 4 más prevalentes junto con las 3 anteriormente citadas (Díaz *et al.*, 2009). Así pues, en solamente 6 años la situación había cambiado de forma significativa y dicho cambio fue debido fundamentalmente a la emergencia del grupo clonal O25b:H4-B2-ST131, ya que 32 de las 37 cepas CTX-M-15 investigadas resultaron pertenecer a dicho grupo clonal (Díaz *et al.*, 2010).

En el estudio GEIH-BLEE-2006 (Díaz *et al.*, 2010) únicamente se investigaron 37 cepas CTX-M-15 para saber si pertenecían al grupo clonal O25b:H4-B2-ST131 y sus genes de virulencia no se habían evaluado. En el presente estudio hemos investigado las 1.021 cepas de *E. coli* BLEE del estudio GEIH-BLEE-2006 y hemos determinado los genes de virulencia de un grupo representativo de las cepas O25b:H4-B2-ST131 identificadas, con el objetivo principal de analizar la diversidad de las cepas productoras de BLEE procedentes de diferentes hospitales y **establecer como novedad los virotipos más significativos (TABLA 22)**. También examinamos los virotipos de cepas BLEE ST131 aisladas en otros países y relacionamos los virotipos con los datos epidemiológicos y clínicos.

4.4.2. Aislados clínicos (cepas)

Se analizaron 1.021 cepas de *E. coli* productoras de BLEE que fueron aisladas de pacientes internos y externos en Febrero y Marzo del año 2006 en 44 hospitales que participaron en el proyecto GEIH-BLEE-2006 y que estaban distribuidos por todas las comunidades autónomas de España.

También analizamos 52 cepas ST131 internacionales, que representan 8 países de 3 continentes y pertenecen a las colecciones de referencia de Nicolas-Chanoine *et al.* (2008) y Johnson *et al.* (2012b).

4.4.3. Estudios realizados

Las cepas fueron analizadas con la triple PCR desarrollada en el LREC-USC para la identificación de cepas del grupo clonal O25b:H4-B2-ST131 (Blanco *et al.*, 2009). Tras la identificación de las cepas pertenecientes al grupo clonal O25b:H4-B2-ST131 se determinó el tipo de enzima BLEE, el serotipo, los genes de virulencia, el grupo filogenético, los perfiles de PFGE, la secuencias tipo por MLST siguiendo el esquema de Achtman y las resistencias a antibióticos.

4.4.4. Prevalencia y distribución del grupo clonal O25b:H4-B2-ST131

Un total de 195 (19%) de las 1.021 cepas BLEE del estudio GEIH-BLEE-2006 pertenecían al grupo clonal O25b-ST131. Las cepas de este grupo clonal estaban ampliamente distribuidas en toda España y fueron recuperadas de 30 de los 44 hospitales participantes. Se encontraron en 13 de las 17 comunidades autónomas, pero resultaron especialmente prevalentes en los hospitales de las comunidades de Madrid y las Islas Canarias. La prevalencia por hospital varió desde 0% a 52% (TABLA 23 y FIGURA 35).

4.4.5. Enzimas BLEE producidas por las cepas O25b:H4-B2-ST131

Del total de las 195 cepas O25b-ST131 detectadas, 130 cepas fueron seleccionadas al azar para su posterior caracterización. Se seleccionó un máximo de 10 cepas por hospital. De las 130 cepas representativas seleccionadas, 96 cepas (74%) fueron CTX-M-15, 15 (12%) CTX-M-14, 9 (7%) SHV-12, 6 (5%) CTX-M-9, 5 (4%) CTX-M-32, y 1 cepa fue positiva para CTX-M-3 y 1 para CTX-M-103, la cual fue identificada por primera vez en este estudio (TABLA 23 y FIGURA 35).

La nueva enzima CTX-M-103 (EMBL HG423149) tiene un cambio en un solo aminoácido con respecto a las enzimas CTX-M-15 y CTX-M-3, y pertenece al grupo CTX-M-1 (Poirel *et al.*, 2002).

4.4.6. Genes de virulencia y virotipos de las cepas O25b:H4-B2-ST131

De los 40 genes de virulencia asociados a ExPEC analizados en este estudio, 13 genes fueron detectados por PCR en la mayoría de las 130 cepas seleccionadas O25b-ST131 (**TABLA 24**). Estos 13 genes fueron: *fimH* (99%), *F10 papA* (77%), *iha* (75%), *sat* (76%), *iucD* (93%), *iutA* (94%), *fyuA* (100%), *chuA* (100%), *kpsMII* (82%), *traT* (74%), *malX* (100%), *usp* (100%) y *ompT* (100%). En contraste, en las cepas de este grupo clonal no fueron identificados 9 genes de virulencia: *papGI*, *papGII*, *sfa/focDE*, *sfaS*, *focG*, *bmaE*, *gafD*, *kpsMIII* y *tsh*. Por otra parte, las 130 cepas O25b-ST131 presentaron una media de 14,4 genes de virulencia, con un rango que varió entre un mínimo de 9 genes y un máximo de 20 genes de virulencia, y 106 cepas (82%) cumplieron el criterio molecular de cepas ExPEC establecido por Johnson *et al.* (2003).

Aunque los patrones de genes de virulencia fueron bastante homogéneos, se establecieron 4 virotipos (arbitrariamente denominados como A, B, C y D) en base a la presencia o ausencia de 4 distintivos genes de virulencia. Estos 4 genes fueron el *afa* FM955459 (alelo específico de las cepas O25b-ST131 que codifica para una adhesina de la familia Afa/Dr), *iroN* (receptor del sideróforo catecolato), *ibeA* (invasina del endotelio cerebral) y *sat* (toxina autotransportadora secretora). Las cepas del virotipo A se caracterizan por ser *afa* FM955459 positivas, *iroN* negativas, *ibeA* negativas y *sat* positivas o negativas; las del virotipo B por ser *afa* FM955459 negativas, *iroN* positivas, *ibeA* negativas y *sat* positivas o negativas; las del virotipo C por ser *afa* FM955459 negativas, *iroN* negativas, *ibeA* negativas y *sat* positivas; y las del virotipo D por ser *afa* FM955459 negativas, *iroN* positivas o negativas, *ibeA* positivas y *sat* positivas o negativas. De las 130 cepas O25b-ST131 analizadas, 29 cepas (22%) correspondían al virotipo A, 40 (31%) al virotipo B, 41 (32%) al virotipo C y 17 (13%) al virotipo D. Tres cepas no se pudieron clasificar porque resultaron negativas para los 4 genes que definen los virotipos (**TABLA 22**).

Es destacable, que las 17 cepas del virotipo D mostraron un número significativamente mayor de genes de virulencia que las pertenecientes a los otros 3 virotipos (media de 16,8 para el virotipo D *versus* 14,4 para A, 14,5 para B y 13,6 para C) (**TABLA 24**).

Los 4 virotipos identificados en las cepas O25b-ST131 españolas también se encontraron en 51 de las 52 cepas internacionales, siendo el virotipo C el más prevalente a nivel internacional (65%), seguido de los virotipos A (17%), B (10%) y D (6%).

4.4.7. Inserción de la secuencia *ISL3-like* transposasa en el gen *fimB*

Una secuencia de inserción similar a la *ISL3-like*, observada en el gen *fimB* de la cepa Nissle 1917 fue detectada por PCR en las 113 cepas españolas de los virotipos A, B y C, pero en ninguna de las 17 cepas del virotipo D ($P < 0,001$) (**TABLA 24**).

4.4.8. Relación entre los alelos *fimH* y los virotipos

En 40 cepas O25b-ST131 españolas se realizó la identificación de la secuencia nucleotídica del gen *fimH*. Se seleccionaron 10 cepas por cada virotipo de tal forma que estuviesen representados los diferentes patrones de genes de virulencia y pulsotipos. El alelo *fimH30* se detectó en las 30 cepas de los virotipos A, B y C y el alelo *fimH22* en las 10 cepas del virotipo D ($P < 0,001$) (**TABLA 24**).

4.4.9. Virotipo *versus* tipo de BLEE y resistencia antimicrobiana

Entre las 130 cepas O25b-ST131 seleccionadas, 69 cepas, que corresponden al total de las cepas de los virotipo A y B y el 63% (26/41) de las cepas del virotipo C, eran productoras de CTX-M-15. En contraste, ninguna de las 17 cepas del virotipo D resultó positiva para CTX-M-15 ($P < 0,001$). Las cepas del virotipo D fueron positivas para CTX-M-9 (5 cepas), CTX-M-14 (6 cepas), SHV-12 (5 cepas) y CTX-M-32 (1 cepa) (**TABLA 25**).

Diferentes patrones de resistencia antimicrobiana fueron observados en relación al virotipo, especialmente la resistencia a la ciprofloxacina y tobramicina, que fue significativamente asociada con los virotipos A, B, y C ($P < 0,001$). Por otra parte, la resistencia a la gentamicina fue asociada de manera significativa con los virotipos B y C ($P < 0,05$) en comparación con los virotipos A y D. El virotipo A fue significativamente asociado con la resistencia al trimetoprim-sulfametoxazol ($P < 0,05$) (**TABLA 25**).

Como era de esperar los genes *bla*_{OXA-1} y *aac*(6')-*ib-cr* se asociaron con la producción de la enzima CTX-M-15. Estos genes se detectaron en el 69% y el 100% de las cepas del virotipo A, respectivamente, en el 88% (ambos genes) del virotipo B y en el 51% (ambos genes) del virotipo C, pero en ninguna de las cepas del virotipo D (**TABLA 25**).

Únicamente hemos detectado la secuencia IS26, insertada al final de la secuencia movilizadora ISEcp1 interrumpiendo la secuencia promotora del gen *bla*_{CTX-M-15}, en las 29 cepas del virotipo A ($P < 0,001$ con respecto a los virotipos B, C y D) (**TABLA 25**).

4.4.10. Relación entre los virotipos y los pulsotipos (PFGE)

En base al dendrograma obtenido por PFGE, 116 de las 130 cepas O25b-ST131 fueron distribuidas en 4 grandes *clusters* específicos para cada virotipo, con un nivel de similitud del 72% (11 cepas del virotipo D), 76% (28 cepas del virotipo A), 77% (33 cepas del virotipo C) y 74% (39 cepas del virotipo B) (**FIGURA 36** y **FIGURA 1 suplementaria** incluida únicamente en la versión electrónica).

En las **FIGURAS 37, 38, 39** y **40** figuran los pulsotipos de las cepas españolas de los virotipos A, B, C y D, respectivamente.

Cuando se obtuvo el dendrograma con los pulsotipos de las 130 cepas españolas y de las 52 cepas internacionales también se formaron los 4 grandes *clusters* virotipo específicos (**FIGURA 2 suplementaria** incluida únicamente en la versión electrónica). Estos 4 *clusters* presentaron una similitud del 80% (47 cepas, 40 del virotipo B), 78% (60 cepas, 58 del virotipo C), 82% (37 cepas, 36 del virotipo A) y 67% (18 cepas, 16 del virotipo D) e incluyeron todos ellos cepas de varios países.

Las 13 cepas internacionales pertenecientes a los 4 principales pulsotipos establecidos por Johnson *et al.* (2012b) presentaron los virotipos A (pulsotipo 812), B (pulsotipo 905), y C (pulsotipos 968, 800, 905 y 812). Ninguna de las cepas de estos 4 pulsotipos prevalentes entre las cepas ST131 de EE.UU. presentó el virotipo D.

4.4.11. Asociaciones clínicas y epidemiológicas

En la **TABLA 26** se han comparado los datos clínicos y epidemiológicos de las infecciones causadas por las cepas O25b-ST131 y por cepas no pertenecientes a dicho grupo clonal. Las infecciones causadas por O25b-ST131 se han asociado significativamente con una mayor edad de los pacientes, con pacientes ingresados en residencias de ancianos/cuidados especiales, con las infecciones extrahospitalarias asociadas con cuidados sanitarios, con bacteriuria asintomática y con bacteriemia. No obstante, después de ajustar los datos por el tipo de adquisición y la edad con un análisis logístico de regresión no se encontró una asociación significativa con la bacteriemia.

En la **TABLA 27** se comparan los datos demográficos, el tipo de adquisición y el tipo de infección en relación con los 4 virotipos de las cepas O25b-ST131. El virotipo B se asoció estadísticamente con los pacientes de mayor edad, con una menor proporción de infecciones asintomáticas (especialmente urinarias), pero con una mayor proporción de infecciones respiratorias. En contraste, el virotipo C se asoció significativamente con infecciones sintomáticas, mientras que el virotipo D se asoció con los pacientes más jóvenes y la adquisición comunitaria. Además, los virotipos A y B se asociaron con los pacientes de residencias (17/69, 25%) *versus* los virotipos C y D (4/61, 7%) (P=0,005).

4.4.12. Desarrollo de una PCR triple para el virotipado de las cepas O25b-ST131

Hemos diseñado una PCR múltiple basada en la detección de los genes *sat*, *iroN* e *ibeA* que puede ser combinada con la PCR múltiple (genes *afa* FM955459, *rfbO25b* y *bla*_{CTX-M-15}) que ya se había desarrollado en el LREC-USC para la detección de las cepas pertenecientes al grupo clonal O25b-ST131 (**TABLA 28** y **FIGURA 34**). Cuando la nueva PCR múltiple se aplicó a las 130 cepas O25b-ST131 españolas del presente estudio se obtuvo una especificidad y sensibilidad del 100%.

TABLA 22. Virotipos de las cepas O25b:H4-B2-ST131 (Estudio GEIH-BLEE-2006).

Virotipo	<i>afa</i> FM955459	<i>iroN</i>	<i>ibeA</i>	<i>sat</i>	Nº cepas (n= 130)
A	+	-	-	+/-	29 (22%)
B	-	+	-	+/-	40 (31%)
C	-	-	-	+	41 (32%)
D	-	+/-	+	+/-	17 (13%)



TABLA 23. Prevalencia del grupo clonal O25b:H4-B2-ST131 entre las cepas de *E. coli* productoras de BLEE obtenidas en 44 hospitales (Estudio GEIH-BLEE-2006).

Código del centro	Hospital	Ciudad	Nº de cepas O25b-ST131/ Total cepas BLEE	Nº de cepas O25b-ST131 y virotipos (tipo de BLEE) entre las 130 cepas representativas
2	Marina Baixa	Villajoyosa	4/18 (22%)	2 A (CTX-M-15), 2 B (CTX-M-15)
3	Severo Ochoa	Cangas de Narcea	0/1	
4	Infanta Cristina	Badajoz	0/7	
5	Bellvitge	Barcelona	3/19 (16%)	3 D (SHV-12)
6	Sant Pau	Barcelona	3/22 (14%)	1 A (CTX-M-15), 1 B (CTX-M-15), 1 C (CTX-M-3)
7	Vall d'Hebron	Barcelona	4/21 (20%)	1 A (CTX-M-15), 3 B (CTX-M-15)
8	Cínico	Barcelona	7/24 (29%)	2 B (CTX-M-15), 1 C (CTX-M-15), 3 D (CTX-M-9)
11	General Yagüe	Burgos	0/9	
12	Puerta del Mar	Cádiz	0/27	
13	La Mancha Centro	Alcázar de San Juan	1/10 (10%)	1 D (CTX-M-14)
14	Reina Sofía	Córdoba	1/14 (7%)	1 A (CTX-M-15)
15	Figueras	Figueras	0/3	
16	Doctor Negrín	Gran Canaria	16/31 (52%)	1 A (CTX-M-15), 7 C (CTX-M-15), 2 D (SHV-12)
17	San Cecilio	Granada	0/8	
19	General Ciudad de Jaén	Jaén	0/14	
20	Juan Canalejo	A Coruña	1/18 (6%)	1 C (CTX-M-14 y CTX-M-15)
21	Arquitecto Marcide	Ferrol	1/13 (8%)	1 C (CTX-M-14 y CTX-M-15)
22	Complejo Asistencial de León	León	0/3	
23	Complejo Hospitalario San Millán y San Pedro	Logroño	3/13 (23%)	1 A (CTX-M-15), 1 B (CTX-M-15), 1 D (CTX-M-9)
24	Ramón y Cajal	Madrid	15/45 (33%)	4 A (CTX-M-15), 4 B (CTX-M-15), 1 C (CTX-M-14), 1 D (CTX-M-9)
25	Gregorio Marañón	Madrid	20/52 (39%)	1 A (CTX-M-15), 5 B (CTX-M-15), 1 C (CTX-M-32)
26	12 de Octubre	Madrid	17/35 (49%)	2 A (CTX-M-15), 5 B (CTX-M-15), 1 C (CTX-M-14), 1 NT (CTX-M-15)
27	Clínica San Carlos	Madrid	21/70 (30%)	3 A (CTX-M-15), 5 B (CTX-M-15), 1 D (CTX-M-14), 1 NT (CTX-M-14)
28	De Alcorcón	Alcorcón	30/60 (50%)	3 A (CTX-M-15), 5 B (CTX-M-15), 1 C (CTX-M-14), 1 D (CTX-M-14)
29	Morales Meseguer	Murcia	4/37 (11%)	3 C (CTX-M-15)
30	Santa María Nai	Ourense	2/22 (9%)	1 C (CTX-M-15), 1 C (CTX-M-9)
31	Central de Asturias	Oviedo	2/26 (8%)	1 C (CTX-M-15), 1 C (CTX-M-14)
32	Son Dureta	Palma de Mallorca	2/30 (7%)	1 D (CTX-M-14), 1 D (CTX-M-32)
34	De Navarra	Pamplona	0/1	
35	Provincial	Pontevedra	1/18 (6%)	1 C (CTX-M-32)
36	Clínico	Salamanca	0/14	
37	Marqués de Valdecilla	Santander	0/31	
38	Clínico Universitario	Santiago de Compostela	0/23	
39	Virgen Rocío	Sevilla	5/70 (7%)	4 A (CTX-M-15), 1 C (CTX-M-15)
40	Virgen Macarena	Sevilla	3/34 (9%)	3 B (CTX-M-15)
41	Virgen Candelaria	Tenerife	5/15 (33%)	4 C (CTX-M-15), 1 NT (SHV-12)
42	Hospital de Alcañiz	Teruel	0/4	
43	Parapléjicos	Toledo	6/17 (35%)	1 A (CTX-M-15), 4 B (CTX-M-15), 1 C (SHV-12)
44	Clínico	Valencia	2/20 (10%)	2 C (CTX-M-32)
45	La Fe	Valencia	8/53 (15%)	3 C (CTX-M-15), 1 C (CTX-M-14), 1 C (CTX-M-103), 2 C (SHV-12), 1 D (CTX-M-14)
46	Clínico	Valladolid	3/10 (30%)	3 A (CTX-M-15)
47	Xeral Cies	Vigo	2/13 (15%)	1 C (CTX-M-14 y CTX-M-15), 1 D (CTX-M-14)
48	Txagorritxu	Victoria	0/14	
49	Lozano Blesa	Zaragoza	3/32 (9%)	1 A (CTX-M-15), 2 C (CTX-M-15)

Las prevalencias más elevadas se indican en negrilla (30% a 52%).

Resultados

TABLA 24. Comparación de la prevalencia de genes de virulencia entre las 130 cepas O25b:H4-B2-ST131 en relación con el virotipo (Estudio GEIH-BLEE-2006).

Genes	Virotipos				Nº Total de Cepas O25b-ST131 n=130	Valor de P
	A n=29	B n=40	C n=41	D n=17		
Adhesinas						
<i>fimH</i>	29 (100%)	40 (100%)	40 (98%)	17 (100%)	129 (99%)	
<i>ISL3</i> -como en <i>fimB</i>	29 (100%)	40 (100%)	41 (100%)	0	110 (85%)	<0,001
<i>fimAV_{MIT78}</i>	0	0	0	1 (6%)	1 (1%)	
<i>F10papA</i>	27 (93%)	31 (78%)	41 (100%)	0	100 (77%)	<0,001
<i>papA</i>	0	0	0	12 (71%)	12 (9%)	<0,001
<i>papC</i>	0	0	2 (5%)	9 (53%)	11 (8%)	<0,001
<i>papEF</i>	0	0	0	12 (71%)	12 (9%)	<0,001
<i>papG I</i>	0	0	0	0	0	
<i>papG II</i>	0	0	0	0	0	
<i>papG III</i>	0	0	0	12 (71%)	12 (9%)	<0,001
<i>sfa/focDE</i>	0	0	0	0	0	
<i>sfaS</i>	0	0	0	0	0	
<i>focG</i>	0	0	0	0	0	
<i>afa/draBC</i>	29 (100%)	0	1 (2%)	0	30 (23%)	<0,001
<i>afaFM955459</i>	29 (100%)	0	0	0	29 (22%)	<0,001
<i>iha</i>	27 (93%)	29 (73%)	41 (100%)	0	98 (75%)	<0,001
<i>bmaE</i>	0	0	0	0	0	
<i>gafD</i>	0	0	0	0	0	
Toxinas						
<i>cnfI</i>	0	0	0	10 (59%)	10 (8%)	<0,001
<i>cdtB</i>	0	0	0	5 (29%)	5 (4%)	<0,001
<i>sat</i>	28 (97%)	30 (75%)	41 (100%)	0	99 (76%)	<0,001
<i>hlyA</i>	0	0	0	10 (59%)	10 (8%)	<0,001
Sideróforos						
<i>iucD</i>	27 (93%)	39 (98%)	41 (100%)	13 (76%)	121 (93%)	
<i>iutA</i>	28 (97%)	40 (100%)	41 (100%)	13 (76%)	122 (94%)	
<i>iroN</i>	0	40 (100%)	0	13 (76%)	53 (41%)	<0,001
<i>fyuA</i>	29 (100%)	40 (100%)	41 (100%)	17 (100%)	130 (100%)	
<i>chuA</i>	29 (100%)	40 (100%)	41 (100%)	17 (100%)	130 (100%)	
Cápsula						
<i>kpsM II</i>	29 (100%)	31 (78%)	28 (68%)	17 (100%)	106 (82%)	
<i>kpsM II-K2</i>	29 (100%)	0	0	0	29 (22%)	<0,001
<i>kpsM II-K5</i>	0	31 (78%)	28 (68%)	15 (88%)	75 (58%)	<0,001
<i>neuC-K1</i>	0	0	0	2 (12%)	2 (2%)	
<i>kpsM III</i>	0	0	0	0	0	
Varios						
<i>cvaC</i>	0	1 (3%)	0	9 (53%)	10 (1%)	<0,001
<i>iss</i>	0	39 (98%)	0	16 (94%)	55 (42%)	<0,001
<i>traT</i>	21 (72%)	21 (53%)	36 (88%)	16 (94%)	96 (74%)	
<i>ibeA</i>	0	0	0	17 (100%)	17 (13%)	<0,001
<i>malX</i> (PAI)	29 (100%)	40 (100%)	41 (100%)	17 (100%)	130 (100%)	
<i>usp</i>	29 (100%)	40 (100%)	41 (100%)	17 (100%)	130 (100%)	
<i>tsh</i>	0	0	0	0	0	
<i>ompT</i>	29 (100%)	40 (100%)	41 (100%)	17 (100%)	130 (100%)	
Estatus ExPEC	29 (100%)	31 (78%)	28 (68%)	17 (100%)	106 (82%)	
Rango de genes de virulencia	10-15	11-17	12-14	9-20	9-20	No aplicable
Media de genes de virulencia	14,4	14,5	13,6	16,8	14,4	No aplicable

En negrilla se señalan los resultados estadísticamente significativos ($P < 0,05$). El valor de P fue obtenido mediante la prueba exacta de Fisher.

TABLA 25. Tipos de BLEE, genes asociados con plásmidos CTX-M-15 y resistencia antimicrobiana de las 130 cepas O25b:H4-B2-ST131 en relación a sus virotipos.

Características	Virotipos				Total de cepas O25b-ST131 n=130
	A n=29	B n=40	C n=41	D n=17	
Enzimas BLEE					
CTX-M-3	0	0	1 (2%)	0	1 (0.8%)
CTX-M-9	0	0	1 (2%)	5 (29%)	6 (5%)
CTX-M14	0	0	8 (20%)	6 (35%)	15 (12%)
CTX-M-15	29 (100%)	40 (100%)	26 (63%)	0	96 (74%)
CTX-M-32	0	0	4 (10%)	1 (6%)	5 (4%)
CTX-M-103	0	0	1 (2%)	0	1(0.8%)
SHV-12	0	0	3 (7%)	5 (29%)	9 (7%)
Genes asociados con CTX-M-15					
<i>bla_{OXA-1}</i>	20 (69%)	35 (88%)	21 (51%)	0	85 (65%)
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	29 (100%)	35 (88%)	21 (51%)	0	85 (65%)
IS26 ^a	29 (100%)	0	0	0	30 (23%)
Resistencia Antimicrobiana					
Ciprofloxacina	29 (100%)	40 (100%)	40 (98%)	5 (29%)	117 (90%)
Gentamicina	0	27 (68%)	16 (39%)	1 (6%)	46(35%)
Tobramicina	29 (100%)	33 (83%)	28 (68%)	3 (18%)	95 (73%)
Trimetoprim/ sulfamethoxazol	29 (100%)	31 (78%)	20 (50%)	10 (59%)	92 (71%)
Amoxicilina/ Ácido clavulánico	10 (34%)	6 (15%)	9 (22%)	0	26 (20%)
Fosfomicina	5 (17%)	3 (8%)	2 (5%)	0	11 (9%)

En negrilla se señalan los resultados estadísticamente significativos ($P < 0,05$). El valor de P fue obtenido mediante la prueba exacta de Fisher.

Resultados

TABLA 26. Comparación de los datos epidemiológicos y clínicos de pacientes con infección por cepas O25b:H4-B2-ST131 productoras de BLEE y pacientes con infección por cepas no-ST131.

Variables	N° de cepas		Valor de P ^e ST131 vs no-ST131
	ST131 (n=190) ^a	no-ST131 (n=818) ^a	
Género masculino	70 (37%)	328 (40%)	
Media y rango de edad en años	75 (68-84)	69 (50-79)	0,01 ^b
Pacientes pediátricos (≤14 años)	4 (2%)	53 (6%)	0,01 ^c
Tipo de adquisición			
Nosocomial	66 (35%)	238 (29%)	
Asociada con cuidados sanitarios	47 (25%)	115 (14%)	<0,001
Comunitaria	77 (41%)	465 (57%)	<0,001
Residencia de ancianos	37 (19%)	39 (5%)	<0,001
Lugar de infección	136 (72%)	651 (80%)	0,02
Tracto urinario ^d	102 (75%)	485 (75%)	
Tejidos blandos ^d	16 (12%)	71 (11%)	
Tracto digestivo ^d	6 (4%)	37 (6%)	
Otros tipos ^d	20 (15%)	116 (18%)	
Bacteriemia (primaria o secundaria) ^d	22 (16%)	56 (9%)	0,01
Mortalidad cruda en 30 días ^d	5 (4%)	12 (2%)	

^aNo estaban disponibles los datos de 5 pacientes con infección por ST131 y 8 pacientes por No-ST131. El valor de P fue calculado por la prueba de Chi-cuadrado excepto cuando se indica otra prueba.

^bPrueba Mann-Whitney U.

^cPrueba exacta de Fisher.

^dSólo se consideraron los pacientes con infección.

^eLos valores de P únicamente se muestran si son estadísticamente significativos (P<0,05).

TABLA 27. Asociación de los virotipos con los datos clínicos y epidemiológicos de las 130 cepas O25b:H4-B2-ST131 productoras de BLEE.

Variables	N° de cepas			
	Virotipo A (n=29)	Virotipo B (n=40)	Virotipo C (n=41)	Virotipo D (n=17)
Género masculino	10 (35%)	16 (40%)	22 (54%)	7 (41%)
Edad ≤14 years	1 (3%)	0	1 (2%)	2 (12%)
Media y rango de edad	77 (63-82)	75 (64-83)^a	64 (56-79)	60 (34-78)^b
Nosocomial	9 (31%)	18 (45%)	18 (44%)	4 (24%)
Relacionada con cuidados sanitarios	9 (31%)	9 (23%)	7 (17%)	1 (6%)
Comunitaria	11 (38%)	13 (32%)	16 (39%)	12 (71%)^c
Residencia de ancianos	7 (24%)	10 (25%)	3 (7%)	1 (6%)
Infección	22 (85%)	21 (57%)^d	36 (92%)^e	13 (77%)
Tracto urinario	20 (69%)	13 (33%)^f	25 (61%)	13 (77%)
Tracto respiratorio	0	4 (10%)^g	1 (2%)	0
Tracto digestivo	0	0	2 (5%)	0
Bacteriemia primaria	0	2 (5%)	3 (7%)	0
Otros tipos	2 (7%)	2 (5%)	5 (12%)	0
Bacteriemia (primaria o secundaria)	5 (17%)	8 (20%)	8 (15%)	0
Mortalidad cruda en 30 días	0	6 (15%)	4 (10%)	1 (6%)
Infección relacionada con la mortalidad	0	3 (8%)	1 (2%)	0

^aP=0,05 (Prueba de Mann-Whitney U); ^bP=0,03 (Prueba de Mann-Whitney U); ^cP=0,03 (Prueba de Fisher); ^dP=0,009; ^eP=0,01; ^fP=0,0001; ^gP=0,03 (Prueba de Fisher).

TABLA 28. *Primers* utilizados para la identificación del grupo clonal O25b:H4-B2-ST131 y virotipos.

Genes	Primers	Secuencia de los oligonucleótidos (5'-3')	Tamaño (bp)	T° de hibridación	Referencia
<i>afa</i> FM955459 ^a	AFA-O25F	GAGTCACGGCAGTCGCGGCGG	207	55°C	Blanco <i>et al.</i> , 2009
	AFA-O25R	TTCACCGGCAGCCAGCCATCTCC			
<i>rfbO25b</i> ^a	rfb.1bis	ATACCGACGACGCCGATCTG	300	55°C	Clermont <i>et al.</i> , 2008
	rfbO25b.r	TGCTATTATTATGCGCAGC			
<i>bla</i> _{CTX-M-15} ^a	CTX-M-F1	ATAAAACCGGCAGCGGTG	483	55°C	Leflon-Guibout <i>et al.</i> , 2004
	CTX-M-F2	GAATTTTGACGATCGGGG			
<i>iroN</i> ^b	IRON-F	AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG	667	60°C	Johnson <i>et al.</i> , 2000a
	IRON-R	GACGCCGACATTAAGACGCAG			
<i>sat</i> ^b	SAT-F	ACTGGCGGACTCATGCTGT	387	60°C	Johnson <i>et al.</i> , 2003
	SAT-R	AACCCTGTAAGAAGACTGAGC			
<i>ibeA</i> ^b	IBEA 10F	AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC	170	60°C	Johnson y Stell, 2000
	IBEA 10R	TGGTGCTCCGGCAAACCATGC			

^aPCR múltiple para la identificación de cepas O25b-ST131 (Blanco *et al.*, 2009).

^bPCR múltiple para el virotipado de cepas O25b-ST131 (Desarrollada en este estudio).

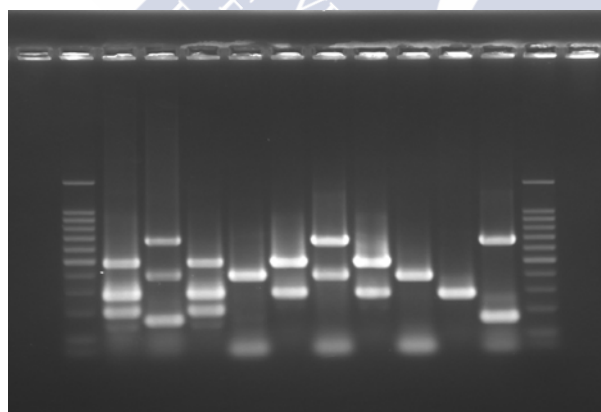


FIGURA 34. PCRs múltiples usadas para la identificación de las cepas del grupo clonal O25b:H4-B2-ST131 y el virotipado. Bandas 1 y 12: marcadores de diferentes pesos moleculares. Bandas 2, 4, 6, 8 y 10: Triple PCR para la identificación de las cepas O25b-ST131. Bandas 3, 5, 7, 9 y 11: Nueva triple PCR para el virotipado desarrollada en este estudio. Banda 2: Cepa control FV9863 (*bla*_{CTX-M-15}⁺, *rfbO25b*⁺, *afa*FM955459⁺). Banda 3: Cepas control FV14025 y H1387: (*iroN*, *sat*, *ibeA*). Bandas 4 y 5: Cepa 24.18 del virotipo A (*bla*_{CTX-M-15}⁺, *rfbO25b*⁺, *afa*FM955459⁺) (*sat*⁺). Bandas 6 y 7: Cepa 26.02 del virotipo B (*bla*_{CTX-M-15}⁺, *rfbO25b*⁺) (*iroN*⁺, *sat*⁺). Bandas 8 y 9: Cepa 45.09 del virotipo C (*bla*_{CTX-M-15}⁺, *rfbO25b*⁺) (*sat*⁺). Bandas 10 y 11: Cepa 8.23 del virotipo D (*rfbO25b*⁺) (*iroN*⁺, *ibeA*⁺).

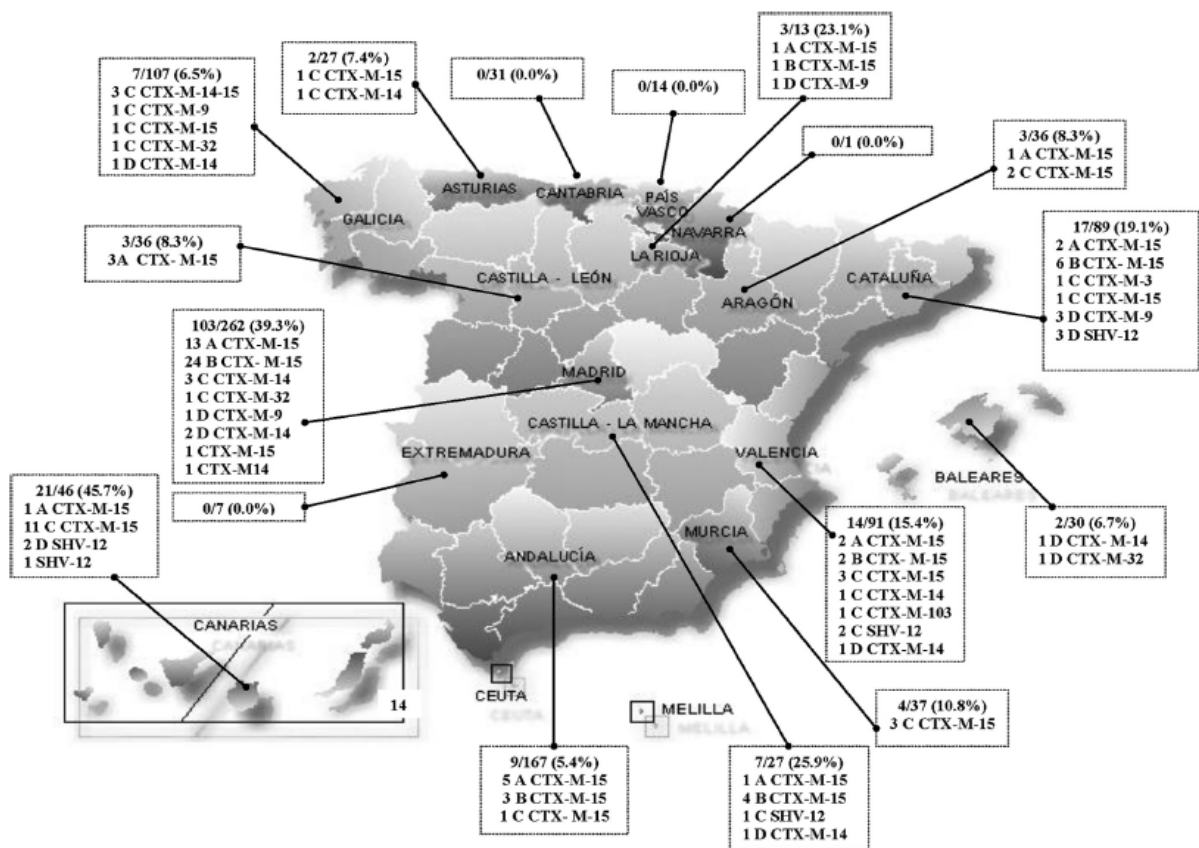


FIGURA 35. Distribución de las cepas O25b-ST131 en España. Las cepas O25b-ST131 fueron ampliamente distribuidas en toda España, estas cepas fueron identificadas en 30 de 44 hospitales participantes. Los nombres de los hospitales vienen detallados en la **TABLA 23**.

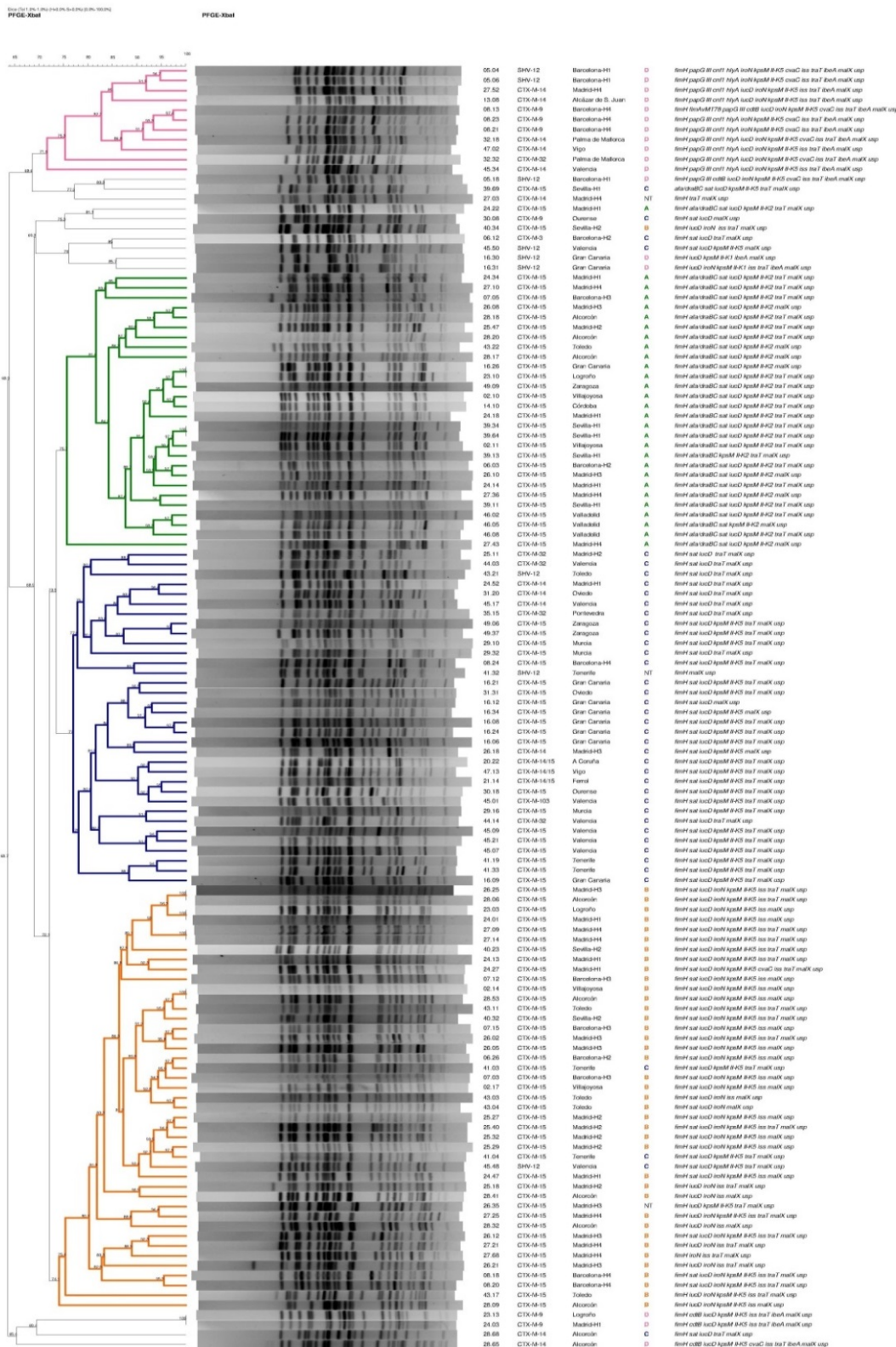


FIGURA 36. Dendrograma de 130 cepas de *E. coli* O25b:H4-B2-ST131 del estudio GEIH-BLEE-2006. Estas cepas se distribuyeron en 4 grandes *clusters* en relación a sus virotipos. A la derecha de la imagen se indica la designación de la cepa (05.04; 05 es el código del centro), tipo de enzima BLEE, ciudad, virotipo, genes de virulencia y resistencia antimicrobiana. NAL, ácido nalidixico; CIP, ciprofloxacina; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina, FOF, fosfomicina; AMC, amoxicilina-ácido clavulánico. En la **FIGURA 1 suplementaria** del CD adjunto se puede ver la información.



FIGURA 37. Dendrograma del análisis de los perfiles de PFGE-XbaI de las 29 cepas de *E. coli* O25b-ST131 españolas del virotipo A del estudio GEIH-BLEE-2006. A la derecha de la imagen se indica la designación de la cepa (24.22; 24 es el código del centro), tipo de enzima BLEE, ciudad, genes de virulencia y resistencia antimicrobiana. CIP, ciprofloxacina; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina, FOF, fosfomicina; AMC, amoxicilina-ácido clavulánico.

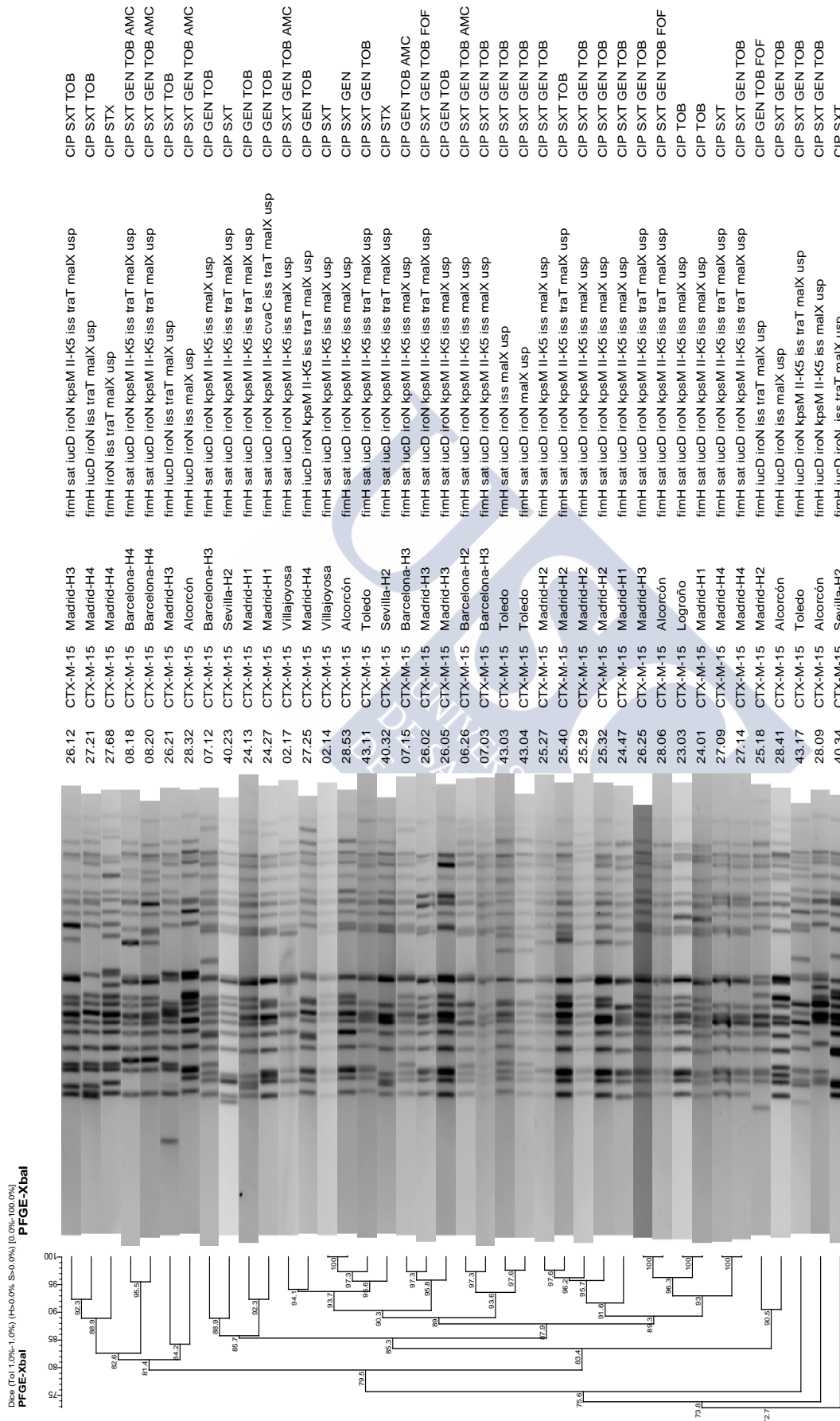


FIGURA 38. Dendrograma del análisis de los perfiles de PFGE-XbaI de las 40 cepas de *E. coli* O25b-ST131 españolas del virotipo B del estudio GEIH-BLEE-2006. A la derecha de la imagen se indica la designación de la cepa (26.12; 26 es el código del centro), tipo de enzima BLEE, ciudad, genes de virulencia y resistencia antimicrobiana. CIP, ciprofloxacina; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina; FOF, fosfomicina; AMC, amoxicilina-ácido clavulánico.

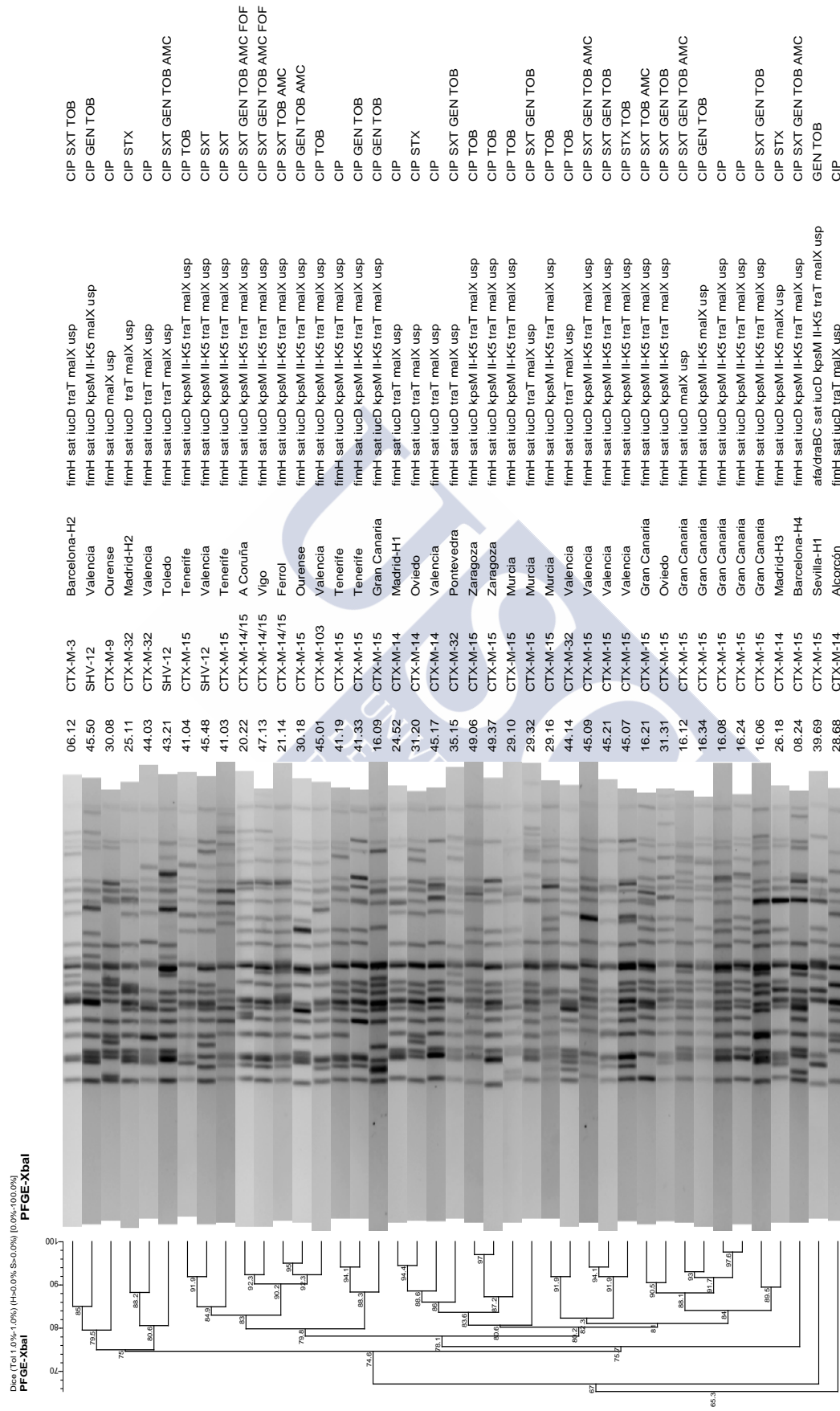


FIGURA 39. Dendrograma del análisis de los perfiles de PFGE-XbaI de las 41 cepas de *E. coli* O25b-ST131 españolas del virotipo C del estudio GEIH-BLEE-2006. A la derecha de la imagen se indica la designación de la cepa (06.12; 06 es el código del centro), tipo de enzima BLEE, ciudad, genes de virulencia y resistencia antimicrobiana. CIP, ciprofloxacina; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina, FOF, fosfomicina; AMC, amoxicilina-ácido clavulámico.

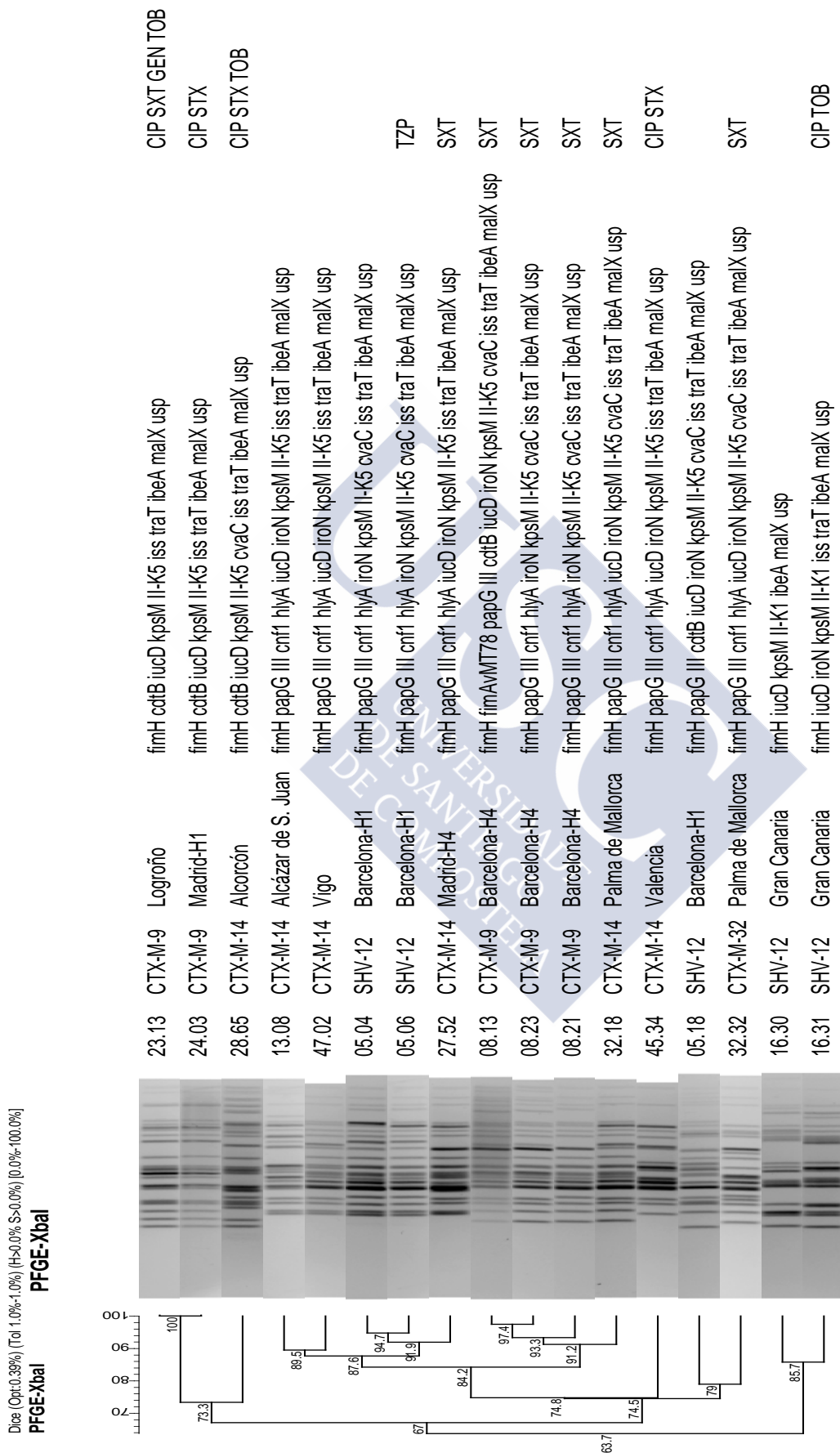


FIGURA 40. Dendrograma del análisis de los perfiles de PFGE-XbaI de las 17 cepas de *E. coli* O25b-ST131 españolas del virotipo D del estudio GEIH-BLEE-2006. A la derecha de la imagen se indica la designación de la cepa (23.13; 23 es el código del centro), tipo de enzima BLEE, ciudad, genes de virulencia y resistencia antimicrobiana. CIP, ciprofloxacina; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina; FOF, fosfomicina; TZP, piperacilina-tazobactam.

4.5. ESTUDIO V: Emergencia de los subclones H22, H30, H30-Rx y H41 del grupo clonal B2-ST131 entre cepas de *E. coli* bacteriémicas. Prevalencia con respecto a otros filoserogrupos y grupos clonales. Genes de virulencia y resistencia a antimicrobianos. Estudio HULA 1989-2011.

4.5.1. Breve introducción y objetivos

La incidencia de la bacteriemia por *E. coli* se ha incrementado a nivel mundial, probablemente debido a la aparición de cepas multirresistentes que dificultan el tratamiento, a la difusión de grupos clonales exitosos como el O25b:H4-ST131 y al envejecimiento de la población que aumenta el nivel de inmunodeprimidos y de pacientes con enfermedad de base importantes.

En el presente estudio nos planteamos comparar los genes de virulencia y de resistencia a antibióticos de las cepas del grupo clonal ST131 que actualmente están causando sepsis en seres humanos con los de las cepas de dicho grupo clonal aisladas a lo largo de los 23 últimos años en los hemocultivos de pacientes del HULA de Lugo, con el objetivo de conocer cuando apareció por primera vez dicho grupo clonal y como se ha ido expandiendo a la vez que iba adquiriendo genes de virulencia y resistencia a antibióticos.

Paralelamente quisimos determinar si durante la expansión de las cepas del grupo clonal ST131 entre *E. coli* causantes de sepsis en los últimos 23 años en el HULA de Lugo se han desplazado otros clones de ExPEC predominantes en las últimas décadas, dedicando especial atención a los grupos clonales O15:H1-D-ST393 y GCA-D-ST69.

Por último también queríamos ver si están emergiendo otros clones de ExPEC resistentes a los antibióticos.

4.5.2. Aislados clínicos (cepas)

Se analizaron un total de 3.260 cepas de *E. coli* aisladas de hemocultivos de pacientes internos y externos que acudieron al HULA de Lugo durante un período de 23 años (1989-2011).

4.5.3. Estudios realizados

Se establecieron los grupos filogenéticos por PCR y el serogrupo O por serotipado de las 3.260 cepas bacteriémicas de *E. coli* incluidas en este estudio. Además, todas las cepas se analizaron por PCR para la identificación de los grupos clonales B2-ST131, O15:H1-D-ST393 y GCA-D-ST69 y para la presencia de los genes *bla*_{CTX-M}.

Con respecto a los 4 anteriores estudios, **como novedad** se incluye la identificación de todas las cepas del grupo clonal ST131 (O25b, O16, y de otros posibles serogrupos, incluidas las ONT) utilizando una PCR múltiple específica de SNPs de los genes *gyrB* y *mdh* desarrollada por Johnson *et al.* (2009). En los estudios previos las cepas fueron analizadas por una triple PCR desarrollada en el LREC-USC que permitía únicamente la identificación de cepas del grupo clonal O25b:H4-B2-ST131 (Blanco *et al.*, 2009).

Además, se secuenció el gen *fimH* de todas las cepas del grupo clonal ST131, lo que nos permitió identificar las cepas pertenecientes a los subclones H22, H30 y H41.

También por primera vez se realiza la identificación de las cepas pertenecientes al subclón H30-Rx de ST131 empleando una PCR de un SNP específico del gen *ybbW* (Price *et al.*, 2013).

Por último, aunque solo en determinadas cepas, se realizó la identificación de los genes de virulencia, la resistencia antimicrobiana, el tipado molecular por PFGE y las relaciones clonales por MLST siguiendo el esquema de Achtman.

4.5.4. Grupos filogenéticos

El grupo filogenético B2 fue el más predominante (40%) entre las 3.260 cepas de *E. coli* causantes de bacteriemia, seguido por los grupos filogenéticos A (25%), D (23%) y B1 (13%) (**TABLA 29**). Al comparar la distribución de los 4 grupos filogenéticos entre los 2 períodos (1989-1999 y 2000-2011), observamos que la prevalencia del grupo filogenético A ha descendido en el segundo período, pasando del 28% al 23% (estadísticamente significativo $P=0,008$). En contraste, la prevalencia del grupo filogenético B1 ha aumentado

significativamente durante el segundo período, del 9% al 14% ($P < 0,001$), mientras que la distribución de los grupos filogenéticos B2 (41% *versus* 40%) y D (22% *versus* 23%) se ha mantenido estable en ambos períodos.

4.5.5. Serogrupos O, filoserogrupos y estatus ExPEC

Aunque las cepas bacteriémicas presentaron una gran diversidad de serogrupos O, ya que se identificaron un total de 138 serogrupos diferentes, el 66% de las cepas se englobaron en únicamente 18 serogrupos (O1, O2, O4, O6, O7, O8, O9, O11, O15, O17, O18, O22, O25, O75, O77, O83, O101 y O153) (**TABLA 30**).

En la **TABLA 30** también podemos observar que entre los 9 serogrupos más frecuentes, el O6 (9%) presentó la mayor prevalencia durante el período de los 23 años de estudio, seguido por el O2 (8%), O8 (7%), O25 (7%), O1 (7%), O15 (4%), O18 (4%), O9 (4%) y el O4 (4%).

Durante el segundo período (2000-2011), el serogrupo O25 ha emergido con fuerza pasando de un 3% en el primer período (1989-1999) a un 8% en el segundo, desplazando a los serogrupos O1, O2, O4, O8, O15 y O18 que han descendido en los últimos años (**TABLA 31**). Destacar que en los últimos 7 años (2005-2011) el serogrupo O25 presentó la mayor prevalencia (9,6%), desplazando incluso al serogrupo O6 (7,9%).

En la **TABLA 32** se relacionan los 24 filoserogrupos más prevalentes. Observamos que el filoserogrupo O25-B2 pasa de un 2,4% en el primer período (1989-1999) a un 6,7% en el segundo (2000-2011) ($P < 0,001$). También aumenta la prevalencia de las cepas O9-B1 (0% al 0,9%). En contraste, los filogrupos O18-B2 y O83-B2 descienden significativamente. Las diferencias observadas en el resto de los filoserogrupos no fueron estadísticamente significativas.

En la **TABLA 33** se analiza la distribución de los 24 filoserogrupos más prevalentes en 3 períodos observándose que las cepas O6:B2 fueron las más prevalentes en los 2 primeros períodos (1989-1998 y 1999-2008) mientras que las O25-B2 fueron las más prevalentes en el último período (2009-2011). En el último período también se observa un aumento significativo en la prevalencia de las cepas de los filogrupos O8-A, O9-B1 y O153-D.

Para determinar el estatus ExPEC, se analizaron un total de 1.810 cepas de *E. coli* bacteriémicas, de las cuales 1.166 cepas (64%) cumplieron el criterio de cepas ExPEC de acuerdo a la definición de Johnson *et al.* (2003). Entre las cepas de los 18 serogrupos más frecuentes, el 73% cumplieron el criterio de cepas ExPEC, mientras que entre las cepas de los serogrupos menos frecuentes únicamente el 39% fueron ExPEC ($P < 0,001$) (**TABLA 34**).

Como se observa en la **TABLA 35**, la gran mayoría de las cepas de los filoserogrupos O1-B2 (89%), O1-D (89%), O2-B2 (95%), O2-D (97%), O4-B2 (95%), O6-B2 (97%), O7-A (89%), O11-D (74%), O15-D (86%), O18-B2 (81%), O25-B2 (90%), O75-B2 (100%) y O83-B2 (79%) cumplen el estatus ExPEC.

4.5.6. Comparación entre los períodos extremos, 1989-1993 y 2010-2011

En las **TABLAS 36** a **42** se comparan los resultados obtenidos en los 2 períodos extremos del estudio para detectar los cambios que se han producido en lo relativo a la prevalencia de grupos filogenéticos, clones O15-ST393, GCA-ST69 y ST131, filoserogrupos y genes de virulencia. Para ello se completó la caracterización de 213 cepas de *E. coli* históricas aisladas de hemocultivos que corresponden a los primeros 5 años (1989-1993) y de 614 cepas recientes que corresponden a los 2 últimos años (2010-2011).

Al comparar las cepas aisladas en los primeros 5 años con las cepas de los 2 últimos años observamos que no existen diferencias significativas en relación a los grupos filogenéticos, el estatus ExPEC y los grupos clonales O15-ST393 y GCA-ST69. No obstante, sí que existen diferencias significativas en el grupo clonal ST131 que se incrementó del 0,5% al 8% ($P < 0,001$) (**TABLA 36**).

Únicamente 3 filoserogrupos (O25-B2, O101-A y O153-D) aumentaron y 2 descendieron (O18-B2 y O77-D) significativamente entre los períodos 1989-1993 y 2010-2011 (**TABLA 37**).

Las 827 cepas de *E. coli* bacteriémicas fueron analizadas por PCR para la presencia de 30 genes que codifican para factores de virulencia típicos de cepas ExPEC (**TABLA 38**). Los genes de virulencia más frecuentemente detectados en las cepas fueron *fimH*, *papEF*, *iucD*,

iroN, *kpsMIII*, *traT*, *malX* y *usp*. Al comparar las primeras 213 cepas con las últimas 614 cepas aisladas, solo un gen de virulencia (*fimA*_{VM78}) fue significativamente asociado con las primeras cepas. Por el contrario, con las cepas aisladas durante los 2 últimos años, 7 fueron los genes (*papG* NT, *afa/draBC*, *afa* FM955459, *cnf1*, *iucD*, *cvaC* y *traT*) asociados de manera significativa.

4.5.6.1. Genes de virulencia y grupos filogenéticos

La **TABLA 38** muestra la distribución de los genes de virulencia entre las cepas de los grupos filogenéticos A, B1, B2 y D de los períodos 1989-1993 y 2010-2011.

Al analizar las cepas del **grupo filogenético A** vemos que los genes *fimA*_{VM78} (36% versus 17%) y *neuC*-K1 (9% versus 1%) se encontraron más frecuentemente entre las cepas del primer período, mientras que los genes *papEF* (19% versus 35%), *papG*-NT (9% versus 28%), *iroN* (28% versus 48%), *cvaC* (19% versus 41%), y *traT* (41% versus 60%) se asociaron estadísticamente con las cepas del segundo período.

En las cepas del **grupo filogenético B1** observamos que los genes *iucD* (19% versus 49%), *iroN* (24% versus 50%) y *traT* (43% versus 68%) se asociaron con significación estadística con las cepas aisladas más recientemente.

Entre las cepas del **grupo filogenético B2** el gen *sfa/focDE* (65% versus 53%) se encontró más frecuentemente en las cepas del primer período, mientras que los genes *afa/draBC* (1% versus 8%), *cnf1* (38% versus 50%), *sat* (31% versus 44%), *iucD* (51% versus 62%) y *traT* (33% versus 56%) se observaron más frecuentemente entre las cepas aisladas en los 2 últimos años.

Por su parte, al analizar las cepas del **grupo filogenético D** únicamente el gen *iucD* (59% versus 76%) se encontró asociado estadísticamente con las cepas aisladas más recientemente.

Como era de esperar, entre los grupos filogenéticos se observaron diferencias notorias en relación a la media de los genes de virulencia. Así, las cepas del grupo B2 presentaron las medias más elevadas (9,5 y 10), seguido por el grupo D (medias 6,1 y 6,4), el grupo A

(medias 3,8 y 4,5) y el grupo B1 (medias 2,5 y 4,0). Las mayores medias en los 4 grupos filogenéticos se encontraron entre las cepas aisladas durante los 2 últimos años (2010-2011). No obstante, el nivel de cepas que cumplieron el estatus ExPEC fue similar en ambos períodos (58% *versus* 63%) y el porcentaje de cepas con 8 o más genes de virulencia fue el mismo en ambos períodos (37%).

4.5.6.2. Genes de virulencia y serogrupos O

Las **TABLA 39 y 40** muestran la distribución de los genes de virulencia entre las cepas de los 9 serogrupos más prevalentes (O1, O2, O4, O6, O8, O9, O15, O18 y O25) comparando los períodos 1989-1993 y 2010-2011.

Entre las cepas del **serogrupo O1** los genes de virulencia *fimH*, *fimA*_{VM78}, *papEF*, *papGII*, *sat*, *iucD*, *neuC-K1*, *traT*, *malX* y *usp* fueron los más frecuentes, superando en todos los casos su presencia en el 50% de las cepas. Además, más del 90% cumplieron el criterio de cepas ExPEC y más del 50% presentaron 8 o más genes de virulencia. Al comparar las cepas del serogrupo O1 de ambos períodos únicamente se apreciaron diferencias significativas con respecto a los genes *papEF* (67% *versus* 94%) y *papGII* (33% *versus* 77%) que fueron más frecuentes entre las cepas aisladas más recientemente (**TABLA 39**).

En las cepas del **serogrupo O2** fueron 8 los genes de virulencia que se encontraron en al menos el 50% de las cepas de este serogrupo: *fimH*, *papEF*, *sfa/focDE*, *iucD*, *iroN*, *kpsMII*, *malX* y *usp*. También más del 90% cumplieron el criterio de cepas ExPEC y más del 50% presentaron 8 o más genes de virulencia. Únicamente los genes *cnf1* (19% *versus* 53%) y *hlyA* (19% *versus* 60%) mostraron diferencias estadísticas en los 2 períodos analizados. No obstante el número de cepas con al menos 8 genes de virulencia fue superior (33% *versus* 72%) entre las aisladas más recientemente (**TABLA 39**).

En el **serogrupo O4** al menos el 90% de sus cepas contenían los genes *fimH*, *papEF*, *sfa/focDE*, *cnf1*, *hlyA*, *iroN*, *malX* y *usp*. Además, más del 90% de sus cepas cumplieron el criterio de cepas ExPEC y el 100% contenían 8 o más genes de virulencia. Observamos diferencias significativas en los períodos analizados únicamente con los genes *cnf1* (70% *versus* 100%) e *iucD* (40% *versus* 5%) (**TABLA 39**).

Las cepas del **serogrupo O6** mostraron el mayor número de genes de virulencia, presentando al menos el 50% de sus cepas los siguientes 12 genes: *fimH*, *papEF*, *papGII*, *sfa/focDE*, *cnfI*, *sat*, *hlyA*, *iucD*, *iroN*, *kpsMII-K5*, *malX* y *usp*. Además, al menos el 90% cumplieron el criterio de cepas ExPEC y presentaron 8 o más genes de virulencia. Los genes *papGII* (29% versus 64%), *cnfI* (65% versus 89%), *sat* (35% versus 64%), *hlyA* (70% versus 92%) y *traT* (18% versus 53%) se detectaron con frecuencias significativamente superiores entre las cepas aisladas en el período 2010-2011. Únicamente el gen *papGIII* fue más frecuente entre las cepas antiguas (**TABLA 39**).

Las cepas de los **serogrupos O8 y O9** fueron las que presentaron menos genes de virulencia, no presentando el estatus ExPEC la mayoría de ellas. No obstante, se ha observado que las aisladas en los 2 últimos años presentaron una media de genes de virulencia más elevada, pasando de 4,4 a 5,3 en las del serogrupo O8 y de 3,0 a 5,4 en las del serogrupo O9. Entre las cepas del serogrupo O9 se observó que los genes *papEF* (11% versus 51%), *papG-NT* (11% versus 49%), *iroN* (22% versus 63%) e *iss* (22% versus 63%) eran mucho más frecuentes entre las aisladas recientemente. En el caso de las cepas del serogrupo O8 el gen *tsh* (24% versus 2%) se observó más frecuentemente entre las cepas más antiguas y el gen *cvaC* (29% versus 63%) entre las más recientes (**TABLA 40**).

Entre las cepas del **serogrupo O15** los genes de virulencia *fimH*, *fimAV_{MT78}*, *papEF*, *papGII*, *sat*, *iucD* y *kpsM II-K5* fueron los más frecuentes, superando en todos los casos su presencia en el 50% de las cepas. Además, más del 75% cumplieron el criterio de cepas ExPEC, pero únicamente el 11% presentaron 8 o más genes de virulencia. Al comparar las cepas del serogrupo O15 de ambos períodos no se apreciaron diferencias significativas con respecto a ninguno de los genes de virulencia analizados (**TABLA 40**).

Con respecto a las cepas del **serogrupo O18**, 10 genes de virulencia (*fimH*, *papEF*, *sfa/focDE*, *sat*, *hlyA*, *iucD*, *iroN*, *kpsMII-K5*, *malX* y *usp*) se encontraron con una prevalencia de al menos el 50%. Además, el 88% de sus cepas cumplieron el criterio de cepas ExPEC y presentaron 8 o más genes de virulencia. Las medias (9,7 y 10,6) de genes de virulencia entre las cepas O18 fueron muy elevadas y únicamente algo inferiores a las encontradas en las cepas del serogrupo O6 (10,0 y 11,0). Únicamente el gen *traT* (20% versus 62%) se observó más frecuentemente en las cepas O18 aisladas más recientemente (**TABLA 40**).

4.5.6.3. Genes de virulencia y filoserogrupos

Las **TABLA 41** y **42** muestran la distribución de los genes de virulencia entre las cepas de los 9 filoserogrupos más prevalentes (O1-D, O2-B2, O4-B2, O6-B2, O8-A, O9-A, O15-D, O18-B2 y O25-B2) comparando los períodos 1989-1993 y 2010-2011.

Entre las cepas del **filoserogrupo O1-D** los genes de virulencia *fimH*, *fimA*_{VM78}, *papEF*, *sat*, *iucD*, *neuC-K1*, *traT*, *malX* y *usp* fueron los más frecuentes, superando en todos los casos su presencia en el 50% de las cepas. Además, el 90% cumplieron el criterio de cepas ExPEC y el 73% presentaron 8 o más genes de virulencia. Al comparar las cepas del filoserogrupo O1-D de ambos períodos se apreciaron diferencias significativas con respecto a los genes *papEF* (64% *versus* 95%), *papGII* (9% *versus* 68%) y *iucD* (64% *versus* 95%), que fueron más frecuentes entre las cepas aisladas más recientemente (**TABLA 41**).

En las cepas del **filoserogrupo O2-B2**, fueron 10 los genes de virulencia que se encontraron en al menos el 50% de las cepas de este filoserogrupo: *fimH*, *papEF*, *sfa/focDE*, *cnf1*, *hlyA*, *iucD*, *iroN*, *neuC-K1*, *malX* y *usp*. El 100% cumplieron el criterio de cepas ExPEC y el 75% presentaron 8 o más genes de virulencia. Únicamente los genes *cnf1* (29% *versus* 68%) y *hlyA* (29% *versus* 71%) mostraron diferencias estadísticas en los 2 períodos analizados. No obstante el número de cepas con al menos 8 genes de virulencia fue superior (50% *versus* 85%) entre las aisladas más recientemente (**TABLA 41**).

En el **filoserogrupo O4-B2** al menos el 50% de sus cepas presentaban los siguientes 10 genes de virulencia: *fimH*, *papEF*, *papGIII*, *sfa/focDE*, *cnf1*, *hlyA*, *iroN*, *kpsMII-K5*, *traT*, *malX* y *usp*. Además, el 97% de sus cepas cumplieron el criterio de cepas ExPEC y el 100% contenían 8 o más genes de virulencia. Observamos diferencias significativas en los períodos analizados únicamente con los genes *cnf1* (70% *versus* 100%) e *iucD* (40% *versus* 5%) (**TABLA 41**).

Las cepas del **filoserogrupo O6-B2** mostraron el mayor número de genes de virulencia, presentando al menos el 50% de sus cepas los siguientes 13 genes: *fimH*, *papEF*, *papGII*, *sfa/focDE*, *cnf1*, *sat*, *hlyA*, *iucD*, *iroN*, *kpsMII-K5*, *malX* y *usp*. Además, el 99% cumplieron el criterio de cepas ExPEC y el 93% presentaron 8 o más genes de virulencia. Los genes *papGII*

(31% versus 65%), *cnfI* (69% versus 90%), *sat* (38% versus 65%), *hlyA* (75% versus 94%) y *traT* (19% versus 52%) se detectaron con frecuencias significativamente superiores entre las cepas aisladas en el período 2010-2011, mientras que lo contrario pasó con los genes *papGIII* (50% versus 19%) y *sfa/focDE* (100% versus 79%) (TABLA 41).

Las cepas de los **filosero grupos O8-A y O9-A** fueron las que presentaron menos genes de virulencia. No obstante, se ha observado que las cepas O9-A aisladas en los 2 últimos años presentaron una media de genes de virulencia más elevada, pasando de 3,0 a 5,6. Entre las cepas del filosero grupo O9-A se observó que los genes *papEF* (11% versus 60%) y *papG-NT* (11% versus 56%) eran mucho más frecuentes entre las aisladas recientemente. En el caso de las cepas del filosero grupo O8-A los genes *sfa/focDE* y *tsh* (22% versus 0%) se detectaron más frecuentemente entre las cepas más antiguas y el gen *cvaC* (44% versus 82%) entre las más recientes (TABLA 42).

Entre las cepas del **filosero grupo O15-D** los genes de virulencia *fimH*, *fimAV_{MT78}*, *papEF*, *papGII*, *sat*, *iucD* y *kpsM II-K5* fueron los más frecuentes superando en todos los casos su presencia en el 50% de las cepas. Además, el 83% cumplieron el criterio de cepas ExPEC, pero únicamente el 13% presentaron 8 o más genes de virulencia. Al comparar las cepas del filosero grupo O15-D de ambos períodos no se apreciaron diferencias significativas con respecto a ninguno de los genes de virulencia analizados (TABLA 42).

En las cepas del **filosero grupo O18-B2**, 10 genes de virulencia (*fimH*, *papEF*, *sfa/focDE*, *sat*, *hlyA*, *iucD*, *iroN*, *kpsMII-K5*, *malX* y *usp*) presentaron una prevalencia de al menos el 50%. Además, el 90% de sus cepas cumplieron el criterio de cepas ExPEC y presentaron 8 o más genes de virulencia. Las medias (10,2 y 10,6) de genes de virulencia entre las cepas O18-B2 fueron muy elevadas. Únicamente el gen *traT* (21% versus 60%) se observó más frecuentemente en las cepas O18-B2 aisladas más recientemente (TABLA 42).

4.5.7. Grupos clonales (O15-ST393, GCA-ST69 y ST131) y genes de virulencia

La detección de los grupos clonales O15-D-ST393, CGA-D-ST69 y B2-ST131 se realizó por PCR en las 3.260 cepas bacteriémicas. Un total de 92 (2,8%) fueron del grupo clonal O15-ST393, 158 (4,8%) del grupo clonal A, 157 (4,8%) del grupo clonal ST131. De las 157 cepas

ST131, 150 pertenecieron al serotipo O25b:H4 y 7 al O16:H5. Los 3 grupos clonales representaron el 12,5% del total de las cepas bacteriémicas aisladas entre los años 1989 y 2011 (**TABLA 43**).

El grupo clonal **O15-ST393** apareció por primera vez en el año 1991 y presentó algunas variaciones en su distribución a lo largo de los años, especialmente en el primer período (1989-1999), en el cual se observaron algunos incrementos esporádicos, como en el año 1993 donde su prevalencia fue de 7%. No se observaron diferencias significativas en la prevalencia de las cepas del primer período (3,4%) con respecto al segundo (2,6%). En este grupo clonal se identificaron únicamente 4 cepas productoras de CTX-M-14, la primera de las cuales fue identificada el año 2003.

En la distribución del **grupo clonal A** también se observaron algunos picos en los años 1999 a 2001 y 2006 a 2008. En el primer período (1989-1999), el grupo clonal A presentó una prevalencia de 2,9%, mientras que en el segundo (2000-2011) su prevalencia fue significativamente mayor (5,5%). Entre las cepas del grupo clonal A encontramos únicamente 2 cepas productoras de CTX-M-14 que se aislaron en los años 2008 y 2010.

A partir del año 2005 se observó un incremento muy significativo de cepas **O25b:H4-ST131**. La prevalencia de estas cepas fue de 1% en el primer período del estudio (1989-1999) pasando al 5,9% en el segundo período (2000-2011). La primera cepa O25b:H4-ST131 se aisló en el año 1993, pero no fue hasta el año 2006 cuando se detectaron las primeras cepas productoras de CTX-M-15. Entre las cepas O25b:H4-ST131, 35 fueron productoras de CTX-M-15, 1 de CTX-M-14, 2 de CTX-M-9 y 1 de SHV-12.

La primera cepa O16:H5-ST131 se aisló 2005. En el año 2010 se aislaron 4 de las 7 cepas de este subclón coincidiendo con la detección de la primera cepa productora de CTX-M-14 (**TABLA 43**).

Como se observa en la **TABLA 43**, 55 cepas (1,7%) fueron de la **variante O25a**. No se observaron diferencias significativas al comparar la prevalencia de los 2 períodos (2,2% *versus* 1,5%), pero se observa una tendencia a la baja. Las 2 cepas productoras de CTX-M-32 se identificaron en el año 2005.

Al analizar los genes de virulencia de las 92 cepas del grupo clonal **O15-ST393**, nos encontramos que más del 90% de ellas presentaron los siguientes 7 genes: *fimH*, *fimA_{VM78}*, *papEF*, *papGII*, *sat*, *iucD* y *kpsMII-K5*. Además, el 97% de las cepas respondieron al estatus ExPEC, pero únicamente el 3% presentaron 8 o más genes de virulencia (**TABLA 44**).

Los genes de virulencia más comunes entre las cepas del **grupo clonal A** fueron: *fimH*, *papEF*, *iucD*, *kpsMII-K5* y *traT*. Algo más de la mitad (56%) se clasificaron como ExPEC y únicamente el 2% presentaron 8 o más genes de virulencia (**TABLA 44**).

Entre las 157 cepas del **grupo clonal ST131**, 7 genes de virulencia (*fimH*, *sat*, *iucD*, *kpsMII-K5*, *traT*, *malX* y *usp*) presentaron una prevalencia superior al 60%. El 85% presentaron el estatus ExPEC y el 42% presentaron 8 o más genes de virulencia (**TABLA 44**).

Al analizar las diferencias significativas entre los grupos clonales O15-ST393 y ST131, 13 genes de virulencia (*papGIII*, *afa/draBC*, *afa* FM955459, *cnf1*, *cdtB4*, *hlyA*, *iroN*, *kpsMII-K2*, *iss*, *traT*, *ibeA*, *malX* y *usp*) fueron asociados con el ST131 y 6 genes (*fimA_{VM78}*, *papEF*, *papGII*, *sat*, *iucD* y *kpsMII-K5*) con el grupo clonal O15-ST393.

De la misma manera, al analizar las diferencias significativas entre los grupos clonales A y ST131, 11 genes de virulencia se asociaron con el ST131 (*papGIII*, *afa/draBC*, *afa* FM955459, *cnf1*, *cdtB4*, *sat*, *hlyA*, *iucD*, *kpsMII-K2*, *neuC-K1*, *ibeA*, *malX* y *usp*) y 6 genes (*fimA_{VM78}*, *papEF*, *papGII*, *papGIV*, *kpsMIII* y *traT*) con el grupo clonal A.

En relación a las diferencias significativas entre los grupos clonales O15 y GCA, 6 genes de virulencia fueron asociados con el O15-ST393 (*fimA_{VM78}*, *papEF*, *papGII*, *sat*, *iucD* y *kpsMII-K5*) y los genes *papGIV*, *iroN*, *kpsMIII*, *iss* y *traT* fueron asociados con el grupo clonal A (**TABLA 44**).

4.5.8. Virotipos de las cepas O25b:H4-ST131

En este estudio las cepas O25:H4-ST131 se clasificaron en 6 virotipos (arbitrariamente denominados como A, B, C, D, E y F) y en 5 subvirotipos (D1, D2, D3, D4 y D5) en base a la presencia o ausencia de 11 genes de virulencia (**TABLA 45**).

De las 150 cepas O25:H4-ST131, 34 cepas correspondían al virotipo A, 4 cepas al B, 47 cepas al C, 51 cepas al D, 4 cepas al E y 6 cepas al F. Cuatro cepas fueron clasificadas como no tipables porque fueron negativas para los 11 genes que definen a estos virotipos (**TABLA 46**).

El virotipo D fue el único identificado en el primer período, no observándose diferencias significativas entre los 2 períodos (1989-1999 y 2000-2011). Los restantes 5 virotipos (A, B, C, E y F) emergieron en el segundo período, y únicamente se observaron diferencias significativas con los virotipos A y C (**TABLA 46**).

Si bien la característica principal de las cepas del virotipo D es que posean el gen *ibeA*, el virotipo D fue subclasificado en 5 subvirotipos (denominados en orden de aparición como D1 en 1993, D2 en 1998, D3 en 1998, D4 en 2007 y D5 en 2009) en base a la presencia o ausencia de 9 genes de virulencia (**TABLAS 45 y 47**).

Como se observa en las **TABLAS 46 y 47**, el virotipo D, desde su aparición el año 1993, presentó una prevalencia que osciló entre el 0% y el 3,6%. De las 51 cepas del virotipo D, 19 cepas correspondían al virotipo D2, 12 cepas al D3, 8 cepas al D1, 6 cepas al D4 y 6 cepas al D5.

4.5.8.1. Virotipos, genes de virulencia y estatus ExPEC

En el **virotipo A**, 7 genes de virulencia fueron identificados en el 100% de sus cepas (*fimH*, *afa/draBC*, *afaFM955459*, *sat*, *kpsMII-K2*, *malX* y *usp*) y el 94% de sus cepas fueron positivas para el gen *iucD*. Es destacable que el 100% de las cepas del virotipo A presentaron el estatus ExPEC (**TABLA 48**).

El 100% de las cepas del **virotipo B** presentaron los genes de virulencia *fimH*, *sat*, *iucD*, *iroN*, *malX* y *usp*. Otros genes encontrados en al menos el 50% de las cepas de este virotipo fueron el *kpsMII-K5*, *iss* y *traT*. Únicamente el 50% de las cepas resultaron ser ExPEC (**TABLA 48**).

Entre las 47 cepas del **virotipo C**, 7 genes de virulencia (*fimH*, *sat*, *iucD*, *kpsMII-K5*, *traT*, *malX* y *usp*) presentaron una prevalencia superior al 70%. Además, el 77% fueron clasificadas como ExPEC (**TABLA 48**).

Las cepas del **virotipo D** mostraron numerosos genes de virulencia, identificándose los siguientes 13 genes en al menos el 49% de las cepas: *fimH*, *papEF*, *papGIII*, *cdtB*, *iucD*, *iroN*, *kpsMII-K5*, *cvaC*, *iss*, *traT*, *ibeA*, *malX* y *usp*. El 92% presentaron el estatus ExPEC y el 88% poseían 8 o más genes de virulencia (**TABLA 48**).

En los **virotipos E y F**, el 100% de sus cepas fueron positivas para los genes *fimH*, *papEF*, *papGII*, *sat*, *iucD*, *kpsMII-K5*, *malX* y *usp*. Además, el 100% de las cepas del virotipo E fueron positivas para *cnf1* y *hlyA*, y el 100% de las cepas del virotipo F presentaron el gen *traT*. También es destacable que el 100% de las cepas de los virotipos E y F resultaron ser ExPEC (**TABLA 48**).

Al comparar los virotipos A y C, 3 genes (*afa/draBC*, *afa* FM955459 y *kpsM II-K2*) se asociaron de manera significativa con el virotipo A y 2 (*kpsMII-K5* y *traT*) con el virotipo C (**TABLA 48**).

Al analizar las diferencias significativas entre los virotipo A y D, se asociaron 13 genes de virulencia (*papEF*, *papG III*, *cnf1*, *cdtB4*, *hlyA*, *iroN*, *kpsM II-K5*, *neuC-K1*, *cvaC*, *iss*, *traT*, *ibeA* y *tsh*) con el virotipo D y 5 genes (*afa/draBC*, *afa* FM955459, *sat*, *iucD* y *kpsM II-K2*) con el virotipo A.

Al comparar los virotipos C y D, el mayor número de los genes de virulencia estuvieron asociados con el virotipo D (*papEF*, *papG III*, *afa/draBC*, *cnf1*, *cdtB4*, *hlyA*, *iroN*, *kpsM II-K5*, *neuC-K1*, *cvaC*, *iss*, *ibeA* y *tsh*) y solo los genes *sat* y *iucD* se asociaron con el virotipo C (**TABLA 48**).

4.5.8.2. Virotipos y BLEE

El 26% de las cepas O25b:H4-ST131 fueron productoras de BLEE (**TABLA 49**). Especialmente, esto se observó en las cepas del virotipo A, donde el 76% (26 de 34) de las cepas fueron productoras de CTX-M-15. Además, desde que apareció por primera vez este virotipo en el año 2006 hasta el 2009, casi la totalidad (20 de 21) de sus cepas fueron productoras de CTX-M-15. No obstante, en los 2 últimos años menos del 50% de las cepas del virotipo A fueron productoras de BLEE (únicamente 6 CTX-M-15 de 13). Sin embargo,

en esos años otros virotipos emergieron (E y F), en los cuales la mayoría de sus cepas eran productoras de CTX-M-15. En contraste, entre las cepas del virotipo C, solo 1 cepa de las 47 fue productora de CTX-M-14; y en el virotipo D, de las 51 cepas únicamente 2 cepas fueron productoras de CTX-M-9 y 1 de SHV-12.

4.5.8.3. Virotipos, alelos *fimH* y subclones H22, H30, H30-Rx y H41

Hemos determinado la secuencia nucleotídica *fimH_{TR}* en las 157 cepas del grupo clonal ST131 e identificamos 11 alelos *fimH*: *fimH22* y 6 derivados mutacionales de este alelo (*fimH161*, *fimH298*, *fimH322*, *fimH326*, *fimH332*, *fimH379*), *fimH30* y un derivado mutacional suyo (*fimH328*), *fimH27* y *fimH41*. Cinco de los alelos fueron nuevos ya que es la primera vez que se describen (*fimH322*, *fimH326*, *fimH328*, *fimH332*, *fimH379*) (**TABLA 50**).

En la **FIGURA 41** se representan los árboles filogenéticos basados en las secuencias nucleotídicas y las aminoacídicas correspondientes a los 11 alelos *fimH* de las cepas ST131. A su vez, en la **TABLA 53** figuran los cambios de nucleótidos y aminoácidos.

La mayoría de las cepas O25b:H4-ST131 pertenecieron al subclón H30 (64%) o al subclón H22 (30%). En contraste las 7 cepas O16:H5-ST131 pertenecieron al subclón H41.

El 100% de las cepas O25b:H4-ST131 de los virotipos A, B, C, E y F pertenecieron al subclón H30 o a un derivado mutacional del mismo (H328) (**TABLA 50**).

El 100% de las cepas del virotipo D pertenecieron al subclón H22 o a derivados mutacionales del suclón H22 (H161, H298, H322, H326, H332 y H379) (**TABLA 50**).

Como se observa en la **TABLA 51**, en los primeros años del estudio las cepas del alelo *fimH22* eran las más prevalentes entre las cepas del grupo clonal ST131, pero desde que emergieron en el 2001, las cepas del alelo *fimH30* se fueron incrementando continuamente hasta que en el último año (2011) 20 cepas fueron de este alelo frente a únicamente 1 *fimH22*. Y lo que es más destacable, de las 20 cepas H30 aisladas en el 2011, 15 eran del subclón H30-Rx.

El subclón H22 se identificó por primera vez en el año 1993 coincidiendo con la detección de la primera cepa ST131. Además, 7 de las 8 cepas aisladas entre los años 1993 y 1999 pertenecieron al subclón H22 y la octava a un derivado mutacional de este subclón (H326) (**TABLA 51**).

Por su parte el subclón H30 fue detectado por primera vez en el año 2001 y el H30-Rx se identificó por primera vez en el año 2006. En los 3 últimos años del estudio (2009 a 2011) el subclón H30-Rx fue el más prevalente: 32 cepas H30-Rx *versus* 18 cepas H30 no-Rx *versus* 17 cepas H22 y *versus* 6 cepas H41 (**TABLA 51**).

Es importante destacar que el 100% de las cepas de los virotipos A, E y F pertenecieron al subclón H30-Rx, mientras que la mayoría de las cepas de los virotipos B y C pertenecieron al subclón H30 no-Rx (**TABLA 51**).

En la **TABLA 52** se puede ver que las cepas del subclón H22 presentaron una media de genes de virulencia más elevada (10) que las cepas de los subclones H30-Rx (7,5), H30 no-Rx (6,6) y H41 (6,3). También es destacable que el 100% de las cepas H30-Rx y el 91% de las cepas H22 se pudieron clasificar como ExPEC frente a tan solo el 69% de las H30 no-Rx y el 57% de las H41.

Otro aspecto que también merece destacar es que 11 genes de virulencia (*papEF*, *papGIII*, *cdtB4*, *iroN*, *kpsMII-K5*, *neuC-K1*, *cvaC*, *iss*, *traT*, *ibeA* y *tsh*) fueron significativamente más prevalentes entre las cepas del subclón H22 que entre las del subclón H30. Entre las cepas con el alelo *fimH30*, 5 genes de virulencia (*papGII*, *afa* FM955459, *sat*, *iucD* y *kpsMII-K2*) fueron significativamente más prevalentes. Además, al comparar los genes de virulencia de las cepas del subclón H30-Rx con las H30 no-Rx, observamos que los genes *papEF*, *papGII*, *afa* FM955459, *cnf1*, *hlyA* y *kpsMII-K2* tenían una prevalencia significativamente mayor entre las cepas H30-Rx y los genes *kpsMII-K5* y *traT* entre las cepas H30 no-Rx (**TABLA 52**).

4.5.8.4. Tipado molecular por PFGE

En la **FIGURA 3 suplementaria**, incluida únicamente en la versión electrónica, se muestra el dendrograma obtenido tras realizar el análisis de los perfiles de macrorrestricción obtenidos

con la enzima *XbaI* de las 157 cepas ST131 bacteriémicas que presentaron una similitud del 59,8%. Las cepas se distribuyeron en 9 *clusters* específicos de virotipos con unas identidades del 66,9% (incluye 5 cepas del virotipo D1/ total 8 cepas), 70,6% (5 cepas del virotipo D5/ total 6 cepas), 77,1% (18 cepas del virotipo D2/ total 20 cepas), 80,7% (40 cepas de virotipo C/ total 46 cepas), 83,3% (34 cepas de virotipo A/ total 34 cepas), 75,7% (8 del virotipo D3/ total 9 cepas), 84,5% (5 cepas del virotipo D4/ total 5 cepas), 93,3% (6 cepas del virotipo F/ total 6 cepas) y 72,0% (7 cepas del serotipo O16:H5/ total 7 cepas).

Es interesante destacar que las 34 cepas O25b:H4-ST131 del virotipo A pertenecieron al subclón H30-Rx y que todas quedaron incluidas dentro de un único *cluster* formado exclusivamente por las cepas del virotipo A. Las 34 cepas fueron resistentes a ácido nalidixico y ciprofloxacina, y 26 resultaron ser CTX-M-15 (**FIGURA 42**).

En la **FIGURA 43**, se observa el dendrograma de los perfiles de PFGE de las 47 cepas O25b:H4-ST131 del virotipo C, que mostraron una similitud del 59,2%. La mayoría de las cepas fueron resistentes a ácido nalidixico y ciprofloxacina, pero únicamente una resultó ser productora de CTX-M-14.

Los perfiles de PFGE de las 51 cepas O25b:H4-ST131 del virotipo D mostraron una similitud del 57,8%. Las cepas de este virotipo generaron 5 *clusters* asociados con los subvirotipos D1, D2, D3, D4 y D5 con unas identidades del 71,0%, 77,1%, 77,0%, 84,5% y 70,6%, respectivamente (**FIGURA 44**).

4.5.9. Cepas de *E. coli* bacteriémicas productoras de BLEE

A lo largo de los 23 años de estudio, se identificaron 96 cepas (3%) productoras de BLEE. La primera cepa productora de BLEE emergió en el año 2001 y pertenecía al filoserotipo O2:H5-B2. Durante los primeros 17 años (1989-2005), 8 cepas (0,5%) fueron productoras de CTX-M, de las cuales 4 cepas fueron productoras de CTX-M14, 2 cepas de CTX-M-32, 1 cepa de CTX-M-9 y 1 cepa de CTX-M-1. Todas ellas pertenecían a diferentes serotipos (**TABLA 54**). Durante los últimos 6 años la prevalencia de cepas BLEE aumentó al 6%, emergiendo las cepas O25b:H4-ST131 productoras de CTX-M-15. En el último año del estudio (2011) un total de 26 cepas (8%) fueron productoras de BLEE y 12 de ellas fueron O25b:H4-ST131 (11

CTX-M-15 y 1 SHV-12). Las cepas productoras de CTX-M-14 también aumentaron a partir del año 2006, incrementándose 10 veces su prevalencia pasando de un 0,2% en el período 1989-2005 a un 2,0% en el 2006-2011. Las cepas CTX-M-14 pertenecieron a diferentes serotipos y grupos filogenéticos. No obstante, en los años 2010 y 2011 se repiten los serotipos O7:H4 y O9:H4.

De las 96 cepas bacteriémicas productoras de BLEE, 40 cepas fueron productoras de CTX-M-15, de las cuales 35 cepas (88%) fueron del grupo filogenético B2 y del grupo clonal ST131. Treinta y seis cepas fueron productoras de CTX-M-14. De estas cepas, 10 fueron del grupo filogenético A, otras 10 del B1, 5 del B2 y 11 del D. Únicamente 2 cepas productoras de CTX-M-14 pertenecieron al grupo clonal ST131 (**TABLA 55**).

En este estudio, las cepas productoras de BLEE se repartieron en 21 serogrupos (O1, O2, O7, O8, O9, O11, O15, O16, O20, O23, O25, O54, O68, O77, O91, O101, O102, O105, O130, O144 y O153) y 47 serotipos O:H diferentes, y a distintos grupos filogenéticos (**TABLA 56**). Sin embargo, 39 cepas fueron O25b:H4-ST131: 35 CTX-M-15, 2 CTX-M-9, 1 CTX-M-14 y 1 SHV-12.

Entre las 40 cepas productoras de CTX-M-15, 8 genes de virulencia estaban presentes al menos en el 50% de las cepas (*fimH*, *afa/draBC*, *afa* FM955459, *sat*, *iucD*, *kpsMII-K2*, *malX* y *usp*). En contraste, en las cepas productoras de CTX-M-14 únicamente 3 genes de virulencia (*fimH*, *iucD* y *traT*) presentaron una prevalencia $\geq 50\%$. Al analizar las diferencias significativas entre las cepas productoras de CTX-M-15 y las productoras de CTX-M-14, 6 genes fueron asociados de manera significativa con las cepas productoras de CTX-M-15 (*afa* FM955459, *sat*, *iucD*, *kpsMII-K2*, *malX* y *usp*). Con las cepas productoras de CTX-M-14, 4 fueron los genes *fimA*_{VM78}, *iroN*, *cvaC* e *ibeA* asociados con ellas. Por otra parte, de las 40 cepas productoras de CTX-M-15, 38 cepas (95%) cumplieron el criterio de cepas ExPEC y el 38% de las cepas presentaron 8 o más genes de virulencia. Por su parte, en las cepas productoras de CTX-M-14, solo 16 cepas (44%) de las 36 cumplieron el criterio de cepas ExPEC y únicamente el 14% de las cepas presentaron 8 o más genes de virulencia (**TABLA 57**).

De las 40 cepas bacteriémicas BLEE del grupo clonal ST131, 35 fueron productoras de CTX-M-15, por lo que, lógicamente, los 6 genes de virulencia asociados con las cepas productoras de CTX-M-15 también estuvieron asociados con este grupo clonal (**TABLA 58**).

4.5.10. Resistencias de cepas del grupo clonal ST131

Entre las cepas O25b:H4-ST131 productoras de BLEE el 90% (35/39 cepas) fueron *fimH30* y resistentes a la ciprofloxacina. Únicamente 3 cepas fueron *fimH22* y productoras de BLEE (**TABLA 59**). No obstante, la mayoría de las cepas O25b:H4-ST131 no fueron productoras de BLEE (111 de 150 cepas, 74%), de las cuales 57 cepas (51%) eran resistentes a la ciprofloxacina y presentaban el alelo *fimH30*. Entre las cepas O25b:H4-ST131 no BLEE también predominaban las que tenían el alelo *fimH22* pero únicamente 2 de las 42 cepas del subclón H22 resultaron ser resistentes a la ciprofloxacina.

En los 23 años del estudio (1989-2011), 97 cepas (3%) O25b:H4-ST131 fueron resistentes a la ciprofloxacina, de las cuales el 95% (92/97) presentaban el alelo *fimH30* y por lo tanto pertenecían al subclón H30. La primera cepa de este tipo se aisló en el HULA en el año 2004 (**TABLA 60**). Entre las 1.477 cepas bacteriémicas aisladas entre los años 1989 y 2004, únicamente 1 (0,1%) perteneció al subclón H30 y era resistente a la ciprofloxacina, frente a 96 (5%) de las 1.783 aisladas entre los años 2005 y 2011, aumentando su prevalencia 50 veces entre ambos períodos y 70 veces del año 2004 (0,1%) al 2011 (7%).

Un total de 36 cepas (1%) O25b:H4-ST131 fueron resistentes a la ciprofloxacina y productoras de BLEE. Las 2 primeras cepas de este tipo se aislaron en el HULA en el año 2006 y el número de estas cepas aumentó desde el 1% (2/190) en el 2006 al 4% (12/313) en el 2011. Treinta y cinco cepas fueron productoras de CTX-M-15 y 1 de SHV-12 (**TABLA 60**).

De las 157 cepas ST131, el 61% (96/157) eran del alelo *fimH30*, mientras que el 47% (45/96) de las cepas *fimH30* pertenecían al subclón H30-Rx. En los últimos 5 años del estudio se observó un incremento sustancial del porcentaje de las cepas del alelo *fimH30*, desde el 0,2% (1989-2004) al 5% (2005-2011), diferencia significativa ($P < 0,001$). Lo más destacable de este resultado es que el incremento sustancial fue debido al aumento significativo del subclón H30-Rx. Además, el 78% (35/45) de las cepas de este subclón fueron resistentes a la

ciprofloxacina y productoras de CTX-M-15 (**TABLA 60**). Las primeras cepas del subclón H30-Rx se aislaron en el HULA en el año 2006 y el número de estas cepas aumentó desde 1% (2/190) en el 2006 al 5% (15/313) en el 2011 (**TABLAS 60 y 61**).

En la **TABLA 62** podemos ver que las cepas del grupo clonal ST131 que poseen más resistencias fueron las O25b:H4 de los virotipos A, B, C, E, F y NT, destacando el alto porcentaje (79%) de cepas multirresistentes entre las cepas O25b:H4 del virotipo A. Entre las 150 cepas del grupo clonal O25b:H4-ST131, el 65% fueron resistentes a la ciprofloxacina, el 43% al trimetoprim/sulfametoxazol, el 37% a los aminoglucósidos y el 29% fueron multirresistentes a 3 o más familias de antibióticos. El 100% de las cepas de los virotipo A, B, E y F fueron resistentes a la ciprofloxacina, en el virotipo C fue el 91% y solo el 8% de las cepas del virotipo D fueron resistentes a este antimicrobiano. En contraste, el nivel de resistencias observado entre las cepas ST131 del serotipo O16:H5 resultó ser mucho menor, aunque destaca la resistencia a los aminoglucósidos (43%).

4.5.11. Resistencias en cepas de diferentes períodos, grupos filogenéticos y serogrupos.

Al comparar los datos de resistencia a antibióticos de las 213 cepas aisladas en los primeros 5 años (1989-1993) y de las 614 cepas aisladas en los últimos 2 años (2010 y 2011), observamos un aumento muy significativo de resistencias. De las 614 cepas (2010-2011), 189 (31%) fueron resistentes a la ciprofloxacina, 208 (34%) al trimetoprim/sulfametoxazol, 106 (17%) a los aminoglucósidos, 83 (14%) a la amoxicilina/ácido clavulánico y 52 (8%) a las cefalosporinas de espectro extendido. De estas últimas, 41 cepas fueron productoras de BLEE. Además, 101 (16%) de las 614 cepas aisladas en los años 2010 y 2011 fueron multirresistentes a 3 o más familias de antibióticos y otras 81 (13%) cepas a 2 familias de antibióticos. En contraste, de las 213 cepas históricas (1989-1993) ninguna resultó ser multirresistente a 3 o más familias de antibióticos y únicamente el 1% resistentes a la ciprofloxacina y el 0,5% a los aminoglucósidos y a las cefalosporinas de espectro extendido (**TABLA 63**).

Por último hemos analizado las resistencias de las 614 cepas bacteriémicas aisladas durante los 2 últimos años del estudio (2010 y 2011) (**TABLA 64**), observando que las cepas del grupo filogenético A fueron las que presentaron el mayor nivel de resistencias. Así, de las

156 cepas del grupo filogenético A, 86 (55%) fueron resistentes a la ciprofloxacina, 84 (54%) al trimetoprim/sulfametoxazol, 52 (33%) a los aminoglucósidos y 46 (29%) a la amoxicilina/ácido clavulánico. También es significativo que el 38% de cepas del grupo filogenético A fuesen multirresistentes a 3 o más familias de antibióticos frente a únicamente el 15%, 10% y 6% de las cepas de los grupos filogenéticos D, B1 y B2, respectivamente.

En la **TABLA 65** vemos que las cepas de los serogrupos O8, O9, O101 y ONT del grupo filogenético A presentan un nivel muy elevado de multirresistencias a 3 o más familias de antimicrobianos. Las cepas de los serogrupos O8, O9 y ONT también fueron frecuentes entre las del grupo filogenético B1 (**TABLA 66**), pero el porcentaje de cepas multirresistentes a 3 o más familias de antimicrobianos fue menor que el encontrado entre las cepas del grupo filogenético A. Dentro del grupo filogenético B2 las multirresistencias a 3 o más familias de antibióticos se detectan casi exclusivamente entre las cepas O25b:H4 del grupo clonal ST131 (**TABLA 67**). Por último, las cepas multirresistentes del grupo filogenético D pertenecieron a los serogrupos O1 y O153 y a los grupos clonales O15-ST393 y GCA-ST69 (**TABLA 68**).



TABLA 29. Distribución de las 3.260 cepas de *E. coli* bacteriémicas aisladas durante 23 años (1989-2011) de acuerdo al grupo filogenético.

Año	N° de cepas	Grupo filogenético (%)			
		A	B1	B2	D
1989	24	8 (33)	1 (4)	12 (50)	3 (13)
1990	7	2 (29)	0	3 (43)	2 (29)
1991	39	11 (28)	3 (8)	16 (41)	9 (23)
1992	57	14 (25)	7 (12)	24 (42)	12 (21)
1993	86	23 (27)	10 (12)	33 (38)	20 (23)
1994	67	19 (28)	5 (8)	27 (40)	16 (24)
1995	60	14 (23)	3 (5)	29 (48)	14 (23)
1996	83	23 (28)	4 (5)	44 (53)	12 (14)
1997	113	37 (33)	12 (11)	41 (36)	23 (20)
1998	145	47 (32)	9 (6)	56 (39)	33 (23)
1999	152	35 (23)	22 (15)	58 (38)	37 (24)
1989-1999	833	233 (28)	76 (9)	343 (41)	181(22)
2000	142	40 (28)	17 (12)	42 (30)	43 (30)
2001	120	22 (18)	11 (9)	57 (48)	30 (25)
2002	93	18 (19)	12 (13)	41 (44)	22 (24)
2003	90	17 (19)	14 (16)	31 (34)	28 (31)
2004	199	54 (27)	24 (12)	76 (38)	45 (23)
2005	183	41 (22)	28 (15)	72 (39)	42 (23)
2006	190	30 (16)	29 (15)	82 (43)	49 (26)
2007	231	65 (28)	42 (18)	77 (33)	47 (20)
2008	276	54 (20)	43 (16)	104 (38)	75 (27)
2009	289	69 (24)	30 (10)	126 (44)	64 (22)
2010	301	70 (23)	43 (14)	129 (43)	59 (20)
2011	313	86 (28)	39 (13)	123 (39)	65 (21)
2000-2011	2.427	566 (23)	332 (14)	960 (40)	569 (23)
Total	3.260	799 (25)	408 (13)	1.303 (40)	750 (23)

El valor de P fue obtenido mediante la prueba de Chi-cuadrado.

P = 0,008 (1989-1999 *versus* 2000-2011, grupo filogenético A).

P = <0,001 (1989-1999 *versus* 2000-2011, grupo filogenético B1).

TABLA 30. Serogrupos O más frecuentes entre cepas de *E. coli* bacteriémicas.

Grupo Filogenético	Cepas 1989-2011 (resultados obtenidos por PCR)					
	n=3.260 (%)					
	Nº de cepas	GC O15	GCA	O25b	O25a	CTX-M
A	799 (25)	0	1 (0,03)	0	6 (0,2)	13 (0,4)
B1	408 (13)	0	0	1 (0,03)	2 (0,1)	18 (0,6)
B2	1.303 (40)	0	0	147 (5)	35 (1)	43 (1)
D	750 (23)	92 (3)	157 (5)	4 (0,1)	12 (0,4)	18 (0,6)
Serogrupo						
Más frecuentes (n = 18)	2.147 (66)	92 (3)	102 (3)	152 (5)	53 (2)	68 (2)
O1	214 (7)	0	1 (0,03)	0	0	1 (0,03)
O2	270 (8)	0	0	0	0	3 (0,1)
O4	117 (4)	0	0	0	1 (0,03)	0
O6	278 (9)	0	0	0	0	0
O7	37 (1)	0	0	0	0	2 (0,1)
O8	243 (7)	0	0	0	0	6 (0,2)
O9	120 (4)	0	0	0	0	3 (0,1)
O11	47 (1)	0	11 (0,3)	0	0	1 (0,03)
O15	137 (4)	91 (3)	8 (0,2)	0	0	5 (0,2)
O17 *	44 (1)	0	40 (1)	0	0	0
O18	129 (4)	0	0	0	0	0
O22	38 (1)	0	0	0	0	0
O25	220 (7)	0	1 (0,03)	152 (5)	52 (2)	40 (1)
O75	58 (2)	0	0	0	0	0
O77	51 (2)	0	41 (1)	0	0	1 (0,03)
O83	37 (1)	0	0	0	0	0
O101	70 (2)	0	0	0	0	2 (0,1)
O153	37 (1)	1 (0,03)	0	0	0	4 (0,1)
Menos Frecuentes (n = 120)	612 (19)	0	25 (1)	0	1 (0,03)	11 (0,3)
O3, O5, O10, O12, O14, O16, O19, O20, O21, O23, O24, O26, O27, O29, O32, O33, O34, O35, O36, O38, O39, O41, O44, O45, O46, O48, O49, O50, O51, O52, O53, O54, O55, O57, O58, O59, O60, O61, O63, O64, O66, O68, O69, O71, O73, O76, O78, O79, O80, O81, O82, O84, O85, O86, O87, O88, O90, O91, O92, O100, O102, O103, O104, O105, O106, O108, O109, O110, O111, O112, O113, O115, O117, O118, O119, O120, O123, O124, O125, O126, O128, O130, O131, O132, O133, O134, O135, O136, O137, O138, O139, O140, O141, O142, O143, O144, O145, O146, O147, O148, O149, O154, O156, O157, O158, O159, O160, O162, O163, O166, O168, O169, O171, O172, O173, O174, O175, O176, O177, O178						
No tipables	501 (15)	0	31 (1)	0	1 (0,03)	13 (0,4)

* Entre las 44 cepas del serogrupo O17 fueron incluidas 5 cepas del serogrupo O17,77; de las cuales 3 corresponden al grupo clonal A.

TABLA 31. Prevalencia de los 9 serogrupos más prevalentes de las cepas de *E. coli* bacteriémicas en cada año y en los períodos 1989-1999 y 2000-2011.

Año	Nº de cepa	Serogrupos (%)								
		O1	O2	O4	O6	O8	O9	O15	O18	O25
1989	24	0	4 (17)	1 (4)	2 (8)	2 (8)	2 (8)	1 (4)	0	3 (13)
1990	7	1 (14)	0	0	0	0	0	0	1 (14)	0
1991	39	7 (18)	2 (5)	3 (8)	5 (13)	3 (8)	1 (3)	1 (3)	0	1 (3)
1992	57	6 (11)	4 (7)	3 (5)	5 (9)	5 (9)	2 (4)	1 (2)	6 (11)	1 (2)
1993	86	4 (5)	11 (13)	3 (3)	5 (6)	7 (8)	4 (5)	8 (9)	8 (9)	2 (2)
1994	67	3 (4)	3 (4)	7 (10)	9 (13)	5 (7)	2 (3)	4 (6)	2 (3)	0
1995	60	6 (10)	2 (3)	4 (7)	5 (8)	3 (5)	2 (3)	4 (7)	4 (7)	2 (3)
1996	83	6 (7)	10 (12)	3 (4)	16 (19)	5 (6)	3 (4)	2 (2)	3 (4)	2 (2)
1997	113	8 (7)	16 (14)	4 (4)	4 (4)	8 (7)	4 (4)	8 (7)	6 (5)	5 (4)
1998	145	9 (6)	18 (12)	5 (3)	9 (6)	10 (7)	4 (3)	6 (4)	7 (5)	5 (3)
1999	152	10 (7)	14 (9)	4 (3)	9 (6)	15 (10)	4 (3)	3 (2)	10 (7)	5 (3)
1989-1999	833	60 (7)	84 (10)	37 (4)	69 (8)	63 (8)	28 (3)	38 (5)	47 (6)	26 (3)
2000	142	11 (8)	19 (13)	2 (1)	11 (8)	6 (4)	3 (2)	4 (3)	2 (1)	2 (1)
2001	120	5 (4)	17 (14)	3 (3)	13 (11)	4 (3)	5 (4)	7 (6)	9 (8)	3 (3)
2002	93	9 (10)	7 (8)	4 (4)	17 (18)	2 (2)	4 (4)	6 (6)	5 (5)	1 (1)
2003	90	8 (9)	9 (10)	2 (2)	7 (8)	9 (10)	2 (2)	6 (7)	1 (1)	4 (4)
2004	199	12 (6)	21 (11)	6 (3)	21 (11)	22 (11)	2 (1)	10 (5)	7 (4)	12 (6)
2005	183	15 (8)	8 (4)	7 (4)	13 (7)	15 (8)	6 (3)	7 (4)	2 (1)	20 (11)
2006	190	12 (6)	20 (11)	9 (5)	15 (8)	14 (7)	7 (4)	6 (3)	6 (3)	12 (6)
2007	231	6 (3)	7 (3)	7 (3)	16 (7)	18 (8)	10 (4)	7 (3)	8 (3)	24 (10)
2008	276	27 (10)	15 (5)	11 (4)	20 (7)	12 (4)	7 (3)	9 (3)	13 (5)	27 (10)
2009	289	18 (6)	20 (7)	10 (3)	23 (8)	18 (6)	11 (4)	13 (4)	13 (4)	28 (10)
2010	301	21 (7)	21 (7)	9 (3)	27 (7)	23 (8)	15 (5)	15 (5)	3 (1)	28 (9)
2011	313	10 (3)	22 (7)	10 (3)	26 (8)	37 (12)	20 (6)	9 (3)	13 (4)	33 (11)
2000-2011	2.427	154 (6)	186 (8)	80 (3)	209 (9)	180 (7)	92 (4)	99 (4)	83 (3)	194 (8)
Total	3.260	214 (7)	270 (8)	117 (4)	278 (9)	243 (7)	120 (4)	137 (4)	129 (4)	220 (7)

El valor de P fue obtenido mediante la prueba de Chi-cuadrado. Únicamente se muestran si son estadísticamente significativos ($P < 0,05$).

$P = 0,034$ (1989-1999 *versus* 2000-2011, cepas del serogrupo O2).

$P = 0,006$ (1989-1999 *versus* 2000-2011, cepas del serogrupo O18).

$P = < 0,001$ (1989-1999 *versus* 2000-2011, cepas del serogrupo O25).

Resultados

TABLA 32. Distribución de los 24 filoserogrupos más prevalentes entre cepas de *E. coli* bacteriémicas en 2 períodos.

Serogrupo	Grupo filogenético	Nº Total de cepas n=3.260 (%)	1989-1999 n=833 (%)	2000-2011 n=2.427 (%)	Valor de P 1989-1999 vs 2000-2011
O1	B2	74 (2,3)	22 (2,6)	52 (2,1)	
	D	133 (4,1)	36 (4,3)	97 (4,0)	
O2	B2	227 (7,0)	67 (8,0)	160 (6,6)	
	D	31 (1,0)	10 (1,2)	21 (0,9)	
O4	B2	114 (3,5)	36 (4,3)	78 (3,2)	
O6	B2	263 (8,1)	67 (8,0)	196 (8,1)	
O7	A	17 (0,5)	3 (0,4)	14 (0,6)	
	D	18 (0,6)	4 (0,5)	14 (0,6)	
O8	A	147 (4,5)	46 (5,5)	101 (4,2)	
	B1	87 (2,7)	16 (1,9)	71 (2,9)	
O9	A	93 (2,9)	27 (3,2)	66 (2,7)	
	B1	21 (0,6)	0	21 (0,9)	0,014
O11	A	17 (0,5)	4 (0,5)	13 (0,5)	
	D	28 (0,9)	7 (0,8)	21 (0,9)	
O15	D	117 (3,6)	31 (3,7)	86 (3,5)	
O17 *	D	42 (1,3)	9 (1,1)	33 (1,4)	
O18	B2	111 (3,4)	41 (4,9)	70 (2,9)	0,007
O22	B2	28 (0,9)	3 (0,4)	25 (1,0)	
O25	B2	182 (5,6)	20 (2,4)	162 (6,7)	<0,001
O75	B2	51 (1,6)	16 (1,9)	35 (1,4)	
O77	D	49 (1,5)	16 (1,9)	33 (1,4)	
O83	B2	31 (1,0)	17 (2,0)	14 (0,6)	<0,001
O101	A	69 (2,1)	14 (1,7)	55 (2,3)	
O153	D	28 (0,9)	5 (0,6)	23 (0,9)	
Total		1.978 (60,7)	517 (62,1)	1.461 (60,2)	

* Entre las 42 cepas del serogrupo O17 fueron incluídas 4 cepas del serogrupo O17,77.

El valor de P fue obtenido mediante la prueba de Chi-cuadrado. Únicamente se muestran si son estadísticamente significativos ($P < 0,05$).

TABLA 33. Distribución de los 24 filoserogrupos más frecuentes entre cepas de *E. coli* bacteriémicas en 3 períodos.

Serogrupo	Grupo filogenético	Nº Total de cepas n=3.260 (%)	1989-1998 n=681 (%)	1999-2008 n=1.676 (%)	2009-2011 n=903 (%)	Valor de P
O1	B2	74 (2,3)	20 (2,9)	36 (2,1)	18 (2,0)	
	D	133 (4,1)	30 (4,4)	75 (4,5)	28 (3,1)	
O2	B2	227 (7,0)	53 (7,8)	121 (7,2)	53 (5,9)	
	D	31 (1,0)	10 (0,1)	14 (0,8)	7 (0,8)	
O4	B2	114 (3,5)	32 (4,7)	54 (3,2)	28 (3,1)	
O6	B2	263 (8,1)	58 (8,5)	130 (7,8)	75 (8,3)	
O7	A	17 (0,5)	3 (0,4)	8 (0,5)	6 (0,7)	
	D	18 (0,6)	4 (0,6)	7 (0,4)	7 (0,8)	
O8	A	147 (4,5)	35 (5,1)	61 (3,6)	51 (5,6)	0,022
	B1	87 (2,7)	12 (1,8)	51 (3,0)	24 (2,6)	
O9	A	93 (2,9)	23 (3,4)	39 (2,3)	31 (3,4)	
	B1	21 (0,6)	0	9 (0,5)	12 (1,3)	0,006
O11	A	17 (0,5)	2 (0,3)	10 (0,6)	5 (0,6)	
	D	28 (0,9)	7 (1,0)	15 (0,9)	6 (0,7)	
O15	D	117 (3,6)	29 (4,2)	54 (3,2)	34 (3,8)	
O17	D	42 (1,3)	4 (0,6)	30 (1,8)	8 (0,9)	0,042
O18	B2	111 (3,4)	34 (5,0)	49 (2,9)	28 (3,1)	
O22	B2	28 (0,9)	2 (0,3)	20 (1,2)	6 (0,7)	
O25	B2	182 (5,6)	15 (2,2)	88 (5,2)	79 (8,7)	<0,001
O75	B2	51 (1,6)	13 (1,9)	19 (1,1)	19 (2,1)	
O77	D	49 (1,5)	12 (1,8)	26 (1,6)	11 (1,2)	
O83	B2	31 (1,0)	13 (1,9)	12 (0,7)	6 (0,7)	0,043
O101	A	69 (2,1)	13 (1,9)	35 (2,1)	21 (2,3)	
O153	D	28 (0,9)	2 (0,3)	13 (0,8)	13 (1,4)	0,038
Total		1.978 (60,7)	426 (62,5)	976 (58,2)	576 (63,8)	0,007

El valor de P fue obtenido mediante la prueba de Chi-cuadrado. Únicamente se muestran si son estadísticamente significativos ($P < 0,05$).

TABLA 34. Serogrupos O y estatus ExPEC en cepas de *E. coli* bacteriémicas.

Serogrupos	Nº Total de cepas n=3.260	Cepas Analizadas n=1.810 (%)	
		Nº de cepas	Estatus ExPEC
Más frecuentes	2.147	1.374	1.009 (73)
O1	214	213	186 (87)
O2	270	211	197 (93)
O4	117	38	36 (95)
O6	278	92	87 (95)
O7	37	19	14 (74)
O8	243	110	35 (32)
O9	120	62	24 (39)
O11	47	26	16 (62)
O15	137	123	103 (84)
O17*	44	40	22 (55)
O18	129	45	35 (78)
O22	38	12	6 (50)
O25	220	219	185 (85)
O75	58	17	16 (94)
O77	51	47	14 (30)
O83	37	14	11 (79)
O101	70	69	13 (19)
O153	37	17	9 (53)
Menos frecuentes	612	236	92 (39)
O5, O12, O14, O16, O19, O20, O21, O23, O26, O33, O38, O39, O44, O45, O46, O48, O49, O50, O51, O54, O55, O57, O60, O61, O64, O68, O71, O73, O76, O78, O80, O81, O82, O84, O85, O86, O88, O91, O92, O100, O102, O103, O105, O108, O109, O111, O113, O117, O119, O120, O123, O128, O130, O132, O134, O138, O139, O141, O144, O147, O149, O154, O156, O159, O166, O169, O172, O173.			
No tipables (ONT)	501	200	65 (33)
Total	3.260	1.810	1.166 (64)

* Entre las 44 cepas del serogrupo O17 fueron incluidas 5 cepas del serogrupo O17, 77.

El valor de P fue obtenido mediante la prueba de Chi-cuadrado.

P = <0,001 (estatus ExPEC cepas frecuentes *versus* menos frecuentes).

P = <0,001 (estatus ExPEC cepas frecuentes *versus* no tipables).

TABLA 35. Filoserogrupos y estatus ExPEC de cepas de *E. coli* bacteriémicas.

Serogrupo	Grupo filogenético	Nº Total de cepas n=3.260 (%)	Cepas Analizadas n=1.810 (%)	
			Nº de cepas	Estatus ExPEC
O1	B2	74 (2,3)	74	66 (89)
	D	133 (4,1)	132	118 (89)
O2	B2	227 (7,0)	170	162 (95)
	D	31 (1,0)	29	28 (97)
O4	B2	114 (3,5)	38	36 (95)
O6	B2	263 (8,1)	87	84 (97)
O7	A	17 (0,5)	9	8 (89)
	D	18 (0,6)	9	6 (67)
O8	A	147 (4,5)	69	30 (44)
	B1	87 (2,7)	38	3 (8)
O9	A	93 (2,9)	50	21 (42)
	B1	21 (0,6)	11	3 (27)
O11	A	17 (0,5)	5	1 (20)
	D	28 (0,9)	19	14 (74)
O15	D	117 (3,6)	114	98 (86)
O17*	D	42 (1,3)	39	21 (54)
O18	B2	111 (3,4)	37	30 (81)
O22	B2	28 (0,9)	10	6 (60)
O25	B2	182 (5,6)	182	163 (90)
O75	B2	51 (1,6)	16	16 (100)
O77	D	49 (1,5)	45	13 (29)
O83	B2	31 (1,0)	14	11 (79)
O101	A	69 (2,1)	69	13 (19)
O153	D	28 (0,9)	14	8 (57)

* Entre las 42 cepas del serogrupo O17 fueron incluidas 4 cepas del serogrupo O17,77.

TABLA 36. Comparación de las cepas de *E. coli* bacteriémicas de los diferentes grupos filogenéticos en función al estatus ExPEC y grupos clonales. Comparación de las cepas aisladas durante los primeros 5 años (1989-1993) y los 2 últimos años (2010-2011).

Grupo Filogenético	Cepas 1989-1993 n=213 (%)						Cepas 2010-2011 n=614 (%)					
	Nº de cepas	Estatus ExPEC	GC O15	GCA	ST131	Nº de cepas	Estatus ExPEC	GC O15	GCA	ST131		
A	58 (27)	18 (8)	0	0	0	156 (25)	56 (9)	0	0	0		
B1	21 (10)	0	0	0	0	82 (13)	12 (2)	0	0	0		
B2	88 (41)	78 (37)	0	0	1 (0,5)	252 (41)	233 (38)	0	0	52 (8)		
D	46 (22)	27 (13)	8 (4)	4 (2)	0	124 (20)	85 (14)	16 (3)	24 (4)	0		
TOTAL	213	123 (58)	8 (4)	4 (2)	1 (0,5)	614	386 (63)	16 (3)	24 (4)	52 (8)		

El valor de P fue obtenido mediante la prueba de Chi-cuadrado.
P = <0,001 (1989-1993 versus 2010-2011, cepas O25-ST131).



TABLA 37. Distribución de los 24 filoserogrupos más frecuentes entre cepas de *E. coli* bacteriémicas aisladas en los primeros y últimos años y la relación con el estatus ExPEC.

Serogrupos	Grupo Filogenético	1989-1993 n=213 (%)		2010-2011 n=614 (%)		Valor de P
		Nº de cepas	Estatus ExPEC	Nº de cepas	Estatus ExPEC	
O1	B2	7 (3)	6 (86)	11 (2)	11 (100)	
	D	11 (5)	8 (73)	19 (3)	19 (100)	
O2	B2	14 (7)	14 (100)	34 (6)	34 (100)	
	D	5 (2)	4 (80)	6 (1)	6 (100)	
O4	B2	10 (5)	9 (90)	19 (3)	19 (100)	
O6	B2	16 (8)	16 (100)	52 (9)	51 (98)	
O7	A	1 (1)	1 (100)	6 (1)	6 (100)	
	D	1 (1)	1 (100)	5 (1)	4 (80)	
O8	A	9 (4)	6 (67)	38 (6)	20 (53)	
	B1	8 (4)	0	20 (3)	3 (15)	
O9	A	9 (4)	1 (11)	25 (4)	13 (52)	
	B1	0	0	10 (2)	2 (20)	
O11	A	1 (1)	1 (100)	3 (1)	0	
	D	4 (2)	1 (25)	3 (1)	3 (100)	
O15	D	9 (4)	9 (100)	21 (3)	16 (76)	
O17	D	0	0	5 (1)	3 (60)	
O18	B2	14 (7)	13 (93)	15 (2)	13 (87)	0,007
O22	B2	2 (1)	1 (50)	5 (1)	4 (80)	
O25	B2	5 (2)	5 (100)	55 (9)	52 (94)	<0,001
O75	B2	2 (1)	2 (100)	10 (2)	10 (100)	
O77	D	7 (3)	1 (14)	6 (1)	2 (33)	0,027
O83	B2	5 (2)	2 (40)	6 (1)	6 (100)	
O101	A	1 (1)	0	16 (3)	3 (19)	0,042
O153	D	0	0	11 (2)	8 (73)	0,037

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

TABLA 38. Comparación de los genes de virulencia de las cepas de *E. coli* bacteriémicas aisladas durante los primeros 5 años (1989-1993) y los 2 últimos años (2010-2011) en relación al grupo filogenético.

Genes	Cepas 1989-1993					Cepas 2010-2011				
	Grupo Filogenético (%)					Grupo Filogenético (%)				
	Nº Total de cepas n=213	A n=58	B1 n=21	B2 n=88	D n=46	Nº Total de cepas n=614	A n=156	B1 n=82	B2 n=252	D n=124
Adhesinas										
<i>fimH</i>	205 (96)	53 (91)	21 (100)	86 (98)	45 (98)	592 (96)	141 (90)	79 (96)	252 (100)	120 (97)
<i>fimAV_{MT78}</i>	54 (25)	21 (36)	2 (10)	11 (12)	20 (43)	98 (16)	26 (17)	5 (6)	28 (11)	39 (31)
<i>papEF</i>	89 (42)	11 (19)	0	56 (64)	22 (48)	298 (48)	54 (35)	11 (13)	161 (64)	72 (58)
<i>papGI</i>	6 (3)	1 (2)	0	0	5 (11)	9 (2)	0	0	0	9 (7)
<i>papG II</i>	51 (24)	5 (9)	0	31 (35)	15 (33)	158 (26)	5 (3)	1 (1)	101 (40)	51 (41)
<i>papG III</i>	22 (10)	0	0	22 (25)	0	70 (11)	4 (2)	4 (5)	60 (24)	2 (2)
<i>papG IV</i>	0	0	0	0	0	8 (1)	2 (1)	0	0	6 (5)
<i>papG NT</i>	10 (5)	5 (9)	0	3 (3)	2 (4)	53 (9)	43 (28)	6 (7)	0	4 (3)
<i>sfa/focDE</i>	59 (28)	2 (3)	0	57 (65)	0	137 (22)	0	3 (4)	133 (53)	1 (1)
<i>afa/draBC</i>	3 (1)	1 (2)	0	1 (1)	1 (2)	28 (5)	3 (2)	0	19 (8)	6 (5)
<i>afa FM955459</i>	0	0	0	0	0	14 (2)	0	0	14 (6)	0
Toxinas										
<i>cnf1</i>	33 (16)	0	0	33 (38)	0	130 (21)	1 (1)	1 (1)	127 (50)	1 (1)
<i>cnf2</i>	1 (0,5)	1 (2)	0	0	0	7 (1)	1 (1)	4 (5)	1 (0,4)	1 (1)
<i>cdtB</i>	13 (6)	1 (2)	0	11 (12)	1 (2)	38 (6)	2 (1)	4 (5)	29 (12)	3 (2)
<i>cdtB1</i>	5 (2)	0	0	4 (4)	1 (2)	11 (2)	0	0	10 (4)	1 (1)
<i>cdtB3</i>	1 (0,5)	1 (2)	0	0	0	8 (1)	2 (1)	4 (5)	1 (0,4)	1 (1)
<i>cdtB4</i>	7 (3)	0	0	7 (8)	0	19 (3)	0	0	18 (7)	1 (1)
<i>sat</i>	55 (26)	5 (9)	0	27 (31)	23 (50)	180 (29)	4 (2)	0	112 (44)	64 (52)
<i>hlyA</i>	51 (24)	2 (3)	0	48 (54)	1 (2)	141 (23)	2 (1)	1 (1)	135 (54)	3 (2)
Sideróforos										
<i>iucD</i>	103 (48)	27 (46)	4 (19)	45 (51)	27 (59)	382 (62)	91 (58)	40 (49)	157 (62)	94 (76)
<i>iroN</i>	98 (46)	16 (28)	5 (24)	67 (76)	10 (22)	304 (50)	75 (48)	41 (50)	171 (68)	17 (14)

Continuación de la TABLA 38

Genes	Cepas 1989-1993					Cepas 2010-2011				
	Nº total de cepas	A	B1	B2	D	Nº total de cepas	A	B1	B2	D
Cápsula										
<i>kpsM II</i>	123 (58)	11 (19)	0	79 (90)	33 (72)	337 (55)	18 (12)	3 (4)	231 (92)	85 (68)
<i>kpsM II-K2</i>	12 (6)	2 (3)	0	8 (9)	2 (4)	31 (5)	3 (2)	0	23 (9)	5 (4)
<i>kpsM II-K5</i>	72 (34)	4 (7)	0	46 (52)	22 (48)	215 (35)	14 (9)	3 (4)	143 (57)	55 (44)
<i>neuC-K1</i>	39 (18)	5 (9)	0	25 (28)	9 (20)	91 (15)	1 (1)	0	65 (26)	25 (20)
<i>kpsM III</i>	8 (4)	3 (5)	0	3 (3)	2 (4)	26 (4)	1 (1)	0	12 (5)	13 (10)
Varios										
<i>cvaC</i>	34 (16)	11 (19)	3 (14)	13 (15)	7 (15)	146 (24)	64 (41)	25 (30)	41 (16)	16 (13)
<i>iss</i>	41 (19)	15 (26)	5 (24)	12 (14)	9 (20)	144 (23)	57 (36)	29 (35)	43 (17)	15 (12)
<i>traT</i>	89 (42)	24 (41)	9 (43)	29 (33)	27 (59)	374 (61)	94 (60)	56 (68)	142 (56)	82 (66)
<i>ibeA</i>	28 (13)	0	0	27 (31)	1 (2)	67 (11)	1 (1)	0	57 (23)	9 (7)
<i>malX (PAI)</i>	105 (49)	0	1 (5)	87 (99)	17 (37)	296 (48)	4 (2)	3 (4)	249 (99)	40 (32)
<i>usp</i>	97 (46)	0	0	86 (98)	11 (24)	280 (46)	1 (1)	0	248 (98)	31 (25)
<i>tsh</i>	14 (7)	7 (12)	3 (14)	2 (2)	2 (4)	35 (6)	7 (4)	8 (10)	14 (6)	6 (5)
Estatus ExPEC	123 (58)	18 (31)	0	78 (89)	27 (59)	386 (63)	56 (36)	12 (15)	233 (92)	86 (69)
≥8 Genes	79 (37)	3 (5)	0	67 (76)	9 (20)	230 (37)	6 (4)	1 (1)	198 (78)	25 (20)
Rango de genes de virulencia	0-12	0-8	1-7	3-12	1-11	0-14	0-9	0-8	1-14	1-9
Media de genes de virulencia	6,5	3,8	2,5	9,5	6,1	7,1	4,5	4,0	10,0	6,4

En negrilla se señalan los resultados estadísticamente significativos ($P < 0,05$). El valor de P fue obtenido mediante la prueba de Fisher.

TABLA 39. Comparación de los genes de virulencia de las cepas de *E. coli* bacteriémicas aisladas durante los primeros 5 años (1989-1993) y los 2 últimos años (2010-2011) en relación a los serogrupos.

Genes	Cepas 1989-1993					Cepas 2010-2011				
	O1 n=18	O2 n=21	O4 n=10	O6 n=17	O6	O1 n=31	O2 n=43	O4 n=19	O6 n=53	
Adhesinas										
<i>fimH</i>	16 (89)	21 (100)	10 (100)	16 (94)		28 (90)	43 (100)	19 (100)	53 (100)	
<i>fimA_{VMT78}</i>	9 (50)	0	0	0		16 (52)	2 (5)	0	1 (2)	
<i>papEF</i>	12 (67)	15 (71)	10 (100)	13 (76)		29 (94)	31 (72)	19 (100)	44 (83)	
<i>papG I</i>	4 (22)	1 (5)	0	0		2 (6)	0	0	0	
<i>papG II</i>	6 (33)	11 (52)	4 (40)	5 (29)		24 (77)	16 (37)	9 (47)	34 (64)	
<i>papG III</i>	0	3 (14)	5 (50)	8 (47)		0	14 (32)	10 (53)	10 (19)	
<i>papG IV</i>	0	0	0	0		3 (10)	1 (2)	0	0	
<i>papG NT</i>	2 (11)	0	1 (10)	0		0	0	0	0	
<i>sfa/focDE</i>	0	9 (43)	9 (90)	16 (94)		0	28 (65)	19 (100)	41 (77)	
<i>afaI/draBC</i>	1 (6)	0	0	0		1 (3)	3 (7)	0	0	
<i>afa FM955459</i>	0	0	0	0		0	3 (7)	0	0	
Toxinas										
<i>cnf1</i>	0	4 (19)	7 (70)	11 (65)		0	23 (53)	19 (100)	47 (89)	
<i>cnf2</i>	0	0	0	0		0	1 (2)	0	0	
<i>cdtB</i>	1 (6)	1 (5)	0	4 (24)		0	7 (16)	0	7 (13)	
<i>cdtB1</i>	0	1 (5)	0	0		0	3 (7)	0	0	
<i>cdtB3</i>	0	0	0	0		0	1 (2)	0	0	
<i>cdtB4</i>	1 (6)	0	0	4 (24)		0	3 (7)	0	7 (13)	
<i>sat</i>	11 (61)	9 (43)	0	6 (35)		18 (58)	18 (42)	0	34 (64)	
<i>hlyA</i>	2 (11)	4 (19)	10 (100)	12 (70)		1 (3)	26 (60)	19 (100)	49 (92)	
Sideróforos										
<i>iucD</i>	11 (61)	13 (62)	4 (40)	8 (47)		26 (84)	25 (58)	1 (5)	35 (66)	
<i>iroN</i>	5 (28)	11 (52)	10 (100)	17 (100)		9 (29)	32 (74)	18 (95)	43 (81)	

Continuación de la TABLA 39

Genes	Cepas 1989-1993						Cepas 1989-1993					
	O1	O2	O4	O6	O1	O2	O4	O6	O1	O2	O4	O6
Cápsula												
<i>kpsM II</i>	16 (89)	18 (86)	7 (70)	15 (88)	29 (94)	41 (95)	8 (42)	15 (88)	29 (94)	41 (95)	8 (42)	51 (96)
<i>kpsM II-K2</i>	1 (6)	2 (10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>kpsM II-K5</i>	3 (17)	7 (33)	7 (70)	15 (88)	3 (10)	21 (49)	8 (42)	15 (88)	3 (10)	21 (49)	8 (42)	50 (94)
<i>neuC-K1</i>	12 (67)	9 (43)	0	0	26 (84)	20 (46)	0	0	26 (84)	20 (46)	0	1 (2)
<i>kpsM III</i>	0	0	3 (30)	1 (6)	0	0	10 (53)	1 (6)	0	0	10 (53)	0
Varios												
<i>cvaC</i>	3 (17)	4 (19)	0	0	8 (26)	6 (14)	0	0	8 (26)	6 (14)	0	0
<i>iss</i>	3 (17)	3 (14)	0	1 (6)	8 (26)	6 (14)	0	1 (6)	8 (26)	6 (14)	0	1 (2)
<i>traT</i>	13 (72)	9 (43)	5 (50)	3 (18)	28 (90)	17 (40)	12 (63)	3 (18)	28 (90)	17 (40)	12 (63)	28 (53)
<i>ibeA</i>	1 (6)	5 (24)	0	2 (12)	0	8 (19)	0	2 (12)	0	8 (19)	0	1 (2)
<i>malX (PAI)</i>	17 (94)	18 (86)	10 (100)	16 (94)	29 (94)	40 (93)	19 (100)	16 (94)	29 (94)	40 (93)	19 (100)	52 (98)
<i>usp</i>	15 (83)	14 (67)	10 (100)	16 (94)	27 (87)	35 (81)	18 (95)	16 (94)	27 (87)	35 (81)	18 (95)	52 (98)
<i>tsh</i>	0	1 (5)	0	0	1 (3)	4 (9)	0	0	1 (3)	4 (9)	0	0
Estatus ExPEC	14 (78)	19 (90)	9 (90)	16 (94)	30 (97)	41 (95)	19 (100)	16 (94)	30 (97)	41 (95)	19 (100)	51 (96)
≥8 Genes	11 (61)	7 (33)	10 (100)	14 (82)	23 (74)	31 (72)	19 (100)	14 (82)	23 (74)	31 (72)	19 (100)	49 (92)
Rango de genes de virulencia	3-9	1-11	8-11	4-10	3-10	1-13	8-10	4-10	3-10	1-13	8-10	4-12
Media de genes de virulencia	8,2	8,3	10,5	10,0	9,2	9,9	10,5	10,0	9,2	9,9	10,5	11,0

En negrilla se señalan los resultados estadísticamente significativos (P<0,05). El valor de P fue obtenido mediante la prueba de Fisher.

TABLA 40. Comparación de los genes de virulencia de las cepas de *E. coli* bacteriémicas aisladas durante los primeros 5 años (1989-1993) y los 2 últimos años (2010-2011) en relación a los serogrupos.

Genes	Cepas 1989-1993						Cepas 2010-2011					
	Serogrupos (%)						Serogrupos (%)					
	O8 n=17	O9 n=9	O15 n=11	O18 n=15	O25 n=7	O8 n=60	O9 n=35	O15 n=24	O18 n=16	O25 n=61		
Adhesinas												
<i>fimH</i>	17 (100)	8 (89)	11 (100)	15 (100)	7 (100)	58 (97)	33 (94)	24 (100)	16 (100)	61 (100)		
<i>fimAV_{MT78}</i>	1 (6)	3 (33)	9 (82)	6 (40)	1 (14)	2 (3)	6 (17)	14 (58)	7 (44)	1 (2)		
<i>papEF</i>	4 (24)	1 (11)	10 (91)	8 (53)	2 (28)	24 (40)	18 (51)	16 (67)	10 (62)	28 (46)		
<i>papG I</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2 (3)		
<i>papG II</i>	0	0	9 (82)	7 (47)	0	0	1 (3)	15 (62)	8 (50)	12 (20)		
<i>papG III</i>	0	0	0	0	2 (28)	2 (3)	0	0	2 (12)	14 (23)		
<i>papG IV</i>	0	0	0	0	0	0	0	1 (4)	0	0		
<i>papG NT</i>	4 (24)	1 (11)	1 (9)	1 (7)	0	22 (37)	17 (49)	0	0	0		
<i>sfa/focDE</i>	2 (12)	0	1 (9)	10 (67)	4 (57)	1 (2)	0	0	9 (56)	6 (10)		
<i>afa/draBC</i>	0	0	0	0	0	0	0	1 (4)	0	14 (23)		
<i>afa FM955459</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14 (23)		
Toxinas												
<i>cnf1</i>	0	0	0	0	3 (43)	2 (3)	0	0	3 (19)	13 (21)		
<i>cnf2</i>	0	0	0	0	0	0	0	1 (4)	0	0		
<i>cdtB</i>	0	0	0	3 (20)	2 (28)	0	0	1 (4)	4 (25)	4 (6)		
<i>cdtB1</i>	0	0	0	3 (20)	0	0	0	0	4 (25)	0		
<i>cdtB3</i>	0	0	0	0	0	0	0	1 (4)	0	0		
<i>cdtB4</i>	0	0	0	0	2 (28)	0	0	0	0	4 (6)		
<i>sat</i>	0	0	8 (73)	9 (60)	3 (43)	1 (2)	0	16 (67)	7 (44)	43 (70)		
<i>hlyA</i>	0	0	0	9 (60)	3 (43)	2 (3)	0	0	8 (50)	14 (23)		
Sideróforos												
<i>iucD</i>	10 (59)	5 (56)	10 (91)	12 (80)	5 (71)	47 (78)	23 (66)	20 (83)	10 (62)	55 (90)		
<i>iroN</i>	8 (47)	2 (22)	2 (18)	10 (67)	3 (43)	40 (67)	22 (63)	4 (17)	11 (69)	16 (26)		

Continuación de la TABLA 40

Genes	Cepas 1989-1993					Cepas 2010-2011				
	O8	O9	O15	O18	O25	O8	O9	O15	O18	O25
Cápsula										
<i>kpsM II</i>	0	0	8 (73)	14 (93)	6 (86)	1 (2)	2 (6)	18 (75)	16 (100)	56 (92)
<i>kpsM II-K2</i>	0	0	0	1 (7)	0	0	0	0	2 (12)	15 (24)
<i>kpsM II-K5</i>	0	0	8 (73)	9 (60)	6 (86)	1 (2)	2 (6)	17 (71)	7 (44)	36 (59)
<i>neuC-K1</i>	0	0	0	4 (27)	0	0	0	1 (4)	7 (44)	5 (8)
<i>kpsM III</i>	0	0	0	0	1 (14)	0	0	3 (12)	0	1 (2)
Varios										
<i>cvaC</i>	5 (29)	2 (22)	1 (9)	3 (20)	2 (28)	38 (63)	21 (60)	8 (33)	4 (25)	10 (16)
<i>iss</i>	8 (47)	2 (22)	0	2 (13)	2 (28)	26 (43)	22 (63)	4 (17)	2 (12)	11 (18)
<i>traT</i>	13 (76)	4 (44)	3 (27)	3 (20)	3 (43)	45 (75)	23 (66)	8 (33)	10 (62)	38 (62)
<i>ibeA</i>	0	0	0	4 (27)	1 (14)	1 (2)	0	0	8 (50)	12 (20)
<i>malX (PAI)</i>	0	0	0	14 (93)	5 (71)	4 (7)	0	0	16 (100)	55 (90)
<i>usp</i>	0	0	0	14 (93)	5 (71)	0	0	0	16 (100)	55 (90)
<i>tsh</i>	4 (24)	0	0	1 (7)	0	1 (2)	3 (9)	3 (12)	2 (12)	4 (6)
Estado ExPEC	6 (35)	1 (11)	10 (91)	13 (87)	6 (86)	25 (42)	15 (43)	17 (71)	14 (88)	55 (90)
≥8 Genes	2 (12)	0	0	13 (87)	5 (71)	2 (3)	0	4 (17)	14 (88)	32 (52)
Rango de genes de virulencia	1-8	0-6	1-7	2-13	3-11	0-9	1-7	1-8	5-13	2-14
Media de genes de virulencia	4,4	3,0	6,6	9,7	8,6	5,3	5,4	6,5	10,6	8,6

En negrilla se señalan los resultados estadísticamente significativos ($P < 0,05$). El valor de P fue obtenido mediante la prueba de Fisher.

TABLA 41. Comparación de los genes de virulencia de las cepas de *E. coli* bacteriémicas aisladas durante los primeros 5 años (1989-1993) y los 2 últimos años (2010-2011) en relación a los filoserogrupos.

Genes	Cepas 1989-1993					Cepas 2010-2011				
	Filoserogrupos (%)					Filoserogrupos (%)				
	O1-D n=11	O2-B2 n=14	O4-B2 n=10	O6-B2 n=16	O1-D n=19	O2-B2 n=34	O4-B2 n=19	O6-B2 n=52		
Adhesinas										
<i>fimH</i>	10 (91)	14 (100)	10 (100)	16 (100)	16 (84)	34 (100)	19 (100)	52 (100)		
<i>fimAV_{MT78}</i>	8 (73)	0	0	0	15 (79)	2 (6)	0	1 (2)		
<i>papEF</i>	7 (64)	10 (71)	10 (100)	13 (81)	18 (95)	26 (76)	19 (100)	44 (85)		
<i>papG I</i>	4 (36)	0	0	0	2 (11)	0	0	0		
<i>papG II</i>	1 (9)	7 (50)	4 (40)	5 (31)	13 (68)	13 (38)	9 (47)	34 (65)		
<i>papG III</i>	0	3 (21)	5 (50)	8 (50)	0	13 (38)	10 (53)	10 (19)		
<i>papG IV</i>	0	0	0	0	3 (16)	0	0	0		
<i>papG NT</i>	2 (18)	0	1 (10)	0	0	0	0	0		
<i>sfa/focDE</i>	0	9 (64)	9 (90)	16 (100)	0	28 (82)	19 (100)	41 (79)		
<i>afaI/draBC</i>	1 (9)	0	0	0	1 (5)	0	0	0		
<i>afa FM955459</i>	0	0	0	0	0	0	0	0		
Toxinas										
<i>cnf1</i>	0	4 (29)	7 (70)	11 (69)	0	23 (68)	19 (100)	47 (90)		
<i>cnf2</i>	0	0	0	0	0	1 (3)	0	0		
<i>cdtB</i>	0	1 (7)	0	4 (25)	0	7 (21)	0	7 (13)		
<i>cdtB1</i>	0	1 (7)	0	0	0	3 (9)	0	0		
<i>cdtB3</i>	0	0	0	0	0	1 (3)	0	0		
<i>cdtB4</i>	0	0	0	4 (25)	0	3 (9)	0	7 (13)		
<i>sat</i>	9 (82)	4 (29)	0	6 (38)	17 (89)	14 (41)	0	34 (65)		
<i>hlyA</i>	1 (9)	4 (29)	10 (100)	12 (75)	0	24 (71)	19 (100)	49 (94)		
Sideróforos										
<i>iucD</i>	7 (64)	7 (50)	4 (40)	7 (44)	18 (95)	20 (59)	1 (5)	35 (67)		
<i>iroN</i>	1 (9)	10 (71)	10 (100)	16 (100)	1 (5)	30 (88)	18 (95)	42 (81)		

Continuación de la TABLA 41

Genes	Cepas 1989-1993				Cepas 2010-2011			
	O1-D	O2-B2	O4-B2	O6-B2	O1-D	O2-B2	O4-B2	O6-B2
Cápsula								
<i>kpsM II</i>	9 (82)	13 (93)	7 (70)	15 (94)	18 (95)	34 (100)	8 (42)	51 (98)
<i>kpsM II-K2</i>	0	2 (14)	0	0	0	0	0	0
<i>kpsM II-K5</i>	2 (18)	3 (21)	7 (70)	15 (94)	3 (16)	15 (44)	8 (42)	50 (96)
<i>neuC-K1</i>	7 (64)	8 (57)	0	0	16 (84)	19 (56)	0	1 (2)
<i>kpsM III</i>	0	0	3 (30)	0	0	0	10 (53)	0
Varios								
<i>cvaC</i>	1 (9)	3 (21)	0	0	1 (5)	5 (15)	0	0
<i>iss</i>	1 (9)	2 (14)	0	0	1 (5)	5 (15)	0	0
<i>traT</i>	8 (73)	4 (29)	5 (50)	3 (19)	17 (89)	10 (29)	12 (63)	27 (52)
<i>ibeA</i>	0	5 (36)	0	2 (13)	0	8 (24)	0	1 (2)
<i>malX (PAI)</i>	10 (91)	14 (100)	10 (100)	16 (100)	18 (95)	34 (100)	19 (100)	52 (100)
<i>usp</i>	9 (82)	14 (100)	10 (100)	16 (100)	16 (84)	34 (100)	18 (95)	52 (100)
<i>tsh</i>	0	0	0	0	1 (5)	3 (9)	0	0
Estatus ExPEC	8 (73)	14 (100)	9 (90)	16 (100)	19 (100)	34 (100)	19 (100)	51 (98)
≥8 Genes	7 (64)	7 (50)	10 (100)	14 (88)	15 (79)	29 (85)	19 (100)	49 (94)
Rango de genes de virulencia	3-9	5-11	8-11	7-10	5-9	6-13	8-10	5-12
Media de genes de virulencia	8,1	9,1	10,5	10,4	9,3	10,8	10,5	11,1

En negrilla se señalan los resultados estadísticamente significativos. El valor de P fue obtenido mediante la prueba de Fisher donde $P < 0,05$

TABLA 42. Comparación de los genes de virulencia de las cepas de *E. coli* bacteriémicas aisladas durante los primeros 5 años (1989-1993) y los 2 últimos años (2010-2011) en relación a los filoserogrupos.

Genes	Cepas 1989-1993						Cepas 2010-2011					
	Filoserogrupos (%)						Filoserogrupos (%)					
	O8-A n=9	O9-A n=9	O15-D n=9	O18-B2 n=14	O25-B2 n=5		O8-A n=38	O9-A n=25	O15-D n=21	O18-B2 n=15	O25-B2 n=55	
Adhesinas												
<i>fimH</i>	9 (100)	8 (89)	9 (100)	14 (100)	5 (100)		36 (95)	25 (100)	20 (95)	15 (100)	55 (100)	
<i>fimA_{VM78}</i>	1 (11)	3 (33)	9 (100)	5 (36)	0		2 (5)	5 (20)	14 (67)	6 (40)	0	
<i>papEF</i>	4 (44)	1 (11)	9 (100)	8 (57)	2 (40)		20 (53)	15 (60)	15 (71)	9 (60)	24 (44)	
<i>papG I</i>	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	
<i>papG II</i>	0	0	9 (100)	7 (50)	0		0	1 (4)	15 (71)	7 (47)	10 (18)	
<i>papG III</i>	0	0	0	0	2 (40)		1 (3)	0	0	2 (13)	14 (25)	
<i>papG IV</i>	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	
<i>papG NT</i>	4 (44)	1 (11)	0	1 (7)	0		19 (50)	14 (56)	0	0	0	
<i>sfai/focDE</i>	2 (22)	0	0	10 (71)	4 (80)		0	0	0	9 (60)	6 (11)	
<i>afaI/draBC</i>	0	0	0	0	0		0	0	0	0	14 (25)	
<i>afa FM955459</i>	0	0	0	0	0		0	0	0	0	14 (25)	
Toxinas												
<i>cnf1</i>	0	0	0	0	3 (60)		1 (3)	0	0	3 (20)	13 (24)	
<i>cnf2</i>	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	
<i>cdtB</i>	0	0	0	3 (21)	2 (40)		0	0	0	4 (27)	4 (7)	
<i>cdtB1</i>	0	0	0	3 (21)	0		0	0	0	4 (27)	0	
<i>cdtB3</i>	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	
<i>cdtB4</i>	0	0	0	0	2 (40)		0	0	0	0	4 (7)	
<i>sat</i>	0	0	8 (89)	9 (64)	3 (60)		0	0	15 (71)	6 (40)	42 (76)	
<i>hlyA</i>	0	0	0	9 (64)	3 (60)		1 (3)	0	0	8 (53)	14 (25)	
Sideróforos												
<i>iucD</i>	7 (78)	5 (56)	9 (100)	12 (86)	4 (80)		34 (89)	16 (64)	18 (86)	9 (60)	51 (93)	
<i>iron</i>	6 (67)	2 (22)	1 (11)	10 (71)	2 (40)		32 (84)	15 (60)	4 (19)	11 (73)	16 (29)	

Continuación de la TABLA 42

Genes	Cepas 1989-1993					Cepas 2010-2011				
	O8-A	O9-A	O15-D	O18-B2	O25-B2	O8-A	O9-A	O15-D	O18-B2	O25-B2
Cápsula										
<i>kpsM</i> II	0	0	8 (89)	14 (100)	5 (100)	0	2 (8)	17 (81)	15 (100)	53 (96)
<i>kpsM</i> II-K2	0	0	0	1 (7)	0	0	0	0	2 (13)	14 (25)
<i>kpsM</i> II-K5	0	0	8 (89)	9 (64)	5 (100)	0	2 (8)	16 (76)	7 (47)	35 (64)
<i>neuC</i> -K1	0	0	0	4 (29)	0	0	0	1 (5)	6 (40)	4 (7)
<i>kpsM</i> III	0	0	0	0	0	0	0	4 (19)	0	0
Varios										
<i>cvaC</i>	4 (44)	2 (22)	1 (11)	3 (21)	1 (20)	31 (82)	14 (56)	8 (38)	4 (27)	10 (18)
<i>iss</i>	6 (67)	2 (22)	0	2 (14)	1 (20)	19 (50)	15 (60)	4 (19)	2 (13)	10 (18)
<i>traT</i>	8 (89)	4 (44)	3 (33)	3 (21)	2 (40)	32 (84)	16 (64)	7 (33)	9 (60)	33 (60)
<i>ibeA</i>	0	0	0	4 (29)	1 (20)	1 (3)	0	0	8 (53)	12 (22)
<i>malX</i> (PAI)	0	0	0	14 (100)	5 (100)	1 (3)	0	0	15 (100)	55 (100)
<i>usp</i>	0	0	0	14 (100)	5 (100)	0	0	0	15 (100)	55 (100)
<i>tsh</i>	2 (22)	0	0	1 (7)	0	0	2 (8)	3 (14)	2 (13)	5 (9)
Estatus ExPEC	6 (67)	1 (11)	9 (100)	13 (93)	5 (100)	20 (53)	13 (52)	16 (76)	13 (87)	52 (95)
≥8 Genes	2 (22)	0	0	13 (93)	5 (100)	2 (5)	0	4 (19)	13 (87)	32 (58)
Rango de genes de virulencia	2-8	0-6	6-7	4-13	8-11	0-9	1-7	4-8	5-13	5-14
Media de genes de virulencia	5,9	3,0	7,3	10,2	10,0	6,0	5,6	6,9	10,6	9,0

En negrilla se señalan los resultados estadísticamente significativos. El valor de P fue obtenido mediante la prueba de Fisher donde $P < 0,05$.

TABLA 43. Prevalencia de los grupos clonales O15-ST393, GCA-ST69 y ST131 en cepas de *E. coli* bacteriémicas en cada año y en los períodos 1989-1999 y 2000-2011. También se incluye la prevalencia de cepas con el antígeno O25a.

Año	Nº de cepas	Grupos Clonales (%)				Antígeno
		O15-ST393	GCA-ST69	O25:H4-ST131	O16:H5-ST131	O25a
1989	24	0	0	0	0	3 (12,5)
1990	7	0	0	0	0	0
1991	39	1 (2,6)	0	0	0	1 (2,6)
1992	57	1 (1,8)	1 (1,8)	0	0	2 (3,5)
1993	86	6 (7,0)	3 (3,5)	1 (1,2)	0	1 (1,2)
1994	67	2 (3,0)	2 (3,0)	0	0	0
1995	60	3 (5)	0	0	0	2 (3,3)
1996	83	2 (2,4)	0	0	0	2 (2,4)
1997	113	6 (5,3)	1 (0,9)	0	0	5 (4,4)
1998	145	6 (4,1)	6 (4,1)	3 (2,1)	0	1 (0,7)
1999	152	1 (0,6)	11 (7,2)	4 (2,6)	0	1 (0,6)
1989-1999	833	28 (3,4)	24 (2,9)	8 (1,0)	0	18 (2,2)
2000	142	1 (0,7)	11 (7,7)	0	0	2 (1,4)
2001	120	3 (2,5)	8 (6,7)	1 (0,8)	0	1 (0,8)
2002	93	2 (2,2)	5 (5,4)	1 (1,1)	0	0
2003	90	4 (4,4)	4 (4,4)	2 (2,2)	0	2 (2,2)
2004	199	6 (3,0)	10 (5,0)	6 (3,0)	0	4 (2,0)
2005	183	7 (3,8)	9 (4,9)	12 (6,6)	1 (0,5)	5 (2,7)
2006	190	3 (1,6)	15 (7,9)	7 (3,7)	0	4 (2,1)
2007	231	5 (2,2)	14 (6,1)	21 (9,1)	0	2 (0,9)
2008	276	8 (2,9)	21 (7,6)	22 (8,0)	0	3 (1,1)
2009	289	9 (3,1)	13 (4,5)	23 (8,0)	1 (0,3)	4 (1,4)
2010	301	10 (3,3)	14 (4,6)	25 (8,3)	4 (1,3)	3 (1,0)
2011	313	6 (1,9)	10 (3,2)	22 (7,0)	1 (0,3)	7 (2,2)
2000-2011	2.427	64 (2,6)	134 (5,5)	142 (5,9)	7 (0,3)	37 (1,5)
Total	3.260	92 (2,8)	158 (4,8)	150 (4,6)	7 (0,2)	55 (1,7)
Cepas BLEE		4 CTX-M-14 2003 y 2009	2 CTX-M-14 2008 y 2010	35 CTX-M-15 1 CTX-M-14 2 CTX-M-9 1 SHV-12 2006-2011	1 CTX-M-14 2010	2 CTX-M-32 2005

El valor de P fue obtenido mediante la prueba de Chi-cuadrado.

P = 0,0029 (1989-1999 *versus* 2000-2011, grupo clonal A).

P = <0,001 (1989-1999 *versus* 2000-2011, grupo clonal O25:H4-ST131).

TABLA 44. Genes de virulencia en las cepas de *E. coli* bacteriémicas de los grupos clonales O15-ST393, GCA-ST69 y ST131.

Genes	Grupos clonales (%)					
	O15-ST393 n=92	GCA-ST69 n=158	ST131 O25+O16 n=157	Valor de P ST131 vs O15-ST393	Valor de P ST131 vs GCA-ST69	Valor de P O15-ST393 vs GCA-ST69
Adhesinas						
<i>fimH</i>	90 (98)	157 (99)	156 (99)			
<i>fimA</i> _{VM78}	89 (97)	5 (3)	0	<0,001	0,031	<0,001
<i>papEF</i>	89 (97)	80 (51)	37 (24)	<0,001	<0,001	<0,001
<i>papG</i> I	0	5 (3)	0			
<i>papG</i> II	89 (97)	59 (37)	12 (8)	<0,001	<0,001	<0,001
<i>papG</i> III	0	0	25 (16)	<0,001	<0,001	
<i>papG</i> IV	0	13 (8)	0		<0,001	0,002
<i>papG</i> NT	0	3 (2)	0			
<i>sfa/focDE</i>	0	0	0			
<i>afa/draBC</i>	0	0	45 (29)	<0,001	<0,001	
<i>afa</i> FM955459	0	0	39 (25)	<0,001	<0,001	
Toxinas						
<i>cnf1</i>	0	0	10 (6)	0,009	<0,001	
<i>cnf2</i>	0	0	0			
<i>cdtB</i>	0	1 (1)	26 (17)	<0,001	<0,001	
<i>cdtB1</i>	0	1 (1)	0			
<i>cdtB3</i>	0	0	0			
<i>cdtB4</i>	0	0	26 (17)	<0,001	<0,001	
<i>sat</i>	90 (98)	74 (47)	112 (71)	<0,001	<0,001	<0,001
<i>hlyA</i>	0	3 (2)	11 (7)	0,005	0,024	
Sideróforos						
<i>iucD</i>	87 (94)	114 (72)	136 (87)	0,033	0,001	<0,001
<i>iroN</i>	0	25 (16)	34 (22)	<0,001		<0,001
Cápsula						
<i>kpsM</i> II	91 (99)	88 (56)	141 (90)	0,003	<0,001	<0,001
<i>kpsM</i> II-K2	0	3 (2)	38 (24)	<0,001	<0,001	
<i>kpsM</i> II-K5	91 (99)	85 (54)	96 (61)	<0,001		<0,001
<i>neuC</i> -K1	0	0	7 (4)		0,014	
<i>kpsM</i> III	0	51 (32)	1 (1)		<0,001	<0,001
Varios						
<i>cvaC</i>	13 (14)	26 (16)	30 (19)			
<i>iss</i>	0	24 (15)	35 (22)	<0,001		<0,001
<i>traT</i>	18 (20)	135 (85)	108 (69)	<0,001	<0,001	<0,001
<i>ibeA</i>	0	0	52 (33)	<0,001	<0,001	
<i>malX</i> (PAI)	0	1 (1)	156 (99)	<0,001	<0,001	
<i>usp</i>	0	2 (1)	157 (100)	<0,001	<0,001	
<i>tsh</i>	0	2 (1)	6 (4)			
Estatus ExPEC	89 (97)	89 (56)	134 (85)	0,003	<0,001	<0,001
≥8 Genes	3 (3)	3 (2)	66 (42)	<0,001	<0,001	

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

TABLA 45. Esquema de genes de virulencia que definen los virotipos de cepas O25:H4-ST131.

Virotipo	Genes de virulencia										
	<i>afa</i> FM955459 <i>nfaE111</i>	<i>iroN</i>	<i>ibeA</i>	<i>sat</i>	<i>afa/draDE</i>	<i>papGII</i>	<i>papGIII</i>	<i>cnf1</i>	<i>hlyA</i>	<i>cdtB</i>	<i>neuC</i> K1
A	+	-	-	+/-	+	-	-	-	-	-	-
B	-	+	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-
C	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
D1	-	+/-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
D2	-	+/-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
D3	-	+/-	+	+/- ^a	+/- ^a	-	-	-	-	-	-
D4	-	+/-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
D5	-	+/-	+	-	-	-	+	+	+	-	-
E	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-
F	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-

^aLas cepas del virotipo D3 tienen que poseer los genes *sat* y *afa/draDE*, o al menos uno de ellos.



TABLA 46. Prevalencia de los virotipos del grupo clonal O25:H4-ST131 por anualidad y en los períodos 1989-1999 y 2000-2011.

Año	Nº de cepa	O25:H4 ST131	Virotipos del grupo clonal O25:H4-ST131 (%)						
			A	B	C	D	E	F	NT
1989	24	0	0	0	0	0	0	0	0
1990	7	0	0	0	0	0	0	0	0
1991	39	0	0	0	0	0	0	0	0
1992	57	0	0	0	0	0	0	0	0
1993	86	1 (1,2)	0	0	0	1 (1,2)	0	0	0
1994	67	0	0	0	0	0	0	0	0
1995	60	0	0	0	0	0	0	0	0
1996	83	0	0	0	0	0	0	0	0
1997	113	0	0	0	0	0	0	0	0
1998	145	3 (2,1)	0	0	0	3 (2,1)	0	0	0
1999	152	4 (2,6)	0	0	0	4 (2,6)	0	0	0
1989-1999	833	8 (1,0)	0	0	0	8 (1,0)	0	0	0
2000	142	0	0	0	0	0	0	0	0
2001	120	1 (0,8)	0	0	1 (0,8)	0	0	0	0
2002	93	1 (1,1)	0	0	0	1 (1,1)	0	0	0
2003	90	2 (2,2)	0	0	0	2 (2,2)	0	0	0
2004	199	6 (3,0)	0	0	2 (1,0)	4 (2,0)	0	0	0
2005	183	12 (6,6)	0	0	6 (3,3)	5 (2,7)	0	0	1 (0,5)
2006	190	7 (3,7)	2 (1,0)	0	5 (2,6)	0	0	0	0
2007	231	21 (9,1)	5 (2,2)	1 (0,4)	10 (4,3)	5 (2,2)	0	0	0
2008	276	22 (8,0)	5 (1,8)	1 (0,4)	8 (2,9)	7 (2,5)	0	0	1 (0,4)
2009	289	23 (8,0)	9 (3,1)	2 (0,7)	4 (1,4)	7 (2,4)	1 (0,3)	0	0
2010	301	25 (8,3)	7 (2,3)	0	6 (2,0)	11(3,6)	0	0	1 (0,3)
2011	313	22 (7,0)	6 (2,0)	0	5 (1,6)	1 (0,3)	3 (1,0)	6 (1,9)	1 (0,3)
2000-2011	2.427	142 (5,9)	34 (1,4)	4 (0,2)	47 (1,9)	43 (1,8)	4 (0,2)	6 (0,2)	4 (0,2)
Total	3.260	150 (4,6)	34 (1,0)	4 (0,1)	47 (1,4)	51 (1,6)	4 (0,1)	6 (0,2)	4 (0,2)

El valor de P fue obtenido mediante la prueba de Chi-cuadrado.

P = <0,001 (1989-1999 versus 2000-2011, grupo clonal O25:H4-ST131).

P = 0,001 (1989-1999 versus 2000-2011, virotipo A).

P = <0,001 (1989-1999 versus 2000-2011, virotipo C).

Resultados

TABLA 47. Prevalencia de cepas O25:H4-ST131 del virotipo D especificando sus variantes por anualidad y en los períodos 1989-1999 y 2000-2011.

Año	N° de cepas	N° de cepas Virotipo D	Variantes del Virotipo D				
			D1	D2	D3	D4	D5
1989	24	0	0	0	0	0	0
1990	7	0	0	0	0	0	0
1991	39	0	0	0	0	0	0
1992	57	0	0	0	0	0	0
1993	86	1 (1,2)	1 (1,2)	0	0	0	0
1994	67	0	0	0	0	0	0
1995	60	0	0	0	0	0	0
1996	83	0	0	0	0	0	0
1997	113	0	0	0	0	0	0
1998	145	3 (2,1)	1 (0,7)	1 (0,7)	1 (0,7)	0	0
1999	152	4 (2,6)	2 (1,3)	0	2 (1,3)	0	0
1989-1999	833	8 (1,0)	4 (0,5)	1 (0,1)	3 (0,4)	0	0
2000	142	0	0	0	0	0	0
2001	120	0	0	0	0	0	0
2002	93	1 (1,1)	0	0	1 (1,1)	0	0
2003	90	2 (2,2)	0	1 (1,1)	1 (1,1)	0	0
2004	199	4 (2,0)	2 (1,0)	1 (0,5)	1 (0,5)	0	0
2005	183	5 (2,7)	1 (0,5)	2 (1,1)	2 (1,1)	0	0
2006	190	0	0	0	0	0	0
2007	231	5 (2,2)	0	3 (1,3)	1 (0,4)	1 (0,4)	0
2008	276	7 (2,5)	0	5 (1,8)	1 (0,4)	1 (0,4)	0
2009	289	7 (2,4)	1 (0,3)	2 (0,7)	2 (0,7)	0	2 (0,7)
2010	301	11 (3,7)	0	4 (1,3)	0	3 (1,0)	4 (1,3)
2011	313	1 (0,3)	0	0	0	1 (0,3)	0
2000-2011	2.427	43 (1,8)	4 (0,2)	18 (0,7)	9 (0,4)	6 (0,2)	6 (0,2)
Total	3.260	51 (1,6)	8 (0,2)	19 (0,6)	12 (0,4)	6 (0,2)	6 (0,2)

TABLA 48. Genes de virulencia de las cepas de *E. coli* bacteriémicas del grupo clonal O25:H4-ST131 en relación a sus virotipos.

Genes	Virotipos del Grupo clonal O25:H4-ST131 n = 150 (%)										
	A n=34	B n=4	C n=47	D n=51	E n=4	F n=6	NT n=4	Valor de P A vs C	Valor de P A vs D	Valor de P C vs D	
Adhesinas											
<i>fimH</i>	34 (100)	4 (100)	46 (98)	51 (100)	4 (100)	6 (100)	4 (100)				
<i>fimA</i> _{MT78}	0	0	0	0	0	0	0				
<i>papEF</i>	0	0	0	25 (49)	4 (100)	6 (100)	1 (25)		<0,001	<0,001	
<i>papG I</i>	0	0	0	0	0	0	0				
<i>papG II</i>	0	0	0	0	4 (100)	6 (100)	1 (25)				
<i>papG III</i>	0	0	0	25 (49)	0	0	0		<0,001	<0,001	
<i>papG IV</i>	0	0	0	0	0	0	0				
<i>papG NT</i>	0	0	0	0	0	0	0				
<i>sfa/focDE</i>	0	0	0	0	0	0	0				
<i>afa/draBC</i>	34 (100)	0	1 (2)	8 (16)	0	0	1 (25)		<0,001	0,020	
<i>afa</i> FM955459	34 (100)	0	0	4 (8)	0	0	1 (25)		<0,001		
Toxinas											
<i>cnf1</i>	0	0	0	6 (12)	4 (100)	0	0		0,041	0,017	
<i>cnf2</i>	0	0	0	0	0	0	0				
<i>cdtB</i>	0	0	0	26 (51)	0	0	0		<0,001	<0,001	
<i>cdtB1</i>	0	0	0	0	0	0	0				
<i>cdtB3</i>	0	0	0	0	0	0	0				
<i>cdtB4</i>	0	0	0	26 (51)	0	0	0		<0,001	<0,001	
<i>sat</i>	34 (100)	4 (100)	47 (100)	11 (22)	4 (100)	6 (100)	1 (25)		<0,001	<0,001	
<i>hlyA</i>	0	0	0	6 (12)	4 (100)	0	1 (25)		0,041	0,017	
Sideróforos											
<i>iucD</i>	32 (94)	4 (100)	46 (98)	38 (75)	4 (100)	6 (100)	1 (25)		0,017	<0,001	
<i>iroN</i>	1 (3)	4 (100)	0	29 (57)	0	0	0		<0,001	<0,001	

Continuación de la TABLA 48

Genes	A n=34	B n=4	C n=47	D n=51	E n=4	F n=6	NT n=4	Valor de P A vs C	Valor de P A vs D	Valor de P C vs D
Cápsula										
<i>kpsM II</i>	34 (100)	2 (50)	34 (72)	51 (100)	4 (100)	6 (100)	2 (50)	<0,001		0,001
<i>kpsM II-K2</i>	34 (100)	0	1 (2)	0	0	0	0	<0,001	<0,001	
<i>kpsM II-K5</i>	0	2 (50)	33 (70)	45 (88)	4 (100)	6 (100)	2 (50)	<0,001	<0,001	0,024
<i>neuC-K1</i>	0	0	0	6 (12)	0	0	0		0,041	0,009
<i>kpsM III</i>	0	0	0	0	0	0	1 (25)			
Varios										
<i>cvaC</i>	0	0	0	30 (59)	0	0	0		<0,001	<0,001
<i>iss</i>	0	2 (50)	0	32 (63)	0	0	0		<0,001	<0,001
<i>traT</i>	6 (18)	3 (75)	39 (83)	42 (82)	3 (75)	6 (100)	4 (100)	<0,001	<0,001	
<i>ibeA</i>	0	0	0	51 (100)	0	0	0		<0,001	<0,001
<i>malX (PAI)</i>	34 (100)	4 (100)	46 (98)	51 (100)	4 (100)	6 (100)	4 (100)			
<i>usp</i>	34 (100)	4 (100)	47 (100)	51 (100)	4 (100)	6 (100)	4 (100)			
<i>tsh</i>	0	0	0	6 (12)	0	0	0		0,041	0,009
Estatus ExPEC	34 (100)	2 (50)	36 (77)	47 (92)	4 (100)	6 (100)	1 (25)	0,001		0,030
≥8 Genes	7 (21)	2 (50)	0	45 (88)	4 (100)	6 (100)	1 (25)	0,002	<0,001	<0,001

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



TABLA 49. BLEE en cepas del grupo clonal O25:H4-ST131 pertenecientes a diferentes virotipos por anualidad y en los períodos 1989-1999 y 2000-2011.

Año	N° de Cepas O25-ST131 n=150	Virotipos del grupo clonal O25:H4-ST131 (N° de cepa y tipo de BLEE)						
		A n=34	B n=4	C n=47	D n=51	E n=4	F n=6	NT n=4
1989	0	0	0	0	0	0	0	0
1990	0	0	0	0	0	0	0	0
1991	0	0	0	0	0	0	0	0
1992	0	0	0	0	0	0	0	0
1993	1	0	0	0	1	0	0	0
1994	0	0	0	0	0	0	0	0
1995	0	0	0	0	0	0	0	0
1996	0	0	0	0	0	0	0	0
1997	0	0	0	0	0	0	0	0
1998	3	0	0	0	3	0	0	0
1999	4	0	0	0	4	0	0	0
1989-1999	8	0	0	0	8	0	0	0
2000	0	0	0	0	0	0	0	0
2001	1	0	0	1	0	0	0	0
2002	1	0	0	0	1	0	0	0
2003	2	0	0	0	2	0	0	0
2004	6	0	0	2	4	0	0	0
2005	12	0	0	6	5	0	0	1
2006	7	2 (2 CTX-M-15)	0	5 (1 CTX-M-14)	0	0	0	0
2007	21	5 (5 CTX-M-15)	1	10	5	0	0	0
2008	22	5 (4 CTX-M-15)	1	8	7 (1 CTX-M-9)	0	0	1
2009	23	9 (9 CTX-M-15)	2	4	7	1 (1 CTX-M-15)	0	0
2010	25	7 (3 CTX-M-15)	0	6	11 (1 CTX-M-9)	0	0	1
2011	22	6 (3 CTX-M-15)	0	5	1 (1 SHV-12)	3 (3 CTX-M-15)	6 (5 CTX-M-15)	1
2000-2011	142	34	4	47	43	4	6	4
Total de Cepas BLEE	39 (26%)	26 (76%)	0	1 (2%)	3 (6%)	4 (100%)	5 (83%)	0
Tipo de BLEE		26 CTX-M-15		1 CTX-M-14	2 CTX-M-9 1 SHV-12	4 CTX-M-15	5 CTX-M-15	

El valor de P fue obtenido mediante la prueba de Fisher.

P = 0,084 (1989-1999 *versus* 2000-2011, cepas BLEE).

P = <0,001 (cepas virotipo A *versus* virotipo C).

P = <0,001 (cepas virotipo A *versus* virotipo D).

Resultados

TABLA 50. Alelos *fimH* de las cepas del grupo clonal O25:H4-ST131 pertenecientes a diferentes virotipos por anualidad y en los períodos 1989-1999 y 2000-2011.

Año	Cepas O25-ST131 n=150	Virotipos del Grupo Clonal O25:H4-ST131 (Nº de cepa y tipo de <i>fimH</i> _{TR})						
		A n=34	B n=4	C n=47	D n=51	E n=4	F n=6	NT n=4
1989	0	0	0	0	0	0	0	0
1990	0	0	0	0	0	0	0	0
1991	0	0	0	0	0	0	0	0
1992	0	0	0	0	0	0	0	0
1993	1	0	0	0	1 (1 H22)	0	0	0
1994	0	0	0	0	0	0	0	0
1995	0	0	0	0	0	0	0	0
1996	0	0	0	0	0	0	0	0
1997	0	0	0	0	0	0	0	0
1998	3	0	0	0	3 (2 H22) (1 H326)	0	0	0
1999	4	0	0	0	4 (4 H22)	0	0	0
1989-1999	8	0	0	0	8	0	0	0
2000	0	0	0	0	0	0	0	0
2001	1	0	0	1 (1 H30)	0	0	0	0
2002	1	0	0	0	1 (1 H22)	0	0	0
2003	2	0	0	0	2 (2 H22)	0	0	0
2004	6	0	0	2 (2 H30)	4 (4 H22)	0	0	0
2005	12	0	0	6 (6 H30)	5 (4 H22) (1 H379)	0	0	1 (1 H30)
2006	7	2 (2 H30)	0	5 (4 H30) (1 H-)	0	0	0	0
2007	21	5 (5 H30)	1 (1 H30)	10 (10 H30)	5 (4 H22) (1 H298)	0	0	0
2008	22	5 (5 H30)	1 (1 H30)	8 (7 H30) (1 H328)	7 (6 H22) (1 H322)	0	0	1 (1 H30)
2009	23	9 (9 H30)	2 (2 H30)	4 (4 H30)	7 (6 H22) (1 H332)	1 (1 H30)	0	0
2010	25	7 (7 H30)	0	6 (6 H30)	11 (10 H22) (1 H161)	0	0	1 (1 H30)
2011	22	6 (6 H30)	0	5 (5 H30)	1 (1 H22)	3 (3 H30)	6 (6 H30)	1 (1 H27)
2000-2011	142	34	4	47	43	4	6	4
Total <i>fimH</i>_{TR}		34 (100%) <i>fimH</i> _{TR} 30	4 (100%) <i>fimH</i> _{TR} 30	45 (96%) <i>fimH</i> _{TR} 30 1 (2%) <i>fimH</i> _{TR} 328 1 (2%) <i>fimH</i> -	45 (88%) <i>fimH</i> _{TR} 22 1 (2%) <i>fimH</i> _{TR} 161 1 (2%) <i>fimH</i> _{TR} 298 1 (2%) <i>fimH</i> _{TR} 322 1 (2%) <i>fimH</i> _{TR} 326 1 (2%) <i>fimH</i> _{TR} 332 1 (2%) <i>fimH</i> _{TR} 379	4 (100%) <i>fimH</i> _{TR} 30	6 (100%) <i>fimH</i> _{TR} 30	1 (25%) <i>fimH</i> _{TR} 27 3 (75%) <i>fimH</i> _{TR} 30

TABLA 51. Distribución de los subclones H30, H30-Rx, H30 no-Rx, H22 y H41 del grupo clonal ST131 en cepas *E. coli* bacteriémicas por anualidad.

Año	Cepas del grupo clonal ST131 (%)							Valor de P <i>fimH30</i> vs <i>fimH22</i>	Valor de P H30-Rx vs H30 no-Rx
	Nº total O25+O16 n=157	O25:H4 <i>fimH30</i> n=96	O25:H4 H30-Rx n=45	O25:H4 H30 no-Rx n=51	O25:H4 <i>fimH22</i> n=45	O16:H5 <i>fimH41</i> n=7			
1989	0	0	0	0	0	0			
1990	0	0	0	0	0	0			
1991	0	0	0	0	0	0			
1992	0	0	0	0	0	0			
1993	1 (1)	0	0	0	1 (2)	0			
1994	0	0	0	0	0	0			
1995	0	0	0	0	0	0			
1996	0	0	0	0	0	0			
1997	0	0	0	0	0	0			
1998	3 (2)	0	0	0	2 (4)	0			
1999	4 (3)	0	0	0	4 (9)	0	0,009		
2000	0	0	0	0	0	0			
2001	1 (1)	1 (1)	0	1 (2)	0	0			
2002	1 (1)	0	0	0	1 (2)	0			
2003	2 (1)	0	0	0	2 (4)	0			
2004	6 (4)	2 (2)	0	2 (4)	4 (9)	0			
2005	13 (8)	7 (7)	0	7 (14)	4 (9)	1 (14)		0,009	
2006	7 (4)	6 (6)	2 (4)	4 (8)	0	0			
2007	21 (13)	16 (17)	6 (13)	10 (20)	4 (9)	0			
2008	22 (14)	14 (15)	5 (11)	9 (18)	6 (13)	0			
2009	24 (15)	16 (17)	10 (22)	6 (12)	6 (13)	1 (14)			
2010	29 (19)	14 (15)	7 (16)	7 (14)	10 (22)	4 (57)			
2011	23 (15)	20 (21)	15 (33)	5 (10)	1 (2)	1 (14)	0,002	0,005	
Virotipos									
A	34 (22)	34 (35)	34 (76)	0	0	0	<0,001	<0,001	
B	4 (3)	4 (4)	0	4 (8)	0	0			
C	54 (34)	45 (47)	1 (2)	44 (86)	0	7 (100)	<0,001	<0,001	
D1	8 (5)	0	0	0	8 (18)	0	<0,001		
D2	19 (12)	0	0	0	16 (36)	0	<0,001		
D3	12 (8)	0	0	0	11 (24)	0	<0,001		
D4	6 (4)	0	0	0	6 (13)	0	<0,001		
D5	6 (4)	0	0	0	4 (9)	0	0,009		
E	4 (3)	4 (4)	4 (9)	0	0	0		0,044	
F	6 (4)	6 (6)	6 (13)	0	0	0		0,009	
NT	4 (3)	3 (3)	0	3 (6)	0	0			
Resistente a la ciprofloxacina	100 (64)	92 (96)	45 (100)	47 (92)	3 (7)	2 (29)	<0,001		
Intermedio a la ciprofloxacina	8 (5)	0	0	0	8 (18)	0	<0,001		
Sensible a la ciprofloxacina	49 (31)	3 (3)	0	3 (6)	34 (76)	5 (71)	<0,001		
Cepas BLEE	40 (26)	35 (36)	35 (78)	0	3 (7)	1 (14)	<0,001	<0,001	
Cepas no-BLEE	117 (75)	61 (64)	10 (22)	51 (100)	42 (93)	6 (86)	<0,001	<0,001	
Tipo de BLEE			35 CTX-M-15		2 CTX-M-9 1 SHV-12	CTX-M-14			

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

Resultados

TABLA 52. Genes de virulencia de las cepas bacteriémicas del grupo clonal ST131 pertenecientes a los subclones H30, H30-Rx, H30 no-Rx, H22 y H41.

Genes	Cepas del grupo clonal ST131 (%)							Valor P <i>fimH30</i> vs <i>fimH22</i>	Valor P H30-Rx vs H30 no-Rx
	N° total O25+O16 n=157	O25:H4 <i>fimH30</i> n=96	O25:H4 H30-Rx n=45	O25:H4 H30 no-Rx n=51	O25:H4 <i>fimH22</i> n=45	O16:H5 <i>fimH41</i> n=7			
Adhesinas									
<i>fimH</i>	156 (99)	96 (100)	45 (100)	51 (100)	45 (100)	7 (100)			
<i>fimAV_{MT78}</i>	0	0	0	0	0	0			
<i>papEF</i>	37 (24)	10 (10)	10 (22)	0	20 (44)	1 (14)	<0,001	0,0003	
<i>papG</i> I	0	0	0	0	0	0			
<i>papG</i> II	12 (8)	10 (10)	10 (22)	0	0	1 (14)	0,018	0,0003	
<i>papG</i> III	25 (16)	0	0	0	20 (44)	0	<0,001		
<i>papG</i> IV	0	0	0	0	0	0			
<i>papG</i> NT	0	0	0	0	0	0			
<i>sfa/focDE</i>	0	0	0	0	0	0			
<i>afa/draBC</i>	45 (29)	34 (35)	34 (76)	0	8 (18)	1 (14)	0,024	<0,001	
<i>afa</i> FM955459	39 (25)	34 (35)	34 (76)	0	4 (9)	0	<0,001	<0,001	
Toxinas									
<i>cnf1</i>	10 (6)	4 (4)	4 (9)	0	4 (9)	0		0,044	
<i>cnf2</i>	0	0	0	0	0	0			
<i>cdtB</i>	26 (17)	0	0	0	23 (51)	0	<0,001		
<i>cdtB1</i>	0	0	0	0	0	0			
<i>cdtB3</i>	0	0	0	0	0	0			
<i>cdtB4</i>	26 (17)	0	0	0	23 (51)	0	<0,001		
<i>sat</i>	112 (71)	93 (97)	45 (100)	48 (94)	10 (22)	5 (71)	<0,001		
<i>hlyA</i>	11 (7)	4 (4)	4 (9)	0	4 (9)	0		0,044	
Sideróforos									
<i>iucD</i>	136 (87)	90 (94)	43 (96)	47 (92)	34 (76)	5 (71)	0,0032		
<i>iroN</i>	34 (22)	5 (5)	1 (2)	4 (8)	25 (56)	0	<0,001		
Cápsula									
<i>kpsM</i> II	141 (90)	82 (85)	45 (100)	37 (73)	45 (100)	5 (71)	0,003	<0,001	
<i>kpsM</i> II-K2	38 (24)	35 (36)	34 (76)	1 (2)	0	3 (43)	<0,001	<0,001	
<i>kpsM</i> II-K5	96 (61)	47 (49)	11 (24)	36 (71)	39 (87)	1 (14)	<0,001	<0,001	
<i>neuC</i> -K1	7 (4)	0	0	0	6 (13)	1 (14)	0,0008		
<i>kpsM</i> III	1 (1)	1 (1)	0	1 (2)	0	0			
Varios									
<i>cvaC</i>	30 (19)	0	0	0	26 (58)	0	<0,001		
<i>iss</i>	35 (22)	3 (3)	1 (2)	2 (4)	28 (62)	0	<0,001		
<i>traT</i>	108 (69)	60 (63)	16 (36)	44 (86)	37 (82)	5 (71)	0,013	<0,001	
<i>ibeA</i>	52 (33)	0	0	0	45 (100)	1 (14)	<0,001		
<i>malX</i> (PAI)	156 (99)	95 (99)	45 (100)	50 (98)	45 (100)	7 (100)			
<i>usp</i>	157 (100)	96 (100)	45 (100)	51 (100)	45 (100)	7 (100)			
<i>tsh</i>	6 (4)	0	0	0	6 (13)	0	0,0008		
Estatus ExPEC	134 (85)	80 (83)	45 (100)	35 (69)	41 (91)	4 (57)		<0,001	
≥8 Genes	66 (42)	19 (20)	17 (38)	2 (4)	40 (89)	1 (14)	<0,001	<0,001	
Media de genes	8,0	7,0	7,5	6,6	10	6,3			
Rango de genes	4-14	4-10	6-10	4-9	6-14	6-8			

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

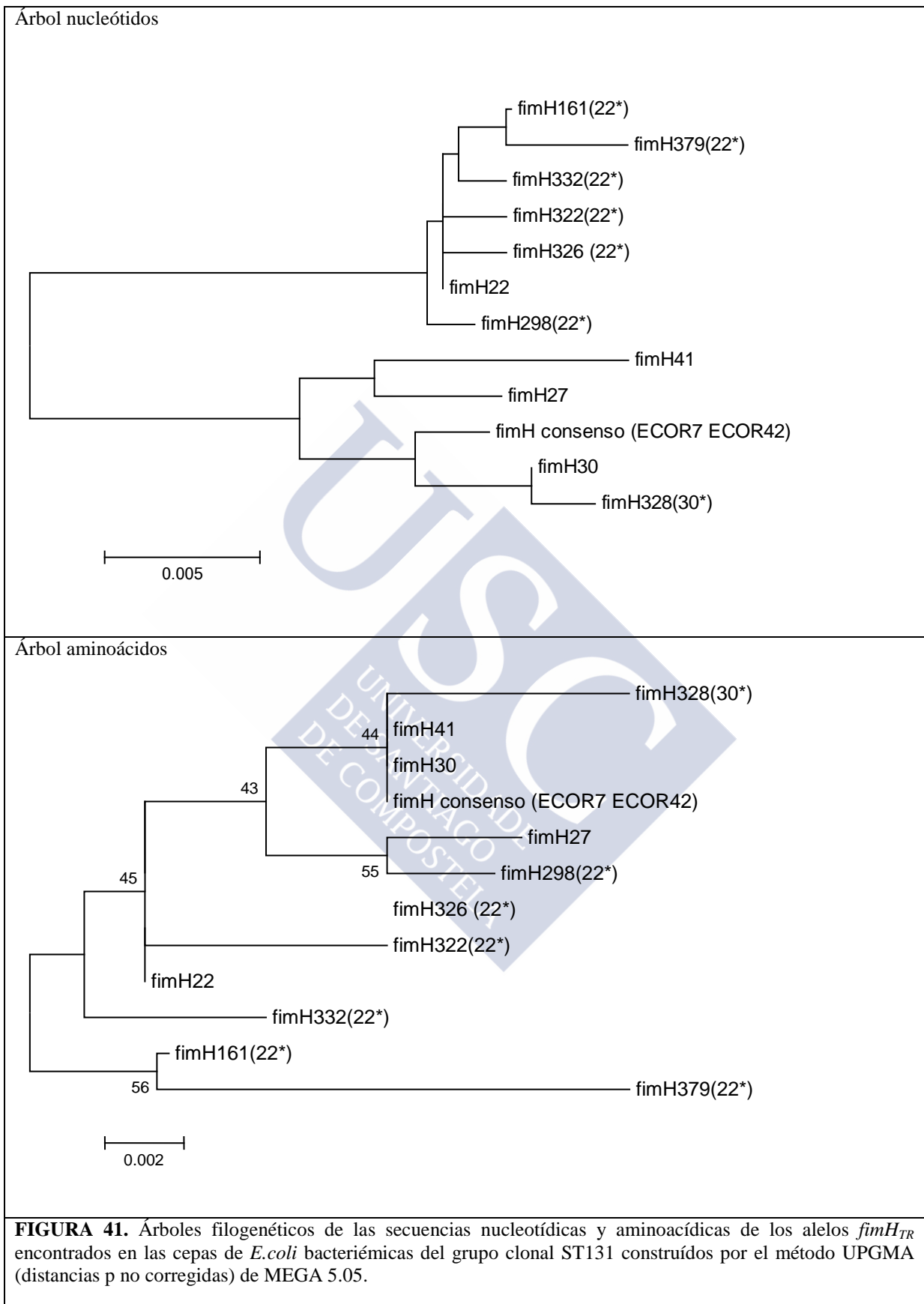


TABLA 53. Cambios de nucleótidos y aminoácidos en los diferentes alelos *fimH* de cepas bacteriémicas ST131.

SNP posición	90	93	96	115	117	141	143	171	207	214	225	259	296	312	315	318	321	339	380	392	411	414	419	450	534	546
<i>fimH</i> consenso (ECOR7 ECOR42)	C	T	C	G	T	T	C	A	T	A	C	G	G	A	T	G	C	C	G	C	C	C	G	C	T	C
<i>fimH</i> 30	.	.	T	T
<i>fimH</i> 328(30*)	.	.	.	A
<i>fimH</i> 41	A	.	C	.	C	.	C	T	C	C	.	.	.	C	.	.	.	C
<i>fimH</i> 27	.	.	C	.	C	C	T	G	T	C	C	.	.	.	C
<i>fimH</i> 22	.	A	C	.	C	.	.	G	C	.	T	.	A	T	C	T	G	A	.	A	T
<i>fimH</i> 326 (22*)	.	A	C	.	C	.	.	G	C	.	T	.	A	T	C	T	T	G	A	.	A	T
<i>fimH</i> 322(22*)	.	A	C	.	C	.	.	G	C	.	T	.	A	T	C	T	G	A	T	A	T
<i>fimH</i> 332(22*)	.	A	C	.	C	.	.	G	C	.	T	C	A	T	C	T	G	A	.	A	T
<i>fimH</i> 161(22*)	.	A	C	.	C	.	.	G	C	.	T	.	A	T	C	T	.	.	.	T	.	G	A	.	A	T
<i>fimH</i> 379(22*)	.	A	C	.	C	.	.	G	C	G	T	T	A	T	C	T	.	.	.	T	.	G	A	.	A	T
<i>fimH</i> 298(22*)	.	A	C	.	C	.	.	T	G	C	.	T	A	T	C	T	G	A	.	A	T
Cambio de aminoácidos				A-T			A-V			T-A		G-R G-C	S-N						A-V	T- M				A-V		
Posición aminoácidos				18			27			51		66	78							106	110				119	



TABLA 54. Prevalencia, tipo de enzima, serotipo y grupo filogenético de las cepas de *E. coli* bacteriémicas productoras de BLEE distribuidas en los períodos 1989-2005 y 2006-2011.

Año	Nº de cepas	Cepas BLEE	Tipo de BLEE	Serotipo (Grupo Filogenético)
1989-2000	975	0	0	0
2001	120	1 (1%)	1 CTX-M-14	O2:H5 (B2)
2002	93	0		
2003	90	1 (1%)	1 CTX-M-14	O15:H1 (D)
2004	199	3 (2%)	1 CTX-M-14 1 CTX-M-9 1 CTX-M-1	O105:H21 (B1) O144:H- (B1) O15:H- (D)
2005	183	3 (2%)	2 CTX-M-32 1 CTX-M-14	O25a:H25 (D), O25a:H- (D) O8:H11 (A)
1989-2005	1.660	8 (0,5%)		
2006	190	8 (4%)	2 CTX-M-15 5 CTX-M-14 1 CTX-M-32	2 O25b:H4 (B2) O8:H7 (B1), O23:H- (B1), O25b:H4 (B2), O102:H6 (D), O153:H34 (D) O2:H4 (B2)
2007	231	8 (4%)	5 CTX-M-15 1 CTX-M-14 1 CTX-M-9 1 CTX-M-1	5 O25b:H4 (B2) ONT:H4 (A) ONT:H10 (B1) O8:HNT (B1)
2008	276	15 (5%)	6 CTX-M-15 7 CTX-M-14 1 CTX-M-9 1 CTX-M-1	O20:H9 (A), O20:H30 (B1), 4 O25b:H4 (B2) 2 ONT:H- (B1), ONT:H25 (B1), ONT:H51 (B1), ONT:H5 (B2), O1:H- (D), ONT:H18 (D) O25b:H4 (B2) ONT:H16 (B1)
2009	289	14 (5%)	10 CTX-M-15 3 CTX-M-14 1 CTX-M-32	10 O25b:H4 (B2) 3 O15:H1 (D) O101:H10 (A)
2010	301	17 (6%)	6 CTX-M-15 8 CTX-M-14 1 CTX-M-9 2 SHV-12	3 O25b:H4 (B2), O8:H6 (D), O130:H6 (D), ONT:H6 (D) O7:H4 (A), O9:H4 (A), O101:H10 (A), O153:H19 (A), O91:28(B1), O2:H- (B2), O16:H5 (B2), O77:H18 (D) O25b:H4 (B2) O68:H21 (B1), ONT:H- (A)
2011	313	26 (8%)	11 CTX-M-15 8 CTX-M-14 5 CTX-M-1 2 SHV-12	11 O25b:H4 (B2) O7:H4 (A), O8:H4 (A), O9:H4 (A), O11:H9 (A), O8:H7 (B1), O23:H28 (B1), O153:H34 (D), ONT:H34 (D) ONT:H- (A), O9:H4 (B1), O54:H21 (B1), ONT:H25 (B1), O153:H15(D) O25b:H4 (B2), O2:H- (D)
2006-2011	1.600	88 (6%)		
Total	3.260	96 (3%)		

El valor de P fue obtenido mediante la prueba de Chi-cuadrado.
P = <0,001 (1989-2005 versus 2006-2011, cepas BLEE).

TABLA 55. Distribución de las cepas de *E. coli* bacteriémicas productoras de BLEE en relación al grupo filogenético y grupos clonales.

Tipo de BLEE	N° de cepas		Grupo Filogenético				ST131	no-ST131	Valor de P
	BLEE n=96 (%)	A n=14	B1 n=19	B2 n=44	D n=19	ST131 vs no-ST131			
CTX-M-15	40 (42)	1	1	35	3	35 (88)	5 (9)	<0,001	
CTX-M-14	36 (38)	10	10	5	11	2 (5)	34 (61)	<0,001	
CTX-M-32	4 (4)	1	0	1	2	0	4 (7)		
CTX-M-9	4 (4)	0	2	2	0	2 (5)	2 (4)		
CTX-M-1	8 (8)	1	5	0	2	0	8 (14)	0,010	
SHV-12	4 (4)	1	1	1	1	1 (3)	3 (5)		

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



TABLA 56. *E. coli* bacteriémicas productoras de BLEE en relación al serogrupo, grupo filogenético, tipo de BLEE y serotipo.

Cepas BLEE n=96	Serogrupo	Grupo Filogenético	Tipo de BLEE	Serotipo
1	O1	D	1 CTX-M-14	O1:H-
3	O2	B2	2 CTX-M-14 1 CTX-M-32	O2:H5, O2:H- O2:H4
1	O2	D	1 SHV-12	O2:H-
2	O7	A	2 CTX-M-14	O7:H4
2	O8	A	2 CTX-M-14	O8:H4, O8:H11
3	O8	B1	2 CTX-M-14 1 CTX-M-1	O8:H7 O8:HNT
1	O8	D	1 CTX-M-15	O8:H6
2	O9	A	2 CTX-M-14	O9:H4
1	O9	B1	1 CTX-M-1	O9:H4
1	O11	A	1 CTX-M-14	O11:H9
5	O15	D	4 CTX-M-14 1 CTX-M-1	O15:H1 (GC-O15) O15:H-
1	O16	B2	1 CTX-M-14	O16:H5 (ST131)
1	O20	A	1 CTX-M-15	O20:H9
1	O20	B1	1 CTX-M-15	O20:H30
2	O23	B1	2 CTX-M-14	O23:H28, O23:H-
2	O25	D	2 CTX-M-32	O25:H25, O25:H-
39	O25	B2	35 CTX-M-15 2 CTX-M-9 1 CTX-M-14, 1 SHV-12	O25:H4 (ST131)
1	O54	B1	1 CTX-M-1	O54:H21
1	O68	B1	1 SHV-12	O68:H21
1	O77	D	1 CTX-M-14	O77:H18 (GCA)
1	O91	B1	1 CTX-M-14	O91:H28
2	O101	A	1 CTX-M-14 1 CTX-M-32	O101:H10
1	O102	D	1 CTX-M-14	O102:H6
1	O105	B1	1 CTX-M-14	O105:H21
1	O130	D	1 CTX-M-15	O130:H6
1	O144	B1	1 CTX-M-9	O144:H-
1	O153	A	1 CTX-M-14	O153:H19
3	O153	D	2 CTX-M-14 1 CTX-M-1	O153:H34 O153:H15
3	ONT	A	1 CTX-M-14 1 CTX-M-1 1 SHV-12	ONT:H4 ONT:H- ONT:H-
7	ONT	B1	4 CTX-M-14 1 CTX-M-9 2 CTX-M-1	ONT:H25, ONT:H51, (2) ONT:H- ONT:H10 ONT:H16, ONT:H25
1	ONT	B2	1 CTX-M-14	ONT:H5
3	ONT	D	2 CTX-M-14 1 CTX-M-15	ONT:H18 (GCA), ONT:H34 ONT:H6

TABLA 57. Caracterización de los genes de virulencia de las cepas de *E. coli* bacteriémicas en relación al tipo de BLEE.

Genes	Tipo de BLEE										Valor de P CTX-M-15 vs CTX-M-14	
	CTX-M-15 n=40	CTX-M-14 n=36	CTX-M-32 n=4	CTX-M-9 n=4	CTX-M-1 n=8	SHV-12 n=4	CTX-M-15 vs CTX-M-14	CTX-M-15 vs CTX-M-14	CTX-M-15 vs CTX-M-14	CTX-M-15 vs CTX-M-14		
Adhesinas												
<i>fimH</i>	40 (100)	34 (94)	4 (100)	4 (100)	8 (100)	4 (100)	4 (100)	8 (100)	4 (100)	4 (100)	0,008	
<i>fimA</i> _{VMT78}	0	6 (17)	1 (25)	0	2 (25)	0	0	2 (25)	1 (25)	1 (25)		
<i>papEF</i>	9 (22)	10 (28)	2 (50)	1 (25)	0	1 (25)	0	0	1 (25)	1 (25)		
<i>papGI</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>papG</i> II	9 (22)	7 (19)	2 (50)	0	0	0	0	0	0	0		
<i>papG</i> III	0	0	0	1 (25)	0	1 (25)	0	0	1 (25)	1 (25)		
<i>papG</i> IV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>papG</i> NT	0	3 (8)	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>sfa/focDE</i>	0	1 (3)	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>afa/draBC</i>	26 (65)	1 (3)	0	0	0	0	0	0	0	0	<0,001	
<i>afa</i> FM955459	26 (65)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<0,001	
Toxinas												
<i>cnf1</i>	4 (10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>cnf2</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>cdtB</i>	0	0	0	1 (25)	0	0	0	0	0	0		
<i>cdtB1</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>cdtB3</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>cdtB4</i>	0	0	0	1 (25)	0	0	0	0	0	0		
<i>sat</i>	38 (95)	7 (19)	0	0	0	0	0	0	0	0	<0,001	
<i>hlyA</i>	4 (10)	0	0	1 (25)	0	0	0	0	0	0		
Sideróforos												
<i>iucD</i>	38 (95)	28 (78)	3 (75)	3 (75)	4 (50)	3 (75)	3 (75)	4 (50)	3 (75)	3 (75)	0,028	
<i>iroN</i>	2 (5)	10 (28)	1 (25)	3 (75)	3 (38)	3 (75)	3 (75)	3 (38)	3 (75)	3 (75)	0,007	

Continuación de la TABLA 57

Genes	CTX-M-15 n=40	CTX-M-14 n=36	CTX-M-32 n=4	CTX-M-9 n=4	CTX-M-1 n=8	SHV-12 n=4	Valor de P CTX-M-15 vs CTX-M-14
Cápsula							
<i>kpsM II</i>	38 (95)	15 (42)	2 (50)	2 (50)	1 (12)	2 (50)	<0,001
<i>kpsM II-K2</i>	26 (65)	1 (3)	0	0	0	0	<0,001
<i>kpsM II-K5</i>	12 (30)	13 (36)	1 (25)	1 (25)	1 (12)	1 (25)	
<i>neuC-K1</i>	0	1 (3)	1 (25)	1 (25)	0	1 (25)	
<i>kpsM III</i>	0	2 (6)	0	0	1 (12)	0	
Varios							
<i>cvaC</i>	1 (2)	10 (28)	1 (25)	2 (50)	1 (12)	2 (50)	0,002
<i>iss</i>	2 (5)	7 (19)	1 (25)	3 (75)	3 (38)	4 (100)	
<i>traT</i>	17 (42)	23 (64)	3 (75)	3 (75)	6 (75)	4 (100)	
<i>ibeA</i>	0	6 (17)	0	2 (50)	0	1 (25)	0,008
<i>malX (PAI)</i>	38 (95)	10 (28)	3 (75)	2 (50)	0	2 (50)	<0,001
<i>usp</i>	35 (88)	9 (25)	1 (25)	2 (50)	0	1 (25)	<0,001
<i>tsh</i>	1 (2)	5 (14)	0	2 (50)	0	2 (50)	
Estatus ExPEC	38 (95)	16 (44)	3 (75)	2 (50)	1 (12)	2 (50)	<0,001
≥8 Genes	15 (38)	5 (14)	0	2 (50)	0	2 (50)	0,017

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

Resultados

TABLA 58. Genes de virulencia de las cepas de *E. coli* bacteriémicas productoras de BLEE del grupo clonal ST131 y de otros grupos clonales (no-ST131).

Genes	Nº de cepas BLEE n=96 (%)	ST131 n=40	no-ST131 n=56	Valor de P ST131 vs no-ST131
Adhesinas				
<i>fimH</i>	94 (98)	39 (98)	55 (98)	
<i>fimA</i> _{MT78}	10 (10)	0	10 (18)	0,003
<i>papEF</i>	23 (24)	10 (25)	13 (23)	
<i>papG</i> I	0	0	0	
<i>papG</i> II	18 (19)	9 (23)	9 (16)	
<i>papG</i> III	2 (2)	1 (3)	1 (2)	
<i>papG</i> IV	0	0	0	
<i>papG</i> NT	3 (3)	0	3 (5)	
<i>sfa/focDE</i>	1 (1)	0	1 (2)	
<i>afa/draBC</i>	27 (28)	27 (68)	0	<0,001
<i>afa</i> FM955459	26 (27)	26 (65)	0	<0,001
Toxinas				
<i>cnf1</i>	4 (4)	4 (10)	0	0,027
<i>cnf2</i>	0	0	0	
<i>cdtB</i>	1 (1)	1 (3)	0	
<i>cdtB1</i>	0	0	0	
<i>cdtB3</i>	0	0	0	
<i>cdtB4</i>	1 (1)	1 (3)	0	
<i>sat</i>	45 (47)	37 (93)	8 (14)	<0,001
<i>hlyA</i>	5 (5)	4 (10)	1 (2)	
Sideróforos				
<i>iucD</i>	79 (82)	38 (95)	41 (73)	0,004
<i>iroN</i>	22 (23)	4 (10)	18 (32)	0,009
Cápsula				
<i>kpsM</i> II	60 (62)	39 (98)	21 (38)	<0,001
<i>kpsM</i> II-K2	27 (28)	26 (65)	1 (2)	<0,001
<i>kpsM</i> II-K5	29 (30)	11 (28)	18 (32)	
<i>neuC</i> -K1	4 (4)	2 (5)	2 (4)	
<i>kpsM</i> III	3 (3)	0	3 (5)	
Varios				
<i>cvaC</i>	17 (18)	3 (8)	14 (25)	0,023
<i>iss</i>	20 (21)	4 (10)	16 (29)	0,022
<i>traT</i>	56 (58)	17 (43)	39 (70)	0,007
<i>ibeA</i>	9 (9)	3 (8)	6 (11)	
<i>malX</i> (PAI)	55 (57)	40 (100)	15 (27)	<0,001
<i>usp</i>	48 (50)	40 (100)	8 (14)	<0,001
<i>tsh</i>	10 (10)	2 (5)	8 (14)	
Estatus ExPEC	62 (64)	39 (98)	23 (41)	<0,001
≥8 Genes	24 (25)	18 (45)	6 (11)	<0,001

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

TABLA 59. Cepas del grupo clonal O25:H4-ST131 productoras y no productoras de BLEE en relación a los alelos *fimH* y la resistencia a la ciprofloxacina.

	Grupo clonal O25:H4-ST131		
	Cepas ST131 BLEE n=39	Cepas ST131 no-BLEE n=111	Total
<i>FimH30</i>			n = 96
Resistente a la ciprofloxacina	35 (90%) CTX-M-15	57 (51%)	92 (96%)
Sensible a la ciprofloxacina	0	4 (4%)	4 (4%)
<i>FimH22</i>			n = 45
Resistente a la ciprofloxacina	1 (3%) SHV-12	2 (2%)	3 (7%)
Sensible a la ciprofloxacina	2 (5%) CTX-M-9	40 (36%)	42 (93%)
Otros <i>FimH</i>			n = 9
Resistente a la ciprofloxacina	0	2 (2%)	2 (22%)
Sensible a la ciprofloxacina	1 (3%) CTX-M-14	6 (5%)	7 (78%)
Total	39 (26%)	111 (74%)	150 (100%)

Resultados

TABLA 60. Distribución de cepas bacteriémicas del grupo clonal ST131 resistentes a la ciprofloxacina, productoras de BLEE, del alelo *fimH30* y subclón H30-Rx en los años 1989 a 2011.

Año	Nº de Cepas	Cepas del grupo clonal ST131 (%)						
		Nº total O25+O16	O25:H4 CIP-R	O25:H4 CIP-R BLEE	O25:H4 <i>fimH30</i>	O25:H4 CIP-R <i>fimH30</i>	O25:H4 H30-Rx	O25:H4 CIP-R CTX-M-15 H30-Rx
1989	24	0	0	0	0		0	0
1990	7	0	0	0	0		0	0
1991	39	0	0	0	0		0	0
1992	57	0	0	0	0		0	0
1993	86	1 (1)	0	0	0		0	0
1994	67	0	0	0	0		0	0
1995	60	0	0	0	0		0	0
1996	83	0	0	0	0		0	0
1997	113	0	0	0	0		0	0
1998	145	3 (2)	0	0	0		0	0
1999	152	4 (3)	0	0	0		0	0
2000	142	0	0	0	0		0	0
2001	120	1 (1)	0	0	1 (1)		0	0
2002	93	1 (1)	0	0	0		0	0
2003	90	2 (2)	0	0	0		0	0
2004	199	6 (3)	1 (1)	0	2 (1)	1 (1)	0	0
1989-2004	1.477	18 (1)	1 (0,1)	0	3 (0,2)	1 (0,1)	0	0
2005	183	13 (7)	7 (4)	0	7 (4)	7 (4)	0	0
2006	190	7 (4)	6 (3)	2 (1)	6 (3)	6 (3)	2 (1)	2 (1)
2007	231	21 (9)	15 (7)	5 (2)	16 (7)	15 (6)	6 (3)	5 (2)
2008	276	22 (8)	17 (6)	4 (1)	14 (5)	14 (5)	5 (2)	4 (1)
2009	289	24 (8)	17 (6)	10 (4)	16 (6)	16 (6)	10 (3)	10 (4)
2010	301	29 (10)	13 (4)	3 (1)	14 (5)	13 (4)	7 (2)	3 (1)
2011	313	23 (7)	21 (7)	12 (4)	20 (6)	20 (6)	15 (5)	11 (4)
2005-2011	1.783	139 (8)	96 (5)	36 (2)	93 (5)	91 (5)	45 (3)	35 (2)
TOTAL	3.260	157 (5)	97 (3)	36 (1)	96 (3)	92 (3)	45 (1)	35 (1)

El valor de P fue obtenido mediante la prueba de Chi-cuadrado. Únicamente se muestran si son estadísticamente significativos (P<0,05).

P = <0,001 (1989-2004 *versus* 2005-2011, total de cepas ST131).

P = <0,001 (1989-2004 *versus* 2005-2011, cepas O25:H4 resistentes a la ciprofloxacina).

P = <0,001 (1989-2004 *versus* 2005-2011, cepas O25:H4 resistentes a la ciprofloxacina + BLEE).

P = <0,001 (1989-2004 *versus* 2005-2011, cepas O25:H4 alelo *fimH30*).

P = <0,001 (1989-2004 *versus* 2005-2011, cepas O25:H4 resistentes a la ciprofloxacina + H30).

P = <0,001 (1989-2004 *versus* 2005-2011, cepas O25:H4 subclón H30-Rx).

P = <0,001 (1989-2004 *versus* 2005-2011, cepas O25:H4 resistentes a la ciprofloxacina + BLEE+H30-Rx).

CIP-R= ciprofloxacina resistente.

TABLA 61. Distribución de los subelones H30, H30-Rx, H30 no-Rx, H22 y H41 del grupo clonal ST131 de cepas de *E. coli* bacteriémicas resistentes a la ciprofloxacina por anualidad.

Año	Cepas del grupo clonal ST131 (%)					
	Nº total O25+O16 n=157 ^a	O25:H4 <i>fimH30</i> n=96	O25:H4 H30-Rx n=45	O25:H4 H30 no-Rx n=51	O25:H4 <i>fimH22</i> n=45	O16:H5 <i>fimH41</i> n=7
1989	0	0	0	0	0	0
1990	0	0	0	0	0	0
1991	0	0	0	0	0	0
1992	0	0	0	0	0	0
1993	1 (1)	0	0	0	1 (Vir-D1)	0
1994	0	0	0	0	0	0
1995	0	0	0	0	0	0
1996	0	0	0	0	0	0
1997	0	0	0	0	0	0
1998	3 (2)	0	0	0	2 (1 Vir-D1 y 1 Vir-D3)	0
1999	4 (3)	0	0	0	4 (2 Vir-D1 y 2 Vir-D3)	0
2000	0	0	0	0	0	0
2001	1 (1)	1 (Vir-C)	0	1 (Vir-C)	0	0
2002	1 (1)	0	0	0	1 (Vir-D3)	0
2003	2 (1)	0	0	0	2 (1 Vir-D2 y 1 Vir-D3)	0
2004	6 (4)	2 (1 Cip-R y Vir-C) (1 Vir-C)	0	2 (1 Cip-R y Vir-C) (1 Vir-C)	4 (2 Vir-D1, 1 Vir-D2 y 1 Vir-D3)	0
2005	13 (8)	7 (7 Cip-R, 6 Vir-C y 1 Vir-NT)	0	7 (7 Cip-R, 6 Vir-C y 1 Vir-NT)	4 (1 Vir-D1, 1 Vir-D2 y 2 Vir-D3)	1 (Vir-NT)
2006	7 (4)	6 (2 CTX-M-15, Cip-R y Vir-A) (4 Cip-R y Vir-C)	2 (2 CTX-M-15, Cip-R y Vir-A)	4 (4 Cip-R y Vir-C)	0	0
2007	21 (13)	16 (5 CTX-M-15, Cip-R y Vir-A) (10 Cip-R, 9 Vir-C y 1 Vir-B) (1 Vir-C)	6 (5 CTX-M-15, Cip-R y Vir-A) (1 Cip-R y Vir-C)	10 (9 Cip-R, 8 Vir-A y 1 Vir-B) (1 Vir-C)	4 (2 Vir-D2, 1 Vir-D3 y 1 Vir-D4)	0
2008	22 (14)	14 (4 CTX-M-15, Cip-R y Vir-A) (10 Cip-R, 1 Vir-A, 1 Vir-B, 7 Vir-C y 1 Vir-NT)	5 (4 CTX-M-15, Cip-R y Vir-A) (1 Cip-R y Vir-A)	9 (9 Cip-R, 1 Vir-B, 7 Vir-C y 1 Vir-NT)	6 (1 CTX-M-9 y Vir-D2) (3 Vir-D2) (2 Cip-R, 1 Vir-D2 y 1 Vir-D4)	0
2009	24 (15)	16 (10 CTX-M-15, Cip-R y Vir-A) (6 Cip-R, 4 Vir-C y 2 Vir-B)	10 (10 CTX-M-15, Cip-R y Vir-A)	6 (6 Cip-R, 2 Vir-B y 4 Vir-C)	6 (1 Vir-D1, 2 Vir-D2, 2 Vir-D3, 1 Vir-D5)	1 (1 Cip-R y Vir-C)
2010	29 (19)	14 (3 CTX-M-15, Cip-R y Vir-A) (10 Cip-R, 4 Vir-A y 6 Vir-C) (1 Vir-NT)	7 (3 CTX-M-15, Cip-R y Vir-A) (4 Cip-R y Vir-A)	7 (6 Cip-R y Vir-C) (1 Vir-NT)	10 (1 CTX-M-9 y Vir-D4) (4 Vir-D2, 2 Vir-D4 y 3 Vir-D5)	4 (1 CTX-M-14, Cip-R y Vir-C) (2 Vir-C y 1 Vir-NT)
2011	23 (15)	20 (11 CTX-M-15, Cip-R, 3 Vir-A, 3 Vir-E y 5 Vir-F) (9 Cip-R, 3 Vir-A, 5 Vir-C y 1 Vir-F)	15 (11 CTX-M-15, Cip-R, 3 Vir-A, 3 Vir-E y 5 Vir-F) (4 Cip-R, 3 Vir-A y 1 Vir-F)	5 (5 Cip-R y Vir-C)	1 (1 SHV-12, Cip-R y Vir-D4)	1 (Vir-C)
Total Cip-R	99 (63)	92 (96)	45 (100)	47 (92)	3 (7)	2 (29)
Tipo de BLEE	40 (26)	35 CTX-M-15	35 CTX-M-15	0	2 CTX-M-9 1 SHV-12	1 CTX-M-14

TABLA 62. Resistencia a antimicrobianos en *E. coli* del grupo clonal ST131. Comparación entre los serotipos O16:H5, O25:H4 y virotipos.

Resistencia	ST131 O16:H5 n = 7	ST131 O25:H4 n = 150	Virotipos del grupo clonal O25:H4 (%)										
			A n = 34	B n = 4	C n = 47	D n = 51	E n = 4	F n = 6	NT n = 4	Valor de P A vs C	Valor de P A vs D	Valor de P C vs D	
Ciprofloxacina	2 (29)	97 (65)	34 (100)	4 (100)	43 (91)	4 (8)	4 (100)	6 (100)	2 (50)	<0,001	<0,001	<0,001	
Trimetoprim/Sulfametoxazol	1 (14)	64 (43)	30 (88)	1 (25)	11 (23)	18 (35)	2 (50)	0	2 (50)	<0,001	<0,001		
Aminoglucósidos (Gentamicina, tobramicina y/o amikacina)	3 (43)	56 (37)	22 (65)	1 (25)	23 (49)	3 (6)	2 (50)	3 (50)	2 (50)	<0,001	<0,001	<0,001	
Amoxicilina/Acido clavulánico	1 (14)	18 (12)	5 (15)	1 (25)	4 (9)	6 (12)	0	1 (17)	1 (25)				
Cefalosporinas de espectro extendido (cefepima, cefotaxima y/o ceftazidima)	1 (14)	37 (25)	22 (65)	0	1 (2)	5 (10)	4 (100)	5 (83)	0	<0,001	<0,001		
Multirresistentes a 3 o más familias	1 (14)	43 (29)	27 (79)	0	6 (13)	4 (8)	3 (75)	3 (50)	0	<0,001	<0,001		
Multirresistentes a únicamente 2 familias	1 (14)	42 (28)	3 (9)	3 (75)	25 (53)	4 (8)	1 (25)	2 (33)	4 (100)	<0,001	<0,001	<0,001	
Resistentes a una sola familia	3 (43)	34 (23)	4 (12)	1 (25)	14 (30)	14 (27)	0	1 (17)	0	0,046			
Total resistentes	5 (71)	119 (79)	34 (100)	4 (100)	45 (96)	22 (43)	4 (100)	6 (100)	4 (100)	<0,001	<0,001	<0,001	
Productores de BLEE	1 (14)	39 (26)	26 (76)	0	1 (2)	3 (6)	4 (100)	5 (83)	0	<0,001	<0,001		
Productores de TEM-1	5 (71)	79 (53)	1 (3)	4 (100)	40 (85)	27 (53)	3 (75)	0	4 (100)	<0,001	<0,001	<0,001	

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



TABLA 63. Resistencias a antimicrobianos en cepas de *E.coli* aisladas de hemocultivos de pacientes del HULA. Comparación entre aislados históricos y recientes.

Resistencia	Nº (%) de <i>E.coli</i> de hemocultivos	
	1989-1993 n = 213	2010-2011 n = 614
Ciprofloxacina	3 (1)	189 (31)
Trimetoprim/Sulfametoxazol	29 (14)	208 (34)
Aminoglucósidos (Gentamicina, tobramicina y/ó amikacina)	1 (0.5)	106 (17)
Amoxicilina/Ácido clavulánico	6 (3)	83 (14)
Cefalosporinas de espectro extendido (Cefepima, cefotaxima, ceftazidima)	1 (0.5) ^a	52 (8)^b
Multirresistentes a 3 o más familias	0	101 (16)
Multirresistentes a únicamente 2 familias	5 (2)	81 (13)
Resistentes a una sola familia	33 (16)	120 (20)
Total resistentes	38 (18)	302 (49)

En negrilla se señalan los resultados estadísticamente significativos ($P < 0,05$). El valor de P fue obtenido mediante la prueba de Fisher.

^aNo se detectaron cepas de *E.coli* productoras de BLEE.

^bSe identificaron 41 (7%) cepas de *E. coli* productoras de BLEE.



TABLA 64. Resistencias a antimicrobianos en cepas de *E. coli* aisladas recientemente (2010-2011) de hemocultivos de pacientes del HULA. Comparación entre diferentes grupos filogenéticos.

Resistencia	Grupos filogenéticos			
	A n = 156	B1 n = 82	B2 n = 252	D n = 124
Ciprofloxacina	86 (55)	31 (38)	37 (15)	35 (28)
Trimetoprim/Sulfametoxazol	84 (54)	29 (35)	43 (17)	52 (42)
Aminoglucósidos (Gentamicina, tobramicina y/ó amikacina)	52 (33)	12 (15)	22 (8)	20 (16)
Amoxicilina/Ácido clavulánico	46 (29)	4 (5)	19 (8)	14 (1)
Cefalosporinas de espectro extendido (Cefepima, cefotaxima, ceftazidima)	16 (10)	8 (10)	18 (7)	10 (8)
Multirresistentes a 3 o más familias	60 (38)	8 (10)	14 (6)	19 (15)
Multirresistentes a únicamente 2 familias	23 (15)	18 (22)	20 (8)	20 (16)
Resistentes a una sola familia	21 (13)	23 (28)	50 (19)	26 (21)
Total resistentes	104 (67)	49 (60)	84 (33)	65 (62)
Productores de BLEE	10 (6)	7 (9)	18 (7)	7 (6)

En negrilla se señalan los resultados estadísticamente significativos ($P < 0,05$). El valor de P fue obtenido mediante la prueba de Fisher.

TABLA 65. Resistencias a antimicrobianos en cepas de *E. coli* aisladas recientemente (2010-2011) de hemocultivos de pacientes del HULA. Cepas del grupo filogenético A de diferentes serogrupos.

Nº de cepa	O	CIP	SXT	AMINO	AMC	CEE	BLEE	R3	R2	R1	R
4	O5	0	1	1	1	0	0	0	1	1	2 (50)
6	O7	6	5	1	0	2	2	2	3	1	6 (100)
38	O8	28	31	22	18	6	1	25	4	5	34 (89)
25	O9	18	17	8	14	2	2	13	5	4	22 (88)
3	O11	2	2	2	0	1	1	2	0	0	2 (67)
3	O45	0	2	0	0	0	0	0	0	2	2 (67)
5	O78	2	2	1	0	0	0	1	0	2	3 (60)
16	O101	14	10	6	3	1	1	6	5	4	15 (94)
31	ONT	12	9	10	9	2	2	10	2	0	12 (39)

O = serogrupo O, ONT = serogrupo O no tipable, CIP = resistencia a ciprofloxacina, SXT = resistencia trimetoprim/sulfametoxazol, AMINO = resistencia a aminoglucósidos, AMC = resistencia a amoxicilina/ácido clavulánico, CEE = resistencia a cefalosporinas de espectro extendido, BLEE = producción de β -lactamasas de espectro extendido, R3= Resistencia a antimicrobianos de 3 o más familias, R2 = Resistencia a antimicrobianos de 2 familias, R1 = Resistencia a antimicrobianos de una única familia, R = Total resistentes.

En negrilla se señalan los resultados estadísticamente significativos ($P < 0,05$). El valor de P fue obtenido mediante la prueba de Fisher.

TABLA 66. Resistencias a antimicrobianos en cepas de *E. coli* aisladas recientemente (2010-2011) de hemocultivos de pacientes del HULA. Cepas del grupo filogenético B1 de diferentes serogrupos.

Nº de cepa	O	CI P	SXT	AMINO	AMC	CEE	BLEE	R3	R2	R1	R
20	O8	8	7	2	2	1	1	2	3	8	13 (65)
9	O9	1	7	3	0	1	1	0	4	4	8 (89)
4	O23	1	2	1	0	1	1	1	0	1	2 (50)
23	ONT	12	7	2	2	2	1	3	5	6	14 (61)

O = serogrupo O, ONT = serogrupo O no tipable, CIP = resistencia a ciprofloxacina, SXT = resistencia trimetoprim/sulfametoxazol, AMINO = resistencia a aminoglucósidos, AMC = resistencia a amoxicilina/ácido clavulánico, CEE = resistencia a cefalosporinas de espectro extendido, BLEE = producción de β -lactamasas de espectro extendido, R3= Resistencia a antimicrobianos de 3 o más familias, R2 = Resistencia a antimicrobianos de 2 familias, R1 = Resistencia a antimicrobianos de una única familia, R = Total resistentes.

En negrilla se señalan los resultados estadísticamente significativos ($P < 0,05$). El valor de P fue obtenido mediante la prueba de Fisher.

Resultados

TABLA 67. Resistencias a antimicrobianos en cepas de *E. coli* aisladas recientemente (2010-2011) de hemocultivos de pacientes del HULA. Cepas del grupo filogenético B2 de diferentes serogrupos.

Nº de cepa	O	CIP	SXT	AMINO	AMC	CEE	BLEE	R3	R2	R1	R
11	O1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1 (9)
34	O2	0	2	0	2	1	1	0	0	5	5 (15)
19	O4	0	4	0	5	0	0	0	2	6	8 (42)
52	O6	1	3	0	2	0	0	0	1	4	5 (10)
5	O16 ST131	1	1	3	0	1	1	1	1	1	3 (60)
15	O18	0	4	0	0	0	0	0	0	4	4 (22)
5	O22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	O25a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
47	O25b ST131	34	21	16	7	16	16	13	16	15	44 (94)
6	O45	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1 (17)
10	O75	0	2	0	1	0	0	0	0	3	3 (30)
6	O83	0	2	1	0	0	0	0	0	3	3 (50)

O = serogrupo O, ONT = serogrupo O no tipable, CIP = resistencia a ciprofloxacina, SXT = resistencia trimetoprim/sulfametoxazol, AMINO = resistencia a aminoglucósidos, AMC = resistencia a amoxicilina/ácido clavulánico, CEE = resistencia a cefalosporinas de espectro extendido, BLEE = producción de β -lactamasas de espectro extendido, R3= Resistencia a antimicrobianos de 3 o más familias, R2 = Resistencia a antimicrobianos de 2 familias, R1 = Resistencia a antimicrobianos de una única familia, R = Total resistentes.

En negrilla se señalan los resultados estadísticamente significativos ($P < 0,05$). El valor de P fue obtenido mediante la prueba de Fisher.

TABLA 68. Resistencias a antimicrobianos en cepas de *E. coli* aisladas recientemente (2010-2011) de hemocultivos de pacientes del HULA. Cepas del grupo filogenético D de diferentes serogrupos, incluidos los grupos clonales A y O15.

Nº de cepa	O	CIP	SXT	AMINO	AMC	CEE	BLEE	R3	R2	R1	R
24	GCA	3	16	4	1	1	1	2	4	11	17 (71)
16	GCO15	16	12	0	4	0	0	4	8	4	16 (100)
19	O1	3	2	3	1	0	0	2	1	0	3 (16)
6	O2	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1 (17)
5	O7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	O153	4	5	5	1	3	1	4	2	2	8 (80)

O = serogrupo O, ONT = serogrupo O no tipable, CIP = resistencia a ciprofloxacina, SXT = resistencia trimetoprim/sulfametoxazol, AMINO = resistencia a aminoglucósidos, AMC = resistencia a amoxicilina/ácido clavulánico, CEE = resistencia a cefalosporinas de espectro extendido, BLEE = producción de β -lactamasas de espectro extendido, R3= Resistencia a antimicrobianos de 3 o más familias, R2 = Resistencia a antimicrobianos de 2 familias, R1 = Resistencia a antimicrobianos de una única familia, R = Total resistentes.

En negrilla se señalan los resultados estadísticamente significativos ($P < 0,05$). El valor de P fue obtenido mediante la prueba de Fisher.

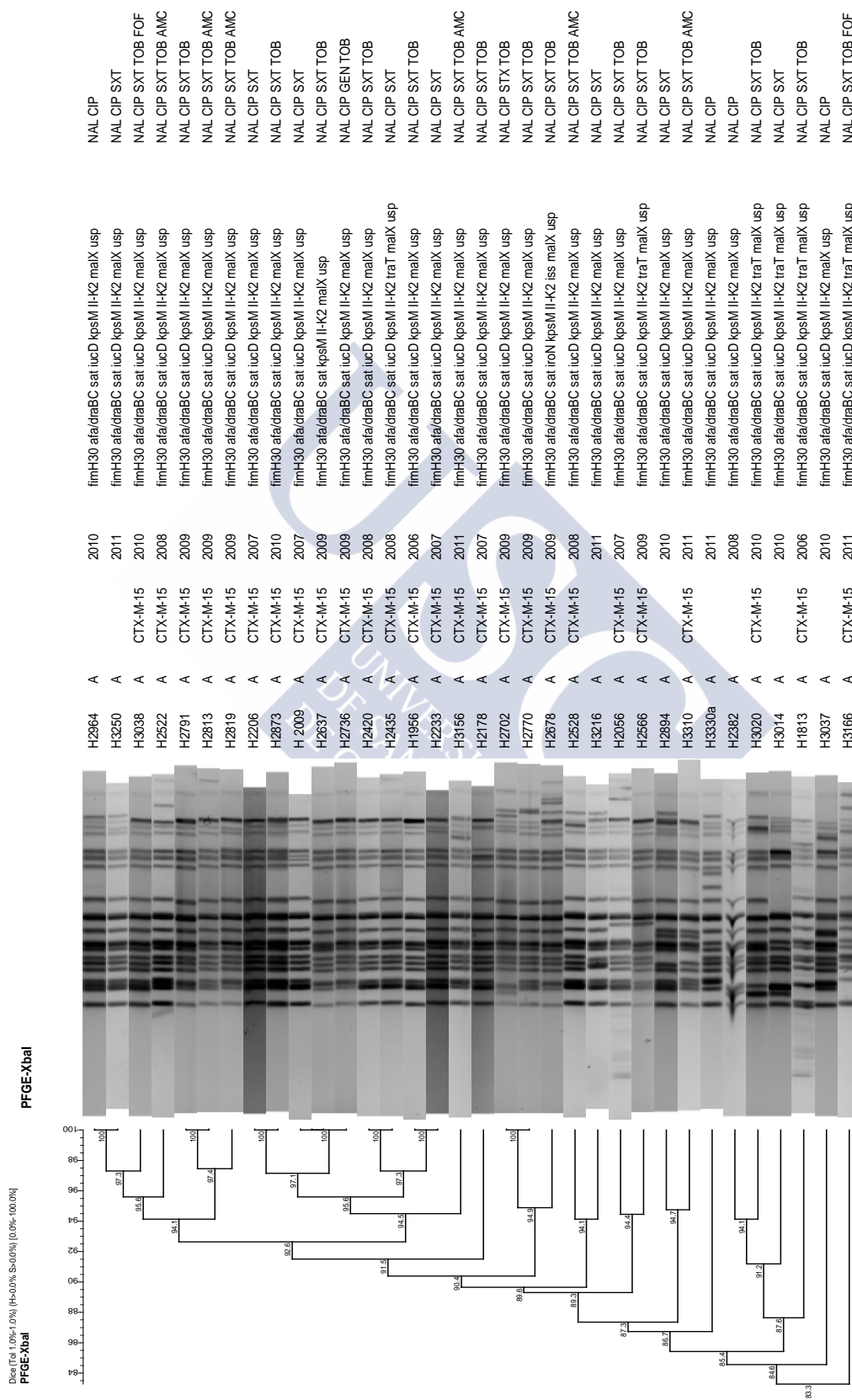


FIGURA 42. Dendrograma del análisis de los perfiles de PFGE-XbaI de las 34 cepas de *E. coli* O25b-ST131 bacteriémicas del virotipo A. A la derecha de la imagen se indica la designación de la cepa (H2964 – H3166), virotipo, tipo de enzima BLEE, año, genes de virulencia y resistencia antimicrobiana. NAL, ácido nalidixico; CIP, ciprofloxacina; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina, FOF, fosfomicina; AMC, amoxicilina-ácido clavulánico.

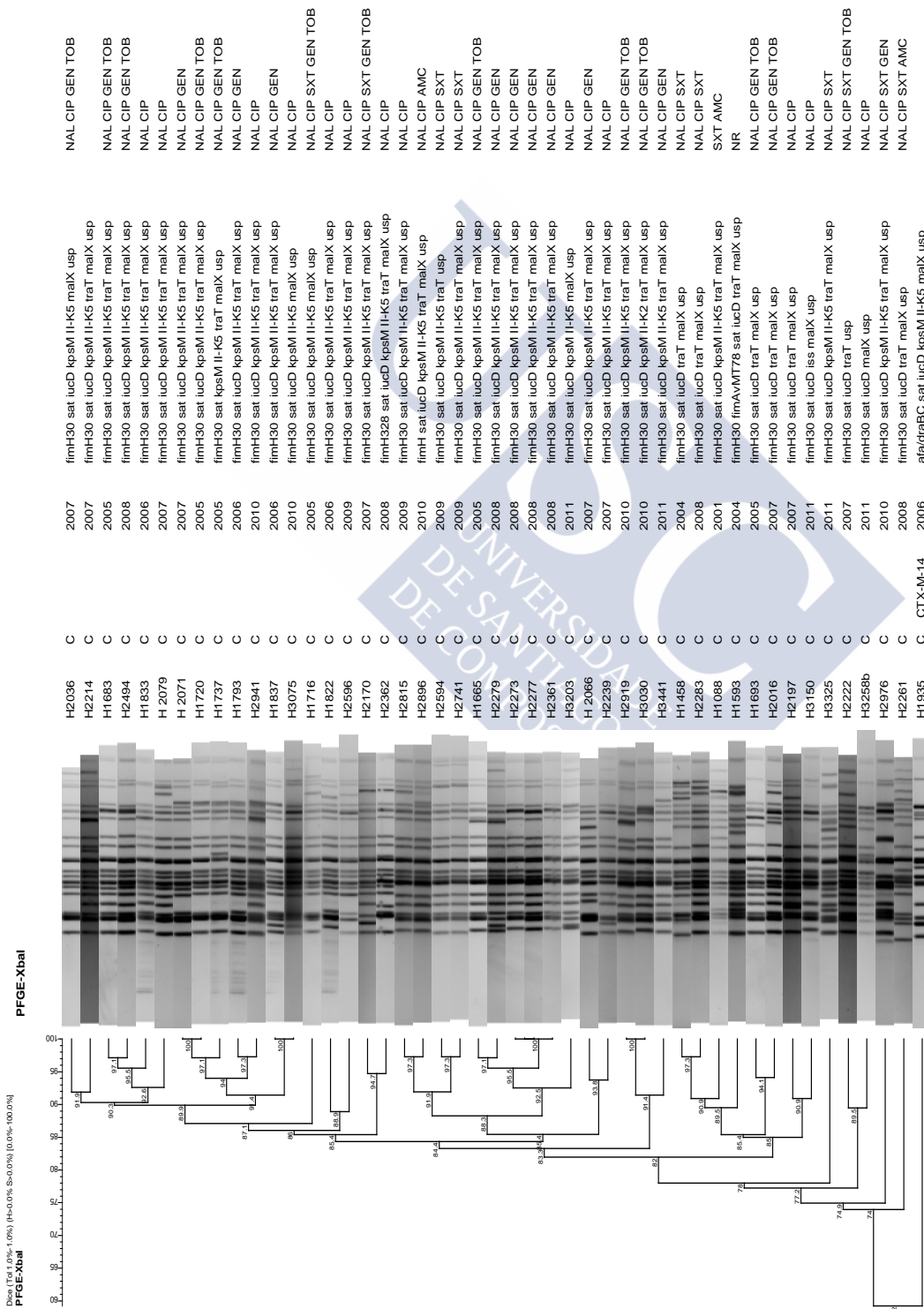


FIGURA 43. Dendrograma del análisis de los perfiles de PFGE-XbaI de las 47 cepas de *E. coli* O25b-ST131 bacteriémicas del virotipo C. A la derecha de la imagen se indica la designación de la cepa (H2036 - H1935), virotipo, tipo de enzima BLEE, año, genes de virulencia y resistencia antimicrobiana. NAL, ácido nalidixico; CIP, ciprofloxacina; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina, FOF, fosfomicina; AMC, amoxicilina-ácido clavulánico.



FIGURA 44. Dendrograma del análisis de los perfiles de PFGE-XbaI de las 51 cepas de *E. coli* O25b-ST131 bacteriémicas del virotipo D. A la derecha de la imagen se indica la designación de la cepa (H2565 – H3345), virotipo, tipo de enzima BLEE, año, genes de virulencia y resistencia antimicrobiana. NAL, ácido nalidixico; CIP, ciprofloxacina; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina, FOF, fosfomicina; AMC, amoxicilina-ácido clavulánico.

5. DISCUSIÓN

5.1. ESTUDIO I: Emergencia de los grupos clonales O1:HNM-D-ST59, O15:H1-D-ST393, O20:H34/HNM-D-ST354, O25b:H4-B2-ST131 y ONT:H21,42-B1-ST101 entre cepas de *E. coli* productoras de CTX-M-14 aisladas en Galicia (2005-2008).

Los resultados obtenidos en el presente estudio confirman que las enzimas CTX-M-14 (51%) y CTX-M-15 (18%) son las más frecuentemente producidas por las cepas BLEE aisladas en Galicia. También se confirma que entre las cepas CTX-M-15 predominan (87%) las del grupo clonal O25b:H4-B2-ST131. Aunque también se confirma que las cepas productoras de CTX-M-14 pertenecen a una amplia variedad de serotipos, observamos la emergencia de 5 grupos clonales que presentan un amplio arsenal de genes de virulencia (Mora *et al.*, 2011a).

En España, Oteo *et al.*, (2009) identificaron un total de 34 diferentes secuencias tipo (STs) entre 41 cepas de *E. coli* CTX-M-14 recogidas en el año 2004 en 11 hospitales entre las que se incluían cepas ST393 del grupo filogenético D, ST101 del grupo filogenético B1 y ST131 del grupo filogenético B2. También en España, Valverde *et al.*, (2009), tras estudiar 61 cepas CTX-M-14 aisladas entre los años 2000 y 2005, identificaron 20 diferentes STs entre las 37 analizadas por MLST, y detectaron cepas ST59 y ST393 del grupo filogenético D. Los grupos clonales ST354-D y ST393-D también se han encontrado recientemente entre cepas productoras de CMY-2 aisladas de pacientes en España (Oteo *et al.*, 2010b) y Francia (Corvec *et al.*, 2010).

5.1.1. Grupo clonal O1:HNM-D-ST59

El serogrupo O1 es uno de los más frecuentemente detectados entre cepas causantes de infecciones extraintestinales en seres humanos y aves. En un estudio reciente de Mora *et al.*, (2009), realizado en el LREC-USC, un total de 59 cepas ExPEC O1:K1:H7/NM (21 de colibacilosis aviar, 15 de meningitis humana, y 23 de ITU y sepsis humana) fueron caracterizadas. Las cepas patógenas aviarias (APEC) y las humanas ExPEC fueron significativamente diferentes en sus grupos filogenéticos, siendo el B2 mucho más prevalente entre cepas aviarias que en las de origen humano (95% *versus* 53%, $P=0,001$), mientras que el grupo filogenético D estaba asociado con las cepas ExPEC de origen humano (47% *versus*

5%, $P=0,0001$). Siete genes de virulencia mostraron una distribución diferente con significación estadística, estando los genes *fimA*_{MT78} y *sat* asociados con las cepas de origen humano. Por MLST, se comprobó que 39 de las 40 cepas del filogrupo B2, and 17 de las 19 pertenecientes al filogrupo D presentaban las secuencias tipo ST95 and ST59, respectivamente.

En el presente estudio se identificaron 10 cepas del grupo clonal O1:HNM-D-ST59 productoras de CTX-M-14 aisladas en 4 diferentes hospitales (Lugo, Ourense, Ferrol, A Coruña) en los años 2005, 2006, 2007 y 2008. La mayoría de las cepas de este grupo clonal tienen una característica combinación de genes de virulencia, destacando los genes *fimA*_{MT78}, *sat*, y *kpsII-K1*.

5.1.2 Grupo clonal O15:H1-D-ST393

Desde su asociación con un brote en el año 1986 en Londres, numerosos estudios han incidido en la importancia clínica del serotipo O15:H1 dentro de las cepas ExPEC resistentes a los antibióticos (Phillips *et al.*, 1988; Cagnacci *et al.*, 2008). Recientemente, Olesen *et al.* (2009), tras realizar un seguimiento epidemiológico durante 3 décadas de las cepas del grupo clonal O15:K52:H1, concluyen que han mantenido su patrón de genes de virulencia pero que han aumentado su resistencia antimicrobiana de forma progresiva. De acuerdo con estos encuentros, nosotros hemos observado que las 5 cepas detectadas en el presente estudio tienen el mismo patrón de genes de virulencia, destacando los genes *fimA*_{MT78}, *papGII*, *sat* y *kpsII-K5*. Estas cepas las encontramos en 2 áreas sanitarias (A Coruña y Lugo) y en 2 años distintos (2005 y 2007).

5.1.3. Grupo clonal O25b:H4-B2-ST131

La emergencia de este grupo clonal se ha asociado con la enzima CTX-M-15 en España y numerosos países. Más tarde también se identificaron cepas de este clon productoras de CTX-M-14 en Canadá y Japón (Pitout *et al.*, 2005b, Suzuki *et al.*, 2009). La primera cepa CTX-M-14 del grupo clonal O25b:H4-B2-ST131 descrita en Europa fue aislada de un paciente en Lugo (Blanco *et al.*, 2009). Ahora también encontramos este tipo de cepas en pacientes de los

hospitales de Ourense y A Coruña en los años 2007 y 2008. Es evidente que existe una diversidad genética elevada entre las cepas de este grupo clonal formando *clusters* diferentes las cepas CTX-M-14 y las CTX-M-15.

5.1.4. Nuevos grupos clonales O20:H34/HNM-D-ST354 y ONT:H21,42-B1-ST101

Según nuestra información, este es uno de los primeros estudios en los que se asocian los grupos clonales O20:H34/HNM-D-ST354 y ONT:H21,42-B1-ST101 con la producción de CTX-M-14, y el primero que se caracterizan para sus genes de virulencia. Previamente, Oteo *et al.*, (2009) identificó 1 cepa ST101-B1 entre 41 productoras de CTX-M-14 aisladas en España y Lee *et al.*, (2010) detectaron 2 cepas ST101-B1 y 4 cepas ST354-D entre cepas resistentes a ciprofloxacina de Corea del Sur. También en Corea del Sur entre 35 cepas productoras CTX-M-14 aisladas en diferentes hospitales se encontraron 4 ST354 (Kim *et al.* 2011). La secuencia ST354 también se ha encontrado entre cepas productoras de CMY-2 aisladas en Francia (Corvec *et al.*, 2010). Recientemente en China se detectó una cepa ST354 productora de la nueva enzima CTX-M-37 (híbrida de CTX-M-14 y CTX-M-15) de un paciente con una ITU (Tian *et al.* 2014). En Mauritania se han aislado de las heces de pacientes hospitalarios cepas ST354 productoras de CTX-M-15 (Sallem *et al.* 2014). Coque *et al.* (2008b) caracterizaron 2 cepas ST354 aisladas en España y Portugal que también producían CTX-M-15, pero que pertenecían al grupo filogenético B2. En Japón se ha aislado una cepa ST354 productora de CTX-M-14 de un gato (Harada *et al.* 2012). Cepas ST354 BLEE también han sido aisladas de carne de pollo en Holanda (Cohen *et al.* 2012).

Es interesante destacar que la carbapenemasa más a menudo detectada, la NDM-1, se asocia con frecuencia con ST101-B1, habiéndose detectado este tipo de cepas en Inglaterra, Alemania, Bulgaria, Canadá, EE.UU., Australia, Pakistán, India, República de Corea (Mushtaq *et al.* 2011; Castanheira *et al.* 2013; Yoo *et al.* 2013; Poirel *et al.* 2014; Peirano *et al.* 2014b; Pannaraj *et al.* 2014). Las cepas ST101-B1 que producen NDM-1 a menudo también producen CTX-M-15.

En el ESTUDIO I observamos que las cepas de estos 2 grupos clonales presentan patrones de genes de virulencia y resistencia característicos. Las cepas de ambos clones tienen el estatus ExPEC y son resistentes a la ciprofloxacina. En el ESTUDIO I únicamente se detectaron en

pacientes del Hospital de Lugo en el año 2007 (O20:H34/HNM-D-ST354) y 2008 (ONT:H21,42-B1-ST101), pero en el ESTUDIO II realizado en Barcelona en el año 2008 se detectaron 4 cepas ONT:H21,42, HNM-B1-ST101 que también resultaron ser productoras de CTX-M-14 (Coelho *et al.* 2011).



5.2. ESTUDIO II: Detección de cepas del grupo clonal O25b:H4-B2-ST131 productoras de SHV-12 con un elevado contenido de genes de virulencia e identificación de los grupos clonales ST101, ST162, ST369, ST393 y ST410 entre cepas de *E. coli* productoras de BLEE (Barcelona, 2008).

5.2.1. Análisis molecular de las enzimas BLEE

Las enzimas BLEE más frecuentemente producidas por las 94 cepas de *E. coli* obtenidas de pacientes del Hospital Vall d'Hebron en el año 2008 fueron: CTX-M-14 (46%), CTX-M-15 (26%) y SHV-12 (18%) (Coelho *et al.*, 2011). Una similar distribución fue observada entre las 105 cepas del Hospital Xeral-Calde de Lugo (2006-2007): CTX-M-14 (58%), CTX-M-15 (22%) y SHV-12 (10%) (Blanco *et al.*, 2009). En un estudio multicéntrico (GEIH-2006) realizado en 44 hospitales españoles también se encontró que las 3 enzimas BLEE más prevalentes eran CTX-M-14 (47%), SHV-12 (27%) y CTX-M-15 (15%), pero la enzima CTX-M-15 en este caso ocupa el tercer lugar por frecuencia (Díaz *et al.*, 2010). En otro estudio multicéntrico realizado en 11 centros españoles en el año 2004 las 3 enzimas más frecuentes fueron: CTX-M-14 (46%), CTX-M-9 (21%) y SHV-12 (22%) (Diestra *et al.*, 2008). Por lo tanto, la aparición en escena de la enzima CTX-M-15 parece que ha desplazado especialmente a la enzima CTX-M-9.

5.2.2. Grupos filogenéticos

Los estudios realizados con cepas de *E. coli* de origen humano han puesto de manifiesto que las cepas comensales usualmente derivan de los grupos filogenéticos A y B1, mientras que la mayoría de las cepas ExPEC derivan de los grupos B2 y D. En el presente estudio realizado en Barcelona (2008) el grupo filogenético B2 fue el más prevalente (38%), seguido por el B1 (23%), el A y el D (19% cada uno). En el estudio previo realizado en Lugo (2006-2007) los 4 grupos filogenéticos fueron encontrados en proporciones muy similares: A (23%), B1 (25%), B2 (28%) y D (24%) (Blanco *et al.*, 2009).

Cabe destacar que en el estudio de Barcelona el 88% de las cepas productoras de CTX-M-15 y el 56% de las cepas SHV-12 pertenecieron al grupo B2, frente a tan solo el 5% de las CTX-M-14 ($P < 0,001$). En el estudio realizado en Lugo el 100% de las cepas CTX-M-15 eran B2,

frente a únicamente el 9% de las SHV-12 y el 8% de las CTX-M-14 (Blanco *et al.*, 2009). Las diferencias en ambos estudios se explican por la emergencia en el Hospital Vall d'Hebrón del grupo clonal O25b:H4-B2-ST131 ligado a la producción de SHV-12.

En el estudio de Barcelona las cepas de los grupos filogenéticos B2 (92%) y D (89%) se asociaron mucho más frecuentemente con el estatus ExPEC que las cepas de los grupos filogenéticos A (22%) y B1 (23%) ($P < 0,001$). Algo que coincide con lo encontrado en la mayoría de los estudios realizados a nivel global sobre las cepas de *E.coli* causantes de ITU y sepsis en seres humanos (Johnson *et al.*, 2003).

5.2.3. Serotipos y grupo clonales ST101, ST131, ST162, ST369, ST393 y ST410

La determinación del serotipo O:H ha sido, antes de la aparición del método de MLST, el mejor sistema de tipado para determinar la posible clonalidad de las cepas, ya que se suponía que las cepas que presentasen el mismo serotipo O:H tendrían más posibilidades de estar relacionadas clonalmente. Aunque esto es cierto, recientes estudios 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. Un ejemplo son las cepas del grupo clonal A (GCA-D-ST69) que, como hemos visto en el ESTUDIO III de esta tesis doctoral, pueden presentar los serotipos O11:H4, O15:H4, O15:H18, O17,77:H18 y O44:H18. Otro ejemplo es el observado entre las cepas del serotipo O25b:H4 que suelen pertenecer a la secuencia tipo ST131, aunque recientemente también hemos observado que hay cepas especialmente prevalentes entre las aisladas de agua de ríos que pueden presentar la secuencia ST69 (Colomer-Lluch *et al.*, 2013).

Como el sistema de serotipado es mucho más económico que el MLST y únicamente se habían establecido los serotipos de cepas BLEE en el estudio previo realizado con las cepas BLEE del hospital de Lugo, decidimos serotipar las 94 cepas productoras de BLEE de Barcelona e identificamos 27 serogrupos O y 48 serotipos O:H diferentes.

El serotipo más común fue el O25b:H4 asociado con el grupo filogenético B2 y ST131, e identificado en 19 cepas CTX-M-15, 8 SHV-12, 1 CTX-M-9, 1 CTX-M-14 y 1 CTX-M-27. Por lo tanto, 30 (32%) de las 94 cepas productoras de BLEE de Barcelona eran del grupo

clonal O25b:H4-B2-ST131. En el estudio previo realizado en Lugo el serotipo O25b:H4 también fue el más prevalente y en total 23 (22%) de las 105 cepas BLEE pertenecieron al grupo clonal O25b:H4-B2-ST131 (Blanco *et al.*, 2009). No obstante, entre las cepas O25b:H4-B2-ST131 aisladas en Lugo no detectamos ninguna productora de la enzima SHV-12. Según nuestros datos, previamente se había publicado un solo estudio en el que se encontró 1 cepa ST131 productora de SHV-12. Dicha cepa se había aislado en España, pero no fue serotipada ni estudiada para genes de virulencia (Oteo *et al.*, 2009).

En contraste con CTX-M-15 y SHV-12, entre las cepas de Barcelona productoras de CTX-M-14 se encontró una amplísima variedad de serotipos. Esto coincide totalmente con lo observado en el estudio lucense y es destacable que algunos de los serotipos observados en las cepas CTX-M-14 se encontraron en ambos hospitales (O8:H19, O9:HNM, O15:HNM, O20:H34, O20:HNM, O25b:H4, O78:HNM y ONT:H28) (Blanco *et al.*, 2009; Coelho *et al.*, 2011).

Aunque entre las 64 cepas BLEE de Barcelona no pertenecientes al grupo clonal O25b:H4-B2-ST131 se encontró una amplia variedad de diferentes serotipos, se pudieron identificar 5 grupos clonales representados por al menos 2 cepas: O15/O25a:H1/HNM-D-ST393, O78:HNM-A-369, ONT:H21,42/HNM-B1-ST101, O9:H4-A-ST410 y O8:H19-B1-ST162. En el Hospital Xeral-Calde de Lugo ya se habían identificado cepas de los grupos clonales O15:H1-D-ST393 y ONT:H21,42-B1-ST101 aisladas entre los años 2005 y 2008 (ESTUDIO I, Mora *et al.*, 2011a).

En España, Oteo *et al.*, (2009) identificaron 34 secuencias tipo STs entre 41 cepas CTX-M-14 aisladas en 11 hospitales en el año 2004, incluyendo los grupos clonales D-ST393, B1-ST101, A-ST410 y B2-ST131 (1 única cepa de cada grupo clonal). También en España, Valverde *et al.*, (2009), estudiando 61 cepas CTX-M-14 aisladas entre los años 2000 y 2005, identificaron 20 diferentes STs entre las 34 cepas analizadas por MLST, entre las que encontraron 1 cepa D-ST393. Cepas A-ST410 pertenecientes a los serotipos ONT:H9, O20:H9 y O55:H9 pero productoras de CTX-M15 se han aislado de muestras clínicas humanas y de alimentos cárnicos en Sevilla (2005-2007) (López-Cerero *et al.*, 2011).

Como en España, en los estudios realizados en los últimos años en otros países, el grupo clonal ST131 ha sido siempre el más frecuentemente encontrado entre las cepas productoras de BLEE: Dinamarca (38%, 2008-2009) (Olesen *et al.*, 2013), Francia (36%, 2008-2009) (Brisse *et al.*, 2012), Francia (42%, 2008-2011) (Izdebski *et al.*, 2013), Italia (51%, 2008-2011) (Izdebski *et al.*, 2013), Israel (33%-41%, 2008-2011) (Izdebski *et al.*, 2013), Noruega (27%, 2000-2008) (Naseer *et al.*, 2012), Reino Unido (60%, 2000-2008) (Nasser *et al.*, 2012), Suecia (58%, 2000-2008) (Nasser *et al.*, 2012), Canada (59%, 2000-2010) (Peirano *et al.*, 2012) y EE.UU. (64%, 2011) (Colpan *et al.*, 2013).

Las secuencias tipo más frecuentemente encontradas entre las cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas en diversos países fueron las siguientes: ST10, ST38, ST69, ST131, ST167, ST315, ST393, ST405, ST410 y ST648 (**TABLA 69**) (Woodford *et al.*, 2011; Brisse *et al.*, 2012; Naseer *et al.*, 2012; Peirano *et al.*, 2012; Van der Bij *et al.*, 2012; Colpan *et al.*, 2013; Izdebski *et al.*, 2013). Concretamente, en el estudio multicéntrico de Izdebski *et al.*, (2013) se determinó la secuencia tipo de 240 cepas aisladas entre los años 2008 y 2011 en España, Francia, Italia e Israel, y aunque se encontraron 76 diferentes STs, únicamente 7 secuencias representaron el 65% de las cepas (ST10, ST38, ST69, ST131, ST405, ST410, y ST648). Similares resultados fueron encontrados en el estudio que Nasser *et al.* (2012) realizaron con 100 cepas aisladas en España, Noruega, el Reino Unido y Suecia entre los años 2000 y 2008, ya que el 68% de las cepas pertenecieron únicamente a 6 secuencias tipo (ST10, ST38, ST131, ST167, ST405 y ST648). En Canadá, Peirano *et al.* (2012) observaron que el 91% de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de hemocultivos entre los años 2000 y 2010 pertenecían únicamente a 8 secuencias tipo (ST10, ST38, ST131, ST315, ST393, ST405, ST61 y ST648) (**TABLA 69**).

TABLA 69. Secuencias tipo más frecuentes en cepas de *E. coli* productoras de BLEE causantes de infecciones extraintestinales.

Secuencia Tipo (Grupo filogenético)	Izdebski <i>et al.</i> (2013) Francia, Italia, España, Israel 2008-2009 (n= 240)	Naseer <i>et al.</i> (2012) Noruega, Reino Unido, España, Suecia 2000-2008 (n=100)	Peirano <i>et al.</i> (2012) Canadá 2000-2010 (n=197)
Total STs	76	33	
Más frecuentes	65,2%	68%	91,4%
ST10 (A) ^a	5,1%	3%	
CC10 (A) ^a ST10+ST617			6,6%
ST38 (D)	4,3%	8%	5,6%
ST69 (D)	2,7%		
ST131 (B2)	41,2%	39%	59,4%
ST167 (A) ^a		4%	
ST315 (D)			4,6%
ST393 (D)			2,5%
ST405 (D)	4,9%	6%	7,1%
ST410 (A)	3,7%		
ST648 (D)	3,5%	8%	5,6%

^aLas secuencias tipo ST10, ST167 y ST617 pertenecen al complejo clonal ST10 (CC10).

5.2.4. Genes de virulencia en cepas ST131 y no ST131

Al analizar la presencia de 30 genes que codifican para factores de virulencia típicos de cepas ExPEC en las 94 cepas productoras de BLEE de Barcelona (2008), comprobamos que 11 genes de virulencia estaban significativamente asociados con las cepas ST131 (*papGIII*, *afaFM955459*, *cnf1*, *sat*, *hlyA*, *kpsMII-K2*, *kpsMII-K5*, *traT*, *ibeA*, *malX* y *usp*). La lista de genes asociados con ST131 en nuestro estudio es muy similar a la observada por Johnson *et al.* (2010) con cepas aisladas en EE.UU. (*iha*, *fimH*, *sat*, *astA*, *fyuA*, *iutA*, *kpsM II-K2*, *kpsM-K5*, *usp*, *traT*, *ompT* y *malX*). Pensamos que estos genes pueden jugar un papel importante en la patogénesis y el éxito expansivo de este grupo clonal. Además, las 30 cepas ST131 exhibieron un significativo mayor número de genes de virulencia (media 9,6) que las 64 cepas no ST131 (media 5,8) del estudio de Barcelona (2008). En particular, las cepas ST131 SHV-12 fueron las que presentaron más genes de virulencia (media 11,8).

5.2.5. Tipado molecular por PFGE

Al analizar los perfiles de macrorrestricción con la enzima *XbaI* de las 30 cepas O25b:H4-B2-ST131 aisladas en Barcelona (2008) observamos una diversidad genética extraordinaria para tratarse de cepas del mismo grupo clonal aisladas de pacientes del mismo hospital y en el mismo año. Presentaron una similitud de tan solo el 66,7% y formaron 5 *clusters* (I – V) que incluían cepas que presentaban patrones de genes de virulencia y resistencia antimicrobiana característicos. Esta diversidad de pulsotipos y patrones de genes de virulencia contrasta con la enorme homogeneidad de las cepas O25b:H4-B2-ST131 aisladas en el Hospital Xeral-Calde de Lugo (2006-2008) (Blanco *et al.*, 2009).

Los patrones de genes de virulencia de las cepas de los *cluster* I y III son similares a los encontrados en las cepas ST131 productoras de CTX-M-15 de la colección intercontinental de Nicolas-Chanoine *et al.*, (2008). En contraste, las cepas *ibeA* positivas de los *clusters* IV (7 cepas *papGIII*, *cnf1*, *hlyA*) y V (3 cepas K1) representan nuevas variantes de este grupo clonal que poseen un arsenal de numerosos genes de virulencia.

Es destacable que las cepas productoras de BLEE (la mayoría SHV-12) del *cluster* IV del estudio de Barcelona (2008) presentaron el mismo patrón de genes de virulencia que las cepas no productoras de BLEE del *cluster* I del ESTUDIO III (aisladas en Lugo, Madrid, Sevilla, Santander y Barcelona). Al comparar sus perfiles de PFGE comprobamos que formaban un *cluster* con 2 *subclusters*, con un 82,1% y un 88,5% de similitud.

Es interesante que las 3 cepas del *cluster* V de Barcelona (2008) que poseen el gen *neuC*, que codifica para el antígeno capsular K1, presentan un patrón de genes de virulencia y perfiles de PFGE similares a los encontrados recientemente entre las cepas O25b:H4-B2-ST131 aisladas de aves infectadas y de carne de pollo en España (Cortes *et al.*, 2010; Mora *et al.*, 2010). Por lo tanto las aves pueden ser un reservorio y los alimentos de origen aviar un vehículo de transmisión de este tipo de cepas.

5.3. ESTUDIO III: Prevalencia y caracterización de los grupos clonales O25b:H4-B2-ST131, O15:H1-D-ST393 y GCA-D-ST69 en infecciones extraintestinales en España. Relación con la resistencia antimicrobiana y el contenido de genes de virulencia (Estudio Nacional, año 2009).

5.3.1. Prevalencia de los 3 grupos clonales

En el presente estudio, realizado en 5 hospitales españoles en el año 2009, comprobamos que el 19% de las infecciones extraintestinales eran causadas por cepas de los 3 clones investigados (Blanco *et al.*, 2011). En Canadá, en un estudio realizado con cepas aisladas entre los años 2000 y 2004, Johnson *et al.*, (2009) encontraron que un 37% eran de estos 3 clones. No obstante, resulta difícil comparar ambos estudios ya que en Canadá se seleccionaron 4 grupos de 50 cepas atendiendo a su resistencia y sensibilidad a los antimicrobianos trimetoprin-sulfametoxazol y ciprofloxacina. No obstante en ambos estudios el grupo clonal más prevalente fue el O25b:H4-B2-ST131 (12% en España *versus* 23% en Canadá). En otro estudio realizado por Johnson *et al.* (2010) se estimó que el grupo clonal ST131 causó el 17% de las infecciones invasivas en pacientes hospitalizados en EE.UU. en el año 2007.

Aunque la mayoría de los estudios y referencias del grupo clonal ST131 se han asociado a la producción de la enzima CTX-M-15, es evidente que su presentación más frecuente es como ciprofloxacina resistente y cefalosporina susceptible, causando en España en el año 2009 una de cada 10 infecciones extraintestinales.

5.3.2. Distribución de los 3 grupos clonales entre las cepas resistentes

Los 3 grupos clonales aislados en España conjuntamente representaron el 37% de las cepas resistentes a trimetoprim-sulfametoxazol y ciprofloxacina, el 34% de las cepas resistentes a aminoglucósidos y el 30% de las cepas multirresistentes. Es de destacar que el grupo clonal ST131 fue el más prevalente entre las cepas multirresistentes, suponiendo el 23% de las mismas en España. Similares resultados fueron encontrados en el estudio canadiense (Johnson *et al.*, 2009). En un estudio realizado en EE.UU., Johnson *et al.* (2010) estimaron que el grupo clonal ST131 representaba más del 40% de las cepas con alguna resistencia, más del 50% de

las cepas eran resistentes a aminoglucosidos, multirresistentes y resistentes a ciprofloxacina más trimetoprim-sulfametoxazol y entre el 67% y el 69% de las cepas eran resistentes a cefalosporinas de espectro extendido y fluoroquinolonas. Por lo tanto, aunque el grupo clonal ST131 era el más prevalente entre las cepas resistentes en España en el año 2009, su frecuencia era significativamente inferior que la encontrada en el año 2007 entre las cepas resistentes de EE.UU.

5.3.3. Prevalencia de cepas productoras de BLEE

La prevalencia (7%) de cepas de *E.coli* productoras de BLEE detectada en los hospitales españoles en el año 2009 es 3 puntos superior (4%) a la observada en un estudio multicéntrico realizado en 44 hospitales en el año 2006 en España (Estudio GEIH-BLEE-2006) (Díaz *et al.*, 2010) y 6,5 puntos superior a la observada en el estudio GEIH-BLEE del año 2000 (Hernández *et al.*, 2005). Por lo tanto, se observa una tendencia ascendente muy significativa y preocupante.

5.3.4. Factores de virulencia

Es destacable que las cepas ST131 presentaron un mayor número de genes de virulencia que las cepas ST393, ST69 y BLEE de otros grupos clonales. En contraste, Johnson *et al.*, (2009), estudiando las cepas canadienses responsables de ITUs (2002-2004), no observaron diferencias significativas en la media de genes de virulencia entre los 3 grupos clonales. En nuestro estudio, el mayor número de genes de virulencia se observó en las cepas ST131 que tenían el gen *ibeA*. Estas cepas representaron el 27% de las cepas ST131 españolas. En contraste, en el estudio de Canadá únicamente el 2% de las cepas ST131 resultaron positivas para el gen *ibeA*. Esto podría explicar las diferencias encontradas entre ambos estudios con respecto a los genes de virulencia.

Es evidente que los patrones de combinaciones de genes de virulencia son diferentes en los 3 grupos clonales caracterizados. Aunque se encontraron diferentes combinaciones de genes de virulencia entre las cepas pertenecientes a un mismo grupo clonal, la mayoría de las cepas compartían muchos genes de virulencia. En contraste, y como era de esperar, entre las cepas

E. coli productoras de BLEE pertenecientes a otros grupos clonales se encontraron numerosos y heterogéneos patrones de genes de virulencia.

5.3.5. Tipado molecular por PFGE de las cepas O25b:H4-B2-ST131

Es llamativa la enorme diversidad genética observada entre las 59 cepas ST131 españolas. No obstante, este encuentro no sorprende ya que coincide también con la gran variabilidad detectada por Nicolas-Chanoine *et al.* (2008) en la colección intercontinental de cepas ST131 productoras de CTX-M-15.

Al analizar el dendrograma generado por la comparación de los perfiles de macrorrestricción de las cepas ST131 españolas se observan 4 *clusters* (I – IV) muy bien definidos que presentan patrones específicos de genes de virulencia y resistencia antimicrobiana. Así, la mayoría de las cepas ST131 del *cluster* II presentan el gen *sat* y carecen del gen *ibeA*. En contraste, las cepas de los *clusters* I y III son *sat*⁺ e *ibeA*⁺, pero las del *cluster* I poseen los genes *cnfI* y *hlyA*, y las del *cluster* III el gen *cdtB*.

Los patrones de genes de virulencia de las cepas del *cluster* II son similares a los encontrados en las cepas ST131 productoras de CTX-M-15 de la colección intercontinental de Nicolas-Chanoine *et al.* (2008). Sin embargo, las cepas de los *clusters* I y III creemos que representan nuevas variantes de este grupo clonal que poseen un arsenal de numerosos genes de virulencia.

5.3.6. Tipado molecular de los grupos clonales O15:H1-D-ST393 y GCA-D-ST69

La mayoría de las cepas del grupo O15:H1-D-ST393 presentaron una similitud muy elevada ($\geq 85\%$) a pesar de que se aislaron en 5 hospitales diferentes. Además, las cepas incluidas en este grupo clonal presentan también un patrón de genes de virulencia muy homogéneo, incluyendo los genes *fimH*, *fimA*_{VMT78}, *papGII*, *sat*, *iucD* y *kpsM* II-K5. En contraste, las cepas del GCA-D-ST69 presentaron una mayor variabilidad tanto en los perfiles de PFGE como en los patrones de genes de virulencia e incluso presentando distintos serotipos O:H. No obstante, la mayoría de las cepas del GCA-D-ST69 presentan el antígeno flagelar H18.

5.4. ESTUDIO IV: Virotipos de cepas de *E. coli* O25b-H4-B2-ST131 productoras de enzimas BLEE. Estudio multicéntrico GEIH-BLEE-2006.

La prevalencia, la epidemiología y los clones de las cepas de *E. coli* productoras de enzimas de resistencia tipo BLEE está cambiando rápidamente y de forma sorprendente, debido a la aparición inicialmente de las enzimas de la familia CTX-M y posteriormente a la emergencia del grupo clonal O25b-ST131. En España, su prevalencia se multiplicó por 8 del año 2000 al 2006, pasando de un 0,5% a un 4%.

La emergencia y la diseminación de las cepas de *E. coli* BLEE tiene 2 posibles explicaciones: que ocurra como consecuencia de la diseminación de elementos genéticos móviles (especialmente de plásmidos) entre cepas no clonalmente relacionadas o como resultado de la diseminación exitosa de determinados clones de riesgo. Ambos mecanismos pueden ocurrir de forma simultánea y contribuir conjuntamente a la diseminación de las cepas.

Hasta no hace muchos años la mayoría de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE no estaban relacionadas, pero en los últimos años la situación ha cambiado de forma radical con la aparición del grupo clonal O25b-ST131, representando en la actualidad un problema prioritario de salud pública.

En el estudio GEIH-BLEE-2006, 195 (19%) de las 1.021 cepas de *E. coli* BLEE analizadas pertenecieron al grupo clonal O25b-ST131. Las cepas de este grupo clonal se encontraron en 30 de los 44 hospitales participantes y hasta en el 52% de las cepas de un mismo hospital. La prevalencia encontrada en el estudio actual es 10 puntos superior al 9% de cepas ST131 encontradas entre 92 cepas BLEE procedentes de 11 hospitales españoles en el año 2004 (Oteo *et al.*, 2009), a pesar de que 7 de los 11 hospitales muestreados en el año 2004 también están incluidos en el estudio del 2006. No obstante, en estudios más recientes realizados en diversas ciudades españolas y en otros países se han encontrado prevalencias de cepas ST131 incluso superiores: Lugo-2008 (23%) (Blanco *et al.*, 2009), Lugo-2012 (61%) (Dahbi *et al.*, 2013), Barcelona-2008 (32%) (Coelho *et al.*, 2011), Madrid-2008 (21%) (Novais *et al.*, 2012), Dinamarca-2008/2009 (38%) (Olesen *et al.*, 2013), Japón-2010 (41%) (Matsumura *et al.*, 2012a), EE.UU.-2000/2009 (47%) (Johnson *et al.*, 2012a) y Canadá-2010 (78%) (Peirano *et al.*, 2012).

La mayoría de las cepas O25b-ST131 del estudio GEIH-BLEE-2006 producían la enzima CTX-M-15, pero también se encontraron cepas CTX-M14, SHV-12, CTX-M-9, CTX-M-32, CTX-M-3 y una cepa productora de una nueva enzima del *cluster* CTX-M-1 (CTX-M-103). A pesar de que en casi todos los países predominan las cepas CTX-M-15, existen excepciones, como en Japón donde predominan las cepas O25b-ST131 productoras de CTX-M-14 y CTX-M-27 (Suzuki *et al.*, 2009; Matsumura *et al.*, 2014) o en Irlanda donde son muy frecuentes las CTX-M-3 (Clermont *et al.*, 2009). En el estudio actual, nosotros hemos encontrado que mientras el 100% de las cepas de los virotipos A, B y el 63% de las del virotipo C produjeron CTX-M-15, ninguna de las cepas del virotipo D resultó positiva para dicha enzima.

Las cepas ExPEC poseen factores de virulencia especializados que les capacitan para colonizar los epitelios, invadir las células de los tejidos y evitar las defensas inmunes del hospedador. En el presente estudio 13 genes de virulencia (*fimH*, *F10 papA*, *iha*, *sat*, *iucD*, *iutA*, *fyuA*, *chuA*, *kpsM II*, *traT*, *malX*, *usp* y *ompT*) fueron detectados en la mayoría de las cepas O25b-ST131. En el ESTUDIO II de esta memoria, en el que se analizaron cepas BLEE de Barcelona-2008, y en el estudio de Johnson *et al.*, (2010), con cepas de EE.UU., se encontró que la mayoría de estos genes eran mucho más frecuentes entre las cepas ST131 que entre las no-ST131. Además, en los 3 estudios se ha encontrado que las cepas ST131 tienen una media de genes de virulencia muy elevada y que la mayoría poseen el status ExPEC.

Hemos seleccionado 4 genes (*afa* FM955459, *iroN*, *ibeA* y *sat*) que claramente definían 4 virotipos dentro de las cepas del grupo clonal O25b-ST131. El virotipo C resultó ser el que estaba más representado a nivel internacional ya que se encontró en cepas aisladas en 7 países (Francia, Portugal, Suiza, EE.UU., Canadá, Corea del Sur y Líbano).

Después de analizar los patrones de genes de virulencia y los pulsotipos de PFGE observamos que los 4 virotipos establecidos se correspondían muy bien con los 4 grandes *clusters* que se generaban por PFGE, lo que sugiere la existencia de una base clonal para los virotipos que podrían representar 4 subclones principales.

Las cepas del virotipo D presentaron la media de genes de virulencia más elevada y lo que podría explicar su asociación con infecciones en pacientes más jóvenes y las comunitarias.

En un reciente estudio sobre los pulsotipos de 579 cepas ST131 obtenidas en su mayoría en EE.UU., Johnson *et al.* (2012b) observaron que únicamente 4 pulsotipos (800, 812, 905 y 968) englobaban al 46% de las cepas analizadas, aunque las cepas pertenecían a un total de 170 pulsotipos diferentes. En el estudio actual nosotros comprobamos que las 13 cepas internacionales de referencia pertenecientes a estos 4 pulsotipos pertenecían a los virotipos A, B y C.

Siete alelos *fimH* (H15, H22, H27, H30, H35, H41 y H49) se han encontrado entre 352 cepas históricas y recientes del grupo clonal O25b-ST131 aisladas en su mayoría en EE.UU. (Johnson *et al.*, 2013). El subclón H22 resultó ser dominante (73%) entre las cepas históricas (1967 a 1999) mientras que el subclón H30 era prevalente entre las recientes (2000 a 2011). Es interesante que en el presente estudio las 30 cepas analizadas de los virotipos A, B y C pertenecieron al subclón H30, mientras que las 10 cepas analizadas del virotipo D pertenecieron al subclón H22. Como Johnson *et al.* (2013), nosotros encontramos una asociación estadísticamente significativa entre las cepas con el alelo *fimH30* y la resistencia a la ciprofloxacina. Así, prácticamente todas las cepas *fimH30* de los virotipos A (100%), B (100%) y C (98%) presentaron resistencia a dicho antimicrobiano frente a tan solo el 29% de las cepas *fimH22* del virotipo D ($P < 0.001$).

Como Banerjee *et al.* (2013a), nosotros hemos encontrado que los pacientes con infecciones causadas por cepas O25b-ST131 eran mayores y estaban más frecuentemente ingresados en residencias que los pacientes con infecciones causadas por cepas BLEE de otros grupos clonales. Como en otros estudios, nosotros tampoco hemos asociado a las cepas del grupo clonal O25b-ST131 con un incremento de mortalidad (Chung *et al.*, 2012; Banerjee *et al.*, 2013a; Rodríguez-Baño *et al.*, 2013).

Diversas teorías se han sugerido para explicar la emergencia y la rápida diseminación del grupo clonal O25b-ST131 entre los seres humanos a nivel mundial, entre las que se encuentra el contacto con los animales y el consumo de alimentos (Platell *et al.*, 2011a). Mora *et al.* (2010) caracterizaron cepas de *E. coli* O25b-ST131 aisladas de pollos con colibacilosis y de carne de pollo en España. Es especialmente interesante que las 19 cepas O25b-ST131 aviares de dicho estudio (7 productoras de CTX-M-9) serían del virotipo D siguiendo el criterio de clasificación establecido en el presente estudio. No obstante, únicamente 2 de las cepas BLEE

de origen humano del estudio GEIH-BLEE-2006 y las 2 únicas cepas aviarias incluidas en la colección internacional de Johnson *et al.* (2012b) presentaron el gen *neuC*-K1 típico de las cepas aviarias del virotipo D.



5.5. ESTUDIO V: Emergencia de los subclones H22, H30, H30-Rx y H41 del grupo clonal B2-ST131 entre cepas de *E. coli* bacteriémicas. Prevalencia con respecto a otros filoserogrupos y grupos clonales. Genes de virulencia y resistencia a antimicrobianos. Estudio HULA 1989-2011.

La bacteriemia por *Escherichia coli* es una de las causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial que acarrea un importante impacto en la salud pública. Estudios realizados en diferentes partes del mundo muestran que la incidencia de la bacteriemia por *E. coli* se ha incrementado a nivel mundial (de Kraker *et al.*, 2012; Alhashash *et al.*, 2013). En el área sanitaria del HULA también se ha producido un incremento gradual de las infecciones bacteriémicas por *E. coli*. Concretamente en los últimos 6 años (2006 a 2011) del estudio se registraron 1.986 casos de bacteriemia por *E. coli* que afectaron a 1.686 pacientes, detectándose este microorganismo en el 25% de los hemocultivos. El incremento de bacteriemias puede ser debido a múltiples factores: 1) las mejoras en el sistema sanitario que hacen que se realicen hemocultivos a un mayor número de pacientes sospechosos de estar afectados; 2) el envejecimiento progresivo de la población que provoca un aumento de individuos inmunodeprimidos y con enfermedades de base importantes muy sensibles a este tipo de infecciones; 3) la emergencia de cepas más virulentas y/o más resistentes a los antimicrobianos. Aunque pensamos que en dicho incremento ha podido influir la aparición de las cepas productoras de BLEE y las del grupo clonal ST131, este estudio no aporta datos suficientes como para poder extraer esta conclusión.

5.5.1. Genes de virulencia

Los resultados obtenidos por Johnson *et al.* (2002c) y Sannes *et al.* (2004) muestran que la mayoría de las cepas de *E. coli* bacteriémicas contienen los genes *fimH*, *pap*, *iutA*, *malX* y *kpsMII* como factores de virulencia más frecuentes. En nuestro estudio, tras analizar 827 cepas de *E. coli* bacteriémicas para la presencia de 30 genes de virulencia, observamos que los más frecuentes eran *fimH*, *papEF*, *iucD*, *iroN*, *kpsMII*, *traT*, *malX* y *usp*. Al comparar las primeras 213 cepas aisladas (1989-1993) con las últimas 614 (2010-2011), solo un gen de virulencia (*fimAV_{MT78}*) fue significativamente asociado con las primeras cepas. Por el contrario, con las cepas aisladas durante los 2 últimos años, 7 fueron los genes (*papG* NT, *afa/draBC*, *afa* FM955459, *cnf1*, *iucD*, *cvaC* y *traT*) asociados de manera significativa, lo que

sugiere que en los últimos años estas cepas bacteriémicas han adquirido mayor potencial patógeno así como también una aproximación combinatoria de los factores de virulencia que incluyen a una fimbria Pap, que es crucial para llegar al riñón; una toxina, que puede modular una variedad de vías de señalizaciones del hospedador (*cnfI*); un sistema de adquisición de hierro (*iucD*), que le permita a la bacteria multiplicarse dentro de un ambiente de limitada concentración de hierro libre como en los tejidos y los fluidos del hospedador; la producción de colicinas (*cvaC*), que aumenta la competitividad de las bacterias; y la resistencia al suero (*traT*), que le permite a la bacteria sobrevivir en el torrente sanguíneo causando la septicemia. Sin lugar a dudas la emergencia de las cepas del grupo clonal ST131 es quizás la principal causa que explica el aumento de la presencia de muchos de los genes anteriormente citados en las cepas aisladas durante los últimos años.

5.5.2. Grupos filogenéticos y potencial de virulencia

En relación a la distribución de los grupos filogenéticos, estudios previos mostraban que el grupo filogenético B2, y en menor frecuencia el grupo D, eran más prevalentes entre las cepas de *E. coli* que causan infecciones extraintestinales, mientras que las cepas comensales pertenecían en su mayoría a los grupos filogenéticos A y B1 (Johnson y Stell, 2000; Johnson *et al.*, 2002c; Moreno *et al.*, 2005; Sannes *et al.*, 2004; Bailey *et al.*, 2010). En la mayoría de los estudios se han caracterizado con detalle solo las cepas de los grupos filogenéticos B2 y D. No obstante, es importante caracterizar las cepas de *E. coli* de los 4 grupos filogenéticos y hacer un seguimiento de ellas, determinar qué genes de virulencia contienen que les permiten invadir el torrente sanguíneo y si con el transcurso del tiempo estas características cambian, justificando a su vez los cambios de las prevalencias de los diferentes grupos filogenéticos.

De las 3.260 cepas analizadas en este estudio la mayoría perteneció al grupo filogenético B2 (40%), lo cual concuerda con los estudios previos (Johnson y Stell, 2000; Johnson *et al.*, 2002c; Sannes *et al.*, 2004; Moreno *et al.*, 2005). Sin embargo, el grupo filogenético A, considerado comensal, presentó la segunda mayor prevalencia (25%), y la incidencia del grupo filogenético B1 aumentó del 9% (1989-1999) al 14% (2000-2011). El estudio realizado por Moreno *et al.* (2006), muestra que las cepas de *E. coli* de los grupos filogenéticos A y B1 pueden producir tanto infecciones del tracto urinario como otras infecciones extraintestinales en personas sanas, pero principalmente en pacientes con factores favorecedores de infección.

Nuestros resultados muestran que las cepas del grupo filogenético B2, y en menor proporción los del grupo D, son las que poseen las mayores medias de genes de virulencia, lo que concuerda con los resultados de otros estudios (Johnson y Stell, 2000; Bingen-Bidois *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2002c; Sannes *et al.*, 2004; Moreno *et al.*, 2005). Es interesante destacar que en nuestro estudio las mayores medias de genes de virulencia en los 4 grupos filogenéticos se encontraron entre las cepas aisladas durante los 2 últimos años (2010-2011). Así, las cepas del grupo B2 presentaron las medias más elevadas (9,5 y 10), seguido por el grupo D (medias 6,1 y 6,4), el grupo A (medias 3,8 y 4,5) y el grupo B1 (medias 2,5 y 4,0).

También es destacable que entre las últimas cepas aisladas del grupo filogenético B2 varios genes incrementaron significativamente su presencia, como el gen *afa/draBC* (adhesina que promueve la persistencia bacteriana dentro del tracto urinario y puede modular vías de señalizaciones del hospedador), *cnf1* (toxina que modula las vías de señalizaciones del hospedador), *sat* (toxina que tiene actividad citopática que daña específicamente el glomérulo y túbulo proximal que facilita la entrada de cepas en el torrente sanguíneo), *iucD* (sideróforo) y *traT* (resistencia al suero), lo cual muestra que estas cepas en los últimos años han incrementado su potencial de virulencia. Además, emerge una variante del operon *afa/dra*, el *afa* FM955459, que es específico de las cepas O25b:H4-ST131 del virotipo A, que fue identificado por primera vez en nuestro laboratorio (Blanco *et al.*, 2009).

Algunos estudios sugieren que mediante la transferencia horizontal las cepas del grupo filogenético B2 pueden aportar islas de patogenicidad o plásmidos con factores de virulencia a cepas de los grupos filogenéticos A y B1, convirtiendo estas cepas no virulentas en patógenas (Johnson y Stell, 2000; Bingen-Bidois *et al.*, 2002; Moreno *et al.*, 2006). Se piensa que uno de los genes que fue transferido de esta manera es el *pap*. De acuerdo con nuestros resultados, entre las primeras cepas aisladas del grupo filogenético A el 19% eran positivas para el gen *papEF* mientras que en las últimas cepas el 35% fueron positivas para este gen y la mayoría de ellas fueron negativas para los 4 alelos del *papG* conocidos, lo que sugiere que en estas cepas pueden estar presentes otros alelos o que no poseen el *papG*. Por lo tanto, la mayoría de las cepas del grupo filogenético A son *papG* no tipables, a diferencia de las cepas de los grupos filogenéticos B2 y D que fueron *papG*II y III.

Entre las últimas cepas aisladas del grupo filogenético A (2010-2011), aparte del gen *papEF*, otros 3 genes (*iroN*, *cvaC* y *traT*) fueron también significativamente más prevalentes, genes que incrementan el potencial patógeno de estas cepas. Además, el 42% de las cepas contenían los 2 sideróforos (*iucD* e *iroN*), reforzando de esta manera su sistema de adquisición de hierro.

En las cepas del grupo filogenético B1 los cambios también fueron notorios. Las primeras cepas carecían de los genes *papEF*, *sfa/focDE*, *cnf1*, *cdtB* y *kpsMII*, mientras que entre las últimas cepas estos 5 genes de virulencia estuvieron presentes. Además, se incrementó la prevalencia de los genes *iucD*, *iroN* y *traT* y el 13% de las cepas fueron positivas para el gen *papEF*.

No obstante, el nivel de cepas que cumplieron el estatus ExPEC fue similar en ambos períodos (58% en 1989-1993 frente 63% en 2010-2011) y el porcentaje (37%) de cepas con 8 o más genes de virulencia fue el mismo en ambos períodos. Si el estatus ExPEC (presencia de al menos 2 de los 5 siguientes genes de virulencia: *papEF*, *sfa/focDE*, *afa/draBC*, *iutA/iucD* y *kpsMII*) es fiel reflejo del potencial de virulencia de las cepas, se podría concluir que globalmente analizadas las cepas no han aumentado significativamente su poder patógeno. Es posible que fuese debido a que no lo necesitarían ya que los pacientes afectados en los últimos años tienen una media de edad más avanzada y como consecuencia presentan más enfermedades de base y están más inmunodeprimidos.

Numerosos autores sugieren que no solo podría ser importante la presencia acumulativa de factores de virulencia, sino la presencia de determinados factores de virulencia especializados, debido a la función que desempeñen cada uno de ellos en la infección (Sannes *et al.*, 2004; Moreno *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2006). En este sentido, recientemente Spurbeck *et al.* (2012) y Vigil *et al.* (2012) han señalado a otros genes de virulencia alternativos (*vat*, *fyuA*, *chuA*, *yfcV* y *tosA*) como indicadores del potencial de virulencia de las cepas que colonizan el tracto urinario y producen bacteriemia. Los genes *vat*, *fyuA*, *chuA*, *yfcV* se encontraron en proporciones 10 veces superiores en cepas de *E. coli* causantes de infecciones urinarias (UPEC) y meningitis (NMEC) que en cepas fecales comensales. El gen *vat* codifica para una toxina serina proteasa autotransportadora, el *fyuA* para un receptor de yersiniabactina, el *chuA*

para una proteína de unión a un grupo hemo, el gen *yfcV* para la subunidad mayor de un posible *chaperon* fimbrial y por su parte el gen *tosA* codifica para una toxina RTX.

5.5.3. Serogrupos O y potencial de virulencia

El serotipado en base a las características antigénicas desempeña un papel importante en el tipado de *E. coli*. De hecho, la determinación del antígeno O se puede considerar como el primer sistema que permitió establecer el parentesco clonal entre los aislados clínicos de este microorganismo. Las cepas que poseen el mismo serogrupo O suelen compartir determinadas características, incluyendo similares combinaciones de genes de virulencia. Por ello se ha encontrado cierta relación entre el antígeno O específico y el comportamiento patógeno. Por esta razón, determinar el antígeno O en cepas de *E. coli* patógenas es crucial para el diagnóstico y la epidemiología. Debido a que esta técnica requiere la utilización de numerosos antisueros (O1 a O185) es bastante laboriosa y costosa, y por ello se han realizado pocos estudios sobre la correlación entre serogrupo y genes de virulencia en cepas de *E. coli* bacteriémicas (Orskov *et al.*, 1977; Orskov y Orskov, 1985).

En este estudio hemos identificado 138 serogrupos diferentes entre las 3.260 cepas bacteriémicas, pero el 66% de las cepas se englobaron en 18 serogrupos (O1, O2, O4, O6, O7, O8, O9, O11, O15, O17, O18, O22, O25, O75, O77, O83, O101 y O153) y el 53% en únicamente 9 serogrupos. El serogrupo O6 (9%) presentó la mayor prevalencia durante el período de los 23 años de estudio, seguido por el O2 (8%), O8 (7%), O25 (7%), O1 (7%), O15 (4%), O18 (4%), O9 (4%) y el O4 (4%). Durante el segundo período (2000-2011), el serogrupo O25 ha emergido con fuerza pasando de un 3% en el primer período (1989-1999) a un 8% en el segundo, desplazando a los serogrupos O1, O2, O4, O8, O15 y O18 que han descendido en los últimos años. Destacar que en los últimos 7 años (2005-2011) el serogrupo O25 presentó la mayor prevalencia (9,6%), desplazando incluso al serogrupo O6 (7,9%).

Previamente en España se habían realizado 2 estudios donde se determinaron los serogrupos de cepas de *E. coli* bacteriémicas utilizando un número reducido de antisueros frente a los serogrupos O más prevalentemente encontrados a nivel mundial por aquellas fechas. En la Tesis Doctoral de Alonso (1990) se estudiaron 76 cepas aisladas de hemocultivos de pacientes de 3 hospitales gallegos (Hospital Juan Canalejo de A Coruña, Hospital Xeral-Calde de Lugo y

Hospital da Costa de Burela) entre 1986 y 1989. En dicho estudio se empleó un kit compuesto por 30 antisueros O entre los que estaban incluidos antisueros frente a 17 de los 18 serogrupos más prevalentes en el estudio de la tesis actual. Solo faltaría el antisuero frente a O101. Usando este kit reducido de antisueros, encontró que el 62% de las cepas bacteriémicas pertenecían a únicamente 7 serogrupos: O2 (13%), O4 (13%), O6 (9%), O8 (12%), O9 (5%), O18 (5%) y O75 (4%). Únicamente una cepa pertenecía al serogrupo O25 (1%). En la Tesis Doctoral de Dalmau (1993) se serotiparon 160 cepas aisladas de hemocultivos de pacientes del Hospital Mútua de Terrassa entre 1998 y 1991. Se emplearon 101 antisueros entre los que se encontraban los 18 frente a los serogrupos O más prevalentes en la tesis actual. El 59% de las cepas se pudieron englobar en solo 8 serogrupos: O1 (6%), O2 (8%), O4 (4%), O6 (16%), O9 (4%), O15 (4%), O18 (6%) y O83 (11%). Únicamente 2 (1%) cepas eran del serogrupo O25.

Devine *et al.* (1989) serotiparon 400 cepas de ITU y 100 de sepsis aisladas en Londres, y encontraron que el 52% de las uropatogénicas y el 62% de las bacteriémicas pertenecían a los serogrupos O1, O2, O4, O6, O7, O8, O9, O18, O25 y O75. No encontrando diferencias significativas en la distribución de los distintos serogrupos en los 2 tipos de cepas. Ørskov y Ørskov (1975) y Cross *et al.* (1984) serotiparon 2 grandes colecciones de cepas aisladas de hemocultivos en Dinamarca y EE.UU., y comprobaron que el 57% y 59% respectivamente de las cepas se podían agrupar en tan solo 10 serogrupos. Los serogrupos más comunes en Dinamarca, por orden de frecuencia, fueron el O2, O4, O6, O75, O9, O8, O18, O7, O22 y O1; mientras que en EE.UU. tales serogrupos fueron el O6, O4, O1, O18, O16, O75, O8, O2, O12 y O15. Brauner *et al.* (1987) encontraron que el 46% de las cepas bacteriémicas aisladas en Suecia pertenecían tan solo a 6 serogrupos (O1, O4, O6, O7, O18 y O25). En Dinamarca, Olesen *et al.* (1995) analizaron 377 cepas de *E. coli* bacteriémicas y encontraron que los serogrupos más frecuentes eran el O18, O6, O1, O2, O15 y O75, los cuales agrupaban al 48% de las cepas.

Por lo tanto nuestros resultados son similares a los encontrados en los estudios realizados en otras zonas geográficas y confirman que un limitado número de serogrupos están ampliamente diseminados y son predominantes a nivel mundial entre las cepas de *E. coli* bacteriémicas.

Como era de esperar, entre las cepas de los 18 serogrupos más frecuentes encontramos un porcentaje (73%) de cepas ExPEC muy superior al observado entre las cepas de los serogrupos menos frecuentes (39%) y entre las no tipables (33%), de lo que se puede deducir que estos serogrupos son los más prevalentes porque se asocian con la presencia de genes de virulencia que se han asociado con la patogenicidad de las cepas. Especialmente elevados fueron los porcentajes de cepas ExPEC entre las cepas de los serogrupos O1, O2, O4, O6, O7, O15, O18, O25, O75 y O83.

Entre las cepas del serogrupo O1 fueron más predominantes los genes *fimH*, *fimAv_{MT78}*, *papEF*, *papGII*, *sat*, *iucD*, *neuC-K1*, *traT*, *malX* y *usp*, y entre las cepas aisladas en los 2 últimos años los genes *papEF* y *papGII* fueron significativamente más prevalentes, lo cual nos muestra que estas cepas contienen un arsenal completo de factores de virulencia (adhesinas, toxina, sideróforo, cápsula, resistencia al suero y proteínas que aumentan su infectividad) siendo más del 90% ExPEC. Similares resultados fueron obtenidos en otros estudios (Bidet *et al.*, 2007; Naves *et al.*, 2008; Mora *et al.*, 2009).

La mayoría de las cepas del serogrupo O2 fueron positivas para los genes *fimH*, *papEF*, *sfa/focDE*, *iucD*, *iroN*, *kpsMII*, *malX* y *usp*. Además, en las últimas cepas los genes *cnf1* y *hlyA* fueron significativamente más prevalentes y el 72% de las cepas presentaron 8 o más genes de virulencia. El potencial virulento de estas cepas es elevado ya que contienen genes para varias adhesinas, toxinas, sideróforos, una cápsula tipo II y proteínas que aumentan su infectividad. Todos estos genes podrían jugar un papel muy importante en la patogénesis de estas cepas. Además, más del 90% de las cepas resultaron ser ExPEC.

Las cepas del serogrupo O4 presentaron un potencial de virulencia aún mayor ya que casi el 100% de sus cepas poseían los genes *fimH*, *papEF*, *sfa/focDE*, *cnf1*, *hlyA*, *iroN*, *malX* y *usp*; y lo más destacable, casi el 100% de sus cepas cumplen el criterio de cepas ExPEC y presentan 8 o más genes de virulencia. Todo este arsenal de genes de virulencia le puede conferir una ventaja competitiva y hace que estas cepas estén teóricamente muy bien equipadas para su éxito como patógenos.

En el trabajo realizado por Ananias y Yano (2008) las cepas del serogrupo O6 poseían los genes *fimH*, *sfaDE*, *papC*, *papGIII*, *kpsMII*, *hlyA*, *cnf1*, *iroN*, *trat* y *usp*. Similar perfil de

virulencia fue identificado en nuestro estudio, con la excepción de que nuestras cepas fueron también positivas para los genes *iucD* (sideróforo), *kpsMII-K5* (cápsula) y *sat* (toxina) y que entre las últimas cepas aisladas los genes *papGII*, *cnf1*, *hlyA* y *sat* fueron significativamente más prevalentes. El gen *papGIII* fue prevalente entre las primeras cepas, lo que concuerda con el estudio de Ananias y Yano (2008). De acuerdo con nuestros resultados las cepas del serogrupo O6 contienen el mayor número de genes de virulencia y posiblemente esa sea la razón de su elevada prevalencia entre las cepas de *E. coli* bacteriémicas.

El estudio realizado por Naves *et al.* (2008) muestra que las cepas de los serogrupos O6 y O2 producen una fuerte formación de biopelículas que ayudan a las bacterias a sobrevivir y aumentar su habilidad para causar enfermedad. También se ha mostrado que existe una asociación entre una elevada formación de biopelículas y algunos genes de virulencia como *papC*, *sfa/focDE*, *focG*, *hlyA* y *cnf1* (Kanamaru *et al.*, 2006b).

La mayoría de las cepas de los serogrupos O8 y O9 fueron de los grupos filogenéticos A y B1, lo que concuerda con el hecho de que las cepas de estos serogrupos presenten una media de genes de virulencia mucho menor que las cepas de los serogrupos O1, O2, O4, O6, O15, O18 y O25, asociados normalmente con los grupos filogenéticos B2 y D. Además, únicamente el 32% y el 39% de las cepas del serogrupo O8 y O9 presentaron el estatus ExPEC. En las cepas del serogrupo O8 los genes más prevalentes fueron *fimH*, *papEF*, *papGNT*, *iucD*, *iroN*, *cvaC*, *iss* y *traT*. Similar perfil de factores de virulencia fueron identificados por Johnson y Stell (2000) en cepas de este serogrupo. De acuerdo con nuestros resultados, la incidencia del serogrupo O9 se ha incrementado levemente en los últimos años y ha surgido el filoserogrupo O9-B1. También fue muy notoria la evolución de las cepas O9 en relación a sus características patogénicas porque en los primeros aislados la mayoría de sus cepas poseían solo los genes *fimH* y *iucD* mientras que en las últimas cepas su potencial patógeno se incrementó, ya que la mayoría de los aislados poseían los genes *fimH*, *papEF*, *iucD*, *iroN*, *cvaC*, *iss* y *traT*, pasando de un 11% (1989-1993) a un 43% (2010-2011) de cepas ExPEC.

En el estudio realizado por Vázquez *et al.* (1992), las cepas del serogrupo O18 fueron las más frecuentes entre las cepas de *E. coli* bacteriémicas aisladas entre los años 1981 y 1986. Entre nuestras cepas de *E. coli* bacteriémicas este serogrupo fue más prevalente en los primeros años del estudio (6%) (1989-1999). Sorprende la bajada de prevalencia observada en los

últimos años (3%) (2000-2011), ya que muchas de las cepas del serogrupo O18 poseen los genes *fimH*, *papEF*, *papGII*, *sfa/focDE*, *sat*, *hlyA*, *iucD*, *iroN*, *kpsM-K5*, *malX* y *usp*. Además, entre las últimas cepas aisladas el 62% contienen el gen *traT* (resistencia al suero) y el 50% el gen *ibeA* (factor de virulencia que contribuye a la invasión de la barrera hemato-encefálica). Además, el 88% de sus cepas recientes presentaron 8 o más genes de virulencia y fueron ExPEC. Por lo tanto las cepas de este serogrupo contienen un arsenal completo de factores de virulencia y se han implicado en la meningitis neonatal (Bidet *et al.*, 2007).

También se han realizado algunos estudios comparativos entre cepas humanas y aviares que han puesto de manifiesto que las cepas humanas de los serogrupos O1 y O18 comparten numerosos factores de virulencia con las aviares. Por lo tanto, sugieren que las cepas de *E. coli* patógenas aviares de los serotipos O18:K1:H7 y O1:K1:H7 son potenciales patógenos humanos (Moulin-Schouleur *et al.*, 2006; Johnson T. *et al.*, 2007; Mora *et al.*, 2009).

Lo más llamativo de nuestro estudio fue que las cepas del serogrupo O25 emergieron con gran fuerza a partir del año 2005, desplazando a los otros serogrupos prevalentes como el O1, O2, O4, O8, O15 y O18. El filoserogrupo más predominante fue el O25-B2, formado por cepas que contienen numerosos factores de virulencia. Entre las primeras cepas O25 aisladas el gen *sfa/focDE* fue significativamente más prevalente debido a que en ese período predominaba la variante alélica O25a y este gen está asociado con esa variante.

5.5.4. Filoserogrupos y potencial de virulencia

Aunque anteriormente hemos analizado los genes de virulencia en relación a los grupos filogenéticos y los serogrupos O de forma independiente, sin duda es más adecuado hacerlo en relación a los filoserogrupos ya que este concepto se acerca más a lo que entendemos hoy en día como grupo clonal y clon. Si analizamos los 8 filoserogrupos más prevalentes representados por al menos 100 cepas bacteriémicas observamos que la gran mayoría de las cepas de 7 de dichos filoserogrupos resultaron ser ExPEC: O1-D (89%), O2-B2 (95%), O4-B2 (95%), O6-B2 (97%), O15-D (86%), O18-B2 (81%) y O25-B2 (90%). La excepción fueron las cepas O8-A con únicamente un 44% de ExPEC.

En nuestro estudio es destacable que las cepas O6:B2 fueron las más prevalentes en los 2 primeros períodos (1989-1998 y 1999-2008) mientras que las del filogrupo O25-B2 fueron las más prevalentes en el último período (2009-2011) entre los hemocultivos de pacientes del HULA. En el último período también es destacable que se observó un aumento significativo en la prevalencia de cepas de los filoserogrupos O8-A, O9-B1 y O153-D. Muchas de las cepas O9-B1 (27% ExPEC) y O153-D (57% ExPEC) al igual que las O8-A (44% ExPEC) no presentaron los genes de virulencia necesarios para poder ser clasificadas dentro del estatus ExPEC. Es posible que las cepas de estos 3 filoserogrupos posean otros genes que jueguen un papel esencial en su virulencia o que sea su elevado nivel de resistencias a los antimicrobianos el que justifique su aumento de prevalencia en los últimos años.

5.5.5. Grupos clonales y potencial de virulencia

Las secuencias tipo del esquema de Achtman más representativas dentro de los 9 filoserogrupos más prevalentes entre las cepas bacteriémicas de nuestro estudio según los resultados parciales llevados a cabo en el LREC-USC serían las siguientes: ST59 para el filoserogrupo O1-D, ST73 para O2-B2, ST12 para O4-B2, ST73 para O6-B2, ST88 para O8-A y O9-A, ST393 para O15-D, ST95 para O18-B2 y ST131 para O25-B2. Las ST12, ST59, ST73, ST88, ST95, ST131 y ST393 se encuentran entre las más frecuentemente encontradas entre cepas de *E. coli* causantes de infecciones extraintestinales (ITU y sepsis) en otros países (**TABLA 70**). Por lo tanto podemos concluir que existe un número reducido de grupos clonales exitosos que tienen una distribución a nivel mundial y que en general las cepas pertenecientes a dichos clones presentan un gran arsenal de genes de virulencia y/o resistencia a antibióticos que justifica su frecuente asociación con infecciones extraintestinales. No obstante, en esta tesis doctoral únicamente hemos caracterizado con detalle las cepas de los grupos clonales O15-D-ST393, GCA-D-ST69 y B2-ST131, por lo que nos centraremos en discutir los resultados obtenidos con las cepas pertenecientes a estos 3 clones.

TABLA 70. Secuencias tipo (STs) más frecuentes en *E. coli* causantes de infecciones extraintestinales en seres humanos.

STs Complejo génico (Grupo filogenético)	Gibreel <i>et al.</i> (2012) Inglaterra 2007-2009 (n=300) 100% ITU	Croxall <i>et al.</i> (2011) Inglaterra 2008-2009 (n=250) 100% ITU >70 años	Alhashash <i>et al.</i> (2013) Inglaterra (n=125/140) ITU/sepsis	Banerjee <i>et al.</i> (2013b) EEUU 2011 (n=299) 90% ITU	Adams-Sapper <i>et al.</i> (2013) EEUU 2007-2010 (n=220) 100% Sepsis	Qin <i>et al.</i> (2013) China 2008-2010 (n=70) 100% ITU
Total STs	102	52	63/58	47	41	26
Más frecuentes	58,6%	52%	45,6%/59,3%	57%	65%	69%
ST10 (A)	4,3%		2,4%/X			10%
ST12 (B2)		X				
CC12 (B2)					6%	
ST14 (B2)	2,6%	X				
ST38 (D)		X				4%
ST69 (D)	9,0%	9%	7,2%/X	5%	9%	13%
ST73 (B2)	16,6%	11%	12,8%/17,1%	8%		
CC73 (B2)					8%	
ST88 (A)	2,0%					
ST95 (B2)	6,3%		4,8%/9,3%	11%	18%	6%
ST127 (B2)	3,6%	X	3,2%/X	6%		
ST131 (B2)	12,3%	22%	7,2%/21,4%	27%	23%	19%
ST141 (B2)			3,2%/X			
ST393 (D)						4,6%
ST404			4,8%/X			
ST405 (D)	1,7%					11%

X = Son secuencias muy frecuentes pero desconocemos el % exacto.

5.5.5.1. Grupo clonal O15-D-ST393

En Londres, entre 1986 y 1987, se describieron brotes por cepas de *E. coli* del serotipo O15:K52:H1 que posteriormente se sabía que pertenecían al grupo filogenético D y a la secuencia tipo ST393. A partir de esta detección la diseminación del grupo clonal O15-D-ST393 ha sido descrito en varios países (Phillips *et al.*, 1988; O'Neill *et al.*, 1990; Olesen *et al.*, 1995; Prats *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2002a; Cagnacci *et al.*, 2008; Olesen *et al.*, 2009; Blanco *et al.*, 2011; Platell *et al.*, 2012).

En nuestro estudio, de las 3.260 cepas de *E. coli* bacteriémicas, 137 fueron del serogrupo O15, de las cuales 92 cepas (2,8%) fueron positivas para el grupo clonal O15:H1-D-ST393; resultado similar al obtenido por Prats *et al.* (2000) en cepas de *E. coli* bacteriémicas de

Barcelona. Lo detectamos por primera vez en el año 1991. En los primeros años de nuestro estudio (1989-1999) se observaron algunas variaciones en la prevalencia de este clon, especialmente el año 1993 en el que alcanzó el 7%. En el segundo período del estudio (2000-2011) su distribución fue más homogénea, manteniéndose por debajo del 3% y solo 4 cepas fueron productoras de CTX-M-14. En otros estudios la prevalencia del grupo clonal O15:H1-D-ST393 fue superior al encontrado por nosotros, aunque la mayoría de las cepas fueron aisladas de infecciones urinarias (Cagnacci *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2009; Platell *et al.*, 2010). De acuerdo con estudios previos, en este grupo clonal pocas cepas resultaron ser productoras de BLEE (Blanco *et al.*, 2011; Peirano *et al.*, 2012).

Se entiende por clonalidad el hecho de que distintas cepas pertenezcan a un mismo serotipo, posean idénticos factores de virulencia y la misma impronta genética cuando se estudia su ADN. En el caso de nuestros resultados todas estas características se cumplieron: las cepas del grupo clonal O15:H1-D-ST393 presentaron idéntico perfil de virulencia. Así, más del 90% de sus cepas fueron positivas para los genes *fimH*, *fimAV_{MT78}*, *papEF*, *papGII*, *sat*, *iucD* y *kpsMII-K5*, lo que concuerda con nuestros ESTUDIOS I y III, donde las cepas del grupo clonal O15:H1-D-ST393 presentaron el mismo perfil de virulencia y se englobaron en un solo *cluster* (Blanco *et al.*, 2011; Mora *et al.*, 2011a). Otros estudios comparativos realizados en varios países también muestran similares resultados (Prats *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2002a; Johnson *et al.*, 2009; Olesen *et al.*, 2009).

Por lo tanto, comprobamos que el grupo clonal O15-D-ST393 no se ha expandido en los últimos años en nuestra área sanitaria y que la tendencia observada es incluso a la baja, lo que sorprende, ya que casi el 100% de las cepas de este grupo clonal son ExPEC y muchas resistentes.

5.5.5.2. Grupo clonal A (GCA-D-ST69)

En EE.UU., en el año 2001 se describió la diseminación del grupo clonal A en cepas de *E. coli* aisladas de orina que pertenecían a los serogrupos O11 y O77 y eran resistentes al cotrimoxazol (Manges *et al.*, 2001). Posteriormente otros estudios confirmaron la diseminación de este clon a nivel mundial, distribuido heterogéneamente y más prevalente en los EE.UU. (Johnson *et al.*, 2002b; Johnson *et al.*, 2005; Tartof *et al.*, 2005; Manges *et al.*,

2008; Johnson *et al.*, 2009; Platell *et al.*, 2010; Johnson *et al.*, 2011). En los estudios realizados por Manges *et al.* (2006) en EE.UU. y Skjot-Rasmussen *et al.* (2013) en Dinamarca, la prevalencia del grupo clonal A fue de 15% entre las cepas de *E. coli* bacteriémicas. En nuestro estudio, entre las cepas bacteriémicas la prevalencia del grupo clonal A fue mucho más baja (4,8%) y los serotipos más frecuentes (O11:H18, O15:H18, O17:H18, O17,77:H18, O25:H18; O44:H18, O73:H18 y O77:H18) fueron también identificados en otros estudios (Manges *et al.*, 2006; Skjot-Rasmussen *et al.*, 2013).

En nuestro estudio las cepas del grupo clonal A las detectamos por primera vez en el año 1992. Hay que destacar que hemos observado un incremento significativo de este grupo clonal en el segundo período (5,5% 2000-2011 *versus* 2,9% 1989-1999). Como en los estudios realizados en otros países, la producción de BLEE se detectó muy raramente, ya que solamente 2 cepas aisladas en los años 2008 y 2010 fueron productoras de CTX-M-14.

De acuerdo con los estudios previos, las cepas del grupo clonal A exhiben un potente perfil de virulencia que incluyen a los genes *fimH*, *papEF*, *papGII*, *sat*, *iucD*, *kpsMII-K5*, *kpsMIII* y *traT* (Johnson *et al.*, 2005; Manges *et al.*, 2006; Skjot-Rasmussen *et al.*, 2013).

5.5.5.3. Grupo clonal ST131.

Desde que fueron identificadas por primera vez en el año 2008 las cepas de *E. coli* del grupo clonal O25:H4-ST131 se han diseminado rápidamente a nivel mundial. Los numerosos estudios realizados en diferentes lugares muestran una elevada prevalencia de este grupo clonal y ponen de manifiesto que las cepas ST131 pueden pertenecer a diferentes serotipos (O25b:H4 y O16:H5) y subclones (H22, H30, H30-Rx, H41) (Nicolas-Chanoine *et al.*, 2008; Pitout *et al.*, 2009; George y Manges, 2010; Peirano y Pitout, 2010; Peirano *et al.*, 2010; Platell *et al.*, 2011b; Johnson *et al.*, 2012a; Matsumura *et al.*, 2012b; Kang *et al.*, 2013; Karfunkel *et al.*, 2013; López-Cerero *et al.*, 2013; McNally *et al.*, 2013; Olesen *et al.*, 2013; Riley, 2014).

En el presente estudio hemos encontrado una prevalencia del 4,8% del grupo clonal ST131 entre las 3.260 cepas de *E. coli* bacteriémicas. Esta prevalencia es menor a la observada en los ESTUDIOS II (32%), III (12%) y IV (19%), debido en parte a que en los 3 estudios

previamente citados únicamente se analizaron cepas aisladas en los últimos años (2006 a 2009) y que 2 de ellos (II y IV) incluían únicamente cepas productoras de BLEE. En el ESTUDIO V, en los primeros 11 años (1989-1999), la prevalencia del grupo clonal ST131 fue del 1%, pero en el segundo período (2000-2011) emergió con fuerza hasta alcanzar una prevalencia del 6,2%. La prevalencia del clon ST131 entre las 96 cepas BLEE bacteriémicas fue del 42% (40 cepas/35 de ellas CTX-M-15), mientras que entre las 3.164 cepas no productoras de BLEE fue del 4%. Recientemente, Lopez-Cerero *et al.* (2014) analizaron 1.077 cepas causantes de infecciones extraintestinales (82% urinarias, 6% sepsis y 12% de otras) en Sevilla durante el año 2010 y comprobaron que el 14% eran ST131 (23% de las 149 BLEE y 12% de las 928 no BLEE).

Nuestros resultados no son fácilmente comparables con los estudios realizados en otros países ya que en la mayoría el grupo clonal ST131 ha sido analizado solo en las cepas productoras de BLEE y/o resistentes a las quinolonas fluoradas (Pitout *et al.*, 2009; Matsumura *et al.*, 2012b; Peirano *et al.*, 2012). Además, existen pocos estudios anteriores al año 2000 en el que se hayan analizado cepas ST131. Bert *et al.* (2010) observaron que el grupo clonal ST131 suponía el 3% de los aislados de *E. coli* causantes de peritonitis y/o bacteriemia en pacientes cirróticos en Francia entre 1997 y 2006. Horner *et al.* (2014) realizaron un amplio estudio multicéntrico en el Reino Unido en el que analizaron 770 cepas aisladas de hemocultivos entre 2010 y 2012. El 17% de las cepas pertenecieron al grupo clonal ST131, representando el 62% de las productoras de BLEE y el 13% de las no productoras de BLEE. Johnson *et al.* (2010), estudiando cepas invasivas no aisladas de UTI (posiblemente en su mayoría bacteriémicas) del año 2007, y Banerjee *et al.* (2013d), con cepas aisladas en el año 2011, encontraron prevalencias del clon ST131 en EE.UU. del 17 y 27%, respectivamente. Por su parte, Adams-Sapper *et al.* (2013), trabajando con cepas bacteriémicas aisladas en EE.UU. entre 2007 y 2010, encontraron que el 26% eran ST131 (72% de las BLEE y 25% de las no BLEE). Williamson *et al.* (2013), trabajando en Nueva Zelanda, encontraron las cepas ST131 en el 17% de las cepas bacteriémicas comunitarias y en el 38% de las cepas bacteriémicas adquiridas en la comunidad después de una biopsia prostática. Por lo tanto, la prevalencia encontrada en los últimos años entre cepas de hemocultivos de pacientes del HULA es claramente inferior a la encontrada en los estudios realizados entre cepas bacteriémicas aisladas durante los últimos años en el Reino Unido, EE.UU y Nueva Zelanda. No obstante, es muy similar a la encontrada recientemente por Lafolie *et al.* (2014) en Francia en el año

2013. Así, entre 249 aislados consecutivos de *E. coli* de hemocultivos (8% BLEE) detectaron 10 cepas (4%) ST131.

El grupo clonal ST131 también está asociado con el serotipo O16:H5 que fue recientemente identificado en Australia, Japón y Dinamarca. Su prevalencia fue muy baja en Australia y Dinamarca, mientras que en Japón fue de 4% (Platell *et al.*, 2011b; Matsumura *et al.*, 2012b; Olesen *et al.*, 2013). En nuestro estudio su prevalencia fue también muy baja; solo 7 cepas del grupo clonal ST131 presentaron el serotipo O16:H5, que apareció por primera vez el año 2005, igual que en el estudio de Japón que también fue identificado el mismo año. En nuestro laboratorio, entre las cepas productoras de BLEE aisladas en el año 2012 de pacientes del HULA de Lugo, identificamos 2 cepas productoras de CTX-M-14 que eran del serotipo O16:H5 (Dahbi *et al.*, 2013). De nuestras 7 cepas bacteriémicas, solo una cepa aislada en el año 2010 fue productora de CTX-M-14.

Las cepas del grupo clonal ST131 pertenecen al grupo filogenético B2 y por lo tanto contienen numerosos factores de virulencia. En estudios previos los genes más prevalentes fueron *fimH*, *F10 papA*, *sat*, *iucD*, *kpsMII*, *traT*, *malX* y *usp* (Johnson *et al.*, 2009; Blanco *et al.*, 2011; Platell *et al.*, 2011b; Karfunkel *et al.*, 2013; Rodríguez-Baño *et al.*, 2013; Olesen *et al.*, 2013). Similar perfil de virulencia fue identificado en las cepas bacteriémicas en el presente estudio. Además, el 85% de las cepas cumplieron el criterio de cepas ExPEC, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Karfunkel *et al.* (2013). También es destacable que 13 genes de virulencia (*papGIII*, *afa/draBC*, *afa* FM955459, *cnf1*, *cdtB4*, *hlyA*, *iroN*, *kpsMII-K2*, *neuC-K1*, *iss*, *ibeA*, *malX* y *usp*) fueron significativamente más prevalentes en las cepas del grupo clonal ST131 comparado con los grupos clonales O15:H1-D-ST393 y GCA-D-ST69.

5.5.5.3.1. Virotipos y subclones de las cepas ST131

En el ESTUDIO IV de esta memoria, en base a 4 genes (*afa* FM955459, *iroN*, *ibeA* y *sat*), se identificaron 4 virotipos (A, B, C y D) entre las cepas del grupo clonal O25b:H4-B2-ST131. En el ESTUDIO V identificamos 2 nuevos virotipos (E y F) que emergieron en los años 2009 y 2011, en base a los genes *papGII*, *cnf1* y *hlyA*. Además, las cepas del virotipo D con el gen

ibeA se subdividieron en subvirotipos D1 a D5 en base a los genes *sat*, *afa/draDE*, *papGIII*, *cnfI*, *hlyA*, *cdtB* y *neuC-K1*.

Con respecto a los virotipos encontrados en el ESTUDIO IV en el que analizamos 130 cepas O25b:H4-ST131 productoras de BLEE que fueron aisladas en el año 2006 en 30 hospitales de España, sorprende la bajísima prevalencia del virotipo B y la alta prevalencia del virotipo D entre las cepas bacteriémicas.

Entre nuestras cepas de *E. coli* bacteriémicas la primera cepa del grupo clonal O25b:H4-ST131 fue del virotipo D y se aisló en el año 1993. En los primeros 11 años solo este virotipo D fue identificado. En el segundo período (2000-2011) emergieron los otros 5 virotipos. Lo más llamativo fue que en 2011 la prevalencia del virotipo D descendió y emergió con fuerza el virotipo F. A pesar de que las cepas del virotipo D presentaron el mayor número de genes de virulencia, en el virotipo F el 100% de sus cepas contenían los genes *fimH*, *papEF*, *papGII*, *sat*, *iucD*, *kpsMII-K5*, *traT*, *malX* y *usp*. Como se puede observar contienen un combinado y completo arsenal de factores de virulencia que potencian su patogenicidad. Lo mismo sucedió con las cepas del virotipo E, que contienen los mismos genes del virotipo F, pero adicionalmente contienen 2 toxinas más (Cnf1 y Hly). Además, el 100% de las cepas del virotipo E y el 83% de las F fueron productoras de CTX-M-15, mientras que en el virotipo D solo el 6% de las cepas fueron productoras de BLEE (CTX-M-9 y SHV-12). En nuestro laboratorio, en un estudio con cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas en el 2012, identificamos 2 *clusters* con idéntico patrón de factores de virulencia que los virotipos E y F, y todas ellas eran productoras de CTX-M-15 (Dahbi *et al.*, 2013). Por lo tanto, y como era de esperar, estos 2 virotipos también están presentes entre las cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con infecciones urinarias.

Desde que aparecieron en el año 2006, las cepas O25b-ST131 del virotipo A han incrementado su prevalencia de forma significativa entre las cepas bacteriémicas. El 76% de las cepas del virotipo A fueron productoras de BLEE (CTX-M-15) y el 100% contenían 7 genes de virulencia (*fimH*, *afa/draBC*, *afa* FM955459, *sat*, *kpsMII-K2*, *malX* y *usp*). Lo que las diferencia de las cepas de los otros virotipos es la adhesina Afa/draBC que promueve la persistencia bacteriana dentro del tracto urinario y puede modular varias vías de señalizaciones del hospedador como las respuestas proinflamatorias. Otra diferencia es el tipo

de antígeno capsular, que en las cepas del virotipo A es el K2 mientras que en las de los virotipos B y C es el K5.

En el estudio realizado por Johnson *et al.* (2012b), 579 cepas de *E. coli* ST131 fueron analizadas por PFGE. Ellos identificaron una elevada diversidad en los pulsotipos y un predominio de ciertos pulsotipos de alta prevalencia que exhiben patrones distintivos.

La amplia distribución global de unos pocos pulsotipos predominantes de ST131 sugiere una continua propagación clonal más que una esporádica aparición de cepas heterogéneas. En nuestro estudio lo más destacable fue que al analizar las 157 cepas ST131 por PFGE los pulsotipos fueron distribuidos en 9 *clusters* específicos de los virotipos, que confirmaban que los virotipos tenían una base clonal. No obstante, como las cepas del virotipo D se englobaban en 5 *clusters* bien diferenciados decidimos subclasificarlas en los subvirotipos D1, D2, D3, D4 y D5.

La determinación del alelo *fimH* por secuenciación es una herramienta recientemente desarrollada que resulta muy útil para identificar subclones dentro de los grupos clonales de cepas ExPEC (Weissman *et al.* 2012; Paul *et al.* 2013). Johnson *et al.* (2013), explorando la estructura clonal de 352 cepas ST131 históricas y recientes aisladas en EE.UU. de 1967 a 2011, encontraron 7 alelos *fimH* (H15, H22, H27, H30, H35, H41, H94), siendo el subclón H30 (67%) el más frecuente seguido por el H22 (21%) y H35 y H41 (ambos con 5% de prevalencia). Durante el primer período (1967-1999) solamente encontraron cepas ST131 susceptibles a las quinolonas fluoradas y entre dichas cepas predominaban los subclones H22 y H35. Las cepas ST131 resistentes a las quinolonas fluoradas aparecieron durante el período 2000-2005 y se asociaron casi exclusivamente con el subclón H30. Dieciocho de las 19 cepas del subclón H41 eran susceptibles a las quinolonas fluoradas y fueron aisladas entre los años 2006 y 2011. Recientemente, Johnson *et al.* (2014) establecieron la asociación entre el alelo *fimH41* y el serogrupo O16. Por su parte, Price *et al.* (2013), después de realizar la secuenciación del genoma completo de un amplio número de cepas del subclón H30, identificaron un sublinaje formado por cepas CTX-M-15 que denominaron H30-Rx por tener un extenso patrón de resistencias a los antimicrobianos.

En nuestro estudio, entre las 157 cepas bacteriémicas ST131 identificamos los subclones H22, H30 (incluyendo a su vez los subclones H30-Rx y H30 no-Rx) y H41. La mayoría de las 150 cepas O25b:H4-ST131 pertenecieron al subclón H30 (64%) o al subclón H22 (30%). En contraste, las 7 cepas O16:H5-ST131 pertenecieron al subclón H41. Además, el 100% de las cepas O25b:H4-ST131 de los virotipo A, B, C, E y F pertenecieron al subclón H30 o a un derivado mutacional del mismo (H328) y el 100% de las cepas del virotipo D pertenecieron al subclón H22 o a derivados mutacionales del suclón H22 (H161, H298, H322, H326, H332 y H379). Como en el estudio de Johnson *et al.* (2013) de EE.UU., en nuestro estudio durante los primeros años (1989-1999) las cepas H22 eran las más prevalentes, pero desde que emergieron en el 2001 las cepas H30 se fueron incrementando continuamente su prevalencia hasta que en el último año (2011) englobaron a 20 cepas frente a únicamente una H22. Y lo que es más destacable, de las 20 cepas H30 aisladas en el 2011, 15 cepas eran del subclón H30-Rx. Es importante destacar que el 100% de las cepas de los virotipos A, E y F pertenecieron al subclón H30-Rx, mientras que la mayoría de las cepas de los virotipos B y C pertenecieron al subclón H30 no-Rx. También es importante destacar que el 100% de las cepas H30-Rx y el 91% de las cepas H22 se pudieron clasificar como ExPEC frente a tan solo el 69% de las H30 no-Rx y el 57% de las H41.

Recientemente, Lafolie *et al.* (2014) entre un total de 490 cepas de *E. coli* aisladas en un hospital de Besancon (Francia) en el año 2013 detectaron el grupo clonal ST131 en el 4% de las cepas bacteriémicas y en el 17% de las productoras de BLEE. La mayoría de las cepas ST131 pertenecían al subclón H30 (45/52; 87%).

En el estudio realizado por Banerjee *et al.* (2013c) con cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con ITU (92%) y asociadas con la comunidad (95%) en la región de Chicago entre los años 2007 y 2010 observaron que el subclón H30 estaba ampliamente expandido. Examiraron 100 cepas productoras de BLEE y 167 no productoras, comprobando que el 49% y el 13% pertenecían al grupo clonal ST131 respectivamente. Entre las 49 cepas ST131 productoras de BLEE, 48 (98%) pertenecían al subclón H30 y 44 (92%) al subclón H30-Rx. En contraste, entre las 22 cepas no productoras de BLEE, sólomente 14 (64%) pertenecieron al subclón H30 y únicamente 3 (14%) eran del subclón H30-Rx. Como en nuestro estudio la mayoría de sus cepas H30 eran resistentes a las quinolonas fluoradas (98%) y la enzima CTX-M-15 se asoció con el subclón H30-Rx. En el estudio de Banerjee *et al.* (2013c) los genes *iha*, *sat* e *iutA* se

asociaron preferentemente con las cepas H30, mientras que los genes *iroN*, *neuC-K1* e *ibeA* se asociaron con las cepas no pertenecientes al subclón H30. En las cepas H30 observaron que el gen *kpsMII* era más frecuente entre las cepas H30-Rx y el K5 entre las H30 no-Rx. No obstante, la media de genes de virulencia fue muy similar en ambos subclones con el alelo *fimH30*. Los resultados obtenidos en nuestro estudio coinciden en muchos aspectos con los observados por Banerjee *et al.* (2013c), con la única excepción de que nosotros sí que hemos observado que las cepas H30-Rx presentan más genes de virulencia que las H30 no-Rx. Así, al comparar los genes de virulencia de las cepas del subclón H30-Rx con las H30 no-Rx, nosotros observamos que los genes *papEF*, *papGII*, *afa* FM955459 y *kpsMII-K2* tenían una prevalencia significativamente mayor entre las cepas H30-Rx y los genes *kpsMII-K5* y *traT* entre las cepas H30 no-Rx.

En un estudio recientemente publicado por Peirano *et al.* (2014a) emplearon el esquema de virotipado desarrollado en el LREC-USC en la caracterización de 240 cepas ST131 productoras de BLEE aisladas entre los años 2000 y 2010 en 9 países (pero la gran mayoría de Canadá, EE.UU. y Nueva Zelanda). El 56% eran de hemocultivos, el 38% de urocultivos y el 76% de la comunidad. El 80% eran productores de CTX-M-15 y el 17% CTX-M-14. El 92% pertenecían al subclón H30 y el 75% al subclón H30-Rx. Unas pocas cepas pertenecían a los subclones H22 (2 cepas), H35 (4 cepas) y H41 (14 cepas). En lo que respecta a los virotipos, 186 (78%) presentaron el virotipo C, 52 (22%) el virotipo A, 2 el virotipo D y ninguna el virotipo B. Como en nuestro estudio el 100% de las cepas del virotipo A pertenecieron al subclón H30-Rx, pero a diferencia de nuestro estudio el 69% de las cepas del virotipo C también pertenecieron al subclón H30-Rx. No obstante, hay que tener en cuenta que la mayoría de las cepas bacteriémicas del virotipo C de nuestro estudio eran no productoras de BLEE lo que explicaría que la mayoría no fuesen del subclón H30-Rx. En este sentido, remarcar que todas las cepas de los virotipos A (29 de 29) y B (40 de 40) y la mayoría del virotipo C (27 de 41) incluidas en el ESTUDIO IV (cepas productoras de BLEE aisladas en diferentes hospitales españoles en el año 2006) resultaron ser del subclón H30-Rx. En contraste, 14 de las 17 cepas del virotipo D pertenecieron al subclón H22 y las 3 restantes presentaron alelos mutacionales derivados del *fimH22* (H332, H374, 377).

Olesen *et al.* (2014) analizaron una colección de 75.000 cepas de *E. coli* recibidas en el *World Health Organization, Collaborating Centre for Reference and Research on Escherichia and*

Klebsiella (*Statens Serum Institut, Copenhagen, Dinamarca*) de 85 países entre los años 1951 y 2011. Las cepas procedían de seres humanos, animales y del medio ambiente. Para identificar las cepas del grupo clonal ST131 centraron sus investigaciones en las cepas del serogrupo O25. Posteriormente, las cepas del serogrupo O25 fueron analizadas por PCR para los alelos *pabB* y *O25b rfb*, y los polimorfismos de *gyrB* y *mdh* asociados con la secuencia tipo ST131. En total identificaron 119 cepas O25 ST131 aisladas entre 1968 y 2011. A estas 119 cepas se añadieron 9 cepas ONT:H4 ST131 procedentes de un estudio previo de Olesen *et al.* (2013). Las 128 cepas ST131 eran de 16 países, aunque la mayoría (80 cepas) procedían de Dinamarca. Aunque el origen de las cepas ST131 únicamente se conocía en el 71% de los casos, el 41% se sabía que procedían de orina, el 14% de heces, el 5% de sangre y el 5% de alimentos o aves de producción. Las 3 primeras cepas ST131 fueron recibidas en el año 1968 y procedían de Inglaterra y Perú, pero se desconocía su origen. La cepa de origen conocido más antigua era del año 1981 y se había aislado de heces humanas en Guatemala. De las 128 cepas ST131, 62 (48%) eran del subclón no-H30 (48%), 17 (13%) del subclón H30 no-Rx y 49 (38%) del subclón H30-Rx. La distribución temporal de los 3 subclones se puede evaluar por su mediana y el rango: no-H30 (mediana 1998, rango 1968-2005), H30 no-Rx (mediana 2010, rango 1997 a 2011) y H30-Rx (mediana 2010, rango 2005-2010). En nuestro estudio de cepas aisladas de bacteriemia entre los años 1989 y 2011, identificamos 157 cepas ST131 con la siguiente prevalencia de subclones: 39% no-H30, 33% H30 no-Rx y 29% H30-Rx. El orden de aparición de estos 3 subclones fue el mismo que en el estudio de Olesen *et al.* (2014): primero el no-H30, representado por las cepas con el alelo *fimH22* y sus derivados mutacionales (rango 1993-2011); segundo el H30 no-Rx (rango 2001-2011); y tercero el H30-Rx (rango 2006-2011) (**TABLA 71**). Este orden de aparición coincide con el árbol filogenético que se deduce tras analizar el genoma completo de las cepas ST131 de dichos subclones (**FIGURA 45**) (Price *et al.* 2013; Petty *et al.* 2014). Las primeras cepas ST131 eran susceptibles a las quinolonas fluoradas, después emergen las cepas H30-R resistentes a las quinolonas fluoradas y por último las H30-Rx resistentes a las quinolonas fluoradas y productoras de CTX-M-15. Las cepas H41 del serogrupo O16 se separan de los subclones H22 y H30 en una fase anterior y forman una rama independiente con el alelo *fimH41*. No obstante, siguen compartiendo numerosos genes de virulencia con las cepas O25b:H4 de los subclones H30 no-Rx y H30-Rx. En nuestro estudio de bacteriemias las cepas del subclón H41 las detectamos por primera vez en el año 2005, al igual que en el estudio realizado por Matsumura *et al.* (2014) con cepas BLEE en Japón. En ambos estudios se aíslan por primera

vez las cepas del subclón H30-Rx en el año 2006. No obstante, en Canadá ya se habían aislado cepas H30-Rx en el año 2003 entre las resistentes a quinolonas fluoradas obtenidas de pacientes con sepsis (TABLA 71).

Olesen *et al.* (2014) emplearon el esquema de virotipado desarrollado en el LREC-USC y publicado en el estudio Mora *et al.* (2014), que incluía los virotipos A, B, C, D1 a D5 y E. De las 128 cepas ST131, el 31% eran del virotipo A, el 1% del virotipo B, el 17% del vitotipo C, el 25% de los virotipos D1-D5 y el 1% del virotipo E. Como en nuestro estudio, el virotipo A se asoció con el subclón H30-Rx, mientras que el virotipo C se asoció con las cepas H30 no-Rx, y los virotipos D1-D5 con cepas no H30. También en el estudio de Matsumura *et al.* (2014) con cepas ST131 BLEE en Japón se analizaron los virotipos de las cepas encontrándose el virotipo A en el 2%, el B en el 0,4%, el C en el 69% y el D en el 2%. Hay que tener en cuenta que en el estudio realizado en Japón el 72% de las cepas ST131 pertenecían al subclón H30 no-Rx y eran productoras de los enzimas CTX-M-14 o CTX-M-27. La situación del Japón es muy diferente a la observada en EE.UU, Canadá y Europa, ya que entre los años 2001 y 2007 las cepas H30 quinolona resistentes productoras de CTX-M-14 predominaban (46% de las ST131) mientras que las H30 quinolona resistentes productoras de CTX-M-27 y las H30-Rx quinolona resistentes productoras de CTX-M-15 eran raras. En contraste, a partir del año 2008 los 2 últimos subgrupos de cepas dominaban (45% y 24% de las cepas ST131 frente al 15% de cepas CTX-M-14).

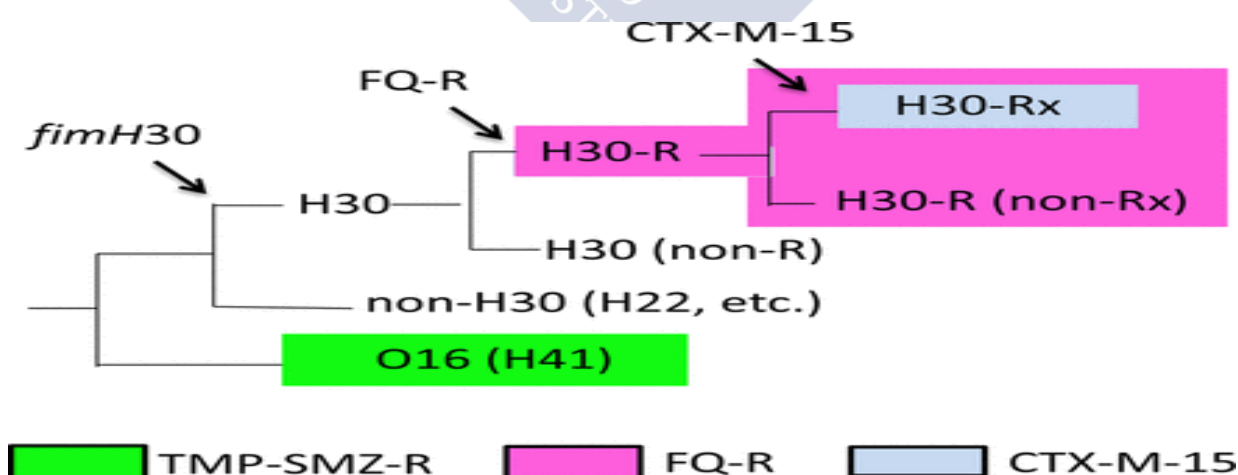


FIGURA 45. Dendrograma de la filogenia del grupo clonal ST131 reconstruido tras analizar el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*) usando el genoma completo. Las flechas indican la emergencia del alelo *fimH30*, la resistencia a las quinolonas fluoradas (FQ-R) y CTX-M-15. Los colores indican asociaciones de los subclones con resistencias. FQ, fluoroquinolonas; TMP-SMZ, trimetoprim-sulfametoxazol; R, resistencia (Banerjee y Johnson, 2014).

TABLA 71. Subclones H22, H30, H30-Rx, H41 y virotipos de ST131: Orden de aparición en distintos estudios.

	Peirano y Pitout (2014)	Matsumura <i>et al.</i> (2014)	Olesen <i>et al.</i> (2014)	Mamani <i>et al.</i> (Tesis-2014)
País	Canadá	Japón	Dinamarca y otros 15 países	Lugo (España)
Período analizado	2000-2010	2001-2012	1968 a 2012	1989-2011
Tipo de estudio	BLEE y no BLEE 100% resistentes a fluoroquinolonas	Cepas BLEE 100% aislados clínicos	BLEE y no BLEE Únicamente el 21% aislados clínicos	BLEE y no BLEE 100% aislados clínicos Bacteremia
Número de cepas ST131 analizadas	312	461	128	157
Total H22		10 (2%)		45 (29%)
Total no H30	13		62 (48%)	60 (39%)
Total H30 no-Rx	202	334 (72%)	17 (13%)	52 (33%) incluida la cepa
Total H30-Rx	97	64 (14%)	49 (38%)	45 (29%)
Total H41		49 (11%)		7 (4%)
Virotipo A		9 (2%)	40 (31%)	34 (21%)
Virotipo B		2 (0,4%)	1 (1%)	4 (3%)
Virotipo C		318 (69%)	22 (17%)	52 (33%)
Virotipo D		10 (2%)	32 (25%)	51 (32%)
Primer año de aparición de los subclones				
H22			1968 (no H30)	1993
H22-Cip ^R	2003		1972 (no H30)	2008
H22-BLEE			2004 (no H30)	2008 (2006)
H30 no-Rx			1997	2001
H30 no-Rx Cip ^R			2003	2004
H30 no-Rx Cip ^R BLEE	2000			
H30-Rx Cip ^R BLEE	2003		2005	2006
H30-Rx Cip ^R				2007
H41				2005
H41 Cip ^R				2009
H41-BLEE		2005		2010
En EE.UU. la primera cepa ST131 se aisló en 1967 y era del subclon H22 y sensible a las quinolonas fluoradas (Johnson et al. 2013). Las primeras cepas H22 y H30 resistentes se aislaron en el período 2000-2005.				

En el LREC-USC, pero formando parte de otra tesis doctoral, hemos examinado la virulencia *in vivo* en un modelo de sepsis murino de 23 cepas del grupo clonal ST131 pertenecientes a los serotipos O25b:H4 (19 cepas) y O16:H5 (4 cepas) y a diferentes virotipos (A, B, C, D1, D2, D3, D4, D5 y E) (Mora *et al.* 2014). Catorce (61%) de las 23 cepas ST131 mataron entre el 90 y 100% de los ratones y 18 (78%) al menos el 50%. Es destacable que se observaron diferentes patrones de virulencia *in vivo* que se asociaron con determinados virotipos. Las 6 cepas H30-Rx de los virotipos A, B y C (2 cepas de cada virotipo) ensayadas resultaron ser altamente virulentas ya que mataron el 100% de los ratones. Sorprendentemente las 2 cepas H30-Rx del virotipo E, a pesar de presentar numerosos genes de virulencia, mostraron una baja letalidad (40% y 10%). Las 11 cepas del virotipo D ensayadas tuvieron un comportamiento heterogéneo siendo 5 (2 D1, D2 y 2 D4) altamente virulentas, ya que mataron $\geq 90\%$ de los ratones, 4 (D2, D3, y 2 D5) moderadamente letales, matando del 40% al 60%, y 2 de baja letalidad, matando el 10% (D4) y el 20% (D3) de los ratones. El comportamiento de las cepas ST131 del serotipo O16:H5 también nos sorprendió mucho ya que a pesar de tener un media de genes de virulencia inferior a las del serotipo O25b:H4, resultaron ser altamente letales ya que las 4 cepas ensayadas mataron $\geq 80\%$ de los ratones. Posteriormente, Johnson *et al.* (2014) confirmaron este novedoso encuentro, ya que sus 6 cepas ST131 O6:H5 mataron del 60% al 100% de los ratones.

5.5.6. Cepas productoras de BLEE y otras resistencias

Numerosos estudios a nivel mundial han mostrado la emergencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEE y también se ha mostrado que estas cepas son una importante causa de bacteriemias (Peirano *et al.*, 2012; Rodríguez-Baño *et al.*, 2012; Adrianzen *et al.*, 2013; Blanco *et al.*, 2013; Kang *et al.*, 2013; Karfunkel *et al.*, 2013; López-Cerero *et al.*, 2013; Rodríguez-Baño *et al.*, 2013; Perianes-Díaz *et al.*, 2013; To *et al.*, 2013). En nuestro estudio, de las 3.260 cepas bacteriémicas aisladas durante 23 años, el 3% fueron productoras de BLEE. Este resultado es similar a los obtenidos en estudios realizados en Canadá por Pitout *et al.* (2009) y Peirano *et al.* (2012), con cepas bacteriémicas aisladas en los períodos 2000-2007 (2% de prevalencia) y 2000-2010 (4% de prevalencia). En Corea, también se encontró una prevalencia similar (4%) de cepas BLEE bacteriémicas (Kang *et al.*, 2008). Sin embargo, en estudios realizados en Perú (26%, 2006-2008), Israel (8%, 2003 a 21% 2009) y China (24%

2007-2008), la prevalencia de cepas BLEE entre las bacteriémicas fue muy superior (Adrianzen *et al.*, 2013; Karfunkel *et al.*, 2013; To *et al.*, 2013).

Hoy en día la atención se centra en el cambio epidemiológico que se está produciendo en cuanto a los tipos de BLEE más prevalentes y su distribución. De acuerdo con nuestros resultados la primera cepa BLEE apareció en el año 2001, era productora de CTX-M-14, del serotipo O2:H5 y del grupo filogenético B2. En los primeros 17 años (1989-2005) la prevalencia de las cepas BLEE era del 0,5% y el enzima predominante CTX.M-14. No obstante, a partir del 2006, cuando emergieron las cepas productoras de CTX-M-15 del serotipo O25b:H4, la prevalencia de cepas BLEE se incrementó de forma significativa, llegando en el 2011 al 8% y siendo la mayoría de las cepas del clon ST131 y productoras de CTX-M-15. Similar incremento exponencial fue observado en el estudio de Peirano *et al.* (2012) en Canadá. En el año 2000 identificaron una prevalencia de 0,3% de cepas BLEE que eran productoras de CTX-M-14, y a partir del 2007 se observó un incremento de las cepas ST131 productoras de CTX-M-15, y en el 2010, 63 cepas (14%) fueron productoras de BLEE, de las cuales 49 eran del clon ST131. Este incremento en cepas BLEE bacteriémicas también fue observado en el estudio realizado por Kang *et al.* (2013) en Corea, donde la prevalencia de cepas BLEE fue del 4% en el 2006 y del 14% en el año 2011.

Debido a que actualmente a nivel mundial predominan las cepas productoras de CTX-M, se han realizado numerosos estudios epidemiológicos sobre el tipo de CTX-M prevalente en los diferentes países. En este sentido, las cepas de *E. coli* ST131 productoras de CTX-M-15 se han diseminado a nivel mundial (Cantón y Coque, 2006; Pitout *et al.*, 2009; Peirano *et al.*, 2012; Blanco *et al.*, 2013; Kang *et al.*, 2013; Olesen *et al.*, 2013; Yano *et al.*, 2013). En el presente estudio la mayoría de las cepas bacteriémicas BLEE fueron productoras de CTX-M-15 y entre estas cepas el 88% fueron del grupo clonal ST131. Las cepas productoras de CTX-M-14 también aumentaron a partir del año 2006, incrementándose 10 veces su prevalencia, pasando de un 0,2% en el período 1989-2005 a un 2,0% del 2006-2011. No obstante, las cepas CTX-M-14 pertenecieron a diferentes serotipos y grupos filogenéticos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Blanco *et al.* (2009) tras serotipar y realizar el tipado molecular por PFGE de 56 cepas productoras CTX-M-14 aisladas la mayoría de urocultivos en los años 2006 y 2007 en el HULA de Lugo.

Desde que emergieron, las cepas de *E. coli* del grupo clonal ST131 se han diseminado rápidamente y han contribuido en gran parte a la creciente prevalencia de cepas de *E. coli* multirresistentes a nivel mundial. Específicamente, la mayoría de estas cepas son resistentes a fluoroquinolonas y algunas son co-resistentes a aminoglucósidos, trimetoprim/sulfametoxazol y cefalosporinas (Coque *et al.*, 2008a; Nicolas-Chanoine *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2012a; Banerjee y Johson, 2013). En nuestros resultados, el 64% de las cepas ST131 fueron resistentes a la ciprofloxacina y el 28% fueron multirresistentes a 3 o más familias de antimicrobianos. La resistencia a la ciprofloxacina se asoció con las cepas ST131 del serotipo O25b:H4 con los virotipos A, B, C, E y F y de los subclones H30 y H30-Rx, mientras que la producción de CTX-M-15 se asoció con el subclón H30-Rx. Precisamente estas cepas fueron las que emergieron en los últimos años y probablemente la resistencia a las fluoroquinolonas puede haber contribuido de forma importante a su expansión. En las cepas del virotipo D no se observó esa expansión, siendo únicamente el 6% productoras de BLEE y el 8% resistentes a la ciprofloxacina.

De acuerdo con nuestros resultados, en los primeros 5 años (1989-1993) únicamente el 18% de las cepas fueron resistentes a los antimicrobianos analizados en este estudio y el 1% de las cepas fueron resistentes a la ciprofloxacina. Similar perfil de resistencias fue encontrado en el estudio de Javaloyas *et al.* (2003) realizado en Barcelona entre los años 1989 y 1993, donde el 98% de las cepas de *E. coli* bacteriémicas fueron sensibles a la ciprofloxacina, aunque en el período 1994-1998 ese porcentaje disminuyó al 88%.

Diferente perfil de resistencia antimicrobiano fue observado en los 2 últimos años de nuestro estudio. El 31% de las cepas fueron resistentes a la ciprofloxacina y el 16% fueron multirresistentes. Este aumento se debe a que en esos últimos años se incrementaron las cepas de los grupos clonales GCA-D-ST69 y O25-B2-ST131, lo cual incrementó la resistencia a la ciprofloxacina y la multirresistencia. Además, otro aspecto muy importante es que en los últimos años emergieron algunos filoserogrupos multirresistentes como el O8-A, O8-B1, O9-A, O9-B1, O101-A y O153-D. Será necesario concentrar los esfuerzos en el futuro en la caracterización de las cepas de estos filoserogrupos ya que pueden representar grupos clonales que se pueden estar expandiendo exitosamente en la actualidad.

Al comparar las características de las cepas de *E. coli* bacteriémicas aisladas en los primeros 5 años (1989-1993) con las últimas (2010-2011), observamos que en los últimos años se han dado cambios importantes en relación a sus genes de virulencia y a su perfil de resistencia antimicrobiano, aumentando teóricamente su potencial de virulencia. Probablemente uno de los factores que ha contribuido a estos cambios es el tratamiento previo con antibióticos, en especial quinolonas, que ha llevado a una elevada tasa de resistencias que constituye no solo un riesgo para el desarrollo de la bacteriemia por bacterias productoras de BLEE, sino que se asocia a una peor evolución, ya que son estos pacientes los que muestran una mayor mortalidad intrahospitalaria y tasa de reingreso hospitalario (Perianes-Díaz *et al.*, 2013).

Especialmente preocupante es la aparición en escena de las carbapenemasas (Cantón *et al.* 2012). Peirano *et al.* (2011) caracterizaron la cepa CH01 ST131 aislada de un paciente con una ITU que había retornado a EE.UU. después de estar hospitalizado recientemente en la India. Dicha cepa producía la carbapenemasa NDM-1 y al compararla con otra cepa NDM-1 ST101 aislada previamente de un paciente en Canadá comprobaron que poseía una significativa mayor cantidad de genes de virulencia. Peirano *et al.* (2014c) recientemente han publicado un interesante estudio en el que caracterizaron 116 cepas productoras de carbapenemasas aisladas en 16 países durante el período 2008-2013. Después de analizar 47.843 cepas de *E. coli*, encontraron 407 que no eran susceptibles al ertapenem o al imipenem. Un total de 116 de las 407 cepas fueron positivas para las carbapenemasas de los tipos NDM, KPC, OXA-48-like, VIM e IMP. Se identificaron los siguientes genes: 44 (38%) *bla*_{NDM}, 38 (33%) *bla*_{KPC}, 30 (26%) *bla*_{OXA-48-like}, 2 (2%) *bla*_{VIM-1} y 2 (2%) *bla*_{IM}. Las cepas habían sido aisladas de muestras intraabdominales (37%), fluido peritoneal (16%), fluido biliar (10%), orina (30%) y otros incluyendo esputos y tejidos (9%). Cuarenta y una (35%) de las 116 cepas pertenecían al grupo clonal ST131. Las cepas ST131 productoras de carbapenemasas procedían de 16 países de 5 continentes: Filipinas, India, China, Tailandia, Vietnam, Argentina, Colombia, Ecuador, Panamá, Puerto Rico, EE.UU., Jordania, Marruecos, Emiratos Arabes Unidos, Turquía e Italia. La mayoría de las cepas ST131 eran *bla*_{KPC} (58%), *bla*_{OXA-48-like} (32%), *bla*_{NDM-1} (7%), y *bla*_{IMP-14} (2%). La secuenciación de los alelos *fimH* de las cepas permitió establecer los siguientes subclones entre las cepas ST131 productoras de carbapenemasas: H30 (58%), H41 (7%), H54 (7%), H22 (5%), H27 (5%), H191 (5%), H24 (2%), H32 (2%), H65 (2%), H434 (2%) y H435 (2%). De las 24 cepas del subclón H30, 5 pertenecían al subclón H30-Rx y 19 al subclón H30-R. En otro interesante estudio, O'Hara *et*

al. (2014) caracterizaron 20 cepas productoras de KPC aisladas en EE.UU. entre los años 2008 y 2012, comprobando que 12 (60%) eran ST131. Las 12 cepas pertenecían al subclón H30.

Afortunadamente nosotros no hemos detectado ninguna cepa de *E. coli* productora de carbapenemasas en nuestra área sanitaria ni entre las cepas procedentes de otros hospitales españoles. No obstante, Tórtola *et al.* (2005) ya habían detectado una cepa de *E. coli* VIM-1 en el año 2003 en el Hospital Vall d'Hebron de Barcelona. Miró *et al.* (2013) examinaron en el año 2009 cepas procedentes de 35 hospitales españoles y únicamente detectaron 1 cepa de *E. coli* que también era positiva para VIM-1. Oteo *et al.* (2013) identificaron 4 cepas (1 OXA-48 y 3 VIM) aisladas en el año 2012 en hospitales españoles. Las 3 cepas productoras de VIM-1 pertenecían a las secuencias tipo ST10, ST226 y ST1152, mientras que la cepa productora de OXA-48 era ST131. También en el año 2012 eran detectadas en el Hospital Universitario Central de Asturias 3 cepas de las secuencias tipo ST58, ST83 y ST131 que llevaban el gen *bla*_{OXA-48} en un plásmido conjugativo IncL/M y que posiblemente habían adquirido de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de OXA-48 implicadas en un brote nacional (Fernández *et al.* 2014).

6. CONCLUSIONES

1. Aunque nuestros estudios confirman que las cepas de *E. coli* productoras de CTX-M-14 pertenecen a una amplia variedad de serotipos, hemos observado en Galicia la emergencia de 5 grupos clonales (O1:HNM-D-ST59, O15:H1-D-ST393, O25b:H4-B2-ST131, O20:H34/HNM-D-ST354 y ONT:H21,42-B1-ST101), que además de ser resistentes a numerosos antimicrobianos muestran un elevado potencial de virulencia.
2. Casi la mitad de las cepas BLEE del estudio realizado en Barcelona (2008) pertenecían a únicamente 6 grupos clonales (ST101, ST162, ST131, ST369, ST393, ST410). En *E. coli* esta clonalidad es muy notable, considerando la elevada diversidad genética de esta especie y el paradigma establecido para la emergencia de cepas BLEE en base a la transferencia de plásmidos R entre cepas no clonales. En contraste, entre las cepas del grupo clonal ST131 se observó una gran diversidad genética, identificándose por primera vez cepas SHV-12 con numerosos genes de virulencia. Esto era inesperado ya que las cepas fueron aisladas en un solo hospital y en un corto período de tiempo. Por lo tanto la capacidad de diversificación genética, junto con el numeroso arsenal de genes de virulencia y resistencia a antibióticos que presentan las cepas del grupo clonal O25b:H4-B2-ST131, explicarían su exitosa diseminación.
3. En el primer estudio realizado en Europa sobre los grupos clonales O25b:H4-B2-ST131, O15:H1-D-ST393 y GCA-D-ST69, observamos que el primero es el más prevalente y que las cepas ST131 poseen un significativo mayor número de genes de virulencia. Además, el grupo clonal ST131 resultó ser también el más prevalente entre las cepas multirresistentes. Es evidente el componente clonal en la emergencia de resistencias entre las cepas ExPEC. No obstante, es necesario realizar futuros estudios ya que los 3 grupos clonales estudiados únicamente representaron la tercera parte de las cepas multirresistentes, por lo que seguramente otros grupos clonales podrían estar desempeñando un papel crítico en el aumento del nivel de resistencia a los antimicrobianos.
4. En los hospitales españoles al igual que pasa a nivel mundial está aumentando de forma significativa la prevalencia de cepas productoras de BLEE y muy especialmente de CTX-M-15 debido fundamentalmente a la emergencia del grupo clonal O25b:H4-B2-ST131.

Las cepas de este grupo clonal como en otros países se aíslan más frecuentemente de pacientes mayores e ingresados en residencias con cuidados especiales. Aunque las cepas de este grupo clonal tienen numerosos genes de virulencia no se asocian con un incremento de la mortalidad.

5. Las cepas del grupo clonal O25b:H4-B2-ST131 atendiendo a sus genes de virulencia se pueden clasificar en diversos virotipos que al tener una base clonal pueden representar diferentes subclones. El virotipo B se asocia con los pacientes de mayor edad y con una menor proporción de infecciones asintomáticas. En contraste el virotipo C se asocia significativamente con infecciones sintomáticas, mientras que el virotipo D se asocia con los pacientes más jóvenes y la adquisición comunitaria. Además, los virotipos A y B se asocian con los pacientes de residencias. La elevada cantidad de genes de virulencia de las cepas del virotipo D podría explicar su asociación con infecciones en pacientes más jóvenes y las comunitarias. Cabe destacar que el virotipo C es el más ampliamente distribuido a nivel mundial.
6. Al analizar las cepas ST131 bacteriémicas aisladas en el hospital HULA de Lugo observamos que los 3 subclones mayoritarios (H30-Rx, H30 no-Rx y H22) son los mismos que predominaban en los estudios realizados recientemente en EE.UU. y Canadá. Como novedad concluimos que las cepas de los virotipos A, B, C, E y F pertenecen a los subclones H30-Rx y/o H30 no-Rx, mientras que las cepas del virotipo D pertenecen al subclón H22. Como en los estudios realizados en EE.UU. y Canadá observamos que durante los primeros años (1993-1999) las cepas H22 eran las más prevalentes, pero desde que emergieron en el 2001 las cepas H30 se fue incrementando continuamente su prevalencia siendo en la actualidad las predominantes. De especial interés clínico es la asociación del subclón H30-Rx con la producción de CTX-M-15. Además, nuestros resultados indican que las cepas del subclón H30-Rx poseen un mayor número de genes de virulencia que las cepas del subclón H30 no-Rx. No obstante, ambos subclones están expandiéndose en la actualidad, predominando el subclón H30-Rx entre las cepas productoras de BLEE y el H30 no-Rx entre las cepas resistentes a las quinolonas fluoradas no productoras de BLEE.

7. Aunque nuestros estudios confirman que el grupo filogenético B2 es el predominante entre las cepas bacteriémicas, es importante destacar que casi el 40% de las cepas bacteriémicas pertenecen a los grupos filogenéticos A o B1 y que entre las cepas de estos dos grupos filogenéticos son especialmente predominantes las resistentes a antimicrobianos. Por ello, creemos que los estudios futuros deberían centrar sus esfuerzos también en la caracterización detallada de las cepas de los grupos filogenéticos A y B1.
8. Aunque entre las cepas bacteriémicas identificamos numerosos serogrupos, muchas de las cepas se englobaron en únicamente 18 serogrupos (O1, O2, O4, O6, O7, O8, O9, O11, O15, O17, O18, O22, O25, O75, O77, O83, O101 y O153). Como era de esperar en entre las cepas de los serogrupos más frecuentes encontramos un porcentaje de cepas ExPEC muy superior al observado entre las cepas de los serogrupos menos frecuentes y entre las no tipables, de lo que se puede concluir que estos serogrupos son los más prevalentes porque se asocian con la presencia de genes de virulencia que contribuyen a la patogenicidad de las cepas. Especialmente elevados fueron los porcentajes de cepas ExPEC entre las cepas de los serogrupos O1, O2, O4, O6, O7, O15, O18, O25, O75 y O83. Estos serogrupos son los encontrados también a nivel mundial ampliamente diseminados.
9. Si analizamos los 8 filoserogrupos más prevalentes entre las cepas bacteriémicas representados por al menos un centenar de cepas observamos que la gran mayoría de las cepas de los filoserogrupos O1-D, O2-B2, O4-B2, O6-B2, O15-D, O18-B2 y O25-B2 resultaron ser ExPEC. La excepción fueron las cepas O8-A. Lo mismo sucede con el filoserogrupo O9-A que es el noveno más frecuentemente identificado. Por ello podemos concluir que incluso cepas con pocos genes de virulencia pueden causar sepsis frecuentemente, dándose la circunstancia que entre dichas cepas abundan las resistentes a los antimicrobianos.
10. En nuestro estudio es destacable que las cepas del filoserogrupo O6:B2 fueron las más prevalentes junto con las O25-B2 entre los hemocultivos de pacientes del HULA (Lugo). Destacar que la inmensa mayoría de las cepas del filoserogrupo O6:B2 son susceptibles a los antimicrobianos, por lo que el éxito de las cepas O6:B2 únicamente es atribuible a la combinación de genes de virulencia que presentan.

11. En el último período del estudio sobre cepas bacteriémicas es interesante el aumento significativo en la prevalencia de cepas de los filoserogrupos O8-A, O9-B1 y O153-D. Muchas de las cepas O9-B1 y O153-D, al igual que las O8-A, no presentaron los genes de virulencia necesarios para poder ser clasificadas dentro del estatus ExPEC. Es posible que las cepas de estos tres filoserogrupos posean otros genes que jueguen un papel esencial en su virulencia o que sea su elevado nivel de resistencias a los antimicrobianos el que justifique su aumento de prevalencia en los últimos años.



7. BIBLIOGRAFIA

- Abe C.M., Salvador F.A., et al. (2008).** "Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*." FEMS Immunol Med Microbiol **52**: 397-406.
- Adams-Sapper S., Diep B.A., et al. (2013).** "Clonal composition and community clustering of drug-susceptible and resistant *Escherichia coli* isolates from bloodstream infections." Antimicrob Agents Chemother **57**: 490-497.
- Adrianzén D., Arbizu A., et al. (2013).** "Mortalidad por Bacteriemia causada por *Escherichia coli* y *Klebsiella spp.* Productoras de beta lactamasas de espectro extendido: cohorte retrospectiva en un hospital de Lima, Perú." Rev Peru Med Exp Salud Publica **30**: 18-25.
- Alhashash F., Weston V., et al. (2013).** "Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Bacteremia." Emerg Infect Dis **19**: 1699-1701.
- Alonso M.P., Blanco J., et al. (1987).** "Frequent production of toxins by *Escherichia coli* strains isolated from human urinary tract infections: relation with haemagglutination." FEMS Microbiology Letters **48**: 391-396.
- Alonso M.P. (1990).** Factores de virulencia de los *Escherichia coli* uropatogénicos y bacteriémicos. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela.
- Ananias M. and Yano T. (2008).** "Serogroup and virulence genotypes of *Escherichia coli* isolated from patients with sepsis." Brazilian J Med Biol Res **41**: 877-883.
- Arbeloa A., Blanco M., et al. (2009).** "Distribution of espM and espT among enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*." J Med Microbiol **58**: 988-995.
- Arpin C., Quentin C., et al. (2009).** "Nationwide survey of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in the French community setting." J Antimicrob Chemother **63**: 1205-1214.
- Asakura M., Hinenoya A., et al. (2007).** "An inducible lambdaoid prophage encoding cytolethal distending toxin (Cdt-I) and type III effector protein in enteropathogenic *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci USA **104**: 14483-14488.
- Bailey J.K., Pinyon J.L., et al. (2010).** "Distribution of human commensal *Escherichia coli* Phylogenetic groups." J Clin Microbiol **48**: 3455-3456.
- Balado D.M. (2009).** Caracterización de un nuevo sistema de asimilación de hierro mediante sideróforos en *Vibrio anguillarum*. Tesis Doctoral. Facultad de Biología. Universidad de Santiago de Compostela.
- Ballot D., Nana T., et al. (2012).** "Bacterial bloodstream infections in neonate in a developing country." ISRN Pediatrics. 1-5.
- Balsalobre C., Morschhäuser J., et al. (2003).** "Transcriptional analysis of the *sfa* determinant revealing multiple mRNA processing events in the biogenesis of S fimbriae in pathogenic *Escherichia coli*." J Bacteriol **185**: 620-629.

Banerjee R. and Johnson J.R. (2013). "*Escherichia coli* ST131: variations on a theme of clonal expansion." Enferm Infecc Microbiol Clín **31**: 355-356.

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

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

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

Banerjee R., Strahilevitz J., et al. (2013d). "Predictors and molecular epidemiology of community-onset extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* infection in a Midwestern community." Infect Control Hosp Epidemiol **34**: 947- 953.

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

Banerjee R., Johnston B., et al. (2014). "*Escherichia coli* Sequence Type 131 is a dominant, antimicrobial-resistant clonal group associated with healthcare and elderly hosts." Infect Control Hosp Epidemiol **34**: 361-369.

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

Baquero F., Cercenado E., et al. (2006). "Patrones de sensibilidad a antimicrobianos de Enterobacteriaceae causantes de infecciones intraabdominales en España: resultados del estudio SMART 2003." Rev Esp Quimioterap **19**: 51-59.

Barondess J.J. and Beckwith J. (1990). "A bacterial virulence determinant encode by lysogenic coliphage lambda." Nature **346**: 871-874.

Barrera B., Canales A., et al. (2005). "Incidencia de B-lactamasas de espectro extendido en el Hospital clínico de la Universidad de Chile." Rev Hospital Clínico de Chile **16**: 101-106.

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

Bauernfeind A., Grimm H., et al. (1990). "A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*." Infection **18**: 294-298.

Ben-Ami R., Schwaber M.J., et al. (2006). "Influx of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* into the hospital." Clin Infect Dis **42**: 925-934.

Bert F., Johnson J.R., et al. (2010). "Genetic diversity and virulence profiles of *Escherichia coli* isolates causing spontaneous bacterial peritonitis and bacteremia in patients with cirrhosis." J Clin Microbiol **48**: 2709-2714.

- Bidet P., Mahjoub-Messai F., et al. (2007).** "Combined multilocus sequence typing and O serogrouping distinguishes *Escherichia coli* subtypes associated with infant urosepsis and/or meningitis." J Infect Dis **196**: 297-303.
- Bielaszewska M., Fell M., et al. (2004).** "Characterization of cytolethal distending toxin genes and expression in shiga toxin-producing *Escherichia coli* strain of non-O157 serogroups." Infect Immun **72**: 1812-1816.
- Bingen-Bidois M., Clermont O., et al. (2002).** "Phylogenetic analysis and prevalence of urosepsis strains of *Escherichia coli* bearing pathogenicity island-like domains." Infect Immun **70**: 3216-3226.
- Binns M., Davies D.L., et al. (1979).** "Cloned fragments of the plasmid ColV, I-K94 specifying virulence and serum resistance." Nature **279**: 778-781.
- Binns M., Maiden J., et al. (1982).** "Further characterization of complement resistance conferred on *Escherichia coli* by the plasmid genes *traT* of R100 and *iss* of colV,I-K94." Infect Immun **35**(654-659).
- Blanco J., Alonso M.P., et al. (1990).** "Virulence factors of bacteraemic *Escherichia coli* with particular reference to production of cytotoxic necrotising factor (CNF) by P-fimbriate strains." J Med Microbiol **31**: 175-183.
- Blanco J., Alonso M.P., et al. (1991).** "Pathogenetic mechanisms of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections." Enferm Infecc Microbiol Clín **9**: 640-651.
- Blanco J., Blanco M., et al. (1992a).** Factores de virulencia de los *Escherichia coli* causantes de infecciones extraintestinales. Lugo, Monografía nº 170, Universidade de Santiago de Compostela.
- Blanco J., Blanco M., et al. (1992b).** "Characteristics of haemolytic *Escherichia coli* with particular reference to production of cytotoxic necrotizing factor type 1 (CNF1)." Res Microbiol **143**: 869-878.
- Blanco M., Blanco J.E., et al. (1996).** "Virulence factors and O groups of *Escherichia coli* isolates from patients with acute pyelonephritis, cystitis and asymptomatic bacteriuria." Eur J Epidemiol **12**: 191-198.
- Blanco M., Blanco J.E., et al. (1997).** "Detection of *pap*, *sfa*, and *afa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains: Relation with expression of adhesins and production of toxins." Res Microbiol **148**: 745-755.
- Blanco M., Alonso M.P., et al. (2009).** "Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in Lugo (Spain): dissemination of clone O25b:H4-ST131 producing CTX-M-15." J Antimicrob Chemother **63**: 1135-1141.
- Blanco J., Mora A., et al. (2011).** "National survey of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections reveals the spread of drug-resistant clonal groups O25b:H4-B2-ST131, O15:H1-D-ST393 and CGA-D-ST69 with high virulence gene content in Spain." J Antimicrob Chemother **66**: 2011-2021.
- Blanco J., Mora A., et al. (2013).** "Four main virotypes among extended-spectrum-beta-lactamase-producing isolates of *Escherichia coli* O25b:H4-B2-ST131: bacterial, epidemiological, and clinical characteristics." J Clin Microbiol **51**: 3358-3367.

- Blum-Oehler G., Heesemann J., et al. (1997).** "Characterization of *Escherichia coli* serotype O12:K1:H7 isolates from an immunocompetent carrier with a history of spontaneous abortion and septicemia." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **16**: 153-155.
- Bonnet R. (2004).** "Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes." Antimicrob Agents Chemother **48**: 1-14.
- Boquet P. (2001).** "The cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1) from *Escherichia coli*." Toxicon **39**: 1673-1680.
- Bouguéneq C., Lalioui L., et al. (2001).** "Characterization of AfaE adhesins produced by extraintestinal and intestinal human *Escherichia coli* isolates: PCR assays for detection of Afa adhesins that do or do not recognize Dr Blood group antigens." J Clin Microbiol **39**: 1738-1745.
- Boyd D.A., Tyler S., et al. (2004).** "Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 extended spectrum beta-lactamase involved in a outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada." Antimicrob Agents Chemother **48**: 3758-3764.
- Branger C., Zamfir O., et al. (2005).** "Genetic background of *E. coli* and extended-spectrum B-lactamase type." Emerg Infect Dis **11**: 54-61.
- Brauner A., Boeufgras J.M., et al. (1987).** "The use of biochemical markers, serotype and fimbriation in the detection of *Escherichia coli* clones." J Gen Microbiol **133**: 2825-2534.
- Brigante G., Luzzaro F., et al. (2005).** "Evolution of CTX-M-type beta-lactamases in isolates of *Escherichia coli* infecting hospital and community patients." Antimicrob Agents Chemother **25**: 157-162.
- Brisse S., Dlancourt L., et al. (2012).** "Phylogenetic distribution of CTX-M and Non-extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates: group B2 isolates, except clone ST131, rarely produce CTX-M Enzymes." J Clin Microbiol **50**: 2974-2981.
- Buckles E., Wang X., et al. (2009).** "Role of the K2 capsule in *Escherichia coli* urinary tract infection and serum resistance." J Infect Dis **199**: 1689-1697.
- Burman W., Breese P., et al. (2003).** "Conventional and molecular epidemiology of trimethoprim-sulfamethoxazole resistance among urinary *Escherichia coli* isolates." Am J med **115**: 348-364.
- Busselo S., Baquedano E., et al. (1997).** "Bacteremia: a Spanish multicenter study with 5000 cases. The hospital infection study group (GEIH)." Rev Clin Esp **197**: 3-9.
- Cagnacci S., Gualco L., et al. (2008).** "European emergence of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* clonal groups O25:H4-ST131 and O15:K52:H1 causing community-acquired uncomplicated cystitis." J Clin Microbiol **46**: 2605-2612.
- Cantón R. and Coque T.M. (2006).** "The CTX-M beta lactamase pandemic." Curr Opin Microbiol **9**: 466-475.
- Cantón R., Valverde A., et al. (2007).** "Evolución y panorama actual de las BLEE." Enferm Infecc Microbiol Clin **2**: 2-10.
- Cantón R., Novais A., et al. (2008).** "Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe." Clin Microbiol Infect **14**: 144-153.

- Cantón R., Akóva M., et al. (2012).** "Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe." Clin Microbiol Infect **18**: 413-431.
- Caprioli A., Falvo V., et al. (1983).** "Partial purification and characterization of an *Escherichia coli* toxic factor that induces morphological cell alterations." Infect Immun **39**: 1300-1306.
- Caprioli A., Donelli G., et al. (1984).** "A cell division active protein from *Escherichia coli*." Biochemical and Biophysical Research Communications **118**: 587-593.
- Castanheira M., Deshpande L.M., et al. (2013).** "Update on the prevalence and genetic characterization of NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* in Indian hospitals during 2010." Diagn Microbiol Infect Dis **75**: 210-213.
- Chi F., Jong T., et al. (2010).** "Vimentin-mediated signalling is required for IbeA+*E. coli* K1 invasion of human brain microvascular endothelial cells." Biochem J **427**: 79-90.
- Chmelnitsky I., Carmeli Y., et al. (2005).** "CTX-M-2 and a new CTX-M-39 enzyme are the mayor extended-spectrum beta-lactamases in multiple *Escherichia coli* clones isolated in Tel Aviv, Israel." Antimicrob Agents Chemother **49**: 4745-4750.
- Chuba P.J., Palchaudhuri S., et al. (1986).** "Contribution of *traT* and *iss* genes to the serum resistance phenotype of plasmid ColV-K94." FEMS Microbiology Letters **37**: 135-140.
- Chung H.C., Lai C.H., et al. (2012).** "Bacteremia caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* secuencia type ST131 and non-ST131 clones: comparison of demographic data, clinical features, and mortality." Antimicrob Agents Chemother **56**: 618-622.
- Clarke B., Pearce R., et al. (1999).** "Genetic organization of the *Escherichia coli* K10 capsule gene cluster: Identification and Characterization of two conserved regions in group III capsule gene clusters encoding polysaccharide transport functions." J Bacteriol **181**: 2279-2285.
- Clermont O., Bonacorsi S., et al. (2000).** "Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group." Appl Environ Microbiol **66**: 4555-4558.
- Clermont O., Johnson J.R., et al. (2007).** "Determination of *Escherichia coli* O types by allelespecific polymerase chain reaction: application to the O types involved in human septicemia." Diagn Microbiol Infect Dis **57**: 129-136.
- Clermont O., Lavollay M., et al. (2008).** "The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup." J Antimicrob Chemother **61**: 1024-1028.
- Clermont O., Dhanji H., et al. (2009).** "Rapid detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* encompassing the CTX-M-15-producing strains." J Antimicrob Chemother **64**: 274-277.
- Coelho A., Mora A., et al. (2011).** "Spread of *Escherichia coli* O25B:H4-B2-ST131 producing CTX-M-15 and SHV-12 with high virulence gene content in Barcelona (Spain)." J Antimicrob Chemother **66**: 517-526.
- Cohen S.J., Van den M.T., et al. (2012).** "Comparison of ESBL contamination in organic and conventional retail chicken meat." Int J Food Microbiol **154**: 212-214.
- Coira M.A. (2008).** Beta-lactamasas de espectro ampliado: Estudio comparativo del período 1989-1993 con la situación actual. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Santiago de Compostela.

- Colomer-Lluch M., Mora A., et al. (2013).** "Detection of quinolone-resistant *Escherichia coli* isolates belonging to clonal groups O25b:H4-B2-ST131 and O25b:H4-D-ST69 in raw sewage and river water in Barcelona, Spain." J Antimicrob Chemother **68**: 758-765.
- Colpan A., Johnson B., et al. (2013).** "*Escherichia coli* sequence type 131 (ST131) subclone H30 as an emergent multidrug-resistant pathogen among US veterans." Clin Infect Dis **57**: 1256-1265.
- Coque T.M., Baquero F., et al. (2008a).** "Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe." Euro Surveill **13**: 1-11.
- Coque T.M., Novais A., et al. (2008b).** "Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15." Emerg Infect Dis **14**: 195-200.
- Cortés P., Blanc V., et al. (2010).** "Isolation and characterization of potentially pathogenic antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains from chicken and pig farms in Spain." Appl Environ Microbiol **76**: 2799-2805.
- Corvec S., Crémet L., et al. (2010).** "Epidemiology of *Escherichia coli* clinical isolates producing AmpC plasmidic beta-lactamase during 5-years period in a French teaching hospital." Diagn Microbiol Infect Dis **67**: 277-281.
- Cross A.S., Gemski P., et al. (1984).** "The importance of the K1 capsule in invasive infections caused by *Escherichia coli*." J Infect Dis **149**: 184-193.
- Croxall G., Hale J., et al. (2011).** "Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates from a regional cohort of elderly patients highlights the prevalence of ST131 strains with increased antimicrobial resistance in both community and hospital care settings." J Antimicrob Chemother **66**: 2501-2508.
- Dahbi G., Mora A., et al. (2013).** "Emergence of new variants of ST131 clonal group among extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases." Int J Antimicrob Agents **42**: 347-351.
- Dalmau D. (1993).** Bacteriemia por *Escherichia coli* y factores de patogenicidad. Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Dalmau D., Navarro F., et al. (1996).** "*Escherichia coli* bacteremia. Serotype O15:K52:H1 as a urinary pathogen." J Hosp Infect **34**: 233-234.
- Datta S., Wattal C., et al. (2012).** "A ten year analysis of multi-drug resistant blood stream infections caused by *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary care hospital." Indian J Med Res **135**: 907-912.
- Davies D.L., Falkiner F.R., et al. (1981).** "Colicin V production by clinical isolates of *Escherichia coli*." Infect Immun **31**: 574-579.
- de Kraker M.E., Jarlier V., et al. (2012).** "The changing epidemiology of bacteremias in Europe: trends from the European Antimicrobial Resistance Surveillance System." Clin Microbiol Infect **19**: 860-868.
- de Lorenzo V. and Neilands J.B. (1986).** "Characterization of *iucA* and *uicC* genes of the Aerobactin system of plasmid colV-K30 in *Escherichia coli*." J Bacteriol **167**: 350-355.

- de Lorenzo V., Bindereif A., et al. (1986).** "Aerobactin biosynthesis and transport genes of plasmid ColV-K30 in *Escherichia coli* K12." J Bacteriol **165**: 570-578.
- De Rycke J., Guillot J.F., et al. (1987).** "Cytotoxins in non-enterotoxigenic strains of *E. coli* isolated from feces of diarrheic calves." Veterinary Microbiology **15**: 137-150.
- De Rycke J., González E.A., et al. (1990).** "Evidence for two types of cytotoxic necrotizing factor in human and animal clinical isolates of *Escherichia coli*." J Clin Microbiol **28**: 694-699.
- Devine D.A., Robinson L., et al. (1989).** "Occurrence of K1, K5 and O antigens in *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections or bacteraemia." J Med Microbiol **30**: 295-299.
- Díaz M.A., Hernández R.J., et al. (2009).** "Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Spanish hospitals: 2nd multicenter study (GEIH-BLEE project, 2006)." Enferm Infecc Microbiol Clin **27**: 503-510.
- Díaz M.A., Hernández-Bello J.R., et al. (2010).** "Diversity of *Escherichia coli* strain producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain: second nationwide study." J Clin Microbiol **48**: 2840-2845.
- Diekema D.J., Beekmann S.E., et al. (2003).** "Epidemiology and Outcome of Nosocomial and Community-Onset Bloodstream Infection." J Clin Microbiol **41**: 3655-3660.
- Diestra K., Coque T.M., et al. (2008).** "Characterization and molecular epidemiology of ESBL in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in 11 Spanish hospitals (2004)." Enferm Infecc Microbiol Clin **26**: 404-410.
- Domingue GJ., Roberts JA., et al. (1985).** "Pathogenic significance of P fimbriated *Escherichia coli* in urinary tract infections." J Urol **133**: 983-989.
- Donnenberg M. and Whittam T. (2001).** "Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *E. coli*." J Clin Invest **107**: 539-548.
- Dozois C.M., Dho-Moulin M., et al. (2000).** "Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region." Infect Immun **68**: 4145-4154.
- Dubois D., Delmas J., et al. (2010).** "Cyclomodulins in urosepsis strains of *Escherichia coli*." J Clin Microbiol **48**: 2122-2129.
- Durso L.M., Bono J.L., et al. (2005).** "Molecular serotyping of *Escherichia coli* O26:H11." Appl Environ Microbiol **71**:4941-4944.
- Edelstein M., Pimkin M., et al. (2003).** "Prevalence and Molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals." Antimicrob Agents Chemother **47**: 3724-3732.
- Escherich T. (1885).** "Die darmbakterien des neugeborenen und säuglings." Fortschritte der Medizin **3**: 515-522.
- Eto D.S., Jones T.A., et al. (2007).** "Integrin-mediated host cell invasion by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*." PLoS Pathog **3**: 949-961.

European Antimicrobial Resistance Surveillance System. (2007). EARSS annual report 2007. Surveillance Report, European Centre for Disease Prevention and Control.

European Antimicrobial Resistance Surveillance System. (2012). Antimicrobial resistance surveillance in Europe. Surveillance Report, European Centre for Disease Prevention and Control

Fabri A., Gauthier M., et al. (1999). "The 5' region of *cnf1* harbours a translational regulatory mechanism for CNF1 synthesis and encodes the cell-binding domain of the toxin." Mol Microbiol **33**: 108-118.

Falbo V., Famiglietti M., et al. (1992). "Gene block encoding production of cytotoxic necrotizing factor 1 and hemolysin in *Escherichia coli* isolates from extraintestinal infections." Infect Immun **60**: 2182-2187.

Fang H., Ataker F., et al. (2008). "Molecular Epidemiology of extended-spectrum Beta-lactamases among *Escherichia coli* isolates collected in a Swedish Hospital and its associated health care facilities from 2001 to 2006." J Clin Microbiol **46**: 707-712.

Fasano A. (2001). "Bacterial infections: small intestine and colon." Current Opinion in Gastroenterology **17**: 4-9.

Fecteau G., Fairbrother JM., et al. (2001). "Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from the blood of bacteremic neonatal calves." Veterinary Microbiology **78**: 241-249.

Feldmann F., Johanna L., et al. (2007). "The salmochelin siderophore receptor Iron contributes to invasion of urothelial cells by extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* *in vitro*." Infect Immun **75**: 3183-3187.

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

Funahara Y. and Nikaido H. (1980). "Asymmetric localization of lipopolysaccharides on the outer membrane of *Salmonella typhimurium*." J Bacteriol **141**: 1463-1465.

Gannon V.P., D'Souza S., et al. (1997). "Use of the flagellar H7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity in identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains." J Clin Microbiol **35**: 656-62.

Garcia E.C., Brumbaugh A.R., et al. (2011). "Redundancy and specificity of *Escherichia coli* iron acquisition systems during urinary tract infection." Infect Immun **79**: 1225-1235.

Garenaux A., Caza M., et al. (2011). "The ins and outs of siderophore mediated iron uptake by extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*." Veterinary Microbiology **153**: 89-98.

Garrido M.E. (2005). Caracterización de los sistemas de captación de hierro y zinc del patógeno animal *Pasteurella multocida*. Tesis Doctoral. Departamento de Genética y Microbiología. Universidad Autónoma de Barcelona.

George D.B. and Manges A.R. (2010). "A systematic review of outbreak and non-outbreak studies of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* causing community-acquired infections." Epidemiol Infect **138**: 1679-1690.

- Gibreel T.M., Dodgson A.R., et al. (2012).** "Population structure, virulence potential and antibiotic susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* from Northwest." J Antimicrob Chemother **67**: 346-356.
- Goluszko P., Popov V., et al. (1997a).** "Dr fimbriae operon of uropathogenic *Escherichia coli* mediate microtubule-dependent invasion to the HeLa epithelial cell line." J Infect Dis **176**: 158-167.
- Goluszko P., Moseley S.L., et al. (1997b).** "Development of experimental model of chronic pyelonephritis with *Escherichia coli* O75:K5:H-bearing Dr fimbriae:mutation in the dra region prevented tubulointerstitial nephritis." J Clin Invest **99**: 1662-1672.
- González-Pedrajo B. and Dreyfus G. (2003).** "Sistemas de secreción de proteínas en las bacterias gram negativas: biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia." Departamento de Bioquímica, Mexico DF. **XXVII**: 45-63.
- Goossens H. and Grabein B. (2005).** "Prevalence and antimicrobial susceptibility data for extended-spectrum beta-lactamase and AmpC-producing *Enterobacteriaceae* from the MYSTIC program in Europe and United States (1997-2004)." Diagn Microbiol Infect Dis **5**: 257-264.
- Gordon D.M., Clermont O., et al. (2008).** "Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method." Environ Microbiol **10**: 2484-2496.
- Gratia A. (1925).** "Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de collibacille." C.R. Soc. Biol. **93**: 1041-1042.
- Guignot J., Bernet-Camard M. F., et al. (2001).** "Polarized entry of uropathogenic Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* strain IH11128 into human epithelial cells: evidence for a5b1 integrin recognition and subsequent internalization through a pathway involving caveolae and dynamic unstable microtubules." Infect Immun **69**: 1856-1868.
- Guinée P.A.M., Agterberg C.M., et al. (1972).** "*Escherichia coli* O antigen typing by means of a mechanized microtechnique." Appl Microbiol **24**: 127-131.
- Guinée P.A.M., Jansen W.H., et al. (1981).** "*Escherichia coli* associated with neonatal diarrhoea in piglets and calves." Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science **13**: 126-162.
- Guyer D., Henderson I.R., et al. (2000).** "Identification of Sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*." Mol Microbiol **38**: 53-66.
- Guyer D., Radulovic S., et al. (2002).** "Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells." Infect Immun **70**: 4539-4546.
- Hacker J., Blum-Oehler G., et al. (1999).** Pathogenicity islands of extraintestinal *Escherichia coli*. Pathogenicity islands and other mobile virulence elements. H. J. Kaper J.B. Washington DC, A.S.M.
- Hagberg L., Hull R., et al. (1984).** "Difference in susceptibility to gram-negative urinary tract infection between C3H/HeJ and C3H/HeN mice." Infect Immun **46**: 839-844.
- Hamon M.A., Batsche E., et al. (2007).** "Histone modification induced by a family of bacterial toxins." Proc Natl Acad Sci USA **104**: 13467-13472.

- Harada K., Nakai Y., et al. (2012).** "Mechanisms of resistance to cephalosporin and emergence of O25b-ST131 clone harboring CTX-M-27 β -lactamase in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from dogs and cats in Japan." Microbiol Immunol **56**: 480-485.
- Harvill E., Preston A., et al. (2000).** "Multiple roles for Bordetella lipopolysaccharide molecules during respiratory tract infection." Infect Immun **68**: 6720-6728.
- Hawser S., Bouchillon S., et al. (2009).** "Emergence of high levels of extended-spectrum-beta-lactamase-producing gram-negative bacilli in the Asia-Pacific region: data from the study for monitoring antimicrobial resistance trends (SMART) program, 2007." Antimicrob Agents Chemother **53**: 3280-3284.
- Heimer S.R., Rasko D.A., et al. (2004).** "Autotransporter genes *pic* and *tsh* are associated with *Escherichia coli* strain that cause acute pyelonephritis and are expressed during urinary tract infection." Infect Immun **72**: 593-597.
- Hernández J.R., Pascual A., et al. (2003).** "Grupo de estudio de infección hospitalaria (GEIH) *E. coli* y *K pneumoniae* productores de betalactamasas de espectro extendido en Hospitales Españoles (proyecto GEIH-BLEE 2000)." Enferm Infecc Microbiol Clin **21**: 77-82.
- Hernández J.R., Martínez-Martínez L., et al. (2005).** "Nationwide study of *E. coli* and *K. pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain." Antimicrob Agents Chemother **49**: 2122-2125.
- Hilali F., Ruimy R., et al. (2000).** "Prevalence of virulence genes and clonality in *Escherichia coli* strains that cause bacteremia in cancer patients." Infect Immun **68**: 3983-3989.
- Hilbert D., Paulish-Miller T., et al. (2012).** "Clinical *Escherichia coli* isolates utilize alpha-hemolysin to inhibit *in vivo* epithelial cytokine production." Microbes Infect **14**: 628-638.
- Hofman P., Negrate G.L., et al. (2000).** "*Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor-1 (CNF-1) increases the adherence to epithelia and the oxidative burst of human polymorphonuclear leukocytes but decreases bacteria phagocytosis." J Leukoc Biol **68**: 522-528.
- Hopkins K.L., Deheer-Graham A., et al. (2006).** "Novel plasmid-mediated CTX-M-8 subgroup extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-40) isolated in the UK." Int J Antimicrob Agents **27**: 572-575.
- Horner C., Fawley W., et al. (2014).** "*Escherichia coli* bacteraemia: 2 years of prospective regional surveillance (2010-2012)." J Antimicrob Chemother **69**: 91-100.
- Houdouin V., Bonacorsi S., et al. (2008).** "Association between mortality of *Escherichia coli* meningitis in young infants and non-virulent clonal groups of strains." Clin Microbiol Infect **14**: 685-690.
- Huang S.H., Stins M., et al. (2000).** "Bacterial penetration of the blood-brain barrier during the development of neonatal meningitis." Microbes Infect **2**: 1137-1144.
- Huang S., Chen Y.H., et al. (2001).** "A novel genetic island of meningitic *Escherichia coli* K1 containing the *ibeA* invasion gene (GimA): functional annotation and carbon-source-regulated invasion of human brain microvascular endothelial cells." Funct Integr Genomics **1**: 312-322.

Hughes C., Phillips R., et al. (1982). "Serum resistance among *E. coli* strains causing urinary tract infection in related O type and the carriage of hemolysin, colicin, and antibiotic resistance determinants." Infect Immun **35**: 270-275.

Humbert J., Jouve M., et al. (2000). "Electron Microscopic Improvement in the study of Diarrheagenic *Escherichia coli* Microscopy." Microsp Res Tech **49**: 383-393.

Hung C.S., Dodson K.W., et al. (2009). "A murine model of urinary tract infection." Nat Protoc **4**: 1230-1243.

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

Jackson L., Benson P., et al. (2005). "Burden of community-onset *Escherichia coli* Bacteremia in seniors." J Infect Dis **191**: 1523-1529.

Jaques M. (1996). "Role of lipo-oligosaccharides and lipopolysaccharides in bacterial adherence." Trends and Microbiology **4**: 408-410.

Jauréguy F., Carbonnelle E., et al. (2007). "Host and bacterial determinants of initial severity and outcome of *Escherichia coli* sepsis." Clin Microbiol Infect **13**: 854-862.

Javaloyas M. (2003). Análisis Epidemiológico y pronóstico de la bacteriemia del adulto en un Hospital Comarcal. Tesis Doctoral. Departamento de Medicina. Universidad de Barcelona.

Javaloyas M., Garcia-Somoza D., et al. (2003). "Bacteriemia por *Escherichia coli*: análisis epidemiológico y de la sensibilidad a los antibióticos en un hospital comarcal." Medicina Clínica. **120**: 125-127.

Jinadasa R., Bloom S., et al. (2011). "Cytolethal distending toxin: a conserved bacterial genotoxin that blocks cell cycle progression, leading to apoptosis of a broad range of mammalian cell lineages." Microbiology **157**: 1851-1875.

Johnson W.M. and Lior H. (1987). "Production of Shiga toxin and a cytolethal distending toxin (CLDT) by serogroups of *Shigella spp.*" FEMS Microbiology Letters **48**: 235-238.

Johnson W.M. and Lior H. (1988). "A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Escherichia coli* isolates from clinical material." Microb Pathog **4**: 103-113.

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

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

Johnson J.R. and Stell A.L. (2000). "Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host comprise." J Infect Dis **181**: 261-272.

Johnson J.R., Russo T.A., et al. (2000a). "Molecular epidemiological and phylogenetic associations of two novel putative virulence genes, *iha* and *iroN*(*E. coli*), among *Escherichia coli* isolates from patients with urosepsis." Infect Immun **68**: 3040-3047.

- Johnson J.R., Stell A.L., et al. (2000b).** "Analysis of the F antigen-specific *papA* alleles of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* using a novel multiplex PCR-based assay." Infect Immun **68**: 1587-1599.
- Johnson J.R., Stell A., et al. (2002a).** "Global molecular epidemiology of the O15:K52:H1 Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* clonal group: evidence of distribution beyond Europe." J Clin Microbiol **40**: 1913-1923.
- Johnson J.R., Manges A., et al. (2002b).** "A disseminated multidrug-resistant clonal group of uropathogenic *Escherichia coli* in pyelonephritis." Lancet **359**: 2249-2251.
- Johnson J.R., Kuskowski M.A., et al. (2002c).** "Epidemiological correlates of virulence genotype and phylogenetic background among *Escherichia coli* blood isolates from adults with diverse-source Bacteremia." J Infect Dis **185**: 1439-1447.
- Johnson J.R., Gajewski A., et al. (2003).** "Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as a cause of invasive nonurinary infections." J Clin Microbiol **41**: 5798-5802.
- Johnson J.R. and O'Bryan T.T. (2004).** "Detection of the *Escherichia coli* group 2 polysaccharide capsule synthesis Gene *kpsM* by a rapid and specific PCR-based assay." J Clin Microbiol **42**: 1773-1776.
- Johnson J.R., Owens K., et al. (2004a).** "Rapid and specific detection of the O15:K52:H1 clonal group of *Escherichia coli* by genes-specific PCR." J Clin Microbiol **42**: 3841-3843.
- Johnson J.R., Owens K., et al. (2004b).** "Rapid and specific detection of *Escherichia coli* clonal A by gene-specific PCR." J Clin Microbiol **42**: 2618-2622.
- Johnson J.R., Murray A., et al. (2005).** "Distribution and characteristics of *Escherichia coli* clonal group A." Emerg Infect Dis **11**: 141-145.
- Johnson J.R., Johnston B., et al. (2008).** "Virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* serogroup O6 isolates from humans, dogs, and cats." J Clin Microbiol **46**: 417-422.
- Johnson J.R., Menard M., et al. (2009).** "Epidemic clonal groups of *Escherichia coli* as a cause of antimicrobial-resistant urinary tract infections in Canada, 2002 to 2004." Antimicrob Agents Chemother **53**: 2733-2739.
- Johnson J.R., Johnston B., et al. (2010).** "*Escherichia coli* sequence type ST131 as the mayor cause of serious multidrug-resistant *E. coli* infections in the United States." Clin Infect Dis **51**: 286-294.
- Johnson J.R., Menard M., et al. (2011).** "Global distribution and epidemiologic Associations of *Escherichia coli* clonal Group A, 1998-2007." Emerg Infect Dis **17**: 2001-2009.
- Johnson J.R., Urban C., et al. (2012a).** "Molecular epidemiological analysis of *Escherichia coli* sequence type ST131 (O25:H4) and *bla*_{CTX-M-15} among extended-spectrum-beta-lactamase-producing *E. coli* from the United States, 2000 to 2009." Antimicrob Agents Chemother **56**: 2364-2370.
- Johnson J.R., Nicolas-Chanoine M.H., et al. (2012b).** "Compararison of *Escherichia coli* ST131 pulsotypes, by epidemiologic traits, 1967-2009." Emerg Infect Dis **18**: 598-607.
- Johnson J.R., Tchesnokova V., et al. (2013).** "Abrupt emergence of a single dominant multidrug-resistant strain of *Escherichia coli*." J Infect Dis **207**: 919-928.

- Johnson J.R., Clermont O., et al. (2014).** "Rapid and specific detection, molecular epidemiology, and experimental virulence of the O16 subgroup within *Escherichia coli* sequence type 131." J Clin Microbiol **52**: 1358-1365.
- Johnson T.J., Kariyawasam S., et al. (2007).** "The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 share strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes." J Bacteriol **189**: 3228-3236.
- Johnson T.J., Wannemuehler Y.M., et al. (2008).** "Evolution of the *iss* gene in *Escherichia coli*." Appl Environ Microbiol **74**: 2360-2369.
- Jones G.L., Warren R.E., et al. (2008).** "Prevalence and distribution of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of *Escherichia coli* lacking extended-spectrum beta-lactamases." J Antimicrob Chemother **62**: 1245-1251.
- Kanamaru S., Kurazono H., et al. (2006a).** "Subtyping of uropathogenic *Escherichia coli* according to the pathogenicity island encoding uropathogenic-specific protein: Comparison with phylogenetic group." Int J Urol **13**: 754-760.
- Kanamaru S., Kurazono H., et al. (2006b).** "Increased biofilm formation in *Escherichia coli* isolated from acute prostatitis." Int J Antimicrob Agents **28**: 21-25.
- Kang C.I., Cheong H.S., et al. (2008).** "Clinical features and outcome of community-onset bloodstream infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **27**: 85-88.
- Kang C.I., Cha M.K., et al. (2013).** "Clinical and molecular epidemiology of community-onset bacteremia caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* over a 6-year Period." The Korean Academy of Medical Sciences **28**: 998-1004.
- Kansau I., Berger C., et al. (2004).** "Zipper-like internalization of Dr-positive *Escherichia coli* by epithelial cells is preceded by an adhesin-induced mobilization of raft-associated molecules in the initial step of adhesion." Infect Immun **72**: 3733-3742.
- Kanukollu U., Bieler S., et al. (1985).** "Contribution of the *traT* gene to serum resistance among clinical isolates of Enterobacteriaceae." J Med Microbiol **19**: 61-67.
- Karfunkel D., Carmeli Y., et al. (2013).** "The emergence and dissemination of CTX-M-producing *Escherichia coli* sequence type 131 causing community-onset bacteremia in Israel." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **32**: 513-521.
- Karisik E., Ellington M.J., et al. (2006).** "Molecular characterization of plasmids encoding CTX-M-15 beta-lactamases from *Escherichia coli* strains in the United Kingdom." J Antimicrob Chemother **58**: 665-668.
- Kauffmann F. (1947).** "The serology of the Coli Group." J Immunol **57**: 71-100.
- Kennedy K., Roberts J., et al. (2008).** "*Escherichia coli* bacteriemia in Canberra: incidence and clinical features." Med J Australia **188**: 209-213.
- Kita H. and Nikaido H. (1973).** "Structure of cell wall lipopolysaccharide from *Salmonella typhimurium*." J Bacteriol **113**: 672-679.

- Kim J., Bae I.K., et al. (2011).** "Characterization of IncF plasmids carrying the blaCTX-M-14 gene in clinical isolates of *Escherichia coli* from Korea." J Antimicrob Chemother **66**: 1263-1268.
- Knust Z., Blumenthal B., et al. (2009).** "Cleavage of *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1 Is required for full biologic activity." Infect Immun **77**: 1835-1841.
- Knust Z. and Schmidt G. (2010).** "Cytotoxic Necrotizing Factors (CNFs)-A Growing Toxin family." Toxins **2**: 116-127.
- Kobayashi R., Gaziri L.C., et al. (2010).** "Functional activities of the Tsh protein from avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strain." J Vet Sci **11**: 315-319.
- Korhonen T.K., Valtonen M.V., et al. (1985).** "Serotypes, hemolysin production, and receptor recognition of *Escherichia coli* strains associated with neonatal sepsis and meningitis." Infect Immun **48**: 486-491.
- Kostakioti M. and Stathopoulos C. (2004).** "Functional analysis of the Tsh autotransporter from an avian pathogenic *Escherichia coli*." Infect Immun **72**: 5548-5554.
- Kudinha T., Johnson J.R., et al. (2013).** "Distribution of phylogenetic group, sequence type ST131, and virulence-associated traits among *Escherichia coli* isolates from men with pyelonephritis or cystitis and healthy controls." Clin Microbiol Infect **19**: E173-180.
- Kurazono H., Yamamoto S., et al. (2000).** "Characterization of a putative virulence island in the chromosome of uropathogenic *Escherichia coli* possessing a gene encoding a uropathogenic-specific protein." Microb Pathog **28**: 183-189.
- Lafolie J., Nicolas-Chanoine M.H., et al. (2014).** "Prevalence of *Escherichia coli* sequence type 131 and its H30 subclone among *E. coli* isolates in a French hospital." Int J Antimicrob Agents **44**: 466-468.
- Lartigue M.F., Fortineau N., et al. (2005).** "Spread of novel expanded-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae in a university hospital in the Paris area, Francia." Clin Microbiol Infect **11**: 588-591.
- Lau S.H., Kaufmann M.E., et al. (2008).** "UK epidemic *Escherichia coli* strains A-E, with CTX-M-15 beta-lactamase, all belong to the international O25:H4-ST131 clone." J Antimicrob Chemother **62**: 1241-1244.
- Lau S.H., Cheesborough J., et al. (2010).** "Rapid identification of uropathogenic *Escherichia coli* of the O25:H4-ST131 clonal lineage using the DiversiLab repetitive sequence-based PCR system." Clin Microbiol Infect **16**: 232-237.
- Laupland K.B., Gregson D.B., et al. (2007).** "Burden of community-onset bloodstream infection a population-based assessment." Epidemiol Infect **135**: 1037-1042.
- Laupland K.B., Gregson D.B., et al. (2008).** "Incidence, risk factors and outcomes of *Escherichia coli* bloodstream infections in a large Canadian region." Clin Microbiol Infect **14**: 1041-1047.
- Lavollay M., Mamlouk K., et al. (2006).** "Clonal dissemination of a CTX-M-15 beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strain in the Paris area, Tunis, and Bangui." Antimicrob Agents Chemother **50**: 2433-2438.

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

Lee M.Y., Choi H.J., et al. (2010). "Dissemination of ST131 and ST393 community-onset, ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* clones causing urinary tract infections in Korea." J Infect. **60**: 146-153.

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

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

Lefort A., Panhard X., et al. (2011). "Host factors and portal of entry outweigh bacterial determinants to predict the severity of *Escherichia coli* Bacteremia." J Clin Microbiol **49**: 777-783.

Linggood M.A. and Ingram P.L. (1982). "The role of alpha haemolysin in the virulence of *E. coli* for mice." J Med Microbiol **15**: 23-30.

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

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

Lodish H., Berk A., et al. (2005). Biología Celular y Molecular. Ed. Médica Panamericana. Madrid-España.

López-Cerero L. and Pascual A. (2007). "Epidemiología de las BLEE en la comunidad: un problema emergente." Enferm Infecc Microbiol Clin **2**: 23-28.

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

López-Cerero L., Bellido M., et al. (2013). "*Escherichia coli* O25b:H4/ST131 are prevalent in Spain and are often not associated with ESBL or quinolone resistance." Enferm Infecc Microbiol Clín **31**: 385-388.

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

Lowe C., McGeer A., et al. (2012). "Decreased susceptibility to noncarbapenem antimicrobials in extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in Toronto, Canada." Antimicrob Agents Chemother **56**: 3977-3980.

Llompert V.C. (2009). "Papel de la cadena O del lipopolisacárido en la regulación de factores de virulencia de *Yersinia enterocolitica*." Tesis Doctoral. Departamento de Biología. Universitat De Les Illes Balears.

- Lund B., Lindberg F., et al. (1987).** "The papG protein is the alpha-D-galactopyranosyl-(1-4)-beta-D-galactopyranose-binding adhesin of uropathogenic *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci USA **84**: 5898-5902.
- Manges A.R., Johnson J.R., et al. (2001).** "Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal Group." New England J Med **345**: 1007-1013.
- Manges A.R., Dietrich P.S., et al. (2004).** "Multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal groups causing community-acquired pyelonephritis." Clin Infect Dis **38**: 329-334.
- Manges A.R., Perdreau-Remington F., et al. (2006).** "Multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal groups causing community-acquired bloodstream infections." J Infect **53**: 25-29.
- Manges A.R., Tabor H., et al. (2008).** "Endemic and epidemic lineages of *Escherichia coli* that cause urinary tract infections." Emerg Infect Dis **14**: 1575-1583.
- Maniatis T., Fritsch E.F., et al. (1990).** "Molecular cloning: A laboratory manual." Cold Spring Harbor, NY.
- Manning S., Zhang L., et al. (2001).** "Prevalence of known P-fimbrial G alleles in *Escherichia coli* and identification of a new adhesin class." Clin Diagn Lab Immunol **8**: 637-640.
- Marc D. and Dho-Moulin M. (1996).** "Analysis of the *fim* cluster of an avian O2 strain of *Escherichia coli*: serogroup-specific sites within *fimA* and nucleotide sequence of *fimI*." J Med Microbiol **44**: 444-452.
- Maroncle N., Sivick K., et al. (2006).** "Protease activity, secretion, cell entry, cytotoxicity, and cellular targets of secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*." Infect Immun **74**: 6124-6134.
- Martin G., Mannino D.M., et al. (2003).** "The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000." New England J Med **348**: 1546-1554.
- Martínez J.J., Mulvey M.A., et al. (2000).** "Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells." EMBO J **19**: 2803-2812.
- Martínez-Martínez L. (2007).** "Asociación de BLEE con otros mecanismos de resistencia." Enferm Infecc Microbiol Clin **2**: 38-47.
- Matsumura Y., Yamamoto M., et al. (2012a).** "Prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and spread of the ST131 clone among extended-spectrum beta-lactamase-producing *E. coli* in Japan." Int J Antimicrob Agents **40**: 158-162.
- Matsumura Y., Yamamoto M., et al. (2012b).** "Emergence and spread of B2-ST131-O25b, B2-ST131-O16 and D-ST405 clonal group among extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan." J Antimicrob Chemother **67**: 2612-2620.
- Matsumura Y., Yamamoto M., et al. (2013).** "Association of fluoroquinolone resistance, virulence genes, and IncF plasmids with extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* sequence type 131 (ST131) and ST405 clonal groups." Antimicrob Agents Chemother **57**: 4736-4742.
- Matsumura Y., Johnson J.R., et al. (2014).** "CTX-M-27 and CTX-M-14-producing, ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* of the H30 subclonal group within sequence type 131 drive the Japanese epidemic of extended-spectrum β -lactamase-producing *E. coli*." J Antimicrob Chemother (en prensa).

- McCabe W.R., Kaijser B., et al. (1978).** "E. coli in bacteremia: K and O antigens and serum sensitivity of strains from adults and neonates." J Infect Dis **138**: 33-41.
- McNally A., Cheng L., et al. (2013).** "The evolutionary path to extraintestinal pathogenic drug-resistant *Escherichia coli* is marked by drastic reduction in detectable recombination with the core genome." Genome Biol Evol **5**: 699-710.
- McSweeney L. and Dreyfus L. (2004).** "Nuclear localization of the *Escherichia coli* cytolethal distending toxin CdtB subunit." Cell Microbiol **6**: 447-458.
- McSweeney L. and Dreyfus L. (2005).** "Carbohydrate-binding specificity of the *Escherichia coli* cytolethal distending toxin CdtA-II and CdtC-II subunits." Infect Immun **73**: 2051-2060.
- Melzer M. and Petersen I. (2007).** "Mortality following bacteraemic infection caused by extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *E. coli* compared to non-ESBL producing *E. coli*." J Infect **55**: 254-259.
- Minshew B.H., Jorgensen J., et al. (1978).** "Some characteristic of *Escherichia coli* isolated from extraintestinal infections of humans." J Infect Dis **137**: 648-654.
- Miró E., Agüero J., et al. (2013).** "Prevalence and molecular epidemiology of acquired AmpC β -lactamases and carbapenemases in *Enterobacteriaceae* isolates from 35 hospitals in Spain." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **32**: 253-259.
- Moch T., Hoschutzky H., et al. (1987).** "Isolation and characterization of the alpha-sialyl-beta-2,3-galactosyl-specific adhesin from frimbriated *E coli*." Proc Natl Acad Sci USA **84**: 3462-3466.
- Molina J. (2014).** (<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/patogenicidad.html>).
- Mora A., Lopez C., et al. (2009).** "Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O1:K1:H7/NM from human and avian origin: detection of clonal group B2 ST95 and ST 59 with different host distribution." BMC Microbiol **9**: 132.
- Mora A., Herrera A., et al. (2010).** "Recent emergence of clonal group O25b:K1:H4-B2-ST131 *ibeA* strains among *Escherichia coli* poultry isolates, including CTX-M-9-producing strains, and comparison with clinical human isolates." Appl Environ Microbiol **76**: 6991-6997.
- Mora A., Blanco M., et al. (2011a).** "Emergence of clonal group O1:HNM-D-ST59, O15:H1-D-ST393, O20:H34/HNM-D-ST354, O25b:H4-B2-ST131 and ONT:H21, 42-B1-ST101 among CTX-M-14-producing *Escherichia coli* clinical isolates in Galicia, northwest Spain." Int J Antimicrob Agents **37**: 16-21.
- Mora A., Herrera A., et al. (2011b).** "Characteristics of the Shiga-toxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4 German outbreak strain and of STEC strains isolated in Spain." Int Microbiol **14**:121-141.
- Mora A., López C., et al. (2012).** "Seropathotypes, Phylogroups, Stx subtypes, and intimin types of wildlife-carried, shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains with the same characteristics as human-pathogenic isolates." Appl Environ Microbiol **78**: 2578-2585.
- Mora A., Viso S., et al. (2013).** "Poultry as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O45:K1:H7-B2-ST95 in humans." Veterinary Microbiology **167**: 506-512.

- Mora A., Dahbi G., et al. (2014).** "Virulence patterns in a murine sepsis model of ST131 *Escherichia coli* clinical isolates belonging to serotypes O25b:H4 and O16:H5 are associated to specific virotypes." PLOS ONE **9**: 1-9.
- Moreno E., Planells I., et al. (2005).** "Comparative study of *Escherichia coli* virulence determinants in strains causing urinary tract bacteremia versus strains causing pyelonephritis and other sources of bacteremia." Diagn Microbiol Infect Dis **53**: 93-99.
- Moreno E., Prats G., et al. (2006).** "Caracterización de *Escherichia coli* de los grupos filogenéticos A y B1 causantes de infección extraintestinal." Enferm Infecc Microbiol Clín **24**: 483-489.
- Moulin-Schouleur M., Schouler C., et al. (2006).** "Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin." J Clin Microbiol **44**: 3484-3492.
- Mulvey M.A. (2002).** "Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*." Cell Microbiol **4**: 257-271.
- Munday C.J., Boyd D.A., et al. (2004).** "Molecular and kinetic comparison of the novel extended-spectrum beta-lactamases CTX-M-25 and CTX-M-26." Antimicrob Agents Chemother **48**: 4829-4834.
- Murray P.R., Baron E.J., et al. (1999).** Manual of clinical microbiology. Capítulos dedicados a las enterobacterias. Ed. Washington, ASM: 442-496.
- Mushtaq S., Irfan S., et al. (2011).** "Phylogenetic diversity of *Escherichia coli* strains producing NDM-type carbapenemases." J Antimicrob Chemother **66**: 2002-2005.
- Nakano M., Yamamoto S., et al. (2001).** "Structural and sequence diversity of the pathogenicity island of uropathogenic *Escherichia coli* which encodes the Usp protein." FEMS Microbiology Letters **205**: 71-76.
- Naseer U., Haldorsen B., et al. (2009).** "Sporadic occurrence of CMY-2-producing multidrug-resistant *Escherichia coli* of ST-complexes 38 and 448, and ST131 in Norway." Clin Microbiol Infect **16**: 171-178.
- Naseer U., Olsson-Liljequist B., et al. (2012).** "Multi-Locus Variable Number of Tandem repeat Analysis for rapid and Accurate Typing of Virulent Multidrug Resistant *Escherichia coli* clones." PLOS ONE **7**: 1-6.
- Navarro M.D. (2009).** Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de Beta-lactamasas de espectro extendido: epidemiología clínica y molecular. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Sevilla.
- Naves P., del Prado G., et al. (2008).** "Correlation between virulence factor and *in vitro* biofilm formation by *Escherichia coli*." Microb Pathog **45**: 86-91.
- Neilands J.B. (1995).** "Siderophores: Structure and function of microbial iron transport compounds." J Biol Chem **270**: 26723-26726.
- Nicolas-Chanoine M.H., Blanco J., et al. (2008).** "Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15." J Antimicrob Chemother **61**: 273-281.
- Nicolas-Chanoine M.H., Bertrand X., et al. (2014).** "*Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group." Clin Microbiol Rev **27**: 543-574.

Nolan L.K., Horne S.M., et al. (2003). "Resistance to serum complement, *iss*, and virulence of avian *Escherichia coli*." Veterinary Research Communications **27**: 101-110.

Novais A., Cantón R., et al. (2006). "Dissemination and persistence of *bla*_{CTX-M-9} are linked to class 1 integrons containing CR1 associated with defective transposon derivatives from Tn402 located in early antibiotic resistance plasmids of IncHI2, incP1-alfa and IncFI group." Antimicrob Agents Chemother **50**: 2741-2750.

Novais A., Viana D., et al. (2012). "Contribution of IncFII and Broad-host IncA/C and IncN plasmids to the local expansion and diversification of phylogroup B2 *Escherichia coli* ST131 clones carrying *bla*_{CTX-M-15} and *qnsS1* genes." Antimicrob Agents Chemother **56**: 2763-2766.

Nowicki B., Moulds J., et al. (1988). "A hemagglutinin of uropathogenic *Escherichia coli* recognizes the Dr blood group antigen." Infect Immun **56**: 1057-1060.

Nowicki B., Selvarangan R., et al. (2001). "Family of *Escherichia coli* Dr adhesins: decay-accelerating factor receptor recognition and invasiveness." J Infect Dis **183**: 24-27.

O'Hara J.A., Hu F., et al. (2014). "Molecular epidemiology of KPC-producing *Escherichia coli*: occurrence of ST131-fimH30 subclone harboring pKpQIL-like IncFIIk plasmid." Antimicrob Agents Chemother **58**: 4234-4237.

O'Neill P., Talboys C., et al. (1990). "The rise and fall of *Escherichia coli* O15 in a London teaching hospital." J Med Microbiol **33**: 23-27.

Olesen B., Kolmos H.J., et al. (1995). "A comparative study of nosocomial and community-acquired strain of *Escherichia coli* causing bacteremia in a Danish University Hospital." J Hosp Infect **31**: 295-304.

Olesen B., Scheutz F., et al. (2009). "Three-decade epidemiological analysis of *Escherichia coli* O15:K52:H1." J Clin Microbiol **47**: 1857-1862.

Olesen B., Hansen D.S., et al. (2013). "Prevalence and characteristics of the epidemic multiresistant *Escherichia coli* ST131 clonal group among extended-spectrum beta-lactamase-producing *E. coli* isolates in Copenhagen, Denmark." J Clin Microbiol **51**: 1779-1785.

Olesen B., Frimodt-Moller J., et al. (2014). "Temporal trends in antimicrobial resistance and virulence-associated traits within the *Escherichia coli* sequence type 131 clonal group and its H30 and H3a-Rx subclones, 1968 to 2012." Antimicrob Agents Chemother **58**: 6886-6895.

Oliver A., Coque T.M., et al. (2005). "CTX-M-10 linked to a phage-related elements is widely disseminated among *Enterobacteriaceae* in a Spanish Hospital." Antimicrob Agents Chemother **49**: 1567-1571.

Orden J., Domínguez-Bernal G., et al. (2007). "Necrotogenic *Escherichia coli* from sheep and goats produce a new type of cytotoxic necrotizing factor (CNF3) associated with the *eae* and *ehxA* genes." Int Microbiol **10**: 47-55.

Orskov F. and Orskov I. (1975). "*Escherichia coli* O:H serotypes isolated from human blood. Prevalence of the K1 antigen with technical details of O and H antigenic determination." Acta Pathol Microbiol Scand Suppl **83**: 595-600.

Orskov I., Orskov F., et al. (1977). "Serology, chemistry and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*." Bacteriol Rev **41**: 667-710.

- Orskov F. and Orskov I. (1984). Methods in Microbiology. London, Academic Press.
- Orskov I. and Orskov F. (1985). "*Escherichia coli* in extra intestinal infections." J Hyg **95**: 551-575.
- Oswald E., De Ryche J., et al. (1989). "Cytotoxic effect of multinucleation in HeLa cell cultures associated with the presence of Vir plasmid in *E. coli* strains." FEMS Microbiology Letters **58**: 95-100.
- Oteo J., Navarro C., et al. (2006). "Spread of *Escherichia coli* strains with high-level cefotaxime and ceftazidime resistance between the community, long-term care facilities, and hospital institutions." J Clin Microbiol **44**: 2359-2366.
- Oteo J., Diestra K., et al. (2009). "Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Spain belong to a large variety of multilocus sequence typing types, including ST10 complex/A, ST23 complex/A and ST131/B2." Int J Antimicrob Agents **34**: 173-176.
- Oteo J., Perez-Vazquez M., et al. (2010a). "Extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli*: changing epidemiology and clinical impact." Curr Opin Infect Dis **23**: 320-326.
- Oteo J., Cercenado E., et al. (2010b). "AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli*: emergence of CMY2-producing virulent phylogroup D isolates belonging mainly to STs 57, 115, 354, 393, and 420 and phylogroup B2 isolates belonging to the international clone O25b-ST131." Diagn Microbiol Infect Dis **67**: 270-276.
- Oteo J., Saez D., et al. (2013). "Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Spain in 2012." Antimicrob Agents Chemother **57**: 6344-6347.
- Pannaraj P.S., Bard J.D., et al. (2014). "Pediatric Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* in Los Angeles, a high-prevalence region in the United States." Pediatr Infect Dis J (en prensa).
- Parret A.H. and De Mot R. (2002). "*Escherichia coli*'s uropathogenic-specific protein: a bacteriocin promoting infectivity." Microbiology **148**: 1604-1606.
- Paterson D.L. and Bonomo R.A. (2005). "Extended-spectrum beta-lactamase: a clinical update." Clin Microbiol Rev **18**: 657-686.
- Pattus F. and Abdallah M.A. (2000). "Siderophores and iron-transport in microorganisms." The Chinese Chemical Society **47**: 1-20.
- Paul S., Linardopoulou E.V., et al. (2013). "Role of homologous recombination in adaptive diversification of extraintestinal *Escherichia coli*." J Bacteriol **195**: 231-242.
- Peiranes-Díaz M.E., Novo-Veleiro I., et al. (2013). "Bacteriemia por *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido: factores asociados a mortalidad y reingreso hospitalario." Medicina Clínica: 1-6.
- Peirano G. and Pitout J. (2010). "Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M beta-lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4." Int J Antimicrob Agents **35**: 316-321.
- Peirano G., Richardson D., et al. (2010). "High prevalence of ST131 isolates producing CTX-M-15 and CTX-M-14 among extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolares from Canada." Antimicrob Agents Chemother **54**: 1327-1330.

Peirano G., Schreckenberger P.C., et al. (2011). "Characteristics of NDM-1-producing *Escherichia coli* isolates that belong to the successful and virulent clone ST131." Antimicrob Agents Chemother **55**: 2986-2988.

Peirano G., Bij A., et al. (2012). "Molecular epidemiology over an 11-year period (2000 to 2010) of Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* causing bacteremia in a centralized Canadian region." J Clin Microbiol **50**: 294-299.

Peirano G. and Pitout J. (2014). "Fluoroquinolone-Resistant *Escherichia coli* sequence type 131 isolates causing bloodstream infection in a Canadian region with a centralized laboratory system: rapid emergence of the H30-Rx sublineage." Antimicrob Agents Chemother **58**: 2699-2703.

Peirano G., van der Bij A., et al. (2014a). "Characteristics of *Escherichia coli* sequence type 131 isolates that produce extended-spectrum β -lactamases: Global distribution of the H30-Rx sublineage." Antimicrob Agents Chemother **58**: 3762-3766.

Peirano G., Ahmed-Bentley J., et al. (2014b). "Travel-related carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Alberta, Canada: the first 3 years." J Clin Microbiol **52**: 1575-1581.

Peirano G., Bradford P.A., et al. (2014c). "Global Incidence of Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* ST131." Emerg Infect Dis **20**: 1928-1931.

Petty N., Ben Zakour N., et al. (2014). "Global dissemination of a multidrug resistant *Escherichia coli* clone." PNAS Microbiology **111**: 5694-5699.

Phillips I., King A., et al. (1988). "Epidemic multiresistant *Escherichia coli* infection in West Lambeth Health District." Lancet **1**: 1038-1041.

Phillips J.A., Guyer D.M., et al. (2000). "Identification of a second pathogenicity island in uropathogenic *Escherichia coli* CFT073 containing the secreted autotransporter toxin (Sat) and other virulence determinants." Abstracts, ASM 100th General Meeting **172**: 80.

Pickett C. and Whitehouse C. (1999). "The cytolethal distending toxin family." Trends Microbiol **7**: 292-297.

Pickett C., Lee R., et al. (2004). "Patterns of variations in *Escherichia coli* strains that produce cytolethal distending toxin." Infect Immun **72**: 684-690.

Pitout J.D., Laupland K.B., et al. (2005a). "Virulence factors of *Escherichia coli* isolates that produce CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases." Antimicrob Agents Chemother **49**: 4667-4670.

Pitout J.D., Gregson D.B., et al. (2005b). "Community-wide outbreaks of clonally related CTX-M-14 beta-lactamase-producing *E. coli* strains in the Calgary Health Region." J Clin Microbiol **43**: 2844-2849.

Pitout J.D., Gregson D.B., et al. (2009). "Molecular characteristics of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates causing bacteremia in the Calgary Health Region from 2000 to 2007: emergence of clone ST131 as a cause of community-acquired infections." Antimicrob Agents Chemother **53**: 2846-2851.

Platell J.L., Cobbold R.N., et al. (2010). "Clonal group distribution of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* among humans and companion animals in Australia." J Antimicrob Chemother **65**: 1936-1938.

- Platell J.L., Johnson J.R., et al. (2011a).** "Multidrug-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* of sequence type ST131 in animals and foods." Veterinary Microbiology **153**: 99-108.
- Platell J.L., Cobbold R., et al. (2011b).** "Commonality among fluoroquinolone-resistant sequence type ST131 extraintestinal *Escherichia coli* isolates from humans and companion animals in Australia." Antimicrob Agents Chemother **55**: 3782-3787.
- Platell J.L., Cobbold R., et al. (2012).** "Fluoroquinolone-resistant extraintestinal *Escherichia coli* clinical isolate representing the O15:K52:H1 clonal group from human and dogs in Australia." Comp Immunol Microbiol Infect Dis: 1-6.
- Pluschke G., Maiden J., et al. (1983).** "Role of capsule and the O antigen in resistance of O18:K1 *E. coli* to complement-mediated killing." Infect Immun **42**: 907-913.
- Poirel L., Gniadkowski M., et al. (2002).** "Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 and of its structurally related beta-lactamase CTX-M-3." J Antimicrob Chemother **50**: 1031-1034.
- Poirel L., Savov E., et al. (2014).** "Outbreak caused by NDM-1-and RmtB-producing *Escherichia coli* in Bulgaria." Antimicrob Agents Chemother **58**: 2472-2474.
- Pomba C., da Fonseca J.D., et al. (2009).** "Detection of the pandemic O25-ST131 human virulent *Escherichia coli* CTX-M-15-producing clone harboring the *qnrB2* and *aac(6)-Ib-cr* genes in a dog." Antimicrob Agents Chemother **53**: 327-328.
- Pons X.I. (2006).** La familia de proteínas Hha-YmoA: estudios estructurales y papel regulador en *Yersinia enterocolitica*. Tesis Doctoral. Departamento de Microbiología, Universitat de Barcelona.
- Prasadarao N. V., Wass C.A., et al. (1993).** "Adhesion of S-fimbriated *Escherichia coli* to brain glycolipids mediated by *sfaA* gene encoded protein of S-fimbriae." J Biol Chem **268**: 10356-10363.
- Prats G., Navarro F., et al. (2000).** "*Escherichia coli* serotype O15:K52:H1 as an uropathogenic clone." J Clin Microbiol **38**: 201-209.
- Prats G. (2007).** Epidemiología Microbiana. Microbiología Clínica. Panamericana. Barcelona: 203-211.
- Price L.B., Johnson J.R., et al. (2013).** "The epidemic of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 is driven by a single highly pathogenic subclone, H30-Rx." mBio **4**: 1-10.
- Provence D.L. and Curtiss III R. (1994).** "Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain." Infect Immun **62**: 1369-1380.
- Qin X., Hu F., et al. (2013).** "Comparison of adhesin genes and antimicrobial susceptibilities between uropathogenic and intestinal commensal *Escherichia coli* strains." PLOS ONE **8**: 1-7.
- Raetz C. and Whitfield C. (2002).** "Lipopolysaccharide endotoxins." Annu Rev Biochem **71**: 635-700.
- Ramos N.L., Saayman M.L., et al. (2010).** "Genetic relatedness and virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and uroseptic patients." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **29**: 15-23.

Rasheed J.K., Jay C., et al. (1997). "Evolution of extended-spectrum beta-lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia." Antimicrob Agents Chemother **41**: 647-653.

Ratner A.J., Hippe K., et al. (2006). "Epithelial cell are sensitive detectors of bacterial pore-forming toxins." J Biol Chem **281**: 12994-12998.

Raymond K., Dertz E., et al. (2003). "Enterobactin: An archetype for microbial iron transport." Proc Natl Acad Sci USA **100**: 3584-3588.

Riley L.W. (2014). "Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*." Clin Microbiol Infect **20**: 380-390.

Roberts I.S. (1996). "The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria." Annu Rev Microbiol **50**: 285-315.

Rodríguez-Angeles G. (2002). "Principales características y diagnóstico de los grupos patogénicos de *Escherichia coli*." Salud Pública de México **44**: 464-475.

Rodríguez-Baño J., Navarro D.M., et al. (2004). "Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients." J Clin Microbiol **42**: 1089-1094.

Rodríguez-Baño J., Navarro M.D., et al. (2006a). "Clinical and molecular epidemiology of extended spectrum beta-lactamases producing *Escherichia coli* as a cause of nosocomial infections or colonization: implications for control." Clin Infect Dis **42**: 37-45.

Rodríguez-Baño J., Navarro D.M., et al. (2006b). "Bacteremia Due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in the CTX-M era: A new clinical challenge." Clin Infect Dis **43**: 1407-1414.

Rodríguez-Baño J., Navarro D.M., et al. (2008). "Risk-factor for emerging bloodstream infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*." Clin Microbiol Infect **14**: 180-183.

Rodríguez-Baño J., López-prieto M.D., et al. (2010a). "Epidemiology and clinical features of community-acquired, healthcare associated and nosocomial bloodstream infection in tertiary and community hospital." Clin Microbiol Infect **16**: 1408-1413.

Rodríguez-Baño J., Picón E., et al. (2010b). "Risk factors and prognosis of nosocomial bloodstream infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli*." J Clin Microbiol **48**: 1726-1731.

Rodríguez-Baño J., Mingorance J., et al. (2012). "Virulence profiles of bacteremic extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: association with epidemiological and clinical features." PLOS ONE **7**: 1-9.

Rodríguez-Baño J., Mingorance J., et al. (2013). "Outcome of bacteraemia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: impact of microbiological determinants." J Infect **67**: 27-34.

Rodríguez-Siek K.E., Giddings C.W., et al. (2005). "Characterizing the APEC pathotype." Vet Res **36**: 241-256.

- Romero L., López L., et al. (2005).** "Long term study of the frequency of *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated producing extended spectrum B-lactamasa." Clin Microbiol Infect **11**: 625-631.
- Romero H.S. and Iregui C.A. (2010).** "El Lipopolisacárido." Revista de Medicina Veterinaria **19**: 37-45.
- Rossi F., Baquero F., et al. (2006).** "In vitro susceptibilities of aerobic and facultatively anaerobic Gram-negative bacilli isolated from patients with intra-abdominal infections worldwide: 2004 results from SMART (Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends)." J Antimicrob Chemother **58**: 205-210.
- Russo T., Wenderoth S., et al. (1998).** "Identification, genomic organization, and analysis of the group III capsular polysaccharide genes *kpsD*, *kpsM*, *kpsT*, and *kpsE* from an extraintestinal isolate of *Escherichia coli* (CP9, O4/K54/H5)." J Bacteriol **180**: 338-349.
- Russo T., Carlino-MacDonald U., et al. (1999).** "Identification of genes in an extraintestinal isolate of *Escherichia coli* with increased expression after exposure to human urine." Infect Immun **67**: 5306-5314.
- Russo T., McFadden C., et al. (2002).** "Iron function as a siderophore receptor and is a urovirulence factor in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*." Infect Immun **70**: 7156-7160.
- Russo T., McFadden C., et al. (2003).** "The siderophore receptor *iroN* of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* is a potencial vaccine candidate." Infect Immun **71**: 7164-7169.
- Sabaté M., Tarrago R., et al. (2000).** "Cloning and sequence of the genes encoding a novel cefotaxime-Hydrolyzing beta-lactamasa (CTX-M-9) from *E. coli* in Spain." Antimicrob Agents Chemother **44**: 1970-1973.
- Saladin M., Cao V.T., et al. (2002).** "Diversity of CTX-M beta-lactamases and their promoter regions from *Enterobacteriaceae* isolated in three Parisian hospitals." FEMS Microbiology Letters **209**: 161-168.
- Sallem R.B., Slama K.B., et al. (2014).** "Detection of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* isolates of lineages ST410-A, ST617-A and ST354-D in faecal samples of hospitalized patients in a Mauritanian hospital." J Chemother (en prensa).
- Salvador E., Wagenlehner F., et al. (2011).** "Comparison of asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* isolates from healthy individuals versus those from hospital patients shows that long-term bladder colonization selects for attenuated virulence phenotypes." Infect Immun **80**: 668-678.
- Sampaio B.A., Takayama K.R., et al. (2010).** "Cloning, expression and sequence diversity of *iss* gene from avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated in Brazil." Ciencias Agrarias Londrina **31**: 723-732.
- Sannes M.R., Kuskowski M., et al. (2004).** "Virulence factor profiles and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from veterans with bacteriemia and uninfected control subjects." J Infect Dis **190**: 2121-2128.
- Sarkar S., Ulett G., et al. (2014).** "Role of capsule and O antigen in the virulence of Uropathogenic *Escherichia coli*." PLOS ONE **9**: 1-11.
- Schilling J., Mulvey M., et al. (2001).** "Structure and function of *Escherichia coli* type 1 pili: new insight into the pathogenesis of urinary tract infections." J Infect Dis **183**: 36-40.

- Schubert S., Rakin A., et al. (1998).** "Prevalence of the high-pathogenicity island of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that is pathogenic to humans." Infect Immun **66**: 480-485.
- Schwaber M.J., Navon-Venezia S., et al. (2005).** "High levels of antimicrobial coresistence among extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae*." Antimicrob Agents Chemother **49**: 2137-2139.
- Scott D.A. and Kaper J.B. (1994).** "Cloning and sequencing of the genes encoding *Escherichia coli* cytolethal distending toxin." Infect Immun **62**: 244-251.
- Servin A.S. (2005).** "Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*." Clin Microbiol Rev **18**: 264-292.
- Sidjabat H.E., Paterson D.L., et al. (2009).** "Molecular epidemiology of CTX-M-producing *Escherichia coli* isolates at a tertiary medical center in Western Pennsylvania." Antimicrob Agents Chemother **53**: 4733-4739.
- Simarro E., Navarro F., et al. (2000).** "*Salmonella enterica* serovar Virchow with CTX-M like beta-lactamasa in Spain." J Clin Microbiol **38**: 4647-4678.
- Simoes R.C., Kobayashi R., et al. (2006).** "Cloning, sequencing, expression, and characterization of the *tsh* gene from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain." Semina: Ciencias Agrarias, Londrina **27**: 253-260.
- Skjot-Rasmussen L., Olsen S., et al. (2013).** "*Escherichia coli* clonal group A causing bacteriemia of urinary tract origin." Clin Microbiol Infect **19**: 656-661.
- Smith H.W. and Huggings M.B. (1976).** "Further observations on the association of the colicine V plasmid of *Escherichia coli* with pathogenicity and with survival in the alimentary tract." J Gen Microbiol **92**: 335-350.
- Smithson A.A. (2008).** Factores dependientes del microorganismo y del huésped en la patogenia de las infecciones urinarias. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Barcelona.
- Sorsa L.J., Dufke S., et al. (2003).** "Characterization of an *iroBCDEN* gene cluster on a transmissible plasmid of uropathogenic *Escherichia coli*: Evidence for horizontal transfer of a chromosomal virulence factor." Infect Immun **71**: 3285-3293.
- Stins M., Prasadarao N., et al. (1994).** "Binding characteristics of S fimbriated *Escherichia coli* to isolated brain microvascular endothelial cells." Am J Pathol **145**: 1228-1236.
- Stoll T., Markwirth G., et al. (2009).** "A new member of a growing toxin family-*Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 3 (CNF3)." Toxicon **54**: 745-753.
- Strömberg N., Marklund B., et al. (1990).** "Hostspecificity of uropathogenic *Escherichia coli* depend on differences in binding specificity to gal alpha 1-4Gal-containing isoreceptors." EMBO **9**: 2001-2010.
- Spurbeck R.R., Dinh P.C., et al. (2012).** "*Escherichia coli* isolates that carry *vat*, *fyuA*, *chuA*, and *yfcV* efficiently colonize the urinary tract." Infect Immun **80**: 4115-4122.
- Sugai M., Hatazaki K., et al. (1999).** "Cytotoxic necrotizing factor type 2 produced by pathogenic *Escherichia coli* deamidates a Gln residue in the conserved G-3 domain of the Rho family and preferentially inhibits the GTPase activity of RhoA and Rac1." Infect Immun **67**: 6550-6557.

- Sukupolvi S. and O'Connor D. (1990).** "TraT lipoproteína, a plasmid-specified mediator of interactions between gram-negative bacteria and their environment." Microbiol Rev **54**: 331-341.
- Sussman M. (1997).** Escherichia coli: Mechanisms of virulence. UK., Cambridge University Press.
- Suzuki S., Shibata N., et al. (2009).** "Change in the prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan by clonal spread." Antimicrob Chemother **63**: 72-79.
- Tartof S.Y., Solberg O., et al. (2005).** "Analysis of an Uropathogenic *Escherichia coli* clonal group by multilocus sequence typing." J Clin Microbiol **43**: 5860-5864.
- Tartof S.Y., Solberg O., et al. (2007).** "Genotypic analyses of uropathogenic *Escherichia coli* based on *fimH* single nucleotide polymorphisms (SNPs)." J Med Microbiol **56**: 1363-1369.
- Tórtola M.T., Lavilla S., et al. (2005).** "First detection of a carbapenem-hydrolyzing metalloenzyme in two enterobacteriaceae isolates in Spain." Antimicrob Agents Chemother **49**: 3492-3494.
- Taylor P.W. (1974).** "Sensitivity of some smooth strain of *E. coli* to the bacterial action of normal human serum." J Clin Pathol **27**: 626-629.
- Tian G.B., Huang Y.M., et al. (2014).** "CTX-M-137, a hybrid of CTX-M-14-like and CTX-M-15-like β -lactamases identified in an *Escherichia coli* clinical isolate." J Antimicrob Chemother **69**: 2081-2085.
- To K.K.W., Lo W.U., et al. (2013).** "Clinical outcome of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* bacteremia in an area with high endemicity." Int J Infect Dis **17**: 120-124.
- Tóth I., Héroult F., et al. (2003).** "Production of cytolethal distending toxins by pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from human and animal sources: establishment of the existence of a new Cdt variant (Type IV)." J Clin Microbiol **41**: 4285-4291.
- Totsika M., Beatson S., et al. (2011).** "Insights into a multidrug resistant *Escherichia coli* pathogen of the globally disseminated ST131 lineage: Genome analysis and virulence Mechanisms." PLOS ONE **6**: 1-11.
- Uslan D., Crane S., et al. (2007).** "Age and Sex-associated trends in bloodstream infection." Arch Intern Med **167**: 834-839.
- Uzzau S. and Fasano A. (2000).** "Cross-talk between enteric pathogenic and the intestine." Cell Microbiol **2**: 83-89.
- Valverde A., Cantón R., et al. (2009).** "Spread of *bla*_{CTX-M-14} is driven mainly by IncK plasmids disseminated among *Escherichia coli* phylogroups A, B1 and D in Spain." Antimicrob Agents Chemother **53**: 5204-5212.
- Valverde-Romero E., García-García M.I., et al. (2005).** "Epidemiology of CTX-M Beta-lactamases in Spain." 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases **2**: 117.
- Van den Bosch J.F., Postma P., et al. (1982).** "Virulence of urinary and faecal *Escherichia coli* in relation to serotype, haemolysis and haemagglutination." J Hyg **88**: 567-577.
- Van der Bij A., Peirano G., et al. (2012).** "The presence of genes encoding for different virulence factors in clonally related *Escherichia coli* that produce CTX-Ms." Diagn Microbiol Infect Dis **72**: 297-302.

Vázquez J., Mendoza M.C., et al. (1992). "Survey of *Escherichia coli* septicemia over a six-year period." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **11**: 110-117.

Vidotto M.C., Cacao J.M.C., et al. (1991). "Plasmid coding for aerobactin production and drug resistance is involved in virulence of *Escherichia coli* avian strains Brazilian." Braz J Med Biol Res **24**: 677-685.

Vigil P.D., Wiles T.J., et al. (2012). "The repeat-in toxin family member TosA mediates adherence of uropathogenic *Escherichia coli* and survival during bacteremia." Infect Immun **80**: 493-505.

Waalwijk C., MacLaren D.M., et al. (1983). "In vivo function of hemolysin in the nephropathogenicity of *E. coli*." Infect Immun **42**: 245-249.

Wang S., Niu C., et al. (2011). "Effects of *ibeA* deletion on virulence and Biofilm formation of Avian Pathogenic *Escherichia coli*." Infect Immun **79**: 279-287.

Waters V.L. and Crosa J.H. (1991). "Colicin V Virulence plasmids." Microbiol Rev **55**: 437-450.

Weissman S., Johnson J.R., et al. (2012). "High-Resolution two-locus clonal typing of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*." Appl Environ Microbiol **78**: 1353-1360.

Whitfield C. (2006). "Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*." Annu Rev Biochem **75**: 39-68.

Wiles T., Kulesus R., et al. (2008). "Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*." Experimental and Molecular Pathology **85**: 11-19.

Williams P.H. and Carbonetti N.H. (1986). "IroN, siderophores, and the pursuit of virulence: independence of the aerobactin and enterochelin iron uptake systems in *Escherichia coli*." Infect Immun **51**: 942-947.

Williamson D.A., Freeman J.T., et al. (2013). Clinical and molecular correlates of virulence in *Escherichia coli* causing bloodstream infection following transrectal ultrasound-guided (TRUS) prostate biopsy. J Antimicrob Chemother **68**: 2898-2906.

Woodford N., Ward M.E., et al. (2004). "Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in the UK." J Antimicrob Chemother **54**: 735-743.

Woodford N., Turton J., et al. (2011). "Multiresistant gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance." FEMS Microbiol Rev **35**: 736-755.

Yamamoto S., Terai A., et al. (1995). "Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction." FEMS Immunol Med Microbiol **12**: 85-90.

Yamamoto S., NaKano M., et al. (2001). "The presence of the virulence island containing the *usp* gene in uropathogenic *Escherichia coli* is associated with urinary tract infection in an experimental mouse model." J Urol **165**: 1347-1351.

Yano H., Uemura M., et al. (2013). "Molecular characteristic of Extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates from *Escherichia coli* at a Japanese tertiary hospital." PLOS ONE **8**: 1-5.

Yoo J.S., Kim H.M., et al. (2013). "Nosocomial transmission of NDM-1-producing *Escherichia coli* ST101 in a Korean hospital." J Antimicrob Chemother **68**: 2170-2172.

Yumuk Z., Afacan G., et al. (2008). "Turkey: a further country concerned by community-acquired *Escherichia coli* clone O25-ST131 producing CTX-M-15." J Antimicrob Chemother **62**: 284-288.

Zou Y., He L., et al. (2008). "Involvement of *Escherichia coli* K1 *ibeT* in bacterial adhesion that is associated with the entry into human brain microvascular endothelial cells." Med Microbiol Immunol **197**: 337-344.



