



MÁSTER  
UNIVERSITARIO EN  
INVESTIGACIÓN  
EN MEDICINA  
CLÍNICA



FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

## TRABAJO FIN DE MÁSTER

Características clínicas y microbiológicas de  
bacteriemias por *Escherichia coli* ST131 en el  
Hospital Clínico Universitario Virgen de la  
Arrixaca

**Alumno:** Javier Segura Basail

**Tutor:** Juan Carlos Rodríguez Díaz

Curso: 2018-2019



D. Juan Carlos Rodríguez Díaz, Profesor asociado de Ciencias de la Salud (Área de Microbiología) de la Universidad Miguel Hernández de Elche y Jefe Microbiología del Hospital General Universitario de Alicante.

AUTORIZA:

La presentación del Trabajo Final de Máster titulado "Características clínicas y microbiológicas de bacteriemias por *Escherichia coli* ST131 en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca", realizado por el alumno D. Javier Segura Basail, bajo mi inmediata dirección y supervisión.

En Alicante, a 13 de junio de 2019

Juan Carlos Rodríguez Díaz (TUTOR)

**GENERALITAT VALENCIANA**  
CONSELLERIA DE SANITAT UNIVERSAL I SALUT PÚBLICA  
DEPARTAMENTO DE SALUD ALICANTE - H.G.U.A.  
Jefe Sección Microbiología  
**Juan Carlos Rodríguez Díaz**

Javier Segura Basail (ALUMNO)

# RESUMEN/SUMMARY

## RESUMEN

INTRODUCCIÓN: En los últimos años se ha observado un incremento de bacteriemias por el clon de *Escherichia coli* "Sequence type" (ST) 131 asociado a la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y resistencia a fluoroquinolonas que puede conducir a un tratamiento antibiótico empírico inadecuado y un resultado clínico desfavorable. El objetivo principal de este trabajo fue estudiar las características epidemiológicas, clínicas y moleculares de las bacteriemias por *E. coli* ST131 durante 1 año.

MATERIAL Y MÉTODOS: Se recuperaron y estudiaron los aislados consecutivos de *Escherichia coli* procedentes de hemocultivos durante el año 2013. Se recogieron los datos demográficos y epidemiológicos de los pacientes. La identificación bioquímica y sensibilidad antibiótica se realizó mediante el sistema automatizado Vitek2®. Se detectó la presencia específica de los clon ST131, se realizó la caracterización de las enzimas BLEE y se detectaron factores de virulencia.

RESULTADOS: La edad media de pacientes con bacteriemias por *E. coli* ST131 fue de 64 años. Se observó un incremento de las bacteriemias de adquisiciones nosocomial y RAS a diferencia de las No-ST131, con un claro predominio de adquisición comunitaria. El foco de origen predominante fue el urinario. El 72,8% de los pacientes presentaron alguna comorbilidad. Las bacteriemias por *E. coli* ST131 fueron estadísticamente inferiores en pacientes con diabetes mellitus ( $p$ -valor=0,031). La mortalidad a los 30 días fue superior en pacientes con bacteriemias por *E. coli* ST131, no obstante, no se observaron diferencias estadísticamente significativas frente a pacientes con bacteriemias por *E. coli* No-ST131. Las cepas ST131 fueron significativamente más resistentes a todos los antibióticos analizados que las NO-ST131 a excepción de piperacilina-tazobactam ( $p$ -valor=0,522). El 38,9% de las cepas ST131 fueron productoras de BLEE y el 83,3% fue resistente a ciprofloxacino. El porcentaje de cepas ExPEC fue del 72,2% y el factor de virulencia más prevalente fue *iutA*, observándose diferencias en la presencia del gen *sfa/foc* ( $p$ -valor=0,040).

CONCLUSIONES: En nuestro estudio se observó un incremento de bacteriemias por *E. coli* ST131 nosocomiales y RAS respecto a NO-ST131 con predominio urinario en pacientes de edad avanzada y elevada comorbilidad. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a los factores de riesgo a excepción de pacientes con diabetes mellitus donde se observó una menor tasa de bacteriemias por ST131. Las cepas ST131 fueron estadísticamente más resistentes destacando elevados porcentajes de BLEE y resistencia a ciprofloxacino.

PALABRAS CLAVE: *bacteriemia, Escherichia coli, Sequence type 131.*

## **SUMMARY**

**INTRODUCTION:** In recent years there has been an increase in bacteremia due to the clone of *Escherichia coli* "Sequence type" (ST) 131 associated with the production of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) and resistance to fluoroquinolones that can lead to a treatment inadequate empirical antibiotic and an unfavorable clinical result. The main objective of this work was to study the epidemiological, clinical and molecular characteristics of *E. coli* ST131 bacteremia for 1 year.

**MATERIAL AND METHODS:** Consecutive isolates of *Escherichia coli* from blood cultures were recovered and studied during 2013. The demographic and epidemiological data of the patients were collected. The biochemical identification and antibiotic sensitivity was carried out using the automated Vitek2® system. The specific presence of the ST131 clon was detected, the characterization of the ESBL enzymes was carried out and virulence factors were detected.

**RESULTS:** The mean age of patients with bacteremia due to *E. coli* ST131 was 64 years. There was an increase in nosocomial and RAS acquisition bacteremia, in contrast to Non-ST131, with a clear predominance of community acquisition. The predominant focus was the urinary origin. 72.8% of the patients presented some comorbidity. Bacteremia due to *E. coli* ST131 was statistically lower in patients with diabetes mellitus ( $p$ -value=0,031). Mortality at 30 days was higher in patients with *E. coli* ST131 bacteremia, however, no statistically significant differences were observed against patients with *E. coli* No-ST131 bacteremia. The ST131 strains were significantly more resistant to all antibiotics analyzed than the NO-ST131 except for piperacillin-tazobactam ( $p$ -value=0,522). 38.9% of ST131 strains were ESBL producers and 83.3% were resistant to ciprofloxacin. The percentage of ExPEC strains was 72.2% and the most prevalent virulence factor was *iutA*, with differences in the presence of the *sfa/foc* gene ( $p$ -value=0,040).

**CONCLUSIONS:** In our study, we observed an increase in *E. coli* ST131 bacteremia due to nosocomial and RAS acquisition compared to NO-ST131 with urinary predominance in elderly patients and high comorbidity. No statistically significant differences were observed regarding the risk factors except for patients with diabetes mellitus where a lower rate of ST131 bacteremia was observed. Strains ST131 were statistically more resistant, highlighting high percentages of ESBL and resistance to ciprofloxacin.

**KEYWORDS:** *bacteremia, Escherichia coli, Sequence type 131*

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 <i>Escherichia coli</i> .....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Características microbiológicas.....	1
1.1.2. Epidemiología. Patogénesis. ....	2
1.1.3. <i>E. coli</i> como patógeno extraintestinal (ExPEC) .....	2
1.1.4. Factores de virulencia (FV) de ExPEC.....	3
1.1.5. Diversidad clonal de ExPEC. ....	5
1.1.6. Resistencia a antibióticos.....	5
1.1.7. Betalactamasas de espectro extendido (BLEE).....	6
<b>1.2. Bacteriemias por <i>E. coli</i>.....</b>	<b>9</b>
1.2.1. Definición de bacteriemia y clasificaciones. ....	9
1.2.2. Incidencia de las bacteriemias por <i>E. coli</i> . ....	10
1.2.3. Factores de riesgo y mortalidad de bacteriemias por <i>E. coli</i> .....	10
1.2.4. Factores de virulencia asociados a bacteriemias por <i>E. coli</i> .....	11
1.2.5. Resistencia a antibióticos en cepas de <i>E. coli</i> invasivas	
Datos del Informe EARSS 2017.....	12
<b>1.3. <i>E. coli</i> ST131.....</b>	<b>13</b>
<b>2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO Y OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO .....</b>	<b>17</b>
<b>2.2 OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>

<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1. Diseño del estudio y pacientes .....</b>	<b>19</b>
<b>3.2. Criterios de inclusión/exclusión. ....</b>	<b>19</b>
<b>3.3. Tamaño muestral y grupos a comparar .....</b>	<b>19</b>
<b>3.4. Variables y definiciones .....</b>	<b>20</b>
<b>3.5. Métodos microbiológicos y moleculares .....</b>	<b>21</b>
3.5.1. Procesamiento de hemocultivo y sensibilidad antibiótica .....	21
3.5.2. Métodos moleculares .....	21
3.5.3. Tipificación molecular mediante PCR de los STs 69,73,95 y 131.....	22
3.5.4. Caracterización molecular de las betalactamasas de espectro extendido (BLEEs).....	23
3.5.5. Detección de genes de virulencia .....	24
<b>3.6. Análisis estadístico .....</b>	<b>25</b>
<b>3.7. Limitaciones del estudio .....</b>	<b>26</b>
<b>4. PLAN DE TRABAJO .....</b>	<b>26</b>
<b>5. ASPECTOS ÉTICOS.....</b>	<b>27</b>
<b>6. PRESUPUESTO .....</b>	<b>27</b>
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>28</b>
<b>8. DISCUSIÓN .....</b>	<b>32</b>
<b>9. DISCUSIÓN .....</b>	<b>34</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>35</b>
<b>ANEXO: LISTA DE TABLAS Y FIGURAS .....</b>	<b>42</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. *Escherichia coli*

### 1.1.1. Características microbiológicas.

*Escherichia coli* es una especie bacteriana descubierta por el pediatra y bacteriólogo alemán Theodore Escherich (Ansbach, 1857-Viena, 1911) (**Figura 1**) que, en 1885 describió una bacteria a la que denominó *Bacterium coli commune* en heces de neonatos y niños sanos (1). En 1919 Castellani y Chalmers, en su honor, la denominaron *Escherichia coli*(2).



**Figura 1.** Imagen de Theodor Escherich. Extraída de <https://es.wikipedia.org>.

Actualmente *Escherichia coli* se sitúa taxonómicamente en el Dominio *Bacteria*, Filo *Proteobacteria*, Clase *Gammaproteobacteria*, Orden *Enterobacteriales*, Familia *Enterobacteriaceae*, Género *Escherichia* y Especie *E. coli*.

En cuanto a las principales características microbiológicas es una bacteria gramnegativa, anaerobia facultativa, de aproximadamente 1,1 – 1,5  $\mu\text{m}$  de diámetro por 2,0 – 6,0  $\mu\text{m}$  de largo. Se dispone de forma aislada o en parejas, es móvil, de metabolismo fermentativo y respiratorio, produce catalasa, está desprovista del enzima citocromo oxidasa, es capaz de reducir el nitrato a nitrito, de fermentar la lactosa y producir indol a partir del triptófano. Las reacciones de

Voges-Proskauer, la producción de ureasa y fenilalanina desaminasa son negativas (3).

### **1.1.2. Epidemiología. Patogénesis.**

*E. coli* es una especie bacteriana de crecimiento rápido, ampliamente distribuida en el suelo, agua y vegetales y que convive como comensal en la flora intestinal de mamíferos y aves (4). Uno de los grandes paradigmas de este microorganismo es su carácter tanto comensal como patógeno. La mayoría de las cepas no son patógenas, y no sólo conviven en el intestino humano sin ocasionar daño, sino que incluso algunas son beneficiosas al sintetizar cofactores y protegerlo de la invasión por microorganismos patógenos (5). Otras son patógenas bien adaptadas, capaces de causar una gran variedad de enfermedades, desde diversos cuadros de gastroenteritis a infecciones extraintestinales como infecciones urinarias (ITUs), meningitis neonatal o bacteriemias (6). La conversión de *E. coli* como microorganismo comensal a microorganismo patógeno se produce tras la adquisición de una combinación de elementos genéticos móviles que portan determinados factores de virulencia.

### **1.1.3 *E. coli* patógeno extraintestinal (ExPEC).**

Las cepas patógenas extraintestinales de *E. coli* (ExPEC), fueron denominadas así por primera vez en el año 2000 por Russo y Johnson (7). Son capaces de causar diferentes infecciones en los seres humanos siendo las más frecuentes las ITUs (8). Para explicar la transformación de cepas comensales fecales de *E. coli* a cepas causantes de ITUs se han desarrollado dos teorías. La teoría de la prevalencia sostiene que las cepas presentes en mayor abundancia en la flora normal intestinal son las que usualmente causan las ITU, mientras que la teoría de la especial patogenicidad apoya la idea de que sólo determinadas cepas con determinados factores de virulencia son capaces de producir estas infecciones extraintestinales. Numerosos estudios han confirmado la validez de la teoría de la especial patogenicidad, ya que se ha comprobado que las cepas causantes de ITUs



presentan una serie de factores de virulencia que les permite invadir, colonizar y dañar el tracto urinario, provocando el cuadro clínico (9–11).

*E. coli* también es responsable de entre el 20%-30% de las bacteriemias de la comunidad y del 20% de las nosocomiales. Estas infecciones se originan principalmente en el tracto urinario y en la cavidad abdominal. Frecuentemente afectan a individuos con enfermedad de base o con enfermedades crónicas de larga evolución. Su pronóstico suele ser mejor que la infección por otros bacilos gramnegativos, con una tasa de mortalidad de entre el 4% y el 18%, que se asocia principalmente a determinados factores de riesgo como la leucopenia, inmunodepresión y la adquisición nosocomial. No obstante, se ha producido un incremento progresivo de la resistencia a antibióticos en las cepas de *E. coli* bacteriémicas en los últimos 10 años, lo cual dificulta el tratamiento de estas infecciones y empeora su pronóstico (12,13).

#### **1.1.4 Factores de virulencia (FV) de ExPEC.**

Las cepas patógenas de *E. coli* poseen diferentes tipos de factores de virulencia (FV) que contribuyen a su patogenicidad. Estos FV pueden estar codificados en el cromosoma bacteriano, donde habitualmente se localizan dentro de PAI o en plásmidos, y se dividen en cinco grupos principales, que incluyen: adhesinas, toxinas, sistemas de adquisición de hierro, factores de resistencia al suero y la fagocitosis y otros factores de virulencia como las protectinas e invasinas.

**Tabla 1.** Factores de virulencia de *E. coli*. Modificada de (14).

Factor de Virulencia	Gen
<b>Adhesinas</b>	
Sideróforo de Adhesión	<i>iha</i>
Adhesinas de unión Dr	<i>afa/draBC</i>
Pilus frecuentes de <i>E. coli</i>	<i>ecpA</i>
Fimbria F1C	<i>foc gene cluster</i>
Hemaglutinina Termoresistente	<i>hra</i>
Fimbria M	<i>bmaE</i>
Fimbria N-acetil D-glucosamino-especifica	<i>gaf</i>
Fimbria P	<i>papACEFG</i>
Fimbria S	<i>sfa/sfaS</i>
Hemaglutinina Termosensible	<i>tsh</i>
Fimbria Tipo 1	<i>fimH</i>
<b>Sistemas de adquisición de Hierro</b>	
Receptor de Aerobactina	<i>iutA</i>
Proteína de adquisición de hierro periplásmica	<i>sitA</i>
Receptor de Salmoquelina	<i>iroN</i>
Receptor de Sideróforo	<i>ireA</i>
Receptor de Yersiniabactina	<i>fyuA</i>
<b>Protectinas e invasinas</b>	
Colicina V	<i>cva</i>
Proteína de exclusión de la superficie de transferencia conjugada	<i>traT</i>
Capsula del grupo 3	<i>kpsMT II</i>
Incremento de supervivencia en suero	<i>iss</i>
Invasión del endotelio cerebral	<i>ibeA</i>
Variantes de capsula del grupo 2 K1/K2/K5	<i>K1/K2/K5 genes</i>
Cápsula del grupo 2 kpsM II	<i>kpsM II</i>
Proteasa T de la membrana externa	<i>ompT</i>
<b>Toxinas</b>	
Alfa-hemolisina	<i>hylD</i>
Toxina citolítica distal	<i>cdtB</i>
Factor de necrosis citotóxico.	<i>cnf1</i>
Toxina enteroagregativa de <i>E. coli</i>	<i>astA</i>
Hemolisina A	<i>hylA</i>
Toxina secretada autotransportada	<i>sat</i>
Serinproteasa	<i>pic</i>
Toxina vacuolizante	<i>vat</i>
<b>Otras</b>	
Beta-glucoronidasa	<i>uidA</i>
Síntesis de colibactina	<i>clb y clbB</i>
Proteína uropatogénica especifica	<i>usp</i>
Variante de flagelina	<i>H7 fliC</i>
Maltose and glucose-specific PTS transporter	<i>malX</i>
Marcador de isla de patogenicidad	<i>malX</i>
D-serina desaminasa	<i>DsdA</i>

### **1.1.5 Diversidad clonal de ExPEC.**

La palabra "clon" se utiliza a menudo para describir un grupo de microorganismos que desciende de una cepa precursora común por reproducción no sexual, con características fenotípicas o genotípicas indistinguibles caracterizadas por un método de tipificación donde se observa que pertenece al mismo grupo (15). Actualmente, la forma más precisa de caracterizar los clones sería la realización de secuenciación completa del genoma, que se aplica cada vez más para estudiar la transmisión de enfermedades infecciosas. No obstante, "*Multilocus Sequence Typing*" (MLST) es un método altamente reproducible que se aplica comúnmente al genotipado de *E. coli*. Como se ha comentado anteriormente, MLST se basa en la amplificación y secuenciación de genes "*housekeeping*" y existen diversos esquemas, siendo el de Atchmann el más utilizado en la actualidad (16). Según la última actualización disponible en el sitio web de este esquema (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>), actualmente existen 600 "*Sequence Type*" (STs) y 54 complejos ST.

### **1.1.6. Resistencia a antibióticos.**

En las últimas décadas hemos asistido a un incremento significativo de la resistencia de *E. coli* a diferentes familias de antimicrobianos de uso clínico (multirresistencia), hecho que complica el tratamiento de las infecciones producidas por este microorganismo. Entre los mecanismos que originan la multirresistencia en *E. coli* destaca la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), que inactivan a la mayoría de los betalactámicos excepto a los carbapenems y, más recientemente, la aparición de carbapenemasas, consideradas en la actualidad uno de los principales problemas de salud pública. Es frecuente que estos aislados muestren resistencia a otras familias de antimicrobianos de amplio uso clínico, como las quinolonas, lo que puede conllevar un retraso en el inicio del tratamiento adecuado y un aumento de la morbimortalidad y de los costes asociados.

### 1.1.7 Betalactamasas de espectro extendido (BLEE).

Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) son enzimas producidas por bacilos gramnegativos fundamentalmente enterobacterias, y con más frecuencia por *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*. La mayoría de las BLEEs se engloban en el subgrupo 2be de la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros. Las BLEE 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 carbapenems (imipenem y ertapenem) (17). Se caracterizan por ser inhibidas por los inhibidores de betalactamasas de clase A (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam). Entre los principales tipos de BLEEs se encuentran TEM, SHV, CTX-M y OXA:

- BLEE tipo TEM: TEM-1 es responsable de más del 90% de la resistencia a ampicilina en *E. coli*. Se encuentra en multitud de especies bacterianas y, junto con SHV-1, es la betalactamasa más frecuentemente descrita en enterobacterias. A partir de una mutación en TEM-1, que no alteraba el perfil de sustrato sino únicamente el punto isoeléctrico de la enzima, surgió TEM-2. Como consecuencia de distintas mutaciones de estas dos enzimas surgieron las betalactamasas con fenotipo BLEE tipo TEM. TEM-3 fue la primera descrita en 1988 con capacidad de hidrolizar cefalosporinas de amplio espectro(18). TEM-24 es una de las enzimas más importantes de esta familia por su frecuencia.
- BLEE tipo SHV: el gen *bla* que codifica SHV-1 se encuentra en el cromosoma de más del 90 % de las cepas de *K. pneumoniae*. Diversas mutaciones en esta enzima han ido conformando una familia muy amplia y diseminada de BLEE. La sustitución de una glicina por serina en la posición 238 fue la mutación que proporcionó a la enzima SHV-2 la capacidad de hidrolizar ceftazidima de forma eficaz. SHV-2 causó el primer brote de microorganismos resistentes a cefalosporinas de tercera generación en España entre 1988 y 1990 (19). SHV-5 y SHV-12 poseen otro cambio que faculta a la enzima para la hidrólisis de cefotaxima. SHV-5 fue identificada en una cepa de *K. pneumoniae* en Chile en

el año 1988 (20) y SHV-12 fue descrita durante la realización de un estudio multicéntrico llevado a cabo en Suiza en 1997 (21). Desde entonces se han diseminado por todo el mundo (22).

- BLEE tipo CTX-M: las BLEE de tipo CTX-M fueron descritas, casi simultáneamente, en Alemania y Argentina en 1989 (23). Actualmente están ampliamente distribuidas a nivel mundial. Aunque las primeras enzimas descritas se caracterizaban por hidrolizar eficientemente cefotaxima, más tarde surgieron otras variantes que aumentaron su capacidad de hidrólisis sobre ceftazidima(24). La familia CTX-M muestra tan sólo un 40% de homología con las betalactamasas de la familia TEM y SHV. Sin embargo, existe una alta homología (mayor del 90%) entre determinados genes del cromosoma de *Kluyvera sp.* y algunos genes *bla<sub>CTX-M</sub>*, por lo que se piensa que estos genes originarios habrían saltado de este cromosoma para integrarse en distintos plásmidos y diseminarse (24). Se han descrito 5 grupos de enzimas CTX-M (**Tabla 2**) y cada uno parece tener diferentes orígenes. El grupo CTX-M-1 parece proceder de la betalactamasa cromosómica 9 de clase A de *Kluyvera ascorbata*, el grupo CTX-M-2 de *K. cryocrescens* y el grupo CTX-M-8 de *K. georgiana*. El origen de las BLEE del grupo CTX-M-9 podría encontrarse en *K. georgiana*, dado que se ha encontrado en un gen en el cromosoma de esta especie que es idéntico al gen *bla<sub>CTXM-14</sub>* (25). Actualmente, 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. 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<sub>CTXM-15</sub>* (26). 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 los años 1996 y 2000 en Barcelona y Murcia (27,28).

**Tabla 2.** Clasificación de las BLEE tipo CTX-M en función de su secuencia aminoacídica y enzimas más representativas de cada uno de los grupos. Modificado de (24)

Grupo	Enzimas integrantes
CTX-M-1	CTX-M-1, -3, -10, -11, -12, -15, -22, -23, -28, -29, -30, -32, -33, -36, -54
CTX-M-2	CTX-M-2, -4, -5, -6, -7, -20, -31, -35, -43, -44
CTX-M-8	CTX-M-8 -40, -63
CTX-M-9	CTX-M-9, -13, -14, 16, -17, -18, -19, -21, -24, -27, -38, -45, -46, -47, -48, -49, -50
CTX-M-25	CTX-M-25, -26, -39, -41.

- BLEE tipo OXA: pertenecen a la clase molecular D y al grupo funcional 2d. Confieren resistencia a penicilinas y cefalosporinas y deben su nombre a que presentan una alta capacidad de hidrólisis de oxacilina y cloxacilina. Su grado de inhibición por ácido clavulánico es variable.
- Otras BLEE: aunque la mayoría de BLEE de aislamientos clínicos pertenecen a las familias TEM, SHV y CTX-M, existen otras BLEE como las de los tipos PER (*Pseudomonas extended resistance*), VEB (*Vietnam Extended-spectrum betalactamase*), CME (*Chryseobacterium meningosepticum* (29)), TLA (*Tlahuicas, tribu india*), SFO (*Serratia fonticola*), BES (*Brasil Extended Spectrum*) y la familia GES/IBC, que son características de regiones concretas y que se agrupan en las clases moleculares A y D.

## **1.2. Bacteriemias por *E. coli*.**

### **1.2.1. Definición de bacteriemia y clasificaciones.**

Se denomina bacteriemia a la presencia de microorganismos viables en el torrente circulatorio detectada mediante hemocultivo(30). Es una de las principales enfermedades infecciosas y una causa importante de morbilidad y mortalidad.

Las bacteriemias pueden clasificarse según el origen de la infección en primarias y secundarias(30).

- En las bacteriemias primarias se incluyen aquellas en las que el foco es endovascular, siendo las más frecuentes la endocarditis y las bacteriemias relacionadas con catéteres vasculares (BRC) y aquellas en las que el origen no es claro bien por ausencia de foco clínico o de muestra microbiológica coincidente en el tiempo con el mismo patógeno que el aislado en sangre (bacteriemias de origen desconocido).
- En las bacteriemias secundarias el origen es una infección focal, en un órgano determinado.

En función del lugar de la adquisición de la bacteriemia se pueden clasificar en nosocomiales, comunitarias y relacionadas con la asistencia sanitaria(31,32)

- Bacteriemias nosocomiales: son aquellas que aparecen tras al menos 48 horas de ingreso hospitalario.
- Bacteriemias comunitarias: son aquellas detectadas en pacientes no ingresados y hasta las primeras 48h del ingreso, considerando que el ingreso es debido a la infección.
- Bacteriemias relacionadas con la asistencia sanitaria (RAS): se engloban dentro de pacientes donde la etiología microbiológica de la infección se clasifica como de origen comunitario, pero proceden de centros sanitarios como residencias de ancianos, centros ambulatorios de hemodiálisis o cirugía mayor ambulatoria por lo que se parece más a la etiología de las infecciones nosocomiales. Esto motivó una reclasificación de las infecciones de origen comunitario en puramente comunitarias y en

infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria. Los criterios propuestos para considerar una bacteriemia como relacionada con la asistencia sanitaria son: ingreso durante más de 48 horas en hospital de agudos o crónicos en los 3 meses previos, residencia en centro socio sanitario, hemodiálisis u otro tipo de diálisis periódica, atención periódica en hospital de día u hospitalización domiciliaria(32).

### **1.2.2. Incidencia de las bacteriemias por *E. coli*.**

La incidencia de bacteriemias por *E. coli* varia dependiendo de las características metodológicas de los diferentes estudios y las particularidades de las poblaciones, oscilando entre 30-60 episodios por 100000 personas-año, normalmente a expensas de pacientes de mayor edad ( $\geq 65$  años) y con un predominio de mujeres (33,34).

En cuanto a la forma de adquisición de las bacteriemias por *E. coli*, se observa un importante predominio comunitario representando aproximadamente la mitad de los casos, seguido en frecuencia por las bacteriemias relacionadas con la asistencia sanitaria (RAS) que están adquiriendo un papel creciente en los últimos años (33–35).

Respecto al foco origen de la bacteriemia, la mayoría de los estudios coinciden en el predominio del foco urinario como origen de la bacteriemia por *E. coli* suponiendo tasas superiores al 50% de los episodios, seguido en frecuencia del foco abdominal (33–36).

### **1.2.3. Factores de riesgo y mortalidad de bacteriemias por *E. coli*.**

La mortalidad asociada a la bacteriemia por *E. coli* oscila entre el 5 y el 30% según los distintos estudios. Esta variabilidad se debe probablemente a diferencias metodológicas(33,34,36,37). También se encuentra una diferencia importante entre los factores de riesgo que condicionan la mortalidad. Así, en la serie de Laupland *et al.*, la mortalidad es del 11%, aumentando el riesgo con la edad, la



resistencia a quinolonas, un foco de origen diferente al urinario y la mayor comorbilidad asociada. Del mismo modo, la adquisición comunitaria y el foco urinario se relacionaron de forma significativa con una menor mortalidad(33). Mora-Rillo *et al.* observaron que la administración de quimioterapia, índice de McCabe-Jackson (últimamente-rapidamente fatal), índice de Pitt (>5) y la presencia del gen de virulencia *fyuA* en la cepa de *E. coli* se asociaron a un aumento de la mortalidad mientras que la presencia de los genes de las fimbrias P tuvo un papel protector(38). Por otro lado, Abernethy *et al.* encontraron una tasa de mortalidad del 18,2% y entre los factores asociados independientemente con la mortalidad encontraron la edad <1 año o > 44 años, el foco de origen respiratorio o desconocido, la resistencia a quinolonas, la adquisición nosocomial y las bacteriemias ocurridas durante el invierno. En cambio, el sexo femenino y las bacteriemias de foco urinario se asociaron con una disminución de la mortalidad (39).

#### **1.2.4. Factores de virulencia asociados a bacteriemias por *E. coli*.**

Los perfiles de factores de virulencia asociados a las cepas de *E. coli* productoras de bacteriemias son altamente variables. Ron determinó que los sistemas de adquisición de hierro son esenciales para las cepas de *E. coli* productoras de bacteriemia que, como se ha comentado anteriormente, incluyen los sideroforos aerobactina o yersiniabactina entre otros y los sistemas de captación de hierro como *IroN* y *SitA*(40,41).

Los mecanismos de resistencia al suero, que evaden la destrucción mediada por el complemento, parece que son también esenciales en cepas de *E. coli* productores de bacteriemia e incluyen componentes capsulares, lipopolisacáridos y genes que codifican proteínas implicadas en la resistencia al suero como *Iss* y *traT*(40,42). En la **Tabla 3** se reflejan otros factores de virulencia específicamente relacionados con *E. coli* productores de bacteriemias.

**Tabla 3.** Factores de virulencia asociados a *E. coli* productores de bacteriemia. Modificado de (43).

<b>Función</b>	<b>Factor de virulencia</b>
<b>Captación de hierro</b>	Aerobactina
	Yersiniabactina
	receptor IroN
	SitABCD
<b>Resistencia al suero</b>	Plásmido ColV
<b>Adhesinas</b>	Pili tipo I
	Pili AC/I
	Pili P
	Adhesinas no fimbriales
	Fimbria larga polar
	Curli
	Tipo IV
<b>Cápsula</b>	K-1
	Tipo IV

#### **1.2.5. Resistencia a antibióticos en cepas de *E. coli* invasivas: datos del informe EARSS 2017.**

La resistencia a antibióticos constituye una de las principales amenazas para la salud pública y para la salud individual de los pacientes en todo el mundo (WHO, 2014). La aparición de cepas de *E. coli* bacteriémicas resistentes a antibióticos continúa incrementándose a nivel europeo, tanto de las multirresistentes como de las resistentes a algún antibiótico. Los informes anuales de *European Antimicrobial Resistance Surveillance System* (EARSS) (<http://www.rivm.nl/earss/about/>) constituyen uno de los documentos más fiables y completos para conocer las tasas de resistencia de las cepas de *E. coli* invasivas en los países participantes de la Unión Europea (UE). En el año 2017 se incluyeron cerca de 112.000 aislamientos de *E. coli* procedentes de 30 países. A continuación, se resumen los principales datos de este último informe referidos España (44) La resistencia aminopenicilinas fue del 62,5%, manteniéndose estable en los últimos 12 años dado que, según los datos de 2005, la resistencia se situaba en torno al 62%. La resistencia a aminoglucósidos fue del 13,8% habiéndose incrementado en los últimos 11 años dado que según los datos de 2005 la resistencia se situaba en torno al 10%. Según los datos de este informe la resistencia a

fluorquinolonas en España fue del 32,5%. A pesar de la tendencia decreciente observada en los últimos años (2014-2017), el incremento de la resistencia a fluoquinolonas en los últimos 11 años ha aumentado ya que en los datos de 2005 la resistencia se situaba en torno al 28%. En España la resistencia a cefalosporinas de tercera generación fue del 13,5%. Se ha observado una tendencia creciente en nuestro país entre los años 2014-2017, y también frente a los datos de 2005 donde se situaba en torno al 8%. La resistencia a carbapenems fue inferior al 0,1% manteniéndose estable durante el periodo 2005-2017 (**Tabla 4**).

**Tabla 4.** Evolución de los porcentajes de resistencia de cepas de *E. coli* invasivas a diferentes familias de antibióticos entre 2005 y 2017 en España. AMI: aminopenicilinas; AMIG: aminoglucósidos; FQ: fluorquinolonas; CEF3ªG: cefalosporinas de tercera generación; CARBA: carbapenems. Modificado de (45).

Grupo antimicrobi	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
AMI	62	64	62	63	65	65	66	65	65	65	64	64	63
AMIG	10	9	10	11	13	14	15	16	15	15	15	15	13
FQ	28	28	30	33	31	33	34	34	35	34	32	33	32
CEF3ªG	8	7	7	9	11	12	12	14	13	12	12	15	13
CARBA	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1

### 1.3. *E. coli* ST131.

A mediados de la década de 2000, los análisis de PFGE de cepas de *E. coli* productoras de BLEEs de tipo CTX-M-15 en el Reino Unido y Canadá identificaron un grupo de pulsotipos con una similitud mayor del 80%, denominado clon A en el Reino Unido y clon 15A en Canadá(46,47). Debido a que estos patrones de PFGE no cumplían los criterios de relación descritos por Tenover *et al.* (48), estas cepas inicialmente no se reconocieron como pertenecientes a un linaje relacionado.

En el año 2008, dos grupos de investigadores internacionales liderados por Nicolas-Chanoine y Coque, simultáneamente, pusieron en evidencia la emergencia intercontinental del grupo clonal O25:H4-ST131 productor de CTX-M-15, tras comprobar que cepas de *E. coli* productoras de CTX-M-15 aisladas de varios continentes presentaban características similares como pertenecer al grupo

filogenético B2, presentar el mismo perfil en ERIC2 PCR, serotipo O25:H4, la resistencia a ciprofloxacino y la secuencia tipo ST131(49,50).

Más recientemente, variantes de ST131 pertenecientes a los serotipos O16:H5 y NT:H4 se han descrito en Europa, Japón y Asia del Sur (51–53). Las cepas de *E. coli* ST131 son predominantemente ExPEC, ya que tienen de 7 a 14 genes de virulencia, presentando de forma característica *fimH*, *sat*, *fyuA*, *usp*, *malX* (42). Debido a su importancia como clon pandémico internacional, en los últimos años, se han publicado infinidad de excelentes revisiones sobre los aspectos microbiológicos, epidemiológicos y clínicos de las infecciones causadas por ST131 siendo el linaje pandémico clonal más estudiado (54–58).

La mayoría de estudios describen cepas ST131 que típicamente producen BLEEs de tipo CTX-M, especialmente CTX-M-15, codificado por plásmidos *blaCTX-M-15* y son generalmente resistentes a fluoroquinolonas, debido a mutaciones cromosómicas del gen *gyrA* y *parC* (50). A pesar de esto, en la actualidad se ha determinado que la resistencia de las cepas ST131 depende de otros factores como el tipo de población, el tipo de adquisición y el foco de la infección. Esta variabilidad se refleja en un estudio realizado en París donde se analizaron muestras fecales de voluntarios sanos y entre los aislamientos de ST131 comprobaron que ninguno expresó BLEE de tipo CTX-M (59). No obstante, una proporción sustancial de las infecciones por ExPEC resistentes a antibióticos a nivel mundial, especialmente cepas resistentes a betalactámicos de espectro extendido y fluoroquinolonas, puede atribuirse a la difusión de este linaje pandémico (15).

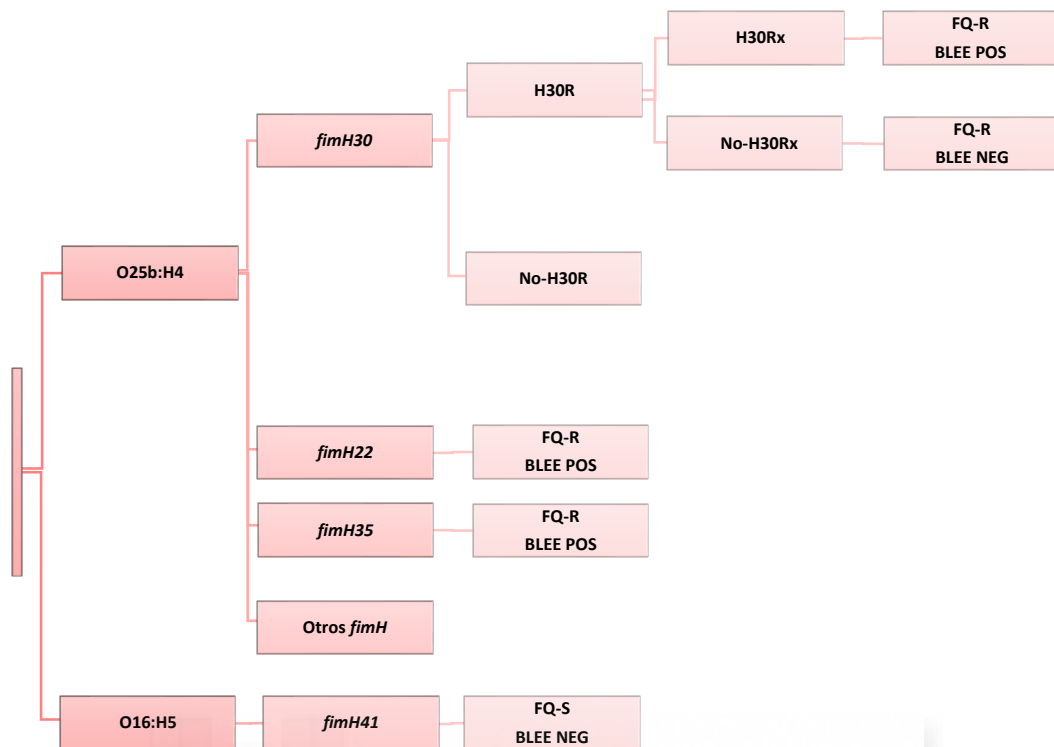
En cuanto al origen de este clon pandémico no se conoce por completo. La cepa más temprana que se ha descrito data de 1985(42). En Francia se detectó en 1994 (60) y un análisis retrospectivo de aislados de *E. coli* productores de BLEEs en Canadá identificó ST131 ya en 2003(47).

Las cepas ST131 se aíslan comúnmente de infecciones comunitarias, pero se desconoce si se originan en la comunidad o se relacionan con la asistencia sanitaria. La mayoría de estudios que han encontrado una alta prevalencia de ST131 entre aislados comunitarios han utilizado muestras de *E. coli* productoras

de BLEE o no han tenido en cuenta el grado de contacto con los servicios sanitarios de los pacientes. Por el contrario, en un estudio de cohortes realizado por Banerjee *et al.*, ST131 se asoció significativamente más con infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria que con infecciones comunitarias (54).

Hasta hace relativamente poco, ST131 se había considerado como una entidad única, no obstante, los últimos estudios de tipificación han permitido la identificación de múltiples subclones ST131 distintos(61,62). El sublinaje más prevalente dentro de ST131 es el denominado *fimH30* porque contiene la variante H30 del gen *fimH* que codifica la adhesina fimbrial tipo 1 (61). El linaje ST131 *fimH30* apareció por primera vez a principios de la década de 2000, y luego se expandió rápidamente a finales de década (62). Price *et al.* en 2013 identificaron dos subclones dentro del linaje ST131 *fimH30*, llamados H30-R y H30-Rx, debido a sus perfiles de resistencia antimicrobiana. El subclon H30-R se caracteriza por mostrar resistencia a fluorquinolonas sin expresar *blaCTX-M-15* y el subclon H30-Rx que muestra resistencia a la fluoroquinolonas y además expresa *blaCTX-M-15* (62).

A finales de los años 2000, varios investigadores observaron que cepas de *E. coli* ST131 con BLEE presentaron diferentes pulsotipos. Algunos de estos aislamientos presentaban *blaCTX-M-14*, eran sensibles a fluoroquinolonas, y, mediante serotipado, se comprobó que pertenecían al serogrupo O16: H5 y al linaje *fimH41* (63). El linaje ST131 O16: H5 *fimH41* comprende del 1 al 5% de las cepas ST131 de *E. coli* y se asocia con resistencia a cotrimoxazol y gentamicina, mientras que la producción de BLEE y la resistencia a las fluoroquinolonas son más raras (64). Dos nuevos linajes de ST131 con el serotipo O25b: H4 que presentan distintos pulsotipos a los del grupo principal *fimH30* se han descrito recientemente(63). Estos aislados pertenecen a los linajes *fimH22* y *fimH35* y también se asocian con *blaCTX-M-15* y resistencia a fluoroquinolonas (**Figura 2**).



**Figura 2.** Estructura poblacional del linaje ST131 *fimH30* de *Escherichia coli*, sublinajes H30 y otros linajes asociados con ST131. FQ-R, resistente a fluoroquinolonas; FQ-S, sensibles a fluoroquinolonas. Modificado de (65)

## 2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO Y OBJETIVOS

### 2.1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.

*Escherichia coli* es parte importante de la flora normal aerobia del intestino humano, pero también el microorganismo que con mayor frecuencia causa infecciones. En los últimos años se ha producido un incremento importante en la resistencia a antibióticos en *E. coli*, siendo una de las causas principales la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEEs), especialmente de la familia CTX-M. Además, estas cepas pueden incluir determinantes de resistencia para otros antibióticos, como quinolonas y aminoglucósidos que complican aún más las opciones de tratamiento. Toda esta situación se agrava por la diseminación a nivel mundial de determinados clones ExPEC con carácter pandémico y asociados frecuentemente a multirresistencia, como es Sequence Type (ST) 131.

Las bacteriemias representan la décima causa principal de mortalidad en los países desarrollados y entre las bacterias gramnegativas, *Escherichia coli* representa la primera causa de bacteriemia con una alta tasa de mortalidad asociada. La incidencia de bacteriemias por *E. coli* está aumentando significativamente, a expensas de la diseminación de linajes pandémicos y multirresistentes como ST131.

Hay pocos trabajos que hayan estudiado las características clínicas, microbiológicas y moleculares de las bacteriemias por *E. coli* ST131 por lo que es de interés conocer la epidemiología y características microbiológicas y clínicas de las bacteriemias en nuestro medio con el fin de mejorar la orientación diagnóstica y terapéutica de esta patología.

## 2.2. OBJETIVOS.

El objetivo principal de nuestro trabajo es estudiar las características epidemiológicas, clínicas y moleculares de *Escherchia coli ST131* productores de bacteriemias en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca durante un año (2013). Este objetivo general comprende una serie de objetivos secundarios:

1. Describir las características epidemiológicas y clínicas de las bacteriemias por *Escherichia coli ST131* y compararlas frente a las de bacteriemias por cepas *No-ST131*.
2. Estudiar la sensibilidad a antibióticos de las cepas de *E. coli ST131* procedentes de bacteriemias.
3. Realizar la caracterización molecular de las Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en estas cepas.
4. Analizar los factores de virulencia en aislados de *E. coli ST131* productores de bacteriemias.



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Diseño del estudio y pacientes

Se realizó de un estudio descriptivo de tipo transversal de pacientes con bacteriemia por *Escherichia coli* atendidos en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia durante un periodo de un año (enero-diciembre de 2013).

#### 3.2. Criterios de inclusión/exclusión

Se incluyeron aquellos pacientes con edad  $\geq 12$  años que presentaron al menos un episodio de bacteriemia entre el 1 de enero el 31 de diciembre de 2013 y de los que se conservaba el aislamiento en el cepario del Servicio de Microbiología del HCUVA. Se excluyeron del estudio aquellos pacientes cuya historia clínica estaba incompleta y los pacientes derivados a otros hospitales. Se excluyeron los episodios si este ocurrió en los 30 días posteriores a un episodio previo al considerarse reinfección o continuación del episodio anterior.

#### 3.3. Tamaño muestral y grupos a comparar.

Tras la realización de una búsqueda bibliográfica exhaustiva, no se encontraron datos suficientes que permitieran estimar de forma apropiada el tamaño muestral requerido para corroborar o descartar la hipótesis de trabajo. Por lo tanto, se eligió una muestra correspondiente a los pacientes con bacteriemias por *E. coli* en 1 año. El estudio debe ser considerado exploratorio.

Durante el periodo del estudio, comprendido desde el 1 de enero hasta el 31 de diciembre de 2013, se identificaron en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca 200 episodios de bacteriemia por *E. coli* (BEC) en pacientes adultos. De estos, tan solo estuvieron disponibles 168 cepas de *E. coli* procedentes de 168 episodios de bacteriemia. La detección del clon ST131 mediante el método de PCR de Doumith *et. al* reveló 18 (10,7%) episodios bacteriemias por *E. coli* ST131 (BEC-ST131) y 150 episodios de bacteriemias por *E. coli* No-ST131 (BEC-NOST131).

### **3.4. Variables y definiciones.**

Se recogieron diferentes variables clínicas como edad y sexo del paciente, tipo de adquisición de la bacteriemia (comunitaria, relacionada con la asistencia sanitaria (RAS), nosocomial o vertical), foco de origen de la infección (urinario, respiratorio, abdominal, piel y partes blandas, relacionada con catéter, neonatal o desconocido), servicio de procedencia del hemocultivo, factores de riesgo (diabetes mellitus, cardiopatía previa, enfermedad pulmonar crónica, insuficiencia renal crónica, hepatopatía, sonda urinaria, traqueotomía/ventilación mecánica, sonda nasogástrica, antibioterapia previa), comorbilidades asociadas, desarrollo de shock séptico y mortalidad asociada al cuadro clínico.

Se consideró la adquisición de la bacteriemia como nosocomial si el primer hemocultivo positivo se obtuvo pasadas 48 horas desde el ingreso hospitalario y no existía evidencia clínica de infección al ingreso. La bacteriemia se consideró de adquisición comunitaria si el primer hemocultivo positivo se obtuvo en las primeras 48 horas del ingreso o si existía evidencia de infección por *Escherichia coli* en el momento del ingreso. Bacteriemia relacionada con la asistencia sanitaria (RAS) se definió como aquel paciente que había sido dado de alta del hospital en los 30 días anteriores, aquellos que se encontraban institucionalizados en centros sociosanitarios, aquellos con contacto continuo ambulatorio con el centro hospitalario como ocurre con los pacientes oncohematológicos que habían acudido al Hospital de día o los pacientes en programa de hemodiálisis ambulatoria. La clasificación según el foco o el origen primario de bacteriemia se ajustó a lo definido por "The Centers for Disease Control and Prevention". Se consideró que había una infección focal como causa primaria de bacteriemia cuando los síntomas y signos a este nivel o el aislamiento en esta localización eran anteriores al comienzo de la bacteriemia. Cuando la bacteriemia no se asociaba a ningún foco primario y precedía a éste en su aparición, se consideró como de foco desconocido.

### **3.5. Métodos microbiológicos y moleculares**

#### **3.5.1. Procesamiento de hemocultivos y sensibilidad antibiótica.**

Los hemocultivos se procesaron con el sistema automático de monitorización continua BacT/Alert (bioMérieux® La Balme Les Grottes, France) siguiendo los protocolos del Servicio de Microbiología. La identificación definitiva se realizó mediante el sistema automatizado Vitek2 (bioMérieux®) con las tarjetas GN (Gram Negativos). Para estudiar la sensibilidad antibiótica se utilizó la tarjeta AST-243 del sistema semiautomatizado Vitek 2® (Biomerieux). La interpretación de los resultados se realizó siguiendo las recomendaciones del “Clinical Laboratory Standards Institute” 2013 (CLSI, 2013). Las BLEEs se investigaron fenotípicamente mediante el método de sinergia con doble disco basado en el efecto inhibitorio del ácido clavulánico de acuerdo con el CLSI (66).

#### **3.5.2. Métodos moleculares**

Para realizar el estudio molecular, las cepas se recuperaron del cepario del Servicio de Microbiología. Tras su descongelación, se realizó una siembra en medio agar Müller-Hinton 2 (bioMérieux, La Balme Les Grottes, France) y las placas se incubaron en atmósfera aerobia a 37°C durante 24 h. Una vez crecidas se comprobó la pureza del crecimiento para realizar las diferentes técnicas moleculares. Se realizó la extracción del ADN total en todos los aislamientos disponibles para el estudio molecular a partir de una resiembra de las colonias puras en el medio de cultivo sólido agar Mueller-Hinton (Biomerieux®, *La Balme Les Grottes, France*) según el siguiente protocolo basado en la centrifugación y en un proceso de choque térmico:

- Se resuspendieron de 3 a 4 colonias en 100 µl de agua destilada estéril.
- A continuación, se calentó durante 15 min a 95°C.
- Inmediatamente, se enfrió en hielo durante 10 min.
- Se centrifugó a 15000 rpm durante 30 segundos, se recogió el sobrenadante con el ADN.

En todas las técnicas de PCR utilizadas, los productos de amplificación se separaron y detectaron mediante electroforesis convencional en geles de agarosa

al 1.5 % en TBE 0.5x. Se utilizó SYBR® Green (Invitrogen) como agente intercalante fluorescente en el momento de fusión de la agarosa. Como marcador del peso molecular se utilizó PCR Marker® (100-1000 pb) de Sigma-Aldrich. La visualización de los amplificados se realizó en un transiluminador de luz ultravioleta.

### 3.5.3. Tipificación molecular mediante PCR de los ST 69, 73, 95 y 131.

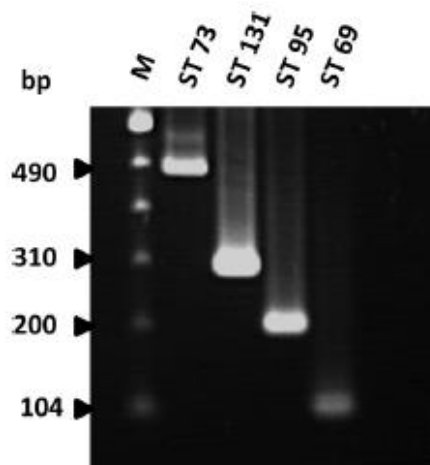
Se realizó una PCR para determinar los *Sequence Type* (STs) 131 según el protocolo descrito por Doumith *et al.* (67). Las secuencias de los iniciadores utilizados se muestran en la **Tabla 5** y la amplificación se realizó con las siguientes condiciones: 1 ciclo de 3 minutos a 94°C, 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C; 30 segundos a 72°C, y 1 ciclo de 5 minutos a 72°C

**Tabla 5.** Iniciadores utilizados en la caracterización molecular de los STs 69,73, 95 y 131(67).

Gen	Iniciadores	Secuencia (5`-3`)	Tamaño fragmento (pb)
ST73	ST73.f	TGGTTTTACCATTTTGTCCGA	490
	ST73.r	GGAAATCGTTGATGTTGGCT	
ST131	ST131.f	GACTGCATTTTCGTCGCCATA	310
	ST131.r	CCGGCGGCATCATAATGAAA	
ST95	ST95.f	ACTAATCAGGATGGCGAGAC	200
	ST95.r	ATCACGCCCATTAATCCAGT	
ST69	ST69.f	ATCTGGAGGCAACAAGCATA	104
	ST69.r	AGAGAAAGGGCGTTCAGAAT	

El tamaño del amplificado permitió determinar el ST, tal y como se muestra en la **Figura 3**.

**Figura 3:** Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de ADN generados en la PCR multiplex que detecta los 4 principales STs de *E. coli*. Extraído de (67).



#### 3.5.4. Caracterización molecular de las betalactamasas de espectro extendido (BLEEs).

Se realizó la caracterización genotípica de las BLEE que se habían detectado fenotípicamente. Se analizaron los tipos SHV, CTX-M, y TEM mediante amplificación por PCR de los genes *blaSHV*, *blaCTX-M* y *blaTEM* utilizando iniciadores específicos que se muestran en la **Tabla 6**. En cada PCR realizada, se incluyeron controles positivos (extraídos de cepas previamente caracterizadas) y controles negativos (agua libre de nucleasas). Las condiciones de PCR para la detección de cada tipo de BLEE fueron las siguientes:

- PCR1 (*blaSHV*, *blaCTX-M*): 1 ciclo de 5 minutos a 95°C, 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 52°C y 1 minuto a 72°C, y una extensión final de 5 minutos a 72°C.
- PCR2 (*blaTEM*): 1 ciclo de 5 minutos a 95°C, 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 49°C y 1 minuto a 72°C, y una extensión final de 5 minutos a 72°C.

**Tabla 6.** Iniciadores utilizados en la caracterización molecular de las BLEEs.

Gen	Iniciadores	Secuencia (5'-3')	Tamaño fragmento (pb)
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	TEM.f	ATGAGTATTCAACATTTCCGTG	931
	TEM.r	TTACCAATGCTTAATCAGTGAG	
<i>bla<sub>SHV</sub></i>	SHV.f	ATGCGTTATATTCGCCTGTG	868
	SHV.r	TTAGCGGTTGCCAGTGCTC	
<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	CTXM.f	GCGATGTGCAGCACCCAGTAA	909
	CTXM.r	CCGCAATATGATTGGTGGTG	

Para determinar el tipo específico de cada BLEE amplificada, se realizó la purificación de los amplicones mediante un método enzimático utilizando enzimas hidrolíticas, una exonucleasa y fosfatasa alcalina (ExoSAP-IT® Clean up, USB Corporation, Ohio, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante y se secuenciaron mediante electroforesis capilar y terminadores fluorescentes BigDye™ de Applied Biosystems según el método de Sanger, en un laboratorio externo (Sistemas Genómicos®, Valencia).

La visualización e interpretación de las secuencias obtenidas se realizó con el software Chromas Lite v.2.01. La herramienta informática BLAST disponible en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> se utilizó para comparar dichas secuencias con las depositadas en la base de datos <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez> (“NCBI, Nacional Center for Biotechnology”).

### 3.5.5. Detección de genes de virulencia.

Se estudiaron 6 genes de virulencia: *afa/dra BC* (adhesinas de la familia Dr), *iutA* (aerobactina), *KpsMT-II* (síntesis de la cápsula del grupo II), *papA* (que codifica para la subunidad estructural de la fimbria P), *papC* (montaje de fimbria P) y *sfa/foc DE* (región consenso de la fimbria S y F1C). La detección de estos genes de virulencia se realizó mediante 2 reacciones de amplificación múltiple según el protocolo previamente descrito por Johnson y Stell (68). Para la amplificación de estos genes se utilizaron los iniciadores que figuran en la **Tabla 7**.

**Tabla 7.** Iniciadores utilizados para la amplificación de los genes que codifican diferentes factores de virulencia(68).

Gen	Iniciadores	Secuencia (5`-3`)	Tamaño fragmento (pb)
<i>afa/dra</i>	<i>afa/dra BC.f</i>	GGCAGAGGGCCGGCAACAGGC	594
	<i>afa/dra BC.r</i>	CCCGTAACGCGCCAGCATCTC	
<i>iutA</i>	<i>iutA.f</i>	GGCTGGACATCATGGAACTGG	302
	<i>iutA.r</i>	CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	
<i>KpsMT-II</i>	<i>Kps MT II.f</i>	GCGCATTGCTGATACTGTTG	272
	<i>Kps MT II.r</i>	CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	
<i>papA</i>	<i>papA.f</i>	ATGGCAGTGGTGTCTTTGGTG	717
	<i>papA.r</i>	CGTCCCACCATACGTGCTTC	
<i>papC</i>	<i>papC.f</i>	GTGGCAGTATGAGTAATGACCGTTA	205
	<i>papC.r</i>	ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	
<i>sfa/foc</i>	<i>sfa/foc.f</i>	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC	410
	<i>sfa/foc.r</i>	CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	

Se realizaron dos reacciones de amplificación: la primera reacción contenía los iniciadores correspondientes a los genes *afa/dra*, *sfa/foc* y *papC*, (PCRFV1) mientras que la segunda contenía los iniciadores de los genes *iutA*, *papA* y *KpsMT-II* (PCRFV2). En los dos casos, la amplificación se realizó con las las mismas condiciones: 1 ciclo de 12 minutos a 95°C, 25 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 63°C; extensión 3 minutos a 68°C, y finalmente 1 ciclo de 10 minutos a 72°C.

### 3.6. Análisis Estadístico

Se realizó un estudio descriptivo en el que las variables cuantitativas se describieron como medias±desviaciones típicas y las cualitativas como frecuencias y porcentajes. Esto se hizo tanto para la población general como por grupos de estudio. El estudio de la relación o asociación de las variables cualitativas se realizó mediante la prueba de Chi-cuadrado de Pearson aplicando la corrección de Yates en los casos necesarios y complementado con un análisis de residuos para

determinar el sentido de la dependencia. Se consideró estadísticamente significativo un valor de " $p$ " inferior a 0,05. El análisis estadístico se realizó con el programa " Statistical Package For The Social Sciences" (v.19.0 SPSS S.L. Madrid).

### **3.7. Limitaciones del estudio**

La principal limitación del estudio fue el bajo tamaño muestral del grupo problema (pacientes con BEC-ST131) dado que el estudio se realizó sobre las BEC que se sucedieron durante el periodo de un año sin reclutar un tamaño concreto de personas para cada uno de los dos grupos. Esta limitación ha podido dificultar encontrar relaciones y generalizaciones significativas a partir de los datos, ya que las pruebas estadísticas normalmente requieren un tamaño de muestra más grande para asegurar una distribución representativa de la población y ser considerados representativos de los grupos estudiados.

## **4. PLAN DE TRABAJO**

### **4.1. Etapas de desarrollo del proyecto**

1ª Fase (2015-2016): Se realizará la revisión de las características clínico-epidemiológicas de todos aquellos pacientes con bacteriemias por *E. coli* en el año 2013 mediante la revisión de las historias clínicas.

2ª Fase (2016-2018): Se descongelarán las cepas de los episodios de bacteriemia previamente revisados del cepario del servicio de microbiología y se determinará la sensibilidad antibiótica. Posteriormente se extraerá el ADN de las cepas para la realización de técnicas moleculares. Las técnicas moleculares (realizadas mediante PCR específicas) se realizarán en el siguiente orden:

- Detección del clon ST131 y otros clones.
- Caracterización de las BLEEs en aquellas cepas que expresen fenotípicamente su presencia.
- Detección/caracterización de factores de virulencia.

3ª Fase (2018-2019): con los datos recogidos de, se procederá a hacer el análisis estadístico para obtener los resultados y las conclusiones pertinentes.



## 5. ASPECTOS ÉTICOS

En la base de datos cada sujeto fue identificado por el número de historia, no registrándose ninguna otra información personal que pudiese permitir la identificación de las personas. El presente proyecto respetó los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial y en el Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y la biomedicina. El manejo de muestras biológicas siguió lo dispuesto en la ley 14/2007, de 3 de julio, de investigación biomédica. La recogida, gestión y publicación de los datos se realizó según las provisiones de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos Personales. El proyecto cumpló los requisitos éticos de la investigación biomédica en seres humanos y se ha presentado a evaluación por la Comisión de Bioética del Servicio Murciano de Salud (Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca) y de la Universidad de Murcia.

## 6. PRESUPUESTO

Material fungible (25.000€)

- o Reactivos PCR (Taq polimerasa, DNTPs, primers) para las distintas técnicas de PCR que se realizan, así como materiales complementarios para la realización de geles de agarosa para la electroforesis y kits de extracción
- o Secuenciación de algunos extraídos en laboratorio externo para su interpretación.
- o Medios de cultivo, asas de siembra, Tarjetas de identificación y sensibilidad antimicrobiana.
- o Material de oficina

Viajes y desplazamientos (3.000 €): Asistencia a congresos.

TOTAL: 28.000 €

## 7. RESULTADOS

Con respecto a la distribución por sexos en el caso de BEC-ST131 se observó un discreto predominio de hombres frente a mujeres (56% vs 44%). Destacó la elevada proporción de enfermedad pulmonar crónica en este grupo frente a BEC-NOST131 (22,2% vs 15,2%), así como la baja presencia de comorbilidades como cardiopatía previa (16,7% vs 26,9%) y, especialmente, diabetes mellitus en la que se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas frente a BEC-NOST131 (5,6% BEC-ST131 vs 29,7% BEC-NOST131; *p-valor*=0,031) (**Tabla 8**).

Entre los dispositivos como factores de riesgo de BEC-ST131 un 11,1% de los pacientes eran portadores de sondaje urinario y el 5,6% de los pacientes estaban sometidos a ventilación mecánica/traqueostomía. La tasa de exposición previa a antibióticos fue superior a la de BEC-NOST131 con un 38,9% mientras que el porcentaje de pacientes que desarrollaron shock séptico y/o fallecieron fue del 22,2% en ambos casos siendo también superiores a las tasas de BEC-NOST131. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en cuanto a dispositivos, gravedad o mortalidad (**Tabla 8**).

**Tabla 8.** Distribución por edad, sexo, comorbilidades, dispositivos, antibioterapia previa, gravedad y mortalidad en pacientes con episodio de BEC-ST131 y BEC-NOST131.

N (%)	BEC (N=168)	BEC-ST131 (N=18)	BEC-NOST131 (N=150)	P valor
EDAD	64±23,3 (13-94A)	64±23,9 (13A-89A)	63±23,9 (14-94A)	
SEXO				0,563
Hombres	81 (48%)	10 (56%)	71 (47%)	
Mujeres	87 (52%)	8 (44%)	79 (53%)	
COMORBILIDADES				
Diabetes mellitus	44 (26,1%)	1 (5,6%)	43 (28,7%)	0,031
Cardiopatía previa	42 (25,0%)	3 (16,7%)	39 (26,0%)	0,357
Enfermedad pulmonar crónica	26 (15,5%)	4 (22,2%)	22 (14,7%)	0,433
Insuficiencia renal crónica	28 (16,7%)	3 (16,7%)	25 (16,7%)	0,961
Hepatopatía	11 (6,6%)	1 (5,6%)	10 (6,7%)	0,836
Neoplasia	41 (24,4%)	5 (27,8%)	36 (24,0%)	0,823
DISPOSITIVOS				
Sondaje urinario	30 (17,9%)	2 (11,1%)	28 (18,7%)	0,429
Ventilación mecánica/traqueotomía	11 (6,5%)	1 (5,6%)	10 (6,7%)	0,862
Sonda nasogástrica	6 (3,6%)	0 (0%)	6 (4,0%)	0,389
ATB previa	55 (32,7%)	7 (38,9%)	48 (32,0%)	0,556
Shock séptico	30 (17,9%)	4 (22,2%)	26 (17,3%)	0,599
Exitus	22 (13,1%)	4 (22,2%)	18 (12,0%)	0,220

Se produjeron un 33,3% de bacteriemias de origen comunitario, nosocomiales y RAS respectivamente siendo comparativamente inferior la tasa de infecciones comunitarias frente a BEC-NOST131 y superiores los porcentajes de infecciones nosocomiales y RAS en BEC-ST131, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (**Tabla 9**). En BEC-ST131 la mitad de los episodios fue de origen urinario, siendo el foco desconocido la segunda causa (22,2%). No se encontraron diferencias significativas en cuanto al foco de origen de la bacteriemia (**Tabla 9**).

**Tabla 9.** Tipo de adquisición y foco de infección de BEC-ST131 y BEC-NOST131 en episodios de población adulta.

N (%)	BEC (N=168)	BEC-ST131 (N=18)	BEC-NOST131 (N=150)	p valor
<b>PROCEDENCIA</b>				0,131
<b>COMUNITARIA</b>	94 (56,0%)	6 (33,3%)	88 (58,7%)	
<b>NOSOCOMIAL</b>	36 (21,4%)	6 (33,3%)	30 (20,0%)	
<b>RAS</b>	38 (22,6%)	6 (33,3%)	32 (21,3%)	
<b>FOCO DE INFECCIÓN</b>				0,105
<b>Urinario</b>	97 (57,7%)	9 (50,0%)	88 (55,5%)	
<b>Desconocido</b>	19 (11,3%)	4 (22,2%)	15 (12,3%)	
<b>Respiratorio</b>	12 (7,1%)	2 (11,1%)	10 (6,9%)	
<b>Abdominal</b>	47 (28,0%)	2 (11,1%)	45 (30,1%)	
<b>Partes blandas</b>	2 (1,2%)	0 (0%)	2 (1,3%)	
<b>BRC</b>	1 (0,6%)	1 (5,6%)	0 (0%)	

Las resistencias antibióticas de cepas ST131 y No-ST131 se reflejan en la **Tabla 10**. En cepas ST131 las resistencias fueron superiores a las cepas No-ST131, observándose diferencias estadísticamente significativas para todos los antibióticos analizados a excepción de piperacilina-tazobactam ( $p$ -valor=0,522), dado que todas las cepas de ST131 fueron sensibles y a cotrimoxazol ( $p$ -valor=0,113). Entre las resistencias observadas destacan un 82,4% ( $p$ -valor=0,016) de resistencia a ampicilina, un 72,2% ( $p$ -valor=0,003) de resistencia a amoxicilina-clavulánico y un 38,8% ( $p$ -valor $\leq$  0,001) de resistencia a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación. La resistencia a ciprofloxacino ( $p$ -valor=0,000) se elevó al 83,3% de los aislamientos ST131 mientras que a gentamicina fue del 29,4% ( $p$ -valor=0,024).

**Tabla 10.** Porcentajes de resistencia a diferentes antibióticos en cepas ST131 y No-ST131.

<i>E. coli</i>				
RESISTENCIA N (%)	(N=168)	ST131 (N=18)	No-ST131 (N=150)	p valor
Ampicilina	108 (64,3%)	15 (83,3%)	93 (62%)	0,016
Amoxicilina-clavulánico	70 (41,7%)	13 (72,2%)	57 (38,0%)	0,003
Piperacilina-tazobactam	15 (8,9%)	0	15 (10%)	0,522
Cefotaxima	22 (13,1%)	7 (38,9%)	15 (10%)	0,001
Cefepime	18 (10,7%)	7 (38,9%)	11 (7,3%)	$\leq$ 0,001
Ciprofloxacino	67 (39,9%)	15 (83,3%)	52 (34,7%)	$\leq$ 0,001
Gentamicina	17 (10,1%)	5 (27,8%)	12 (8%)	0,024
Cotrimoxazol	58 (34,5%)	9 (55,6%)	49 (32,7%)	0,113

En cuanto a la relación entre el clon ST131 y el tipo de BLEE, todas las cepas expresaron enzimas del tipo CTX- M, de las cuales el 85,7% (6/7) fueron del tipo CTX-M-15 y el 14,3% (1/7) fue CTX-M-14.

La tasa de ExPEC en cepas ST131 fue del 72,2%, porcentaje similar en cepas No-ST131 (69,3%;  $p$ -valor=0,814). En cuanto al papel de los genes de virulencia, se observaron mayores porcentajes con respecto a cepas No-ST131 de cepas portadoras de los genes *iutA*, *kpsMTII* y *afa/dra* siendo en este último las diferencias encontradas estadísticamente significativas ( $p$ -valor $\leq$ 0,001). Sin embargo, se observaron menores tasas frente a cepas No-ST131 para los genes *papC*, *papA* y *sfa/foc*, encontrándose para el gen *sfa/foc* diferencias estadísticamente significativas ( $p$ -valor=0,040) (Tabla 11).

**Tabla 11.** Distribución de ExPEC y genes de virulencia en cepas BEC-ST131 y BEC-NoST131.

FV N(%)	BEC (N=168)	BEC-ST131 (N=18)	BEC-NOST131 (N=150)	$p$ -valor
ExPEC	117 (69,4%)	13 (72,2%)	104 (69,3%)	0,814
<i>papA</i>	80 (47,6%)	5 (27,8%)	75 (50,0%)	0,079
<i>papC</i>	93 (55,4%)	7 (38,9%)	86 (57,3%)	0,145
<i>iutA</i>	120 (71,4%)	16 (88,9%)	104 (69,3%)	0,085
<i>kpsMTII</i>	91 (54,2%)	12 (66,7%)	79 (52,7%)	0,270
<i>sfa/foc</i>	43 (25,6%)	1 (5,6%)	42 (28%)	0,040
<i>afa/dra</i>	11 (6,6%)	5 (27,8%)	6 (4%)	$\leq$ 0,001

## 8. DISCUSIÓN

El 10,7% de los episodios en adultos fueron producidos por BECST131. La edad de los pacientes con episodio de BECST131 fue similar a la de su grupo comparativo correspondiente. En cuanto al sexo se observó un predominio de mujeres frente a hombres en BEC-NOST131 mientras que se observó un discreto predominio de varones frente a mujeres en BECST131. Day *et al.* encontraron una asociación entre el sexo del paciente y el ST, específicamente, y en comparación con ST131 y "otros" STs relacionándose significativamente en varones. Por el contrario, no encontraron diferencias entre la edad de los pacientes y los ST como sucedió en nuestro caso(69).

Existen pocos estudios que han analizado los factores de riesgo relacionados con las bacteriemias por los STs de *E. coli* más prevalentes y la mayoría de ellos se centran en cepas ST131 productoras de BLEE, encontrando pocos factores de riesgo significativos(70–73). En nuestro estudio no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las comorbilidades, dispositivos, administración previa de antimicrobianos ni mayor mortalidad en pacientes con BECST131, a excepción de la baja presencia diabetes mellitus ( $p\text{-valor}=0,031$ ). No se han encontrado las razones que pueden indicar que pacientes con diabetes mellitus aparezcan como factores protectores de BECST131, por lo que pensamos que el bajo número de casos en este subgrupo haya producido un sesgo estadístico, aunque solo podrá confirmarse aumentando el tamaño muestral en posteriores estudios.

En cuanto al tipo de adquisición de la BEC, en líneas generales BEC-NOST131 se asociaron a la adquisición comunitaria mientras que las BECST131 estuvieron asociadas a bacteriemias nosocomiales y RAS. La asociación entre BEC-NOST131 con la adquisición comunitaria ha sido encontrada previamente en otros estudios donde se analizaron cepas ExPEC en todo tipo de infecciones. En estas mismas series y en otras se han encontrado evidencias del carácter nosocomial y RAS de los aislamientos del linaje ST131 (69,74,75).

En cuanto a la relación entre cepas del clon ST131 y la resistencia a antimicrobianos, multitud de estudios han puesto de manifiesto la relación de este linaje en infecciones por ExPEC resistentes a antibióticos a nivel mundial, especialmente cepas resistentes a betalactámicos de amplio espectro y fluoroquinolonas(15,54,55,57,58). Day *et al.* encontraron elevados porcentajes de resistencia a cefalosporinas, fluorquinolonas y aminoglucósidos en aislados del complejo ST131(69) y Horner *et al.* observaron que los aislados ST131 fueron los más asociados con la presencia de BLEE y resistencia a múltiples antibióticos, tanto en cepas productoras de BLEE como no productoras de BLEE (75).

En nuestro estudio también se objetivó el alarmante carácter multirresistente de las cepas ST131, dado que se observaron resistencias superiores a cepas No-ST131 para todos los antibióticos analizados a excepción de piperacilina-tazobactam dado que todas las cepas de ST131 fueron sensibles. Entre las resistencias destacan un 82,4% de resistencia a ampicilina, un 72,2% de resistencia a amoxicilina-clavulánico y un 38,8% de resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación que correspondería a la proporción de cepas BLEE encontradas en este grupo pandémico. La resistencia a ciprofloxacino se presentó en el 83,3% y a gentamicina en el 29,4% de los aislamientos ST131.

Típicamente, el clon pandémico ST131 se ha asociado con enzimas de la familia CTX-M, especialmente del tipo CTX-M-15 en multitud de estudios internacionales (15,54,55,57,58). En nuestro estudio se observan datos similares dado que todas las cepas pertenecientes al clon ST131 expresaron enzimas del tipo CTX-M, de las cuales el 85,7% fueron del tipo CTX-M-15. El 14,3% restante fue CTX-M-14.

En nuestro estudio, en el linaje ST131 se encontraron mayores tasas de ExPEC frente a su grupo comparativo suponiendo las tasas de ExPEC un 72,2% de los aislamientos. Observamos porcentajes inferiores a los obtenidos en trabajos como los de Karfunkel *et al.* y Merino *et al.*, donde el 100% de los aislados ST131 de bacteriemias obtuvieron el estatus ExPEC (76,77).

Por último, en cepas del grupo clonal ST131 se observaron mayores porcentajes con respecto a cepas No-ST131 en *iutA*, *kpsMTII* y *afa/dra*. Sin embargo, se observaron menores tasas para los genes *papC*, *papA* y *sfa/foc* frente a cepas No-ST131. La prevalencia de los factores *iutA*, *kpsMTII* y *afa/dra* ha sido demostrada en otros estudios previamente, así como la baja frecuencia de los genes *papA* y *sfa/foc* (76,78–80). En estudios previos otros genes prevalentes en el linaje ST131 no incluidos en nuestro estudio fueron: *fimH*, F10, *sat*, *iucD*, *traT*, *malX* y *usp* (76,78–80).

## 9. CONCLUSIONES

1. Se observó un mayor porcentaje de los tipos de adquisición nosocomial y RAS de bacteriemias por *E. coli* ST131 respecto a NO-ST131 con predominio urinario en pacientes de edad avanzada y elevada comorbilidad. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a los factores de riesgo a excepción de pacientes con diabetes mellitus donde se observó una menor tasa de bacteriemias por ST131.
2. Las resistencias en cepas ST131 fueron superiores a las cepas NO-ST131, observándose diferencias estadísticamente significativas para la mayoría antibióticos analizados destacando un 72,2% (p-valor=0,003) de resistencia a amoxicilina-clavulánico, un 38,8% (p-valor≤ 0,001) de resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación y un 83,3% de resistencia a ciprofloxacino (p-valor=0,000).
3. El 38,9% de las cepas de *E. coli* ST131 fueron productoras de BLEE, mientras que en cepas No-ST131 porcentaje de BLEE fue del 7,3%. Todas las cepas ST131 expresaron enzimas del tipo CTX- M, de las cuales el 85,7% fueron del tipo CTX-M-15 y el 14,3% fue CTX-M-14.
4. La tasa de ExPEC en cepas ST131 fue del 72,2%, siendo similar a cepas No-ST131. El gen más prevalente fue *iutA*. Se observaron mayores porcentajes



de cepas portadoras de los genes *iutA*, *kpsMTII* y *afa/dra* con respecto a cepas No-ST131 y menores porcentajes para los genes *papC*, *papA* y *sfa/foc*, siendo en el caso de *afa/dra* y *sfa/foc* estadísticamente significativos

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Escherich T. The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant. 1885. Rev Infect Dis 1989 Mar-Apr; 11(2):352–6.
2. Castellani A, Chalmers A. Manual of Tropical Medicine. 3ª ed. Londres: Baillière, Tindall and Cox; 1919.
3. Bennet JE, Dolin R, Blaser MJ, Mandell GL, Bennett JE, editores. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 8ª ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2016.
4. Yan F, Polk DB. Commensal bacteria in the gut: learning who our friends are. Curr Opin Gastroenterol. 2004 Nov;20(6):565–71.
5. Kruis W, Fric P, Pokrotnieks J, Lukás M, Fixa B, Kascák M, et al. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. Gut. 2004 Nov;53(11):1617–23.
6. Johnson JR, Russo TA. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: “the other bad *E. coli*”. J Lab Clin Med. 2002 Mar;139(3):155–62.
7. Russo TA, Johnson JR. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. J Infect Dis. 2000 May;181(5):1753–4.
8. Vila J, Sáez-López E, Johnson JR, Römling U, Dobrindt U, Cantón R, et al. *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. Gerdes K, editor. FEMS Microbiol Rev. 2016 Jul 1;40(4):437–63.
9. Korhonen TK, Valtonen M V, Parkkinen J, Väisänen-Rhen V, Finne J, Orskov F, et al. Serotypes, hemolysin production, and receptor recognition of *Escherichia coli* strains associated with neonatal sepsis and meningitis. Infect Immun. 1985 May;48(2):486–91.
10. Blanco J, Alonso MP, Blanco M, González EA. [Pathogenetic mechanisms of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections]. Enferm Infecc Microbiol Clin. 1991 Dec;9(10):640–51.
11. Blanco M, Blanco JE, Alonso MP, Blanco J. Virulence factors and O groups of

- Escherichia coli* isolates from patients with acute pyelonephritis, cystitis and asymptomatic bacteriuria. Eur J Epidemiol. 1996 Apr;12(2):191–8.
12. Javaloyas M, García-Somoza D, Gudiol F. [Bacteremia due to *Escherichia coli*: epidemiological analysis and sensitivity to antibiotics in a county hospital]. Med Clin (Barc). 2003 Feb 8;120(4):125–7.
  13. Chen X, Zou Q, Zhang W, Wang R, Yu F, Chen Y. Clinical features and microbiological characteristics of hospital- and community-onset *Escherichia coli* bloodstream infection. J Med Microbiol. 2019 Feb 1;68(2):178–87.
  14. Dale AP, Woodford N. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): Disease, carriage and clones. J Infect. 2015 Dec;71(6):615–26.
  15. Riley LW. Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Infect. 2014 May;20(5):380–90.
  16. Clermont O, Gordon D, Denamur E. Guide to the various phylogenetic classification schemes for *Escherichia coli* and the correspondence among schemes. Microbiology. 2015 May 1;161(Pt 5):980–8.
  17. Eichenberger EM, Thaden JT. Epidemiology and Mechanisms of Resistance of Extensively Drug Resistant Gram-Negative Bacteria. Antibiotics. 2019 Apr 6;8(2):37.
  18. Sougakoff W, Goussard S, Gerbaud G, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicillinase genes. Rev Infect Dis. 10(4):879–84.
  19. Fernández-Rodríguez A, Reguera JA, Pérez-Díaz JC, Picazo JJ, Baquero F. [1st Spanish epidemic of plasmid resistance to 3d generation cephalosporins: the implication of SHV-2]. Enferm Infecc Microbiol Clin. 1992 Oct;10(8):456–61.
  20. Gutmann L, Ferré B, Goldstein FW, Rizk N, Pinto-Schuster E, Acar JF, et al. SHV-5, a novel SHV-type beta-lactamase that hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins and monobactams. Antimicrob Agents Chemother. 1989 Jun;33(6):951–6.
  21. Nüesch-Inderbinen MT, Kayser FH, Hächler H. Survey and molecular genetics of SHV beta-lactamases in Enterobacteriaceae in Switzerland: two novel enzymes, SHV-11 and SHV-12. Antimicrob Agents Chemother. 1997 May;41(5):943–9.
  22. Liakopoulos A, Mevius D, Ceccarelli D. A Review of SHV Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous. Front Microbiol. 2016 Sep 5;7: 1374.
  23. Bauernfeind A, Grimm H, Schweighart S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. Infection. 18(5):294–8.
  24. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. Antimicrob Agents Chemother. 2004 Jan;48(1):1–14.
  25. Olson AB, Silverman M, Boyd DA, McGeer A, Willey BM, Pong-Porter V, et al.

- Identification of a progenitor of the CTX-M-9 group of extended-spectrum beta-lactamases from *Kluyvera georgiana* isolated in Guyana. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 May;49(5):2112–5.
26. Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, et al. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2008 Jan;14 Suppl 1:144–53.
  27. Sabaté M, Tarragó R, Navarro F, Miró E, Vergés C, Barbé J, et al. Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase (CTX-M-9) from *Escherichia coli* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Jul;44(7):1970–3.
  28. Simarro E, Navarro F, Ruiz J, Miró E, Gómez J, Mirelis B. *Salmonella enterica* serovar *virchow* with CTX-M-like beta-lactamase in Spain. *J Clin Microbiol*. 2000 Dec;38(12):4676–8.
  29. Rossolini GM, Franceschini N, Lauretti L, Caravelli B, Riccio ML, Galleni M, et al. Cloning of a *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum* chromosomal gene (blaA(CME)) encoding an extended-spectrum class A beta-lactamase related to the *Bacteroides cephalosporinases* and the VEB-1 and PER beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999 Sep;43(9):2193–9.
  30. Rodríguez-Díaz JC, Guna-Serrano MR, Larrosa-Escartín N, Marín-Arriaza M. 62. Diagnóstico microbiológico de la bacteriemia y la fungemia: hemocultivos y métodos moleculares. En: Cercenado E, Cantón R, editores. *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; 2018. p. 23.
  31. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *Am J Infect Control*. 1988 Jun;16(3):128–40.
  32. Friedman ND, Kaye KS, Stout JE, McGarry SA, Trivette SL, Briggs JP, et al. Health care--associated bloodstream infections in adults: a reason to change the accepted definition of community-acquired infections. *Ann Intern Med*. 2002 Nov 19;137(10):791–7.
  33. Laupland KB, Gregson DB, Church DL, Ross T, Pitout JDD. Incidence, risk factors and outcomes of *Escherichia coli* bloodstream infections in a large Canadian region. *Clin Microbiol Infect*. 2008 Nov;14(11):1041–7.
  34. Bou-Antoun S, Davies J, Guy R, Johnson AP, Sheridan EA, Hope RJ. Descriptive epidemiology of *Escherichia coli* bacteraemia in England, April 2012 to March 2014. *Euro Surveill*. 2016 Sep 1;21(35):30329.
  35. Kennedy KJ, Roberts JL, Collignon PJ. *Escherichia coli* bacteraemia in Canberra: incidence and clinical features. *Med J Aust*. 2008 Feb 18;188(4):209–13.
  36. Olesen B, Kolmos HJ, Orskov F, Orskov I. A comparative study of nosocomial and

- community-acquired strains of *Escherichia coli* causing bacteraemia in a Danish University Hospital. *J Hosp Infect.* 1995 Dec;31(4):295–304.
37. Skjøt-Rasmussen L, Olsen SS, Jakobsen L, Ejrnaes K, Scheutz F, Lundgren B, et al. *Escherichia coli* clonal group A causing bacteraemia of urinary tract origin. *Clin Microbiol Infect.* 2013 Jul;19(7):656–61.
  38. Mora-Rillo M, Fernández-Romero N, Navarro-San Francisco C, Díez-Sebastián J, Romero-Gómez MP, Fernández FA, et al. Impact of virulence genes on sepsis severity and survival in *Escherichia coli* bacteremia. *Virulence.* 2015 Jan 2;6(1):93–100.
  39. Abernethy JK, Johnson AP, Guy R, Hinton N, Sheridan EA, Hope RJ. Thirty day all-cause mortality in patients with *Escherichia coli* bacteraemia in England. *Clin Microbiol Infect.* 2015 Mar;21(3):251. e1-8.
  40. Ron EZ. Distribution and evolution of virulence factors in septicemic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol.* 2010 Aug;300(6):367–70.
  41. Otto A, Biran D, Sura T, Becher D, Ron EZ. Proteomics of septicemic *Escherichia coli*. *Proteomics Clin Appl.* 2016 Oct;10(9–10):1020–4.
  42. Johnson JR, Johnston B, Clabots C, Kuskowski MA, Castanheira M. *Escherichia coli* Sequence Type ST131 as the Major Cause of Serious Multidrug-Resistant *E. coli* Infections in the United States. *Clin Infect Dis.* 2010 Aug;51(3):286–94.
  43. Mokady D, Gophna U, Ron EZ. Virulence factors of septicemic *Escherichia coli* strains. *Int J Med Microbiol.* 2005 Oct;295(6–7):455–62.
  44. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2017. Solna, Suecia: European Cente for Disease Prevention and Control; 2018. p. 1–71.
  45. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2014. Solna, Suecia: European Cente for Disease Prevention and Control; 2015. p. 1–80.
  46. Woodford N, Ward ME, Kaufmann ME, Turton J, Fagan EJ, James D, et al. Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2004 Oct;54(4):735–43.
  47. Pitout JDD, Gregson DB, Campbell L, Laupland KB. Molecular Characteristics of Extended-Spectrum-β-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.* 2009 Jul 1;53(7):2846–51.
  48. Tenover FC, Arbeit RD, Goering R V, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995 Sep;33(9):2233–9.

49. Coque TM, Novais Â, Carattoli A, Poirel L, Pitout J, Peixe L, et al. Dissemination of Clonally Related *Escherichia coli* Strains Expressing Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis*. 2008 Feb;14(2):195–200.
50. Nicolas-Chanoine M-H, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MP, Caniça MM, et al. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother*. 2008 Feb;61(2):273–81.
51. Matsumura Y, Yamamoto M, Nagao M, Hotta G, Matsushima A, Ito Y, et al. Emergence and spread of B2-ST131-O25b, B2-ST131-O16 and D-ST405 clonal groups among extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan. *J Antimicrob Chemother*. 2012 Nov 1;67(11):2612–20.
52. Dahbi G, Mora A, López C, Alonso MP, Mamani R, Marzoa J, et al. Emergence of new variants of ST131 clonal group among extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Int J Antimicrob Agents*. 2013 Oct;42(4):347–51.
53. Olesen B, Hansen DS, Nilsson F, Frimodt-Moller J, Leihof RF, Struve C, et al. 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*. 2013 Jun 1;51(6):1779–85.
54. Banerjee R, Johnson JR. A new clone sweeps clean: the enigmatic emergence of *Escherichia coli* sequence type 131. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Sep;58(9):4997–5004.
55. Nicolas-Chanoine M-H, Bertrand X, Madec J-Y. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clin Microbiol Rev*. 2014 Jul 1;27(3):543–74.
56. Petty NK, Ben Zakour NL, Stanton-Cook M, Skippington E, Totsika M, Forde BM, et al. Global dissemination of a multidrug resistant *Escherichia coli* clone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Apr 15;111(15):5694–9.
57. Schembri MA, Zakour NL Ben, Phan M-D, Forde BM, Stanton-Cook M, Beatson SA. Molecular Characterization of the Multidrug Resistant *Escherichia coli* ST131 Clone. *Pathog (Basel, Switzerland)*. 2015 Jun 26;4(3):422–30.
58. Stoesser N, Sheppard AE, Pankhurst L, De Maio N, Moore CE, Sebra R, et al. Evolutionary History of the Global Emergence of the *Escherichia coli* Epidemic Clone ST131. *MBio*. 2016 Mar 22;7(2):e02162.
59. Leflon-Guibout V, Blanco J, Amaqdouf K, Mora A, Guize L, Nicolas-Chanoine M-H. 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*. 2008 Dec 1;46(12):3900–5.
60. Clermont O, Dhanji H, Upton M, Gibreel T, Fox A, Boyd D, et al. Rapid detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* encompassing the CTX-M-15-producing

- strains. *J Antimicrob Chemother.* 2009 Aug 1;64(2):274–7.
61. Johnson JR, Tchesnokova V, Johnston B, Clabots C, Roberts PL, Billig M, et al. Abrupt emergence of a single dominant multidrug-resistant strain of *Escherichia coli*. *J Infect Dis.* 2013 Mar 15;207(6):919–28.
  62. Price LB, Johnson JR, Aziz M, Clabots C, Johnston B, Tchesnokova V, et al. The epidemic of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 is driven by a single highly pathogenic subclone, H30-Rx. Parkhill J, editor. *MBio.* 2013 Dec 17;4(6): e00377-13.
  63. Peirano G, van der Bij AK, Freeman JL, Poirel L, Nordmann P, Costello M, et al. Characteristics of *Escherichia coli* Sequence Type 131 Isolates That Produce Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: Global Distribution of the H 30-Rx Sublineage. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Jul;58(7):3762–7.
  64. Johnson JR, Clermont O, Johnston B, Clabots C, Tchesnokova V, Sokurenko E, et al. Rapid and Specific Detection, Molecular Epidemiology, and Experimental Virulence of the O16 Subgroup within *Escherichia coli* Sequence Type 131. *J Clin Microbiol.* 2014 May 1;52(5):1358–65.
  65. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JDD. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev.* 2015 Jul 29;28(3):565–91.
  66. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. Document M100–S10. Wayne, Pa, USA: CLSI; 2013.
  67. Doumith M, Day M, Ciesielczuk H, Hope R, Underwood A, Reynolds R, et al. Rapid identification of major *Escherichia coli* sequence types causing urinary tract and bloodstream infections. Richter SS, editor. *J Clin Microbiol.* 2015 Jan;53(1):160–6.
  68. Johnson JR, Stell AL. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis.* 2000 Jan;181(1):261–72.
  69. Day MJ, Doumith M, Abernethy J, Hope R, Reynolds R, Wain J, et al. Population structure of *Escherichia coli* causing bacteraemia in the UK and Ireland between 2001 and 2010. *J Antimicrob Chemother.* 2016 Aug;71(8):2139–42.
  70. Chung H-C, Lai C-H, Lin J-N, Huang C-K, Liang S-H, Chen W-F, et al. Bacteremia caused by extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* sequence type ST131 and non-ST131 clones: comparison of demographic data, clinical features, and mortality. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Feb;56(2):618–22.
  71. Wu Y-H, Cheng M-F, Lai C-H, Lin H-H, Hung C-H, Wang J-L. The role of Sequence Type (ST) 131 in adult community-onset non-ESBL-producing *Escherichia coli* bacteraemia. *BMC Infect Dis.* 2014 Nov 7;14(1):579.

72. Cho SY, Kang C-I, Cha MK, Wi YM, Ha YE, Chung DR, et al. Clinical Features and Treatment Outcomes of Bloodstream Infections Caused by Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Sequence Type 131. *Microb Drug Resist*. 2015 Aug;21(4):463–9.
73. Wang J-L, Lee C-C, Lee C-H, Lee N-Y, Hsieh C-C, Hung Y-P, et al. Clinical Impact of Sequence Type 131 in Adults with Community-Onset Monomicrobial *Escherichia Coli* Bacteremia. *J Clin Med*. 2018;7(12):508.
74. Banerjee R, Johnston B, Lohse C, Chattopadhyay S, Tchesnokova V, Sokurenko E V, et al. The clonal distribution and diversity of extraintestinal *Escherichia coli* isolates vary according to patient characteristics. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Dec;57(12):5912–7.
75. Horner C, Fawley W, Morris K, Parnell P, Denton M, Wilcox M. *Escherichia coli* bacteraemia: 2 years of prospective regional surveillance (2010-12). *J Antimicrob Chemother*. 2014 Jan 1;69(1):91–100.
76. Karfunkel D, Carmeli Y, Chmelnitsky I, Kotlovsky T, Navon-Venezia S. 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*. 2013 Apr 2;32(4):513–21.
77. Merino I, Shaw E, Horcajada JP, Cercenado E, Mirelis B, Pallarés MA, et al. CTX-M-15- H 30Rx-ST131 subclone is one of the main causes of healthcare-associated ESBL-producing *Escherichia coli* bacteraemia of urinary origin in Spain. *J Antimicrob Chemother*. 2016 Aug;71(8):2125–30.
78. Johnson JR, Menard M, Johnston B, Kuskowski MA, Nichol K, Zhanel GG. Epidemic clonal groups of *Escherichia coli* as a cause of antimicrobial-resistant urinary tract infections in Canada, 2002 to 2004. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Jul 1;53(7):2733–9.
79. Blanco J, Mora A, Mamani R, Lopez C, Blanco M, Dahbi G, et al. 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*. 2011 Sep 1;66(9):2011–21.
80. Olesen B, Hansen DS, Nilsson F, Frimodt-Møller J, Leihof RF, Struve C, et al. 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*. 2013 Jun 1;51(6):1779–85.

## ANEXO: LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

### TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Factores de virulencia de <i>E. coli</i> .....	4
<b>Tabla 2.</b> Clasificación de las BLEE tipo CTX-M en grupos en función de su secuencia aminoacídica y enzimas más representativas de cada grupo.....	8
<b>Tabla 3.</b> Factores de virulencia asociados a <i>E. coli</i> septicémicos.....	12
<b>Tabla 4.</b> Evolución de los porcentajes de resistencia de cepas de <i>E. coli</i> invasivas a diferentes familias de antibióticos entre 2005 y 2017 en España (EARSS, 2014). AMI: aminopenicilinas; AMIG: aminoglucósidos; FQ: fluorquinolonas; CEF3 <sup>a</sup> G: cefalosporinas de tercera generación; CARBA: carbapenems.....	13
<b>Tabla 5.</b> Iniciadores utilizados en la caracterización molecular de los STs 69,73, 95 y 131.....	22
<b>Tabla 6.</b> Iniciadores utilizados en la caracterización molecular de las BLEEs. ....	24
<b>Tabla 7.</b> Iniciadores utilizados para la amplificación de los genes que codifican diferentes factores de virulencia. ....	25
<b>Tabla 8.</b> Distribución por edad, sexo, comorbilidades, dispositivos, antibioterapia previa, gravedad y mortalidad en pacientes con episodio de BECST131 y BECNOST131 .....	29
<b>Tabla 9.</b> Tipo de adquisición y foco de infección de BECST131 y BECNOST131 en episodios de población adulta. ....	30
<b>Tabla 10.</b> Porcentajes de resistencia a diferentes antibióticos en cepas ST131 y No-ST131.....	30
<b>Tabla 11.</b> Distribución de ExPEC y genes de virulencia en cepas ST131 y No-ST131.....	31



## FIGURAS

- Figura 1.** Imagen de Theodor Escherich..... 1
- Figura 2.** Estructura poblacional del linaje ST131 *fimH30* de *Escherichia coli*, sublinajes H30 y otros linajes asociados con ST131. FQ-R, resistente a fluoroquinolonas; FQ-S, sensibles a fluoroquinolonas. .... 16
- Figura 3:** Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de ADN generados en la PCR multiplex que detecta los 4 principales STs de *E. coli*..... 23

