



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Epidemiología Clínica y Molecular de
Bacteriemias por Escherichia coli en el
Hospital Clínico Universitario Virgen de la
Arrixaca**

D. Javier Segura Basail

2017

Et cognoscentis veritatem et veritas liberabit vos.
Juan, 8:32

A mis padres, José Antonio y Marisa.

**EPIDEMIOLOGÍA CLÍNICA Y MOLECULAR DE
BACTERIEMIAS POR *ESCHERICHIA COLI* EN EL HOSPITAL
CLÍNICO UNIVERSITARIO VIRGEN DE LA ARRIXACA**

Memoria presentada por el Licenciado en Farmacia D Javier
Segura Basail para optar al grado de Doctor, en el Área de
Microbiología Clínica

Fdo: Javier Segura Basail

V° B°

El director

V° B°

El director

Genoveva Yagüe Guirao

Carme Salvador García



D^ª Genoveva Yagüe Guirao, Profesora Titular de Universidad de Murcia del Área de Microbiología Clínica del Departamento de Genética y Microbiología, y D^ª Carme Salvador García, Profesora Asociada de Universidad de Murcia del Área de Microbiología Clínica del Departamento de Genética y Microbiología

AUTORIZAN:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “Epidemiología clínica y molecular de bacteriemias por *Escherichia coli* en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca”, realizada por D Javier Segura Basail, bajo nuestra inmediata dirección y supervisión, en el Departamento de Genética y Microbiología, y que presenta para la obtención del grado de doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 07 de junio de 2017

Genoveva Yagüe Guirao

Carme Salvador García

AGRADECIMIENTOS

Al empezar a escribir estas palabras me embarga el temor de que este apartado acabe siendo más extenso que el propio trabajo, dado el número de personas a las que debo agradecer su ayuda y confianza en este proyecto:

En primer lugar, agradecer al Dr. Manuel Segovia su labor como tutor y jefe de Servicio de Microbiología del HCUVA, donde se ha realizado la presente tesis.

Agradecer a mis directoras, la Dra. Genoveva Yagüe y la Dra. Carme Salvador, no solo por su ayuda en este trabajo, sino también en mis años de residente. Ambas han tenido que hacer de profesoras, tutoras, directoras y en alguna ocasión incluso de madres conmigo, por lo cual les estaré eternamente agradecido.

Al Dr. Fernando Carballo y a Joaquín Carrasco, del Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud. Sin su ayuda, esta tesis se hubiese leído mucho más tarde de lo previsto.

A Guadalupe Ruiz, por su inestimable ayuda con la estadística.

A los facultativos del Servicio de Microbiología, que me han formado y de los cuales me llevo sus mejores conocimientos.

A todo el personal técnico del Servicio de Microbiología, dado que son el verdadero motor del laboratorio y sin ellos nuestro trabajo sería imposible.

A los residentes, tanto mayores como pequeños de micro que me han acompañado y enseñado durante estos años: Teresa, Merxe, Marina, Cristina y Luis. En especial a mi R mayor y pequeña directas, Merxe y Marina, por aguantarme y animarme. A Paco Ferrer, por ser un referente.

Al Dr. Joaquín Ruiz, que además de eminente profesional es ante todo “consultor y rentista”. A Salud Ortuño por enseñarme en cada guardia, microbiología “de verdad”.

A mis amigos de Murcia, los “Pseudomonos”, especialmente a Nacho y Miguel. Estos años no hubiesen sido iguales sin vosotros. Espero que cumplamos cada año nuestro compromiso rural.

A mis amigos de toda la vida, integrantes del selecto club denominado “La cuadra”. Gracias por vuestra confianza en mí y por mantener esa unión entre nosotros, aunque pasen los años.

A mi familia: tíos, primos y sobrinos, tanto por mi parte de Cela de Nuñez como por mi familia en Madrid. Especialmente a mis tíos M Carmen, Pepe, Elia y Paco.

A mis padrinos Pepe, Maru y mi prima Elena.

A José Luis y Susi que se han portado en todo momento como unos segundos padres y me han hecho sentir en su casa como un hijo más.

A Mar. Gracias por tu apoyo, cariño y comprensión, pero, ante todo, gracias por hacerme mejor persona cada día. Sabes que te admiro y espero que cada día sea el principio de una vida juntos llena de felicidad y éxitos.

Y por último y no por ello menos importante a mis padres: Jose Antonio y Marisa. Sé que no os demuestro suficiente el amor y admiración que siento por vosotros. Gracias por vuestro apoyo incondicional, fe ciega en mí y por todos los sacrificios que habéis hecho para hacerme feliz. Todo lo que soy y seré siempre será gracias a vosotros. Solo espero el día que sea padre, ser una milésima parte de los buenos padres que habéis sido vosotros conmigo.

A todos los que he mencionado y los que se me han olvidado. MIL GRACIAS.

ÍNDICE

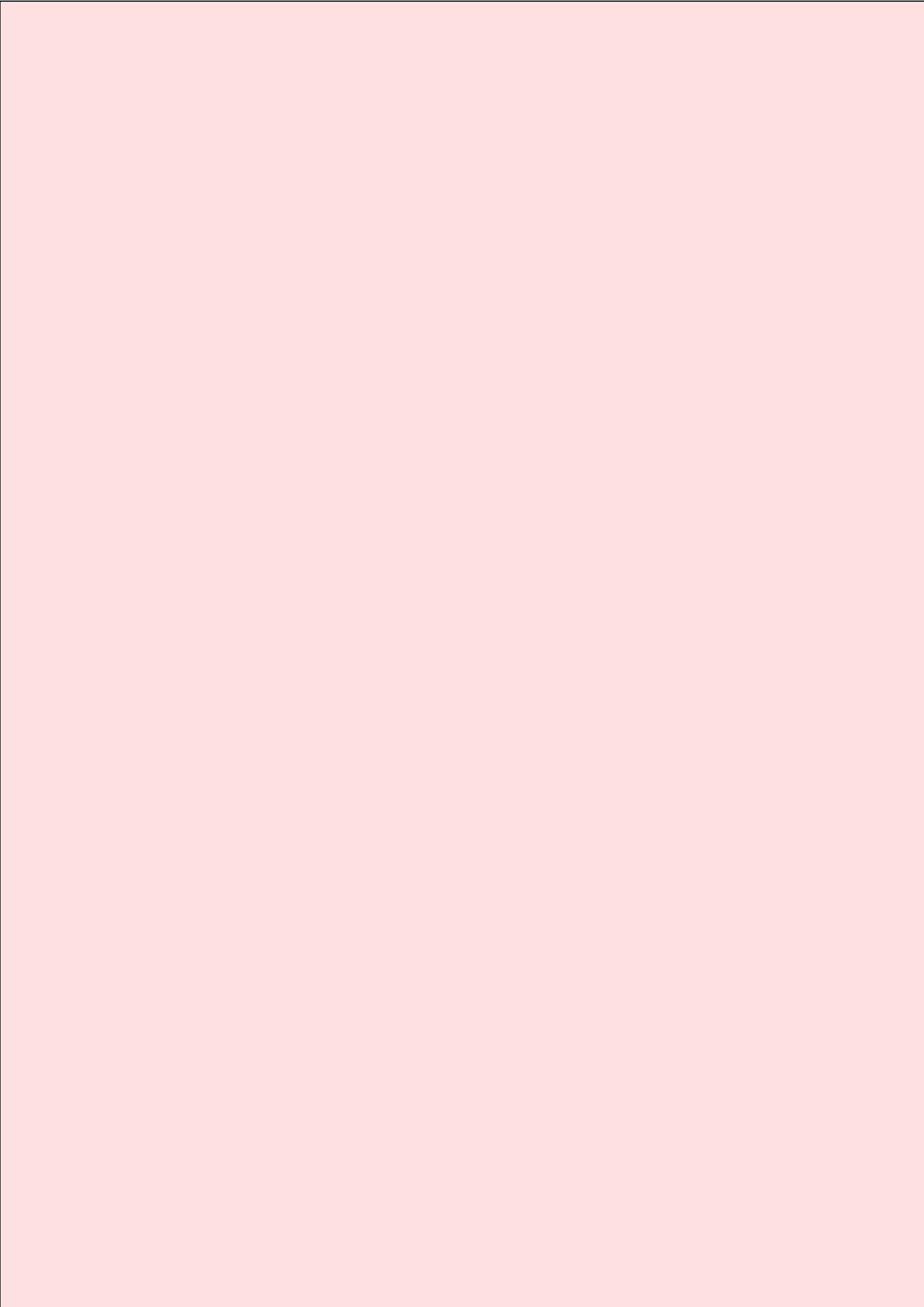
LISTA DE ABREVIATURAS.....	1
I. INTRODUCCIÓN	7
1. <i>Escherichia coli</i>.....	9
1.1. Características microbiológicas.....	9
1.2. Epidemiología. Patogénesis.	11
1.2.1. <i>E. coli</i> como microorganismo comensal.....	12
1.2.2. <i>E. coli</i> como microorganismo patógeno.....	13
1.3. <i>E. coli</i> como patógeno extraintestinal (ExPEC)	14
1.3.1. Factores de virulencia (FV) de ExPEC	15
1.4. Resistencia a antibióticos.....	23
1.4.1. Mecanismos de resistencia a betalactámicos.....	24
1.4.1.1. Betalactamasas: Características y clasificación.....	25
1.4.1.2. Betalactamasas de espectro extendido (BLEE)	26
1.4.2. Mecanismo de resistencia a fluorquinolonas	30
1.5. Tipificación de cepas ExPEC	32
1.5.1. Métodos de tipificación	32
1.5.2. Diversidad filogenética en ExPEC.	36
1.5.3. Diversidad clonal de ExPEC.	39
1.5.3.1. <i>E. coli</i> ST69 (grupo clonal A (CgA))	39
1.5.3.2. <i>E. coli</i> ST73 O6: H1.....	40
1.5.3.3. <i>E. coli</i> complejo ST95.....	40
1.5.3.4. <i>E. coli</i> ST131.....	41
1.5.3.5. <i>E. coli</i> ST393 O15: K52: H1.....	44

1.5.3.6. Otros linajes ExPEC clonales.....	45
2. Bacteriemias.....	46
2.1. Definición de bacteriemia y clasificaciones.	46
2.2. Incidencia de las bacteriemias.	48
2.3. Etiología de las bacteriemias.....	49
3. Bacteriemias por <i>E. coli</i>.	51
3.1. Epidemiología de las bacteriemias por <i>E. coli</i>	51
3.2. Factores de riesgo y mortalidad de bacteriemias por <i>E. coli</i>	53
3.3. Epidemiología, tipo de adquisición y orígenes de la infección en bacteriemias por <i>E. coli</i> productora de BLEE. Caracterización de las BLEE	54
3.4. Factores de riesgo y mortalidad de bacteriemias por <i>E. coli</i> BLEE.	57
3.5. Factores de virulencia asociados a bacteriemias por <i>E. coli</i>	58
3.6. Porcentajes de resistencia a antibióticos en cepas de <i>E. coli</i> invasivas en la Unión Europea (UE): Datos del Informe EARSS 2015.....	59
3.6.1. Resistencia a aminopenicilinas	60
3.6.2. Resistencia a fluoroquinolonas.....	60
3.6.3. Resistencia a cefalosporinas de tercera generación.....	61
3.6.4. Resistencia a aminoglucósidos.....	61
3.6.5. Resistencia a carbapenems.....	62
3.7. Estructura poblacional de <i>E. coli</i> productores de bacteriemia.....	63
II. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO Y OBJETIVOS	67
III. MATERIAL Y MÉTODOS	73

1. Características del hospital	75
2. Tipo y periodo de estudio	75
3. Datos clínicos y epidemiológicos	76
3.1. Criterios de inclusión/exclusión.....	76
3.2. Metodología de recogida de la información	76
3.3. Características epidemiológicas y clínicas	76
4. Estudio microbiológico	79
4.1. Procesamiento de hemocultivos	79
4.2. Estudio de sensibilidad antibiótica	80
5. Estudio molecular	81
5.1. Extracción del ADN	81
5.2. Caracterización molecular de las betalactamasas de espectro extendido (BLEEs).....	81
5.3. Caracterización filogenética.....	82
5.4. Detección de genes de virulencia	84
5.5. Tipificación molecular	86
5.5.1. Tipificación molecular mediante PCR de los STs 69,73,95 y 131	87
5.5.2. Tipificación molecular mediante MLST	87
5.6. Detección y separación de los amplificados en geles de agarosa.....	89
5.6.1. Detección y separación de los amplificados	89
5.6.2. Purificación de los amplificados	89
5.6.3. Secuenciación de los amplificados	89
5.6.4. Interpretación de los amplificados.....	90
6. Análisis estadístico	90
 IV. RESULTADOS.....	 91
1. Incidencia de <i>E. coli</i> en bacteriemias.....	93
2. Características epidemiológicas y clínicas de la bacteriemia por <i>Escherichia coli</i> (BEC).....	94
2.1. Características de BEC en la población adulta	94

2.2. Características de las bacteriemias por <i>E. coli</i> en niños.	100
3. Características generales de los aislamientos de <i>E. coli</i>.....	102
3.1. Estudio de sensibilidad a antibióticos.....	102
3.1.1. Características epidemiológicas y clínicas de la bacteriemia por <i>Escherichia coli</i> según presencia de BLEE y sensibilidad a ciprofloxacino en adultos.	104
3.1.2. Características epidemiológicas y clínicas de la bacteriemia por <i>Escherichia coli</i> según sensibilidad a ciprofloxacino en población pediátrica.	110
3.2. Caracterización molecular de las BLEE.....	112
3.3. Diversidad genética de los aislados de <i>E. coli</i>	112
3.4. Estudio de factores de virulencia en aislados de <i>E. coli</i> productores de bacteriemias.	121
3.5. Tipificación molecular.	130
3.5.1. Detección de STs en <i>E. coli</i> pertenecientes a los grupos filogenéticos B2 y D.....	130
3.6. Características clínicas y microbiológicas de bacteriemias por los STs más frecuentes.....	132
V. DISCUSIÓN.....	145
VI. CONCLUSIONES.....	175
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	181
VIII. LISTA DE TABLAS.....	209
IX. LISTA DE FIGURAS.....	215

LISTA DE ABREVIATURAS



°C	Grados Celsius
µg	Microgramo (10 ⁻⁶ gramos)
µl	Microlitro (10 ⁻⁶ litros)
3'	Extremo 3' del ADN
5'	Extremo 5' del ADN
ABD	Abdominal
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMP	Ampicilina
BEC	Bacteriemia por <i>Escherichia coli</i>
BEC-BLEE	Bacteriemia por <i>Escherichia coli</i> productor de BLEE
BEC- CIP R	Bacteriemia por <i>Escherichia coli</i> resistente a quinolonas
BEC- CIP S	Bacteriemia por <i>Escherichia coli</i> sensible a quinolonas
BEC-NO BLEE	Bacteriemia por <i>Escherichia coli</i> no productor de BLEE
BECST69	Bacteriemia por <i>Escherichia coli</i> ST69
BECST73	Bacteriemia por <i>Escherichia coli</i> ST73
BECST95	Bacteriemia por <i>Escherichia coli</i> ST95
BECST131	Bacteriemia por <i>Escherichia coli</i> ST131
BECNOST69	Bacteriemia por <i>Escherichia coli</i> distinto de ST69
BECNOST73	Bacteriemia por <i>Escherichia coli</i> distinto de ST73
BECNOST95	Bacteriemia por <i>Escherichia coli</i> distinto de ST95
BECNOST131	Bacteriemia por <i>Escherichia coli</i> distinto de ST131
BLEE	Betalactamasas de espectro extendido
BRC	Bacteriemia relacionada con cateteres vasculares
CC	Complejo clonal
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
cfu	Unidades formadoras de colonias
CgA	Grupo clonal A
CIP	Ciprofloxacino

CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
cm	Centímetros
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CEF	Cefepime
COT	Cotrimoxazol
CV	Catéter venoso
DAEC	<i>E. coli</i> difusamente adherente
DES	Desconocido
dNTPs	Deoxinucleósidos trifosfato
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EARSS	European Antimicrobial Resistance Surveillance System
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativo
ECBLEE	<i>E. coli</i> productor de BLEE
ECDC	European Center of Disease Control
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágico
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasivo
EPC	Enfermedad pulmonar crónica
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatógeno
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
<i>et al.</i>	y colaboradores
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigénico
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
ExPEC	<i>E. coli</i> productores de cuadros extraintestinales
FOR	Forward
FOT	Cefotaxima
FQ	Fluoroquinolonas
FV	Factor de virulencia
GEN	Gentamicina

LISTA DE ABREVIATURAS

HCUVA	Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca
IC	Intervalo de confianza
IPPB	Infección de piel y partes blandas
ITU	Infección del tracto urinario
KDa	KiloDaltons (1 KDa=1000 Daltons)
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LPS	Lipopolisacárido
M	Concentración molar (mol soluto/litro solución)
mg	Miligramo
MH	Agar Mueller-Hinton
min	Minutos
ml	Mililitro
MLEE	Electroforesis de enzimas multilocus
MLST	Multilocus sequence typing
mM	Concentración milimolar (M/1000)
NaCl	Cloruro sódico
NGS	Secuenciación de última generación (Next Generation Sequencing)
nm	Nanómetros (10 ⁻⁹ metros)
NMEC	<i>E coli relacionado con meningitis neonatal</i>
INH	Penicilina antipseudomónicas + inhibidor de β -lactamasas
OR	Odds ratio
PAI	Isla de patogenicidad
pb	Pares de bases del ADN
PBP	Proteínas de unión a penicilina (Penicillin Binding Proteins)
PCR	Reacción en cadena de la ADN polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
PFGE	Electroforesis en gel de campo pulsante (Pulsed- Field Gel Electrophoresis)
PTC	Piperacilina/tazobactam

R	Resistente
RAS	Relacionado con la asistencia sanitaria
REA	Unidad de Reanimación
RES	Respiratorio
REV	Reverse
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
S	Sensible
SEC	<i>E. coli</i> relacionado con septicemias/bacteriemias
SGC	Secuenciación del genoma completo
SNC	Sistema nervioso central
ST	Secuencia tipo (Sequence type)
U	Unidades
UE	Unión Europea
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
UPEC	<i>E. coli</i> uropatogenico
URI	Urinario
V	Voltios
XLD	Amoxicilina-clavulánico

I. INTRODUCCIÓN



1.- *Escherichia coli*

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 (Escherich, 1885). En 1919 Castellani y Chalmers, en su honor, la denominaron *Escherichia coli* (Castellani y Chalmers, 1919).

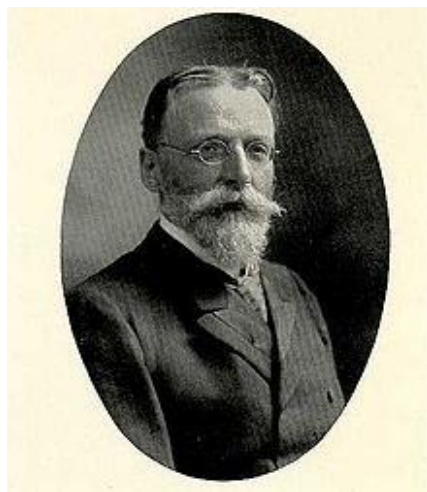


Figura 1. Imagen de Theodor Escherich. Extraída de <https://es.wikipedia.org>.

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 μm de diámetro por 2,0 – 6,0 μm 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 (Mandell *et al.*, 2005).

La estructura de la pared celular de *E. coli* es similar a la de otras enterobacterias y está constituida por (**Figura 2**):

- Membrana plasmática: Formada por una capa de fosfolípidos con proteínas intercaladas.
- Peptidoglicano: Capa fina situada por encima de la membrana plasmática. Entre ambas se encuentra el espacio periplásmico.
- Membrana externa: Situada encima del peptidoglicano y constituida por una bicapa de fosfolípidos intercalada con distintos componentes como el lipopolisacárido (LPS), lipoproteínas y porinas.
- Flagelos, fimbrias o pili y las adhesinas no fimbrias

En cuanto a su estructura antigénica está formada por tres clases de antígenos.

- Antígenos somáticos o antígenos O: Cadenas de polisacáridos procedente del LPS de la pared celular que están presentes en todas las bacterias gramnegativas y que les confiere especificidad serológica.
- Antígenos flagelares o antígenos H: Proteínas que se localizan en los flagelos.
- Antígenos capsulares o antígenos K: Presentes en cepas con cápsula. Constituyen una barrera defensiva disminuyendo la capacidad de los anticuerpos para unirse a la bacteria. Son un factor de virulencia fundamental porque impiden la fagocitosis.

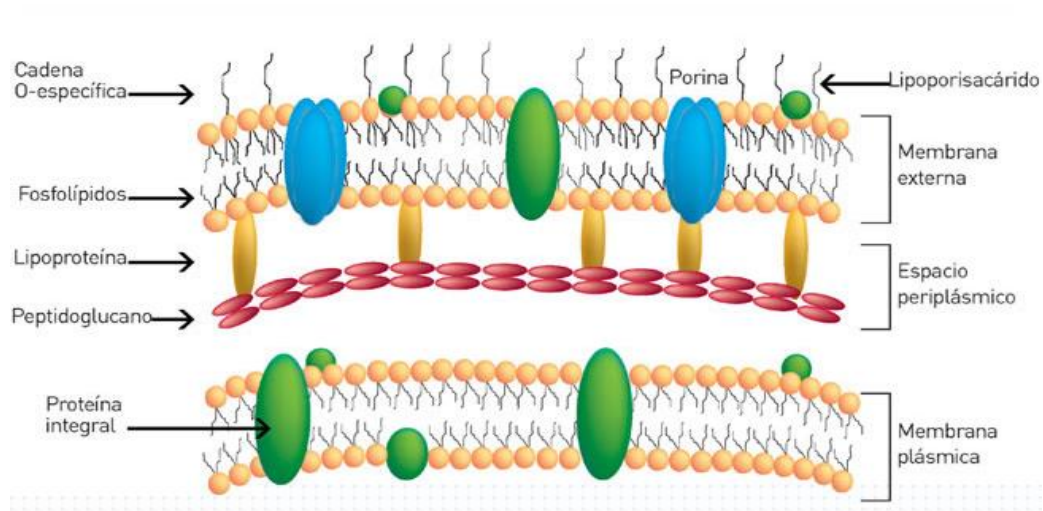


Figura 2. Estructura de la pared celular de *E. coli*. Figura extraída de <http://cluster-divulgacioncientifica.blogspot.com.es>

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 (Yan y Polk, 2004). 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 (Kruis *et al.*, 2004). 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 (Johnson y Russo, 2002). Para pasar de comensal a patógeno, *E. coli* necesita adquirir una combinación de elementos genéticos móviles que portan determinados factores de virulencia.

1.2.1 *E. coli* como microorganismo comensal.

E. coli forma parte de la microbiota intestinal del ser humano, compuesta por más de 500 especies de bacterias distintas. Cada gramo de contenido intestinal posee una cantidad entre 10^{10} y 10^{11} células bacterianas. Es la especie predominante de la microbiota aerobia del tubo digestivo de la mayoría de los animales de sangre caliente, sólo superada en número por las bacterias anaerobias en una proporción entre 100/1 y 10000/1 (Berg, 1996). Pese a la densa colonización del tracto gastrointestinal por múltiples especies bacterianas, *E. coli* parece ser el competidor más exitoso, debido, según algunas hipótesis, a la alta capacidad que tiene para usar el gluconato, permitiéndole ocupar un nicho metabólico específico (Chang *et al.*, 2004).

E. coli coloniza el tracto gastrointestinal en las primeras horas de vida del recién nacido siendo adquirido tanto desde la flora materna en el momento del parto por inoculación oral a partir de flora vaginal e intestinal materna como del medio ambiente (Palmer *et al.*, 2007). Desde el principio se establece una relación simbiótica de mutuo beneficio entre cepas comensales de *E. coli* y el huésped que dura años (Schulze *et al.*, 2006), formando parte de la microbiota intestinal. Estas cepas comensales, sin alteraciones de la barrera mucosa gastrointestinal o situaciones de inmunosupresión, raramente ocasionan infección. En la actualidad el papel de la microbiota intestinal se considera fundamental y, además, cada día aparecen nuevos estudios que relacionan su alteración con todo tipo de patologías como diabetes, enfermedades hepáticas, enfermedad inflamatoria intestinal, cáncer de colon, etc (Tojo *et al.*, 2014; Staley *et al.*, 2017).

1.2.2 *E. coli* como microorganismo patógeno.

A pesar de la adaptación al huésped, ciertos linajes de *E. coli* son capaces de adquirir múltiples elementos de virulencia que les confieren la capacidad de adaptarse a nuevos nichos ecológicos y ocasionar un amplio espectro de enfermedades. Estos factores de virulencia están codificados habitualmente en elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones e islas de patogenicidad (PAI) que en algunas ocasiones pueden evolucionar e integrarse en el genoma (Kaper *et al.*, 2004). Las combinaciones genéticas de los factores de virulencia más eficaces han persistido convirtiéndose en patotipos capaces de generar infección en personas previamente sanas, a diferencia de las cepas de *E. coli* comensales de la flora intestinal.

Los patotipos de *E. coli* producen 4 grandes síndromes clínicos: diarreas, ITUs, sepsis y meningitis (Smith *et al.*, 2007). En función de si producen enfermedad intestinal (cepas diarreogénicas) o extraintestinal se diferencian dos grandes grupos de patotipos. Además de éstos, existen otros patotipos con mecanismos patogénicos no tan establecidos. Los patotipos identificados hasta la fecha son:

- Productores de cuadros de diarrea:

- *E. coli* enteropatogénico (EPEC “Enteropathogenic *E. coli*”).
- *E. coli* enterohemorrágico (EHEC “Enterohemorrhagic *E. coli*”).
- *E. coli* enterotoxigénico (ETEC “Enterotoxigenic *E. coli*”).
- *E. coli* enteroinvasivo (EIEC “Enteroinvasive *E. coli*”).
- *E. coli* enteroagregativo (EAEC “Enteroggregative *E. coli*”).
- *E. coli* difusamente adherente (DAEC “Diffuse-adhering *E. coli*”).

- Productores de cuadros extraintestinales (ExPEC “Extraintestinal pathogenic *E. coli*”).

- *E. coli* uropatogénico (UPEC “Uropathogenic *E. coli*”).

- *E. coli* relacionado con meningitis neonatal (NMEC “*Neonatal meningitis E. coli*”).
- *E. coli* relacionado con septicemia/bacteriemia (SEC “*Septicemic E. coli*”).

Existe una relación importante entre el patotipo y el síndrome clínico. Así, los patotipos diarreagénicos pueden producir diarrea, pero rara vez producen enfermedad fuera del tracto gastrointestinal. Por el contrario, las cepas ExPEC mantienen la capacidad de colonizar el tracto gastrointestinal sin consecuencias clínicas para el huésped, pero al mismo tiempo pueden diseminarse y colonizar otros nichos del huésped como el torrente circulatorio, el sistema nervioso central y el tracto urinario, produciendo de ese modo infección a dichos niveles (Wiles *et al.*, 2008).

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

Las cepas patógenas extraintestinales de *E. coli* (ExPEC), fueron denominadas así por primera vez en 2002 por Johnson y Russo (Johnson y Russo, 2002). Son capaces de causar diferentes infecciones en los seres humanos siendo las más frecuentes las ITUs (Wiselka, 1996). Se estima que cada año en el mundo tienen lugar unos 130-175 millones de ITUs y un 80% de las mismas son causadas por cepas UPEC (Russo y Johnson, 2003). La patogenia más frecuente de las ITUs suele ser por vía ascendente con la entrada al tracto urinario desde el colon a través de la piel perineal de una cepa colonizante del tracto gastrointestinal de *E. coli*, que asciende por la uretra hasta la vejiga donde desarrolla una cistitis. En caso de seguir ascendiendo por los uréteres y llegar al riñón causan una pielonefritis, e incluso pueden atravesar la barrera endotelial y entrar en la circulación sanguínea provocando bacteriemias/septicemias (Kaper *et al.* 2004).

Para explicar la transformación de cepas comensales fecales de *E. coli* a cepas causantes de ITU 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 ITU presentan una serie de factores de virulencia que les permite invadir, colonizar y dañar el tracto urinario, provocando infecciones urinarias (Korhonen *et al.*, 1985; Blanco *et al.*, 1991; Blanco *et al.*, 1996).

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, en los últimos 10 años en las cepas de *E. coli* bacteriémicas se ha producido un incremento progresivo de la resistencia a antibióticos, lo cual dificulta el tratamiento de estas infecciones y empeora su pronóstico (Javaloyas, 2003; Oteo *et al.*, 2006).

1.3.1 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.

La evidencia actual sugiere que la presencia de un único FV no consigue que un aislado de ExPEC sea capaz de causar una infección específica, por lo que la virulencia se considera un fenómeno multifactorial. Johnson y Stell, mediante análisis estadísticos, identificaron como independientemente predictivos 5

marcadores de virulencia {{*pap* (Fimbria P), *sfa/focDE* (Fimbria S y F1C), *afa/draBC* (Adhesinas de unión a fimbrias Dr.), *iutA* (Receptor de aerobactina) y *kpsMT II* (Cápsula del grupo 2)}, y propusieron como criterio para la determinación del estatus ExPEC de las cepas de *E. coli*, la presencia de 2 o más de dichos marcadores (Johnson y Stell, 2000). No obstante, en muchos estudios se engloban dentro del patotipo ExPEC a cualquier tipo de cepa de *E. coli* aislada de una infección extraintestinal.

- Adhesinas.

La adherencia supone el paso inicial en la patogénesis de *E. coli*, especialmente en el caso de los uropatógenos, ya que le permite permanecer en el tracto urinario a pesar del efecto de arrastre del flujo urinario. Además, las adhesinas permiten exponer al urotelio a altas concentraciones de productos tóxicos o inflamatorios de origen bacteriano, lo que incrementa la actividad de estos componentes al ocasionar un estrecho contacto entre los microorganismos y el epitelio urinario del huésped (Linder *et al.*, 1988). Las fimbrias o pili de los microorganismos se consideran los principales ligandos responsables de esta adhesión, aunque también existen adhesinas no fimbriales.

Las fimbrias son apéndices filamentosos rígidos o flexibles formados por subunidades de proteínas que están anclados en la membrana externa de las bacterias gramnegativas. En el extremo de las fimbrias se encuentran las adhesinas que son proteínas con afinidad por los azúcares y cuya función es la adherencia (**Figura 3**). Las cepas ExPEC poseen genes que codifican para varias clases de adhesinas, como las fimbrias tipo 1, tipo P, S y *Afa/Dr* (Smithson *et al.*, 2007; Molina *et al.*, 2014).

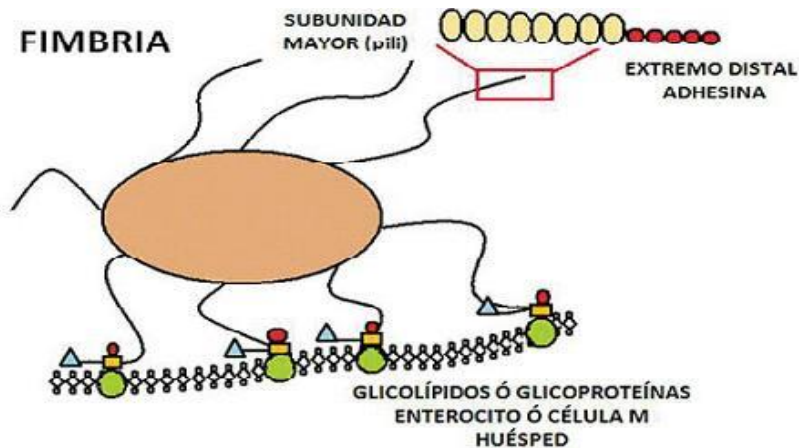


Figura 3. Las adhesinas fimbriales son parte constitutiva de una fimbria y las moléculas encargadas de asegurar la adhesión de esa estructura a su receptor en la célula hospedadora. Extraída de: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902012000100013.

Entre las adhesinas más importantes de *E. coli* se encuentran:

- **Fimbrias tipo 1:** Se unen a los residuos de α -D-manosa presentes en los receptores glicoproteicos y se encuentran implicadas en la adherencia e invasión de las células de la vejiga (Lüthje y Brauner, 2014).
- **Fimbrias tipo P:** Se unen a los residuos de galactosa presentes en los receptores glucoesfingolipídicos y se encuentran presentes en la mayor parte de las cepas aisladas de pacientes con pielonefritis y urosepsis. Estas fimbrias permiten a las bacterias fijarse a los receptores celulares y colonizar el epitelio urinario sin ser arrastradas por la orina (Lüthje y Brauner, 2014).
- **Fimbrias tipo 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 uropatogénicas y septicémicas humanas expresan conjuntamente las fimbrias P y S (Lüthje *et al.*, 2014).
- **Adhesinas Afa/Dr:** Se asocian con cepas causantes de infecciones urinarias y septicemias, ayudan a las bacterias a evadir la respuesta

inmune humoral facilitando así la invasión de las células epiteliales (Lüthje y Brauner, 2014).

- Toxinas.

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

- α -hemolisinas (HlyA): Son proteínas citotóxicas con capacidad para producir lesión en eritrocitos, monocitos, células endoteliales y células epiteliales tubulares renales. La producción de hemolisina, que se ha asociado con la presencia de infección extraintestinal, probablemente otorga a *E. coli* una ventaja selectiva al favorecer la captación del hierro liberado por los hematíes lisados que puede ser usado por los sideróforos (Linggood y Ingram, 1982), la destrucción de las células fagocíticas (Cavaliere y Zinder, 1982) y la aparición de enfermedad invasiva (Svanborg y Godaly, 1997).
- Toxina SAT (“Secreted Autoexporter Tomb”): Es una toxina proteolítica cuya presencia se ha asociado con cepas pielonefríticas de *E. coli*, y parece tener un efecto tóxico frente a líneas celulares de origen renal y vesical. Está presente en cepas ExPEC y especialmente en cepas causantes de pielonefritis (Guyer *et al.*, 2000).
- Toxina Citolítica Distal (CDT): Es una toxina con actividad catalítica asociada con infecciones intestinales y extraintestinales. Se han encontrado al menos cinco variantes en cepas implicadas en diferentes infecciones. Las variedades CDT-I, CDT-II y CDT-IV han sido identificadas en cepas ExPEC (Dubois *et al.*, 2010).
- Factor de Necrosis Citotóxico (CNF): *E. coli* puede producir tres tipos de factores necrosantes citotóxicos CNF1, CNF2 y CNF3 (Orden *et al.*, 2007).

Muchas cepas ExPEC causantes de ITUs y sepsis en seres humanos producen la variedad CNF1 y además α -hemolisina (Blanco *et al.*, 1990).

-Sistemas de adquisición del hierro.

E. coli al igual que la mayoría de las bacterias con metabolismo aeróbico, necesita hierro para los procesos de crecimiento y multiplicación bacteriana. Las cepas ExPEC poseen múltiples mecanismos diseñados para adquirir hierro del huésped, entre los que destacan los sistemas de receptor sideróforo-sideróforo y los de captación del grupo hemo (Russo *et al.*, 2001). Estos sistemas se basan en el uso de moléculas con alta afinidad por el hierro (sideróforos que captan el hierro presente en el medio ambiente circundante). Estas moléculas cargadas de hierro se internalizan a través de receptores presentes en la membrana de las bacterias (Skaar *et al.*, 2010).

Las cepas ExPEC utilizan cuatro sistemas de captación para incorporar el hierro que son: enterobactina, salmoquelina, aerobactina y yersiniabactina (**Figura**). La adquisición del hierro mediante estos sistemas necesita de varias etapas, como la síntesis del sideróforo en el citoplasma, su secreción, la recepción del complejo hierro-sideróforo, la internalización de este complejo y la liberación del hierro en el citoplasma (Garénaux *et al.*, 2011).

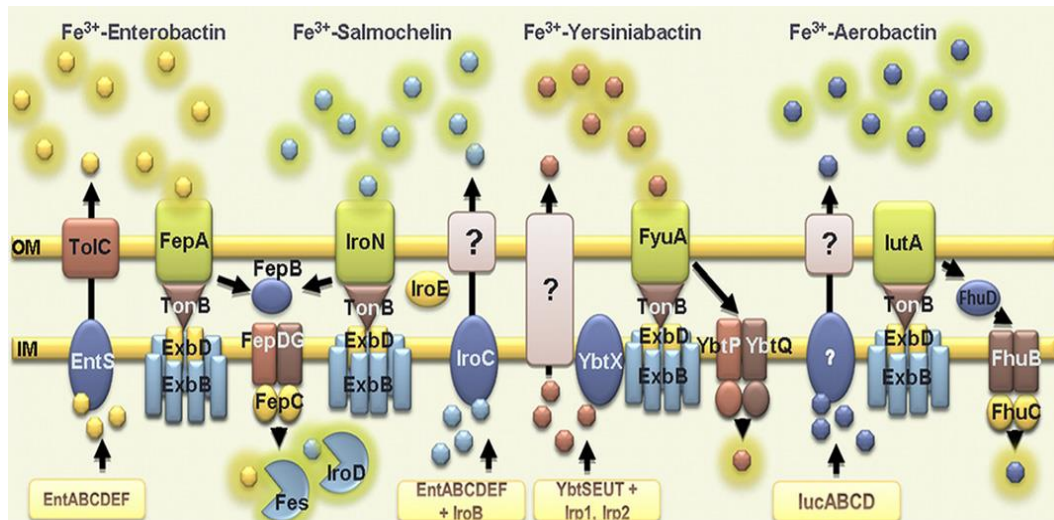


Figura 4. Modelo de diferentes sistemas que contribuyen a la captación de hierro mediante sideróforos en *E. coli*. En el rectángulo amarillo se indican las proteínas relacionadas con la síntesis de los 4 tipos de sideróforos. Los exportadores de membrana se indican en azul oscuro. Los receptores de membrana externa se indican en verde claro. El transportador (ABC) se muestran en la membrana interna. Los signos de interrogación indican los pasos donde aún no se han determinado los mecanismos. Extraído de Garenaux *et al.*, 2011.

-Factores de resistencia al suero y a la fagocitosis.

Una de las propiedades de las cepas ExPEC es la resistencia a la actividad bactericida del suero evitando su bacteriolisis. La mayor parte poseen una cápsula de polisacáridos (antígeno K) que difiere de la cápsula que poseen las cepas comensales. Esta cápsula interfiere en los procesos de fagocitosis y protegen al microorganismo frente a la opsonización y la lisis mediada por el complemento.

El antígeno somático O del LPS es otro importante elemento de la membrana externa de *E. coli*, implicado en la resistencia al suero. El lípido A del LPS, también llamado endotoxina, puede ser considerado un factor de patogenicidad debido a su efecto tóxico en el hospedador y a la respuesta inflamatoria asociada (Johnson *et al.*, 2013).

Varios componentes de la membrana externa se han relacionado con la resistencia al suero entre los que destacan las proteínas *Iss* ("Increased Serum Survival") y *TraT* ("Conjugal transfer surface exclusion protein"). *Iss* parece ser un factor de virulencia importante que promueve la supervivencia en suero y puede ser de utilidad en la discriminación entre cepas virulentas y avirulentas (Nolan *et*

al., 2003). Por otro lado, la proteína *TraT* aumenta la resistencia de la bacteria a la acción bactericida del suero debido a la interacción de estas proteínas con el complemento, reduciendo la fagocitosis (Sukupolvi y O'Connor, 1990).

-Otros factores de virulencia.

Se han descrito infinidad de factores de virulencia extraintestinales (**Tabla 1**), entre los que destacan:

- Tsh (Hemaglutinina Termosensible): Se trata de una proteína de superficie termosensible que posee la capacidad de aglutinar los eritrocitos a 26 °C. Al igual que las adhesinas, esta proteína desempeña un papel de adhesión en la fase inicial de la infección (Kostakioti y Stathopoulos, 2004).
- IbeA (Invasión del endotelio cerebral): Se trata de una proteína de 50 kDa codificada por el gen *IbeA*. La proteína IbeA estimula al receptor vimentina que 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. La vimentina induce la señalización e invasión del endotelio cerebral encontrándose en cepas productoras de meningitis (Chi *et al.*, 2010). *IbeA* también se ha relacionado con la formación de biopelículas que ayudan a la supervivencia de las bacterias y la capacidad invasiva (Wang *et al.*, 2011).
- Usp (Proteína Específica Uropatogénica): La proteína Usp parece actuar como una bacteriocina. Las bacteriocinas son un grupo heterogéneo de moléculas con actividad antimicrobiana producidas por ciertas cepas virulentas, capaces de lisar otras cepas no virulentas, lo que permite a la bacteria poseedora de la proteína Usp competir contra otras cepas que ocupan el mismo nicho (Parret y De Mot, 2002).
- Colicinas: Las colicinas son un grupo de moléculas antimicrobianas capaces de lisar otras cepas entéricas, favoreciendo la supervivencia de las bacterias que las producen (Gratia, 1925).

Tabla 1. Factores de virulencia de *E. coli*. Modificada de Dale *et al.*, 2015.

Factor de Virulencia	Gen
Adhesinas	
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>
Sistemas de adquisición de Hierro	
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>
Protectinas e invasinas	
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>
Toxinas	
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>
Otras	
Beta-glucoronidasa	<i>uidA</i>
Síntesis de colibactina	<i>clb & clbB</i>
Proteína uropatogénica específica	<i>usp</i>
Variante de flagelina	<i>H7 fliC</i>
Maltose and glucose-specific PTS transporter subunit IICB	<i>malX</i>
Marcador de isla de patogenicidad	<i>malX</i>
D-serina desaminasa	<i>DsdA</i>

1.4 Resistencia a antibióticos.

En la última década 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. La resistencia bacteriana a antibióticos se puede definir como la condición microbiológica caracterizada por la capacidad natural o adquirida por parte de una cepa bacteriana de permanecer refractaria a los efectos bactericidas o bacteriostáticos de un antibiótico (Bush *et al.*, 1995). Podemos clasificar la resistencia como natural o adquirida (Marin y Gudiol, 2003). La resistencia natural o intrínseca es característica de cada especie, género o grupo bacteriano, por lo que se trata de una resistencia predecible. Estos mecanismos dependen de funciones codificadas en el cromosoma bacteriano. La resistencia adquirida es variable y se define cuando en una especie que es naturalmente sensible a un antibiótico aparecen cepas resistentes. La adquisición de resistencia puede originarse por mutaciones en genes cromosómicos, o por la adquisición de material genético exógeno en forma de elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones e integrones que son portadores de genes de resistencia (Kong *et al.*, 2010).

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 empírico adecuado y un aumento de la morbimortalidad y los costes asociados.

1.4.1 Mecanismos de resistencia a Betalactámicos.

La resistencia de los bacilos gramnegativos a los antibióticos betalactámicos puede ser debida a varios mecanismos que en ocasiones se pueden interrelacionar. Los principales mecanismos de resistencia a betalactámicos son:

- Alteraciones de la permeabilidad: La membrana externa en las bacterias gramnegativas dificulta el paso de sustancias hidrofílicas, como los antibióticos betalactámicos, los cuales necesitan los poros proteicos llamados porinas para acceder al interior de la célula bacteriana. La modificación estructural o disminución en su número provoca una menor penetración de estos fármacos al espacio periplásmico, y dificulta el acceso a su diana (Marín y Gudiol, 2003).
- Alteraciones en el lugar de acción: Los betalactámicos deben unirse a las Proteínas Fijadoras de Penicilinas (PBP, "*Penicillin Binding Proteins*"), enzimas implicadas en la fase final de la formación de la pared celular, para ejercer su acción. Cualquier alteración a este nivel reduce la afinidad del antibiótico por su diana. Estos cambios suelen deberse generalmente a mutaciones, recombinaciones o la adquisición de nuevas PBP y se produce principalmente en bacterias grampositivas (Marín y Gudiol, 2003).
- Expresión de bombas de eliminación activa: Se basan en proteínas transportadoras encargadas de expulsar las sustancias tóxicas hacia el exterior, por lo que cuando se activan se produce la expulsión del antibiótico al exterior del microorganismo. Estos mecanismos no suelen producir resistencia de alto grado por sí mismas y suelen actuar de forma sinérgica con otros mecanismos de resistencia (Sun *et al.*, 2015).
- Producción de enzimas: La producción de betalactamasas es el mecanismo de resistencia más importante frente a los antibióticos

betalactámicos (Cantón *et al.* 2008). Son enzimas cuya síntesis está controlada por genes cromosómicos o transferidos por plásmidos. Dada su importancia como mecanismo de resistencia a betalactámicos en *E. coli*, a continuación, describiremos los aspectos generales sobre las betalactamasas.

1.4.1.1 Betalactamasas: Características y clasificación.

La primera betalactamasa fue descrita en 1940 por Abraham y Chain (Abraham y Chain, 1988). Las betalactamasas son enzimas con una masa molecular de aproximadamente 29 kDa que hidrolizan el enlace amida del anillo betalactámico de penicilinas y otros betalactámicos, dando lugar a compuestos sin actividad antibacteriana. Estas enzimas tienen cierto grado de homología de secuencia con las PBP de la pared bacteriana y parecen haber evolucionado a partir de éstas. Esta evolución habría sido favorecida por presión selectiva ejercida por microorganismos del entorno productores de betalactamasas (Ghuysen, 1991).

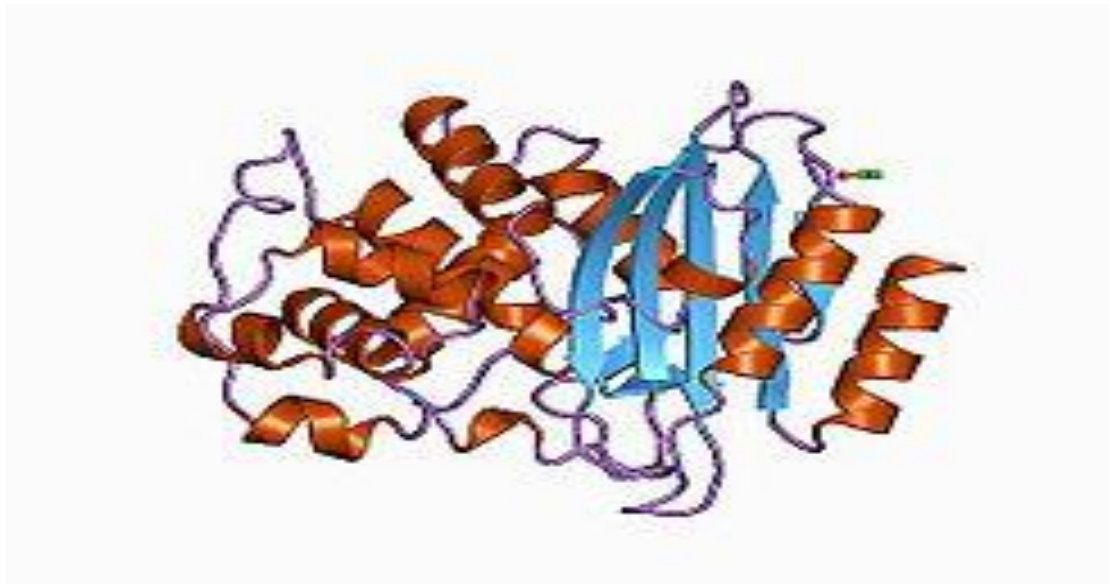


Figura 5. Estructura tridimensional de una betalactamasa. Extraído de: <http://www.ebi.ac.uk/pdbe>

El mecanismo de acción de las betalactamasas consiste en la hidrólisis del anillo betalactámico, en la mayoría de los casos mediante la acción de la serina

de su zona activa (serinaenzimas), o en algunos casos mediante la utilización de iones de zinc (Livermore *et al.*, 1996). La enzima se une al antibiótico mediante un enlace no covalente reversible y posteriormente se produce una acilación entre el grupo éster del anillo betalactámico con el grupo hidroxilo libre del residuo de serina del centro activo de la enzima. Finalmente, la hidrólisis del éster libera la enzima activa y el antibiótico inactivado.

Se han propuesto diferentes clasificaciones de las betalactamasas, entre las que destacan:

- Clasificación de Ambler. Se basa en la secuencia aminoacídica y divide las betalactamasas en cuatro clases (A-D). Las betalactamasas de los grupos A, C y D poseen serina en su centro activo y las pertenecientes al grupo B poseen zinc (se denominan metalobetalactamasas).
- Clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros. Se basa en características funcionales que incluyen el perfil de sustrato de hidrólisis y el patrón de inhibición. Según esto clasifican las betalactamasas en cuatro grupos (1-4). Dentro del grupo 2 existen seis subgrupos (a-f) (Bush y Jacoby, 2010).

Desde que se describió la primera betalactamasa en 1940 estas enzimas han aumentado en número y se han diversificado de forma alarmante. En la actualidad se han descrito más de 300 betalactamasas con distintas afinidades frente a los diferentes grupos de betalactámicos. Entre las que han tenido un mayor impacto clínico y epidemiológico destacan las Betalactamasas de espectro extendido (BLEE). A continuación, describiremos sus características y principales familias.

1.4.1.2 Betalactamasas de espectro extendido (BLEE).

Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) son enzimas producidas por bacilos gramnegativos fundamentalmente enterobacterias, con más frecuencia por *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*. La mayoría de las BLEE se engloban en el subgrupo 2be de la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros. Las

I. INTRODUCCIÓN

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 (cefoxitina) o los carbapenems (imipenem y meropenem) (Calvo *et al.*, 2011). 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 (Sougakoff *et al.*, 1988). TEM-24 es una de las enzimas más importantes de esta familia por su frecuencia. De las betalactamasas tipo TEM derivan también las llamadas IRT ("*Inhibitor Resistant TEM Enzymes*") (Chaibi *et al.*, 1999), que no son inactivadas por inhibidores de betalactamasas como el ácido clavulánico o sulbactam. Estas enzimas, aunque son nombradas como TEM y un número, no son consideradas BLEE, puesto que no tienen actividad frente a cefalosporinas. Se han descrito, además, las llamadas CMT ("*Complex Mutant TEM Enzymes*") (Robin *et al.*, 2007) que comparten características de BLEE e IRT, e igualmente se nombran con las letras TEM más un número.
- **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 (Fernandez-Rodriguez *et al.*, 1992). 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 1987 (Gutmann *et al.*, 1987) y SHV-12 fue descrita durante la realización de un estudio multicéntrico llevado a cabo en Suiza en 1997 (Nuesch-Inderbinnen *et al.*, 1987). Desde entonces se han diseminado por todo el mundo (Liakopoulos *et al.*, 2016).

- **BLEE tipo CTX-M:** Las BLEE de tipo CTX-M fueron descritas, casi simultáneamente, en Alemania y Argentina en 1989 (Bauernfeind *et al.*, 1990). 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 (Bonnet, 2004). 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_{CTX-M}*, por lo que se piensa que estos genes originarios habrían saltado del cromosoma para integrarse en distintos plásmidos y diseminarse (Bonnet, 2004). 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_{CTXM-14}* (Olson *et al.*, 2005). 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

I. INTRODUCCIÓN

contienen el gen *bla*_{CTXM-15} (Cantón *et al.*, 2008). 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 (Sabaté *et al.*, 2000; Simarro *et al.*, 2000).

Tabla 2. Clasificación de las BLEE tipo CTX-M en grupos en función de su secuencia aminoacídica y enzimas más representativas de cada grupo. Modificado de Bonnet, 2004.

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 y -41.

- **BLEE tipo OXA:** Pertenece a la clase molecular D y al grupo funcional 2d. Confiere resistencia a penicilinas y cefalosporinas y debe 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* (Rossolini *et al.*, 1999)), 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.

1.4.2 Mecanismos de resistencia a fluorquinolonas.

El extenso uso de las quinolonas ha generado la aparición de bacterias resistentes a las mismas. Someramente, los principales mecanismos implicados en esta resistencia son:

- Alteraciones en las dianas de las quinolonas (ADN girasa y topoisomerasa IV): En *Escherichia coli*, la modificación de la diana es determinada por mutaciones en *gyrA* o *parC* (genes que codifican para la subunidad A de la ADN-girasa y la topoisomerasa IV, respectivamente), y en menor medida en *gyrB* o *parE* (genes que codifican para la subunidad B de la ADN-girasa y la topoisomerasa IV, respectivamente) (Willmott, 1993).
- Disminución en la acumulación del antibiótico en el interior bacteriano por impermeabilización de la membrana (pérdida de porinas o alteraciones del lipopolisacárido): La pérdida de permeabilidad de membrana es otra de las formas de resistencia de bajo nivel a fluoroquinolonas, por mutaciones en genes estructurales o reguladores que hacen que disminuya el número efectivo de porinas presentes en la membrana externa de las bacterias gramnegativas (Sanders, 1990). En *Escherichia coli* se han descrito mutaciones en los genes *ompC* y *ompF* (Rodríguez-Martínez, 2005).
- Expresión de sistemas de expulsión activa: Otro factor que afecta a la resistencia a fluoroquinolonas son mutaciones en los genes que codifican bombas de expulsión de transporte activo debido a su expresión o sobreexpresión. El gen *acrB*, codifica en *E. coli* bombas de expulsión activas de quinolonas (Muñoz-Bellido *et al.*, 1999). Parece que la simple expresión de bombas de expulsión activa tiene un efecto limitado sobre la resistencia a fluoroquinolonas, pero su expresión basal sí contribuye de modo notable a la resistencia causada por otros mecanismos.

I. INTRODUCCIÓN

- Resistencia plasmídica a fluoroquinolonas (RPFQs): Se han descrito diversos determinantes plasmídicos de resistencia a fluoroquinolonas que disminuyen la sensibilidad a estos antibióticos, facilitando la selección de mutantes resistentes de alto nivel (Rodríguez-Martínez, 2011). Este mecanismo se asocia principalmente con proteínas Qnr y aac (6) -Ib-cr y de forma menos frecuente con los genes *oqxAB* y *qepA* (Albert *et al.*, 2014). La RPFQ abre la posibilidad de una rápida expansión de la resistencia a estos antimicrobianos, más aún con el extenso uso que se hace de los mismos (Rodríguez-Martínez, 2005).

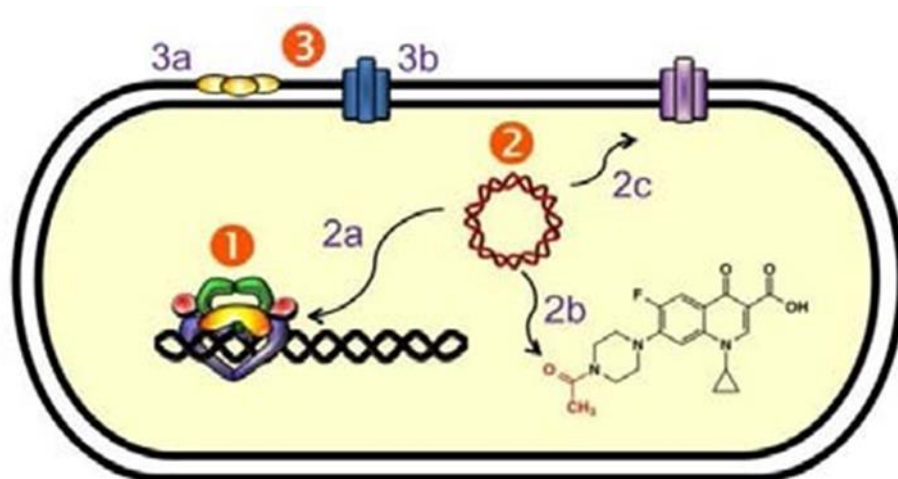


Figura 6. Mecanismos de resistencia a quinolonas. (1) Resistencia por mutaciones en la girasa o en la topoisomerasa IV debilitan la interacción enzima-quinolona. (2) Resistencia plasmídica. (2a) Proteínas Qnr disminuyen la unión DNA-topoisomerasa y protegen al complejo DNA-enzima de las quinolonas. (2b) AAC(6')-Ib-cr acetila el nitrógeno libre de ciprofloxacino y norfloxacino, disminuyendo su efectividad. (2c) Bombas de expulsión de codificación plasmídica disminuyen la concentración de quinolonas en la célula. (3) Resistencia cromosómica. (3a) Alteración de porinas disminuye la penetración del antibiótico. (3b) Hiperexpresión de bombas de expulsión de codificación cromosómica disminuye la concentración del antibiótico en el interior de la célula. Figura extraída de Aldred *et al.*, 2014.

1.5. Tipificación de cepas ExPEC.

La tipificación de cepas ExPEC es importante epidemiológicamente para el reconocimiento de brotes de infección, para la detección de la transmisión cruzada de patógenos nosocomiales, en la detección de fuentes de infección y particularmente, en el reconocimiento de cepas virulentas de un microorganismo determinado (Corvalán *et al.*, 2003). La identificación a nivel de especie y el fenotipo de resistencia puede servir, en algunos casos, para establecer la relación entre los aislamientos. Sin embargo, en otros casos es necesario utilizar métodos con mayor capacidad de discriminación, basados en técnicas moleculares principalmente para el estudio de brotes.

1.5.1. Métodos de tipificación de cepas ExPEC.

Existen diversos métodos para clasificar las cepas de *E. coli* en grupos específicos (tipos o variedades). Estos basan en el estudio de características fenotípicas o genotípicas. Hasta la aparición de los métodos genotípicos la tipificación se realizaba según algunas propiedades fenotípicas como el perfil antigénico (serotipo), características metabólicas (biotipo) o de resistencia antibiótica (antibiotipo). Sin embargo, muchos de estos métodos fenotípicos no son suficientes para establecer diferencias o similitudes concluyentes entre microorganismos, para ello actualmente existen otros métodos como son Electroforesis de Enzimas Multilocus (MLEE), métodos de tipificación basados en Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que permiten determinar el grupo filogenético, “*Multilocus Sequence typing*” (MLST), Clonotipado (CH), Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) y Secuenciación del genoma completo (SGC).

Serotipado.

En 1947 Kauffmann describió un método útil para clasificar cepas de *E. coli* basándose en la determinación de los antígenos superficiales O (somáticos de la membrana externa de la pared celular), K (capsulares) y H (flagelares). Los antígenos O y H se determinan mediante técnicas de aglutinación, mientras que el antígeno K suele determinarse mediante contraelectroforesis

(Kauffmann, 1947). A principios de los años setenta, esta forma de clasificación serológica se utilizó por primera vez para clasificar las cepas de *E. coli* aisladas de seres humanos y otros animales permitiendo hacer una aproximación al estudio de la clonalidad, detectando la presencia de brotes y facilitando la identificación de algunas de las cepas de *E. coli* a las que hoy nos referimos como ExPEC (Bettelheim *et al.*, 1977; Manges *et al.*, 2001).

Electroforesis de Enzimas multilocus (MLEE).

El fundamento de MLEE se basa en diferentes movilidades electroforéticas (ME) de múltiples enzimas metabólicas nucleares. Los alelos en cada *locus* definen la ME de sus productos, ya que diferentes secuencias de aminoácidos entre enzimas dan lugar a diferentes movilidades y bandas distintas cuando se revelan en un gel. La relación de aislamientos puede entonces ser visualizada con un dendrograma generado a partir de la matriz de pares de diferencias entre los tipos electroforéticos. Este método, aunque diferente en cuanto a fundamento, puede considerarse la base de uno de los métodos más utilizados actualmente para la tipificación clonal de *E. coli* conocido como “*Multilocus Sequence typing*” (MLST).

Métodos de tipificación basados en Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para determinar el grupo filogenético.

En el año 2000, un método de PCR *triplex* fue desarrollado por Clermont *et al.* permitiendo una rápida asignación de los grupos filogenéticos de *E. coli* que se correlacionan con las diferencias existentes entre cepas comensales y patógenas (Clermont *et al.*, 2000). Esta metodología es mucho más rápida, sencilla y económica que MLEE, y permitió separar los aislados de *E. coli* en cuatro filogrupos principales (A, B1, B2, D). La comprensión de la filogenia de *E. coli* ha mejorado significativamente y actualmente, un nuevo enfoque de PCR ha permitido clasificar los aislados en 8 filogrupos de *E. coli* (A, B1, B2, D, E, F, G y Clade 1) (Clermont *et al.*, 2013).

“Multilocus Sequence typing” (MLST).

A medida que los métodos de secuenciación de ADN se hicieron más asequibles, reemplazaron a MLEE como tecnologías de referencia para el análisis filogenético dada su mayor capacidad discriminativa. El MLST se basa en la amplificación y secuenciación de, entre 7 y 8, genes “housekeeping” seleccionados y, debido a su enfoque estandarizado y mayor resolución en comparación con el filogrupo, permitió un análisis más detallado de los linajes ExPEC (Maiden *et al.*, 1998; Wirth *et al.*, 2006). Separa los aislados en distintos tipos de secuencia (STs) que se definen como aislamientos con perfiles alélicos idénticos, y en complejos clonales más amplios (CCs), que se definen como un grupo de al menos tres STs cada uno diferente de los otros por no más de 1 de los 7 u 8 alelos (Salvador *et al.*, 2012).

Existen dos esquemas de MLST. El esquema de Achtman (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>) utiliza las secuencias de fragmentos internos amplificados por PCR de 7 genes altamente conservados (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, y *recA*) que definen el perfil alélico o secuencia tipo (ST) para cada cepa. Mientras que el esquema que ha sido desarrollado por el Instituto Pasteur se basa en la secuenciación de 8 genes (*dinB*, *icdA*, *pabB*, *polB*, *putP*, *trpA*, *trpB* y *uidA*) (www.pasteur.fr/mlst). De los dos esquemas de MLST disponibles para *E. coli*, el esquema Achtman es el más utilizado en la actualidad (Clermont *et al.*, 2015).

Aunque MLST es el método más utilizado actualmente a nivel mundial para determinar las relaciones filogenéticas en cepas ExPEC, la potencia de discriminación de esta técnica es limitada. Aislamientos pertenecientes a el mismo ST puede ser genéticamente distintos y sus comportamientos patotípicos pueden ser variables.

Clonotipado (CH).

En 2012, Weissman *et al.* describieron un nuevo método, la tipificación CH, que deriva su nombre del análisis de los genes *fumC* y *fimH*. Demostraron

que este enfoque no sólo puede predecir el respectivo perfil basado en MLST con hasta un 95%, sino que también permite que los ST grandes se dividieran en un número de subgrupos clonales más pequeños. Aunque CH no reemplazará a MLST como una herramienta para los estudios filogenéticos, hay claras ventajas de esta técnica, particularmente en relación con la clasificación de clones dentro de STs y la reducción de costos al realizar evaluaciones preliminares en colecciones de muestras clínicas mayores (Weissman *et al.*, 2012; Banerjee *et al.*, 2013).

Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).

La electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) proporciona la mayor sensibilidad en cuanto al análisis filogenético de cepas ExPEC. Esta sensibilidad puede ser necesaria para la investigación de brotes. En este método, el ADN genómico de *E. coli* es digerido con una enzima de restricción de baja frecuencia de corte. Posteriormente, los fragmentos resultantes son separados en un gel de agarosa sometido a un campo eléctrico cuya polaridad cambia a intervalos variables. El campo pulsado permite una separación clara de fragmentos de ADN de gran tamaño molecular (10-800 kb), los patrones resultantes de la electroforesis se comparan visualmente o utilizando programas informáticos especializados.

Existen plataformas internacionales estandarizadas como PulseNet, coordinada por el Centro Europeo de Control de Enfermedades y Prevención (ECDC) que permiten la comparativa de los resultados de PFGE. No obstante, la naturaleza indefinida de las diferencias observadas entre las bandas y el trabajo intenso que requiere la técnica, está convirtiendo con rapidez la PFGE en una técnica obsoleta (Dale *et al.*, 2015).

Secuenciación del genoma completo (SGC).

En última instancia, la secuenciación del genoma completo (SGC) mediante secuenciación masiva ofrece soluciones definitivas y semicuantitativas de comparación entre aislamientos. La principal limitación de estas técnicas es su elevado coste, no obstante, a medida que el coste de la secuenciación masiva

disminuya, es probable que se utilice rutinariamente en tareas de vigilancia epidemiológica en la práctica clínica (Dale *et al.*, 2015).

1.5.2. Diversidad filogenética en ExPEC.

A lo largo de la evolución, *E. coli* ha divergido formando diferentes grupos filogenéticos o filogrupos con características propias. Este hecho fue descubierto al analizar 72 aislados de *E. coli* de referencia (ECOR) mediante MLEE en diversos estudios. En 1987, Selander *et al.* analizaron 35 *loci* de cada uno de los aislados de referencia. Los resultados obtenidos definían seis grupos filogenéticos principales A, B1, B2, C, D y E (Selander y Ochman, 1988). En un estudio posterior, realizado en 1990, se analizaron 38 *loci* y el resultado fue de cuatro grupos principales A, B1, B2 y D y algunas secuencias no clasificadas que pertenecían al grupo E. El árbol obtenido sugería que el grupo A, el cual incluía a *E. coli* K-12, fue de los primeros en divergir junto con los grupos B1 y B2. El grupo C, el cual se definía en el primer análisis, se consideró como un grupo divergente del grupo B1 (Chaudhuri y Henderson, 2012).

En el año 2008, el grupo de Jaureguy describió el grupo filogenético F después de estudiar la diversidad filogenética de 235 aislados de *E. coli* mediante el análisis por MLST (Jaureguy *et al.*, 2008). Todos estos estudios permitieron realizar una sólida historia filogenética de *E. coli*, en la cual la primera división separó en una rama del árbol filogenético a las cepas del grupo B2 y F, y otra rama con el resto de los aislados. Tras una segunda división, emergió otra rama con cepas del grupo D, seguida del grupo E. Por último, los grupos A y B1 aparecían como hermanos. Se observó, además, la alta diversidad genética del grupo B2, lo cual se suponía que era debido a su temprana divergencia (**Figura 7**) (Jaureguy *et al.*, 2008; Tenailon *et al.*, 2010). A pesar de que el grupo C no está incluido en esta historia filogenética, diversos estudios sitúan a este grupo próximo al grupo B1 (Clermont *et al.*, 2013).

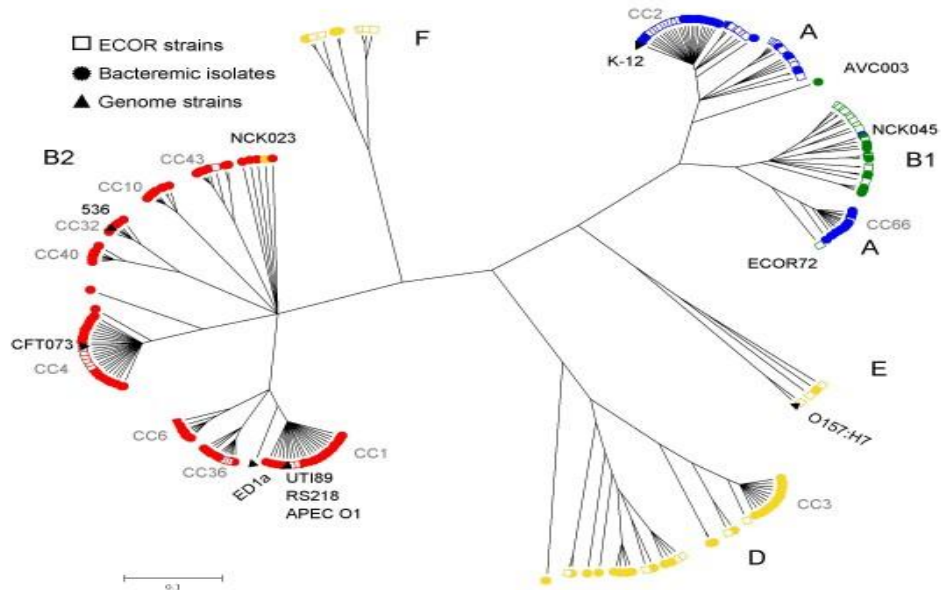


Figura 7. Diversidad filogenética de *E. coli*. Figura extraída de Jauregui *et al.*, 2008.

En líneas generales los grupos filogenéticos A, B1, B2 y D se consideran los grupos principales. Las cepas del grupo filogenético C, están estrechamente relacionadas con cepas del grupo filogenético B1, y las cepas del grupo filogenético F están relacionadas con cepas B1 y D (Tenaillon *et al.*, 2010). *E. coli* O157:H7 es la cepa más conocida del grupo filogenético E (Chauduri y Henderson, 2012).

En un trabajo realizado por Picard *et al.* se observó que los aislados procedentes de muestras fecales de personas sanas pertenecían con menos frecuencia a los filogrupos D y B2 que los procedentes de aislados causantes de infección (Picard *et al.*, 1999). Así, las cepas de *E. coli* causantes de infecciones extraintestinales se han relacionado generalmente con el filogrupos B2 y, en menor medida, con el grupo D. Estas cepas presentan un mayor número de factores de virulencia, por lo que se les consideran cepas ExPEC. En general, se acepta que los aislados comensales pertenecen a los grupos filogenéticos A y B1 y carecen de los factores de virulencia presentes en los aislados patógenos intestinales y extraintestinales y que los aislados ExPEC (Russo y Jhonson, 2000) se asocian principalmente al filogrupos B2 y en menor medida al D (Johnson *et al.*, 2001). Aunque normalmente la infección está producida por cepas del grupo B2,

se calcula que en un 20% de los casos está causada por cepas de otros filogrupos. Este hecho sugiere la existencia de otros factores concomitantes como la concentración bacteriana o la presencia otros factores no conocidos pero necesarios para la infección (Prats, 2013).

También se han observado diferencias según las condiciones socioeconómicas. En países desarrollados, como Australia, Estados Unidos y países europeos, las cepas del filogrupo B1 se relacionan con menor frecuencia a ExPEC que cepas de otros grupos filogenéticos. En contraste, cepas de los grupos filogenéticos A y B1 parecen ser predominantes en personas que viven en países en vías de desarrollo (Gordon y Cowling, 2003; Li *et al.*, 2010; Tenaillon *et al.*, 2010).

El nivel de resistencia a antimicrobianos parece estar inversamente relacionado con la virulencia. Johnson *et al.* encontraron diferencias entre los filogrupos y los genes de virulencia de aislados de *E. coli* sensibles y resistentes a fluorquinolonas causantes de ITU. Entre los aislados resistentes a fluorquinolonas predominaron los grupos filogenéticos A (38%) y B1 (38%), seguidos del D (25%). No encontraron aislados pertenecientes al filogrupo B2. No obstante, entre los aislados sensibles a fluorquinolonas, el porcentaje de aislados pertenecientes al filogrupos B2 se incrementó hasta el 25% (Johnson *et al.*, 2003). Estos resultados han sido similares a otros estudios y apoyan la teoría que la adquisición horizontal de mecanismos de resistencia está comúnmente asociada a un coste biológico y una pérdida de “fitness”, es decir, que una bacteria que adquiriese una mayor resistencia a nivel genético perdería virulencia y viceversa (Andersson y Hughes, 2010).

1.5.3. Diversidad clonal de ExPEC.

La palabra "clon" se utiliza a menudo para describir un organismo que descende de una cepa precursora común por reproducción no sexual, con características fenotípicas o genotípicas caracterizadas por un método de tipificación de la cepa que muestra que pertenece al mismo grupo (Riley, 2014). De acuerdo con esta definición, 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 es el más utilizado en la actualidad (Clermont *et al.*, 2015). 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. De acuerdo con Riley, ST69, ST73, ST95, ST131 y ST393 son los linajes de *E. coli* que más se asocian a infecciones extraintestinales, especialmente a ITUs y bacteriemias (Riley, 2014).

1.5.3.1. *E. coli* ST69 (grupo clonal A (CgA)).

En un estudio realizado en California entre octubre de 1999 y enero de 2000, se analizaron 255 aislamientos de *E. coli* de muestras de orina consecutivas de 228 mujeres con ITU no complicada adquirida en la comunidad. De 55 aislamientos que fueron resistentes a cotrimoxazol, 28 (51%) compartían un patrón de 4 bandas electroforéticas idéntico basado en tipificación ERIC2-PCR, que se describió como CgA (Manges *et al.*, 2001). Posteriormente, mediante MLST, se obtuvo que las cepas del CgA pertenecían a el complejo ST69 (Tartof *et al.*, 2005). Las cepas ST69 pertenecen al grupo filogenético D e incluyen los serogrupos O11, O15, O17, O44, O73, O77, O86, O125ab y O25b (Tartof *et al.*, 2005; Colomer-Lluch *et al.*, 2013; Skjot-Rasmussen., 2013). El prototipo de cepa

ST69 tiene un perfil de FV que se caracteriza por presentar *papGII*, *iha*, *iutA*, *kpsM II*, *traT* y *ompT*.

Posteriormente a estos primeros estudios de las cepas ST69 se han descrito a nivel mundial en infecciones comunitarias y relacionadas con la asistencia sanitaria (Manges *et al.*, 2006; Dias *et al.*, 2009). Las cepas ST69 que expresan BLEEs no son frecuentes, pero se ha encontrado una asociación clara entre el CgA y la resistencia a cotrimoxazol (Manges *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2011).

1.5.3.2. *E. coli* ST73 O6: H1.

Las cepas ST73 pertenecen al filogrupo B2 de ECOR y el serotipo O6: H1 (Johnson *et al.*, 2008). Fue el ST más común entre los principales grupos clonales de ExPEC aislados de urocultivos en un estudio en el Reino Unido (Gibreel *et al.*, 2012) y el tercero en frecuencia entre las cepas productoras de bacteriemia procedentes de pacientes ingresados en un hospital de San Francisco y 10 hospitales de Paris (Adams-Sapper *et al.*, 2013; Brisse *et al.*, 2013). Se ha descrito como uno de los tipos ExPEC predominantes que expresan BLEEs de tipo CTX-M-15 de El Cairo, Egipto (Fam *et al.*, 2011). Se aísla de infecciones comunitarias y relacionadas con los cuidados sanitarios.

Se han aislado cepas de ST73 con perfiles de PFGE estrechamente relacionados en humanos, perros y gatos lo que sugiere la transmisión cruzada entre diferentes especies de este genotipo (Johnson *et al.*, 2008). Posee un perfil de FV característico que consiste en la presencia de *papC*, *papEF*, *papG*, *sfa/foc*, *fimH*, *hra*, *hlyA*, *cnf1*, *pic*, *vat*, *iron*, *fyuA*, *kpsM II*, *usp*, and *ompT* (Martínez-Medina *et al.*, 2009).

1.5.3.3. *E. coli* complejo ST95.

Las cepas ExPEC ST95 pertenecen al grupo filogenético B2, y serotipos O1: K1: H7, O2: K1: H7 y O18: K1: H7 (Weissman *et al.*, 2006). El perfil de FV característico de este clon consiste en la presencia de *fimH*, *fimAvMT78*, *papG II*,

iucD, *iroN*, *kpsM II-K1*, *cvaC*, *iss*, *traT*, *malX*, *usp*, and *tsh* (Mora *et al.*, 2013). Diversos estudios han demostrado la predominancia de ST95 en infecciones invasivas como el estudio realizado por Bert *et al.* sobre muestras de sangre y de líquido ascítico (Bert *et al.*, 2010).

ST95 no parece un clon especialmente resistente ya que diferentes estudios demuestran una frecuencia relativamente baja de multirresistencia en este linaje (Manges *et al.*, 2008; Adams-Sapper *et al.*, 2013; Gibreel *et al.*, 2013). Aunque el primer aislamiento de ST95 registrado en la base de datos MLST se produjo en 1941 (Mora *et al.*, 2013), las bajas tasas de resistencia a antibióticos podrían sugerir que ST95 es una cepa pandémica de reciente introducción y que no ha sido sometida a la presión selectiva de los antibióticos (Riley *et al.*, 2014).

1.5.3.4. *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 (Woodford *et al.* 2004; Pitout *et al.*, 2007). Debido a que estos patrones de PFGE no cumplían los criterios de relación descritos por Tenover *et al.* (Tenover *et al.*, 1995), 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 la pertenencia al grupo filogenético B2, mismo perfil en ERIC2 PCR, serotipo O25:H4, resistencia a ciprofloxacino y la secuencia tipo ST131 (Coque *et al.*, 2008; Nicolas-Chanoine *et al.*, 2008).

Más recientemente, las variantes de ST131 pertenecientes a los serotipos O16:H5 y NT:H4 se han descrito en Europa, Japón y Asia del Sur (Matsumura *et*

al., 2012; Dahbi *et al.*, 2013; Olesen *et al.*, 2013). 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* (Johnson *et al.*, 2010). 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 (Banerjee *et al.*, 2014; Nicolas-Chanoine *et al.*, 2014; Petty *et al.*, 2014; Schembri *et al.*, 2015; Stoesser *et al.*, 2016).

La mayoría de estudios describen cepas ST131 que típicamente producen BLEE 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* (Nicolas-Chanoine *et al.*, 2008). A pesar de esto, en la actualidad se ha determinado que la resistencia entre cepas ST131 depende de parámetros como el tipo de población, el tipo de adquisición y el foco de la infección. Esta variabilidad se refleja en un estudio 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 (Leflon-Guibout *et al.*, 2008). 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 (Riley *et al.*, 2014).

En cuanto al origen de este clon pandémico no se conoce por completo. La cepa más temprana que se ha descrito data de 1985 (Johnson *et al.*, 2010). En Francia se identificó en 1994 (Clermont *et al.*, 2009) y un análisis retrospectivo de aislados de *E. coli* productores de BLEEs en Canadá identificó ST131 ya en 2003 (Pitout *et al.*, 2009).

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

I. INTRODUCCIÓN

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 (Banerjee *et al.*, 2014).

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 distintivos (Johnson *et al.*, 2013; Price *et al.*, 2013). 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 (Johnson *et al.*, 2013). El linaje ST131 *fimH30* apareció por primera vez a principios de la década de 2000, y luego se expandió rápidamente a finales de década (Price *et al.*, 2013). 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* (Price *et al.*, 2013).

A finales de los años 2000, varios investigadores observaron que cepas de *E. coli* ST131 con BLEE presentaron diferentes pulsotipos. Algunos de estos aislamientos contenían *blaCTX-M-14*, eran sensibles a fluoroquinolonas, y mediante serotipado se comprobó que pertenecían al serogrupo O16: H5 y al linaje *fimH41* (Peirano *et al.*, 2014). 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 (Johnson *et al.*, 2014). Dos nuevos linajes de ST131 con el serotipo O25b: H4 que presentan distintos pulsotipos a los del grupo principal *fimH30* se han descrito recientemente (Peirano *et al.*, 2014). Estos aislados pertenecen a los linajes *fimH22* y *fimH35* y también se asocian con *blaCTX-M-15* y resistencia a fluoroquinolonas. (**Figura 8**)

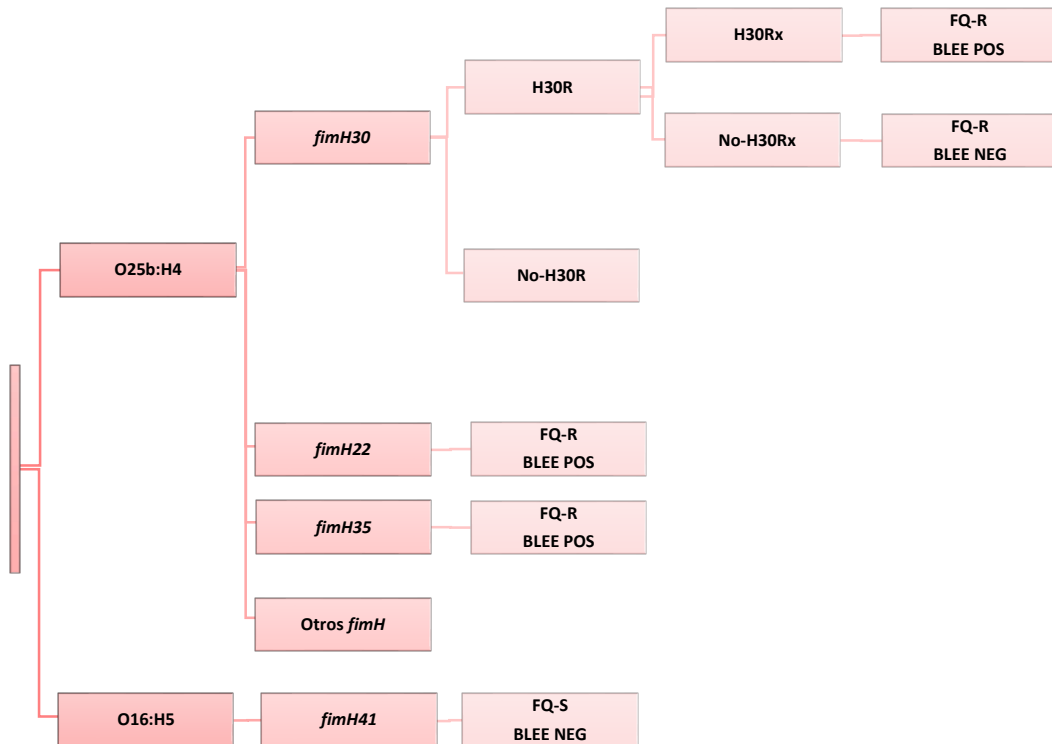


Figura 8. Estructura poblacional del linaje ST131 *fimH30* de *Escherichia coli*, sublinajes H30 y otros linajes asociados con ST131. FQ-R, resistente a fluoroquinolonas; FQ-S, sensibles a fluoroquinolonas. Modificado de Mathers *et al.*, 2016.

1.5.3.5. *E. coli* ST393 O15: K52: H1.

En el sudeste de Londres una cepa de *E. coli* fue responsable de un brote comunitario entre octubre de 1986 y octubre de 1987. 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 pertenecía al serotipo O15:K52:H1 (Phillips *et al.*, 1988). Este fue uno de los primeros brotes comunitarios descritos por cepas ExPEC, que en su mayoría produjeron ITUs, pero también casos de bacteriemia, meningitis y endocarditis. Anteriormente a este brote, el serotipo O15: K52: H1 era poco frecuente en Londres. Posteriormente, se ha aislado de infecciones tanto nosocomiales como

comunitarias en Dinamarca, España, otros países de Europa Occidental, así como en varios estados de EE.UU. (Riley *et al.*, 2014).

Antes del genotipado por MLST, las cepas del serotipo O15: K52: H1 se describieron como pertenecientes a un mismo grupo clonal basándose en su serotipo y pertenencia a un mismo grupo filogenético (grupo D), un patrón de sensibilidad común, o un SNP *fumC* específico de O15: K52: H1 (Johnson *et al.*, 2004), y un perfil similar de factores de virulencia. Por MLST, estas cepas pertenecen a ST393, un miembro del complejo clonal ST31 (Olesen *et al.*, 2009). En un estudio realizado en Canadá, el ST393 fue una de los siete principales clones detectados (Peirano *et al.*, 2012).

En España, también se ha observado el predominio de ST393 en algunos estudios como el de Blanco *et al.*, que encontraron que ST393 junto con otros dos STs (ST131 y ST69), representaron el 30% de aislamientos ExPEC que expresaban betalactamasas de espectro extendido de tipo CTX-M o el de Mora *et al.* en el que ST393 fue uno de los cinco ST más comunes productores de BLEE (Blanco *et al.*, 2011; Mora *et al.*, 2011).

1.5.3.6. Otros linajes ExPEC clonales.

Existen otros complejos clonales distribuidos ampliamente como ST10, ST12 y ST127. Estudios de genotipado de aislados seleccionados de cepas con resistencia a cefalosporinas de amplio espectro o fluoroquinolonas han identificado otros grupos clonales predominantes que parecen estar más restringidos geográficamente como ST38 en Japon y ST405 en el Reino Unido (Jones *et al.* 2008; Suzuki *et al.*, 2009).

2. Bacteriemias.

2.1. Definición de bacteriemia y clasificaciones.

Se denomina bacteriemia a la presencia de microorganismos viables en el torrente circulatorio detectada mediante hemocultivo (Loza-Fernandez *et al.*, 2003). 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 (Loza-Fernandez *et al.*, 2003).

- En las bacteriemias primarias el foco es endovascular, siendo las más frecuentes la endocarditis y las bacteriemias relacionadas con catéteres vasculares (BRC) o cuando el origen no sea claro por ausencia de foco clínico o 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 procede de una infección focal, en un órgano determinado.

El fracaso microbiológico durante y tras el tratamiento antimicrobiano de la bacteriemia, puede manifestarse como, una bacteriemia persistente, una bacteriemia de brecha o como una recidiva:

- La bacteriemia persistente se denomina a la presencia de hemocultivos positivos a partir de las 48-96 horas de tratamiento adecuado.
- La “bacteriemia de brecha” se define como la que ocurre durante un tratamiento antimicrobiano apropiado y en la que unos hemocultivos previos son negativos (Cisneros-Herreros *et al.*, 2007).
- La recidiva puede definirse como la reaparición de la infección tras finalizar un tratamiento antimicrobiano adecuado por la misma cepa. Es importante diferenciar la recidiva de la “reinfeción” por cepas distintas de la misma especie bacteriana que causó el primer episodio. Ante una recidiva siempre hay que sospechar de la presencia de cuerpos extraños endovasculares no retirados, colecciones o abscesos no drenados y la duración insuficiente del tratamiento (Cisneros-Herreros *et al.*, 2007).

Un hemocultivo positivo no siempre representa un episodio verdadero de bacteriemia. En ocasiones, los microorganismos aislados en la sangre no son los responsables del cuadro clínico del paciente, sino que proceden de la contaminación de los hemocultivos. La contaminación puede producirse durante la obtención de la sangre, con microbiota de la piel del paciente, o con microorganismos inoculados accidentalmente durante el procesamiento de los viales en el laboratorio. Aunque no existen criterios universales que permitan diferenciar una bacteriemia verdadera de una contaminación o “falsa bacteriemia” sí hay algunos factores que pueden ayudar a interpretar la importancia clínica de los hemocultivos positivos como la identidad del microorganismo aislado, el número de hemocultivos positivos y el tiempo de crecimiento o positividad.

En función del lugar de la adquisición de la bacteriemia podemos clasificarlas en nosocomiales, comunitarias y relacionadas con la asistencia sanitaria (Garner *et al.*, 1988; Friedman *et al.*, 2002).

- 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. (Friedman *et al.*, 2002)

Atendiendo al curso temporal en el que aparecen los microorganismos en la sangre, se clasifican en transitorias, intermitentes o continuas (Reimer *et al.*, 1997).

- Bacteriemias transitorias: Duran minutos u horas y suelen asociarse a manipulación mecánica o quirúrgica de tejidos infectados o con elevada colonización microbiana como son manipulaciones dentales, cistoscopias o endoscopias gastrointestinales, o en el curso de las actividades diarias, como el cepillado de los dientes, y en el inicio de infecciones agudas bacterianas como neumonía, meningitis o artritis séptica hematógena aguda.
- Bacteriemias intermitentes: Son aquellas que presentan episodios breves de bacteriemia intercalados con periodos sin bacteriemia, habitualmente asociado a colecciones no drenadas como abscesos intraabdominales, pero que también puede ocurrir en pacientes con infecciones locales, tales como la neumonía o la osteomielitis.
- Bacteriemia continua: Se observa con infecciones intravasculares, tales como la endocarditis, la tromboflebitis séptica, los aneurismas micóticos o la infección de dispositivos intravasculares.

2.2. Incidencia de las bacteriemias.

Existen enormes diferencias en la incidencia de las bacteriemias en función de su ámbito (nosocomial, comunitaria o RCS), tipo de población, diferencias interhospitalarias e incluso unidades de hospitalización. No obstante, la incidencia estimada de bacteriemias se encuentra entre 100 y 200 episodios por 100000 habitantes y año y la mortalidad se encuentra entre el 10-20%. Desafortunadamente en lo que coinciden todos estos estudios epidemiológicos

recientes es en un incremento progresivo en la incidencia de las bacteriemias a lo largo de las últimas décadas.

En un estudio poblacional de bacteriemias en los EE. UU. se estimó que la incidencia ajustada por edad y sexo era de 189 casos por 100000 personas año con una mortalidad del 13, 5% (Uslan *et al.*, 2007). Utilizando los datos de este estudio, Goto y Al-hasan realizaron una estimación del número total de episodios de bacteriemia en los EE.UU. determinando un total de 536.000 y 628.000 episodios al año y una tasa de mortalidad de 23-28 por 100000 personas-año concluyendo que la bacteriemia era la séptima causa de mortalidad en los EE.UU. También estimaron entre 1,2 y 1,4 millones de episodios de bacteriemia al año y una mortalidad entre el 13-21% en Europa basándose en tres estudios poblacionales realizados en Dinamarca, Finlandia y Inglaterra (Goto y Al-hasan, 2013).

En cuanto a la incidencia de las bacteriemias en España, Rodríguez-Creixemens *et al.* analizaron todos los episodios de bacteriemia entre los años 1985 y 2006. La incidencia se incrementó de 16 episodios a 31 episodios por 1000 ingresos, con un incremento anual de 0.83 episodios por 1000 ingresos (Rodríguez-Creixemens *et al.*, 2009). En otro estudio realizado por Rodríguez-Baño *et al.* la incidencia mínima estimada fue de 109 casos por 100000 habitantes o 14 episodios por 1000 ingresos (Rodríguez-Baño *et al.*, 2010b).

2.3. Etiología de las bacteriemias.

La etiología de la bacteriemia ha sufrido variaciones a lo largo del tiempo. En la era pre-antibiótica los principales agentes etiológicos eran los microorganismos grampositivos. Posteriormente, en los años 70 hubo un predominio de los gramnegativos y desde finales de los 80, las bacterias grampositivas predominaron de nuevo hasta el año 2000. Este hecho se pone de manifiesto en la cohorte del Hospital Gregorio Marañón en la que se observa un incremento progresivo en la proporción de bacteriemias causadas por todos los grupos de microorganismos grampositivos desde finales de los 80 y durante toda la década de los años 90. Posteriormente, en los inicios de la década del 2000 se

observa un incremento de las bacteriemias por gramnegativos igualando casi a los grampositivos y suponiendo un crecimiento en todo el periodo de 7,8 episodios/1000 ingresos en 1985 a 10,61 episodios/1000 ingresos en 2006 (Figura 9) (Rodríguez-Creixemens *et al.*, 2009).

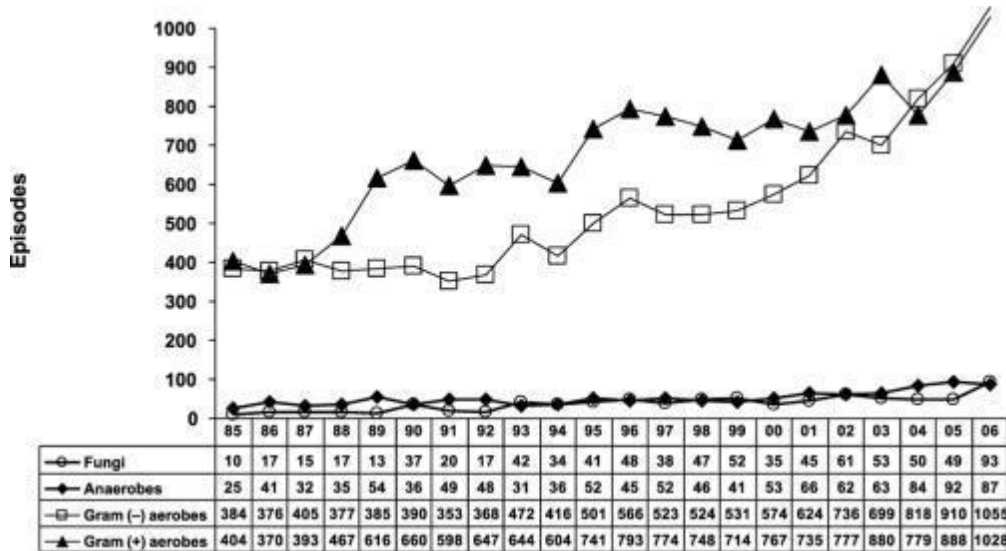


Figura 9. Evolución de la etiología de la bacteriemia de 1985-2006. Extraído de Rodríguez-Creixemens *et al.*, 2009.

La etiología de las bacteriemias por especies es muy diversa y se ve altamente influenciada por el tipo de adquisición. Por este motivo es conveniente clasificarlas por el tipo de adquisición:

- Bacteriemias comunitarias: En éstas predominan las bacterias gramnegativas (68%). El microorganismo más frecuente es *E. coli* (49%), seguido de *Streptococcus pneumoniae* (9%) y *Staphylococcus aureus* (7%) (Soogard *et al.*, 2011; Wilson *et al.*, 2011; Skogberg *et al.*, 2012).
- Bacteriemias relacionadas con la asistencia sanitaria (RAS): En la etiología de estas bacteriemias, los microorganismos gramnegativos son también más frecuentes (64%). En cuanto a microorganismos individuales, predominan *E. coli* (25%), *S. aureus* (15%) y *K. pneumoniae* (9%) (Friedman *et al.*, 2002).

- Bacteriemias nosocomiales: Los microorganismos más frecuentes en este tipo de bacteriemias son los microorganismos grampositivos (65%), como estafilococos coagulasa negativo (ECN) (31%), *S. aureus* (20%) y *Enterococcus spp.* (9%). Entre las bacterias gramnegativas, la más frecuente es *E. coli* (18%), seguida de otras enterobacterias y *P. aeruginosa* (Friedman *et al.*, 2002; Wisplinghoff *et al.*, 2004).

Con todos estos datos se deduce que *E. coli* es el principal microorganismo implicado en bacteriemias comunitarias y RAS, así como uno de los principales patógenos gramnegativos implicados en bacteriemias nosocomiales. Según el registro europeo de vigilancia epidemiológica (“*European Antimicrobial Resistance Surveillance System*”) la incidencia de *E. coli* ha aumentado en los últimos años en Europa (De Kraker *et al.*, 2012).

3. Bacteriemias por *E. coli*.

3.1. Incidencia de las bacteriemias por *E. coli*.

La incidencia de bacteriemias por *E. coli* varía en los diferentes estudios en base a características metodológicas y particularidades de las poblaciones oscilando entre 30-60 episodios por 100000 habitantes y año, normalmente a expensas de pacientes de mayor edad (≥ 65 años) y con un predominio en mujeres (Laupland *et al.*, 2008; Bou-Antoun *et al.*, 2016).

Laupland *et al.* en Canadá, describieron una incidencia de bacteriemia por *E. coli* de 30 episodios por 100000 habitantes y año. En esta serie encontraron que los niños y pacientes de mayor edad (≥ 65 años) fueron los grupos de mayor riesgo y el 60% de los episodios ocurrió en mujeres (Laupland *et al.*, 2008). Bou-Antoun *et al.* en Reino Unido observaron un incremento del 6% en la incidencia entre los años 2012 y 2014, con un aumento de la incidencia en pacientes ≥ 65 años (70,5% de los casos) y un discreto predominio en mujeres (52,4%) (**Figura 10**) (Bou-Antoun *et al.*, 2016).

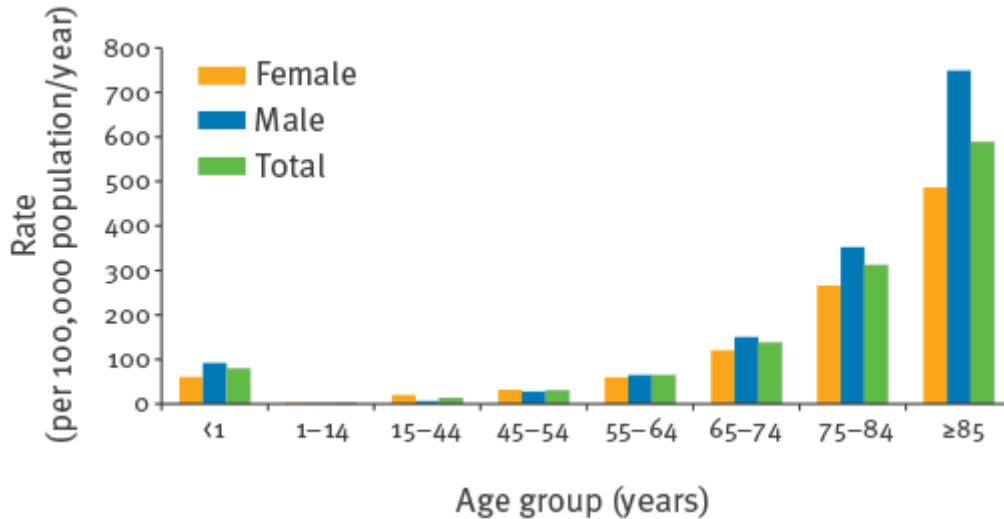


Figura 10. Incidencia según edad y sexo de bacteriemia por *E. coli* en Reino Unido. Extraído de Bou-Antoun *et al.*, 2016.

En cuanto al tipo de adquisición de la bacteriemia se observa un importante componente comunitario de las bacteriemias por *E. coli* 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 (Kennedy *et al.*, 2008; Laupland *et al.*, 2008; Bou-Antoun *et al.*, 2016).

En el estudio de Laupland *et al.* el 53% fueron bacteriemias adquiridas en la comunidad, el 32% RAS y el 15% fue de adquisición nosocomial, observándose una tendencia no estadísticamente significativa hacia un aumento de la incidencia de casos RAS entre los años 2000 y 2006 (Laupland *et al.*, 2008). Kennedy *et al.* encontraron que la tasa de adquisición de tipo comunitario se disparó al 68% de los episodios mientras que el 31,7% fueron RAS (Kennedy *et al.*, 2008).

Estos datos difieren de los del estudio multicéntrico de Bou-Auntoun *et al.* que observó que el 48,9% fueron de adquisición comunitaria, el 23,1% de adquisición nosocomial, el 15,7% de adquisición nosocomial tardía (en este estudio definieron de este modo a aquellas bacteriemias que ocurrieron más de

siete días tras el ingreso hospitalario) (Bou-Antoun *et al.*, 2016). Estas diferencias entre los distintos estudios se deben principalmente al diseño, tipo de población (pacientes que acuden a urgencias o únicamente pacientes que finalmente ingresan) y a características propias de cada región.

Respecto al foco origen de la bacteriemia la mayoría de los estudios coinciden en el predominio del foco urinario como principal origen de la bacteriemia por *E. coli* suponiendo tasas superiores al 50% de los episodios, seguido en frecuencia del origen abdominal (Olesen *et al.*, 1995; Kennedy *et al.*, 2008; Laupland *et al.*, 2008; Bou-Antoun *et al.*, 2016). Olesen *et al.*, encontraron que el 71% de los casos eran de origen urinario, y el 14% de origen biliar mientras que en la serie de Kennedy *et al.* la mitad de los casos correspondieron a infecciones de foco urinario y el 28% a infecciones de origen abdominal (Olesen *et al.*, 1995; Kennedy *et al.*, 2008). No obstante, en la extensa serie del Reino Unido el 41,1 % de los episodios fueron de origen urinario, seguidos de un 18% de los casos que se consideraron de origen desconocido, quedando relegado el foco hepatobiliar al tercer lugar con un 11,4% (Bou-Antoun *et al.*, 2016).

En España, encontramos datos consonantes con otros estudios como los del extenso estudio de epidemiología de las bacteriemias por *E. coli* realizado por Javaloyas *et al.* en el que 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%) (Javaloyas *et al.*, 2003). En esta línea, Dalmau *et al.*, también observaron que el origen más común de la bacteriemia fue el foco urinario (Dalmau *et al.*, 1996).

3.2. 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 entre los distintos estudios analizados (Olesen *et al.*, 1995) (Laupland *et al.*, 2008) (Skjot-Rasmussen *et al.*, 2013) (Abernethy *et al.*, 2015).

Los factores de riesgo que condicionan la mortalidad en bacteriemias por *E. coli* difieren de modo importante en los diferentes estudios. En la serie de Laupland *et al.* la mortalidad es del 11%, presentando un mayor riesgo con el aumento de la edad, la resistencia a ciprofloxacino, el foco distinto del urinario, y la mayor comorbilidad asociada. Del mismo modo, la adquisición comunitaria y el foco urinario se relacionaron de forma significativa con un menor riesgo de muerte (Laupland *et al.*, 2008). Mora-Rillo *et al.* observaron que la quimioterapia activa, índice de McCabe-Jackson, índice de Pitt y la presencia del gen de virulencia *fyuA* se asociaron a un aumento de la mortalidad mientras que la presencia de los genes de las fimbrias P tuvo un papel protector (Mora-Rillo *et al.*, 2015). Por otro lado, Abernethy *et al.* encontraron una tasa de mortalidad del 18,2% y entre los factores asociados independientemente con mayor mortalidad encontraron la (edad <1 año o > 44 años), foco de origen respiratorio o desconocido, resistencia a quinolonas, adquisición nosocomial y bacteriemia ocurridas durante el invierno. En cambio, el sexo femenino y las bacteriemias de foco urinario se asociaron con una disminución de la mortalidad (Abernethy *et al.*, 2015).

3.3. Epidemiología, tipo de adquisición y orígenes de la infección en bacteriemias por *E. coli* productora de BLEE. Caracterización de las BLEE.

La prevalencia de las bacteriemias por *E. coli* productoras de BLEE se han incrementado a lo largo de los años suponiendo en la actualidad un 10-15% del total, siendo fundamentalmente de adquisición nosocomial y RAS. El foco de infección predominante en la mayoría de estudios es también el urinario, pero adquieren mayor protagonismo orígenes como el abdominal.

Kang *et al.*, observaron un incremento significativo de la proporción de BLEE de 3.6% en 2006 a 14.3% en 2011 de los que el 33,0% fueron clasificados como infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria. El foco más frecuente de infección fue la infección del tracto urinario (36,1%), seguido de infecciones de las vías biliares (29,9%) (Kang *et al.*, 2013). Sin embargo, en otros estudios el

tipo de adquisición comunitaria fue el más frecuente (55,3%) (Chung *et al.*, 2012).

No obstante, también podemos encontrar estudios donde se observa un predominio de bacteriemias nosocomiales como en el realizado en el Reino Unido por Melzer y Petersen, donde el 65,2% fueron adquiridas en hospital (Melzer y Petersen, 2007). Cabe destacar que estos autores no tuvieron en cuenta el tipo de adquisición RAS y que el carácter de este estudio era hospitalario. En España, también encontramos estudios donde se observa un importante componente nosocomial y RAS de las bacteriemias por *E. coli* productor de BLEE como en el estudio realizado por Rodríguez-Baño *et al.* donde de 43 casos, 21 fueron de adquisición nosocomial y 14 RAS (Rodríguez-Baño *et al.*, 2006).

En cuanto a la caracterización de las BLEEs de cepas de *E. coli* productoras de bacteriemias existe un predominio de la familia CTX-M, especialmente del tipo CTX-M-15. En los trabajos de Pitout *et al.* y Courpon-Claudinon *et al.*, el 90% de las BLEEs pertenecían a la familia CTX-M y, de éstas, casi el 50% fueron CTX-M-15, seguidas en frecuencia por CTX-M 14. Entre las BLEEs no pertenecientes a CTX-M, el 7% fueron caracterizadas como SHV-2 (Pitout *et al.*, 2009; Courpon-Claudinon *et al.*, 2011). Sin embargo, Kang *et al.* encontraron una mayor frecuencia de CTX-M-14 (41,7%), seguido de CTX-M-15 (35%). La evolución de estos dos tipos de BLEEs a lo largo de los años en este estudio se refleja en la **Figura 11** (Kang *et al.*, 2013).

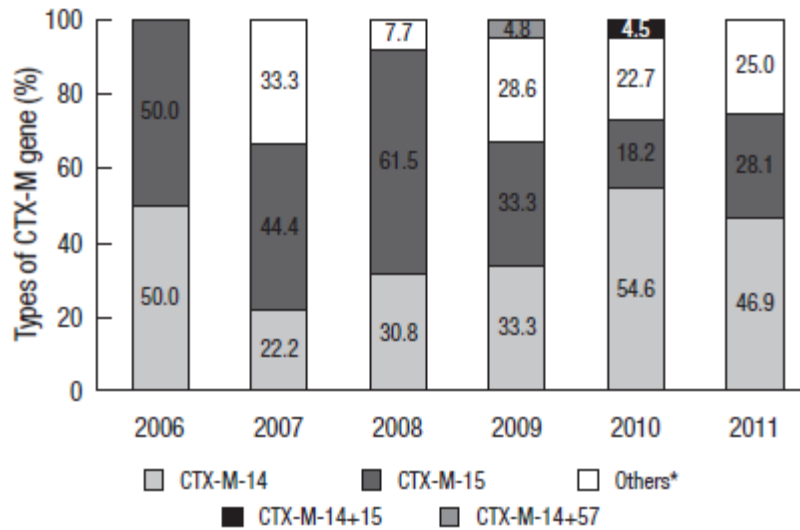


Figura 11. Cambios en la prevalencia de BLEE (%) y los tipos de genes CTX-M durante seis años de episodios bacteriemia por *E. coli* adquiridas en la comunidad. * Otros: CTX-M-3, CTXM- 24, CTX - M - 27, y CTX - M - 57. Extraída de (Kang *et al.*, 2013).

Un extenso estudio multicéntrico realizado en Reino Unido e Irlanda y publicado recientemente mostraron que el 86,6% de las BLEE pertenecían a la familia CTX-M y de éstas, el 96% fueron CTX-M- grupo-1 (Day *et al.*, 2016).

En España, existen estudios pioneros en la epidemiología molecular de las BLEE observándose inicialmente un predominio de CTX-M-14, seguido de SHV (SHV-12) (Rodríguez-Baño *et al.*, 2006). No obstante, estudios más recientes muestran un predominio de CTX-M 15. Así, en el estudio de Merino *et al.*, de las 39 cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas en hemocultivos, 34 produjeron enzimas CTX-M (21 CTX-M-15, 11 CTX-M-14 y 2 CTX-M-1) y OXA-1 se observó en 20 de los aislamientos (Merino *et al.*, 2016). Otros estudios han analizado la relación entre tipo de BLEE y grupo filogenético siendo CTX-M-14 y CTX-M-15 predominantes entre las cepas del grupo filogenético B2 (Rodríguez-Baño *et al.*, 2012).

3.4. Factores de riesgo y mortalidad de bacteriemias por *E. coli* BLEE.

Existen numerosos estudios que han analizado los factores de riesgo asociados a la adquisición de bacteriemias por cepas productoras de BLEE observándose una gran diversidad. No obstante, la mayoría de autores coinciden en que la exposición previa a antimicrobianos es el principal factor para la adquisición de bacteriemias por *E. coli* BLEE.

En un estudio retrospectivo de casos-controles que comparó una cohorte de 50 casos de *E. coli* con BLEE mostró como factores de riesgo independientes en el análisis univariante la adquisición nosocomial, la enfermedad de base grave y el foco urinario. Cabe destacar el carácter nosocomial de este estudio (80% de los pacientes) (Ho *et al.*, 2002). Ortega *et al.* también describieron como factor predictivo para el aislamiento de *E. coli* BLEE la adquisición nosocomial, además del sondaje urinario y la terapia previa con betalactámicos (Ortega *et al.* 2009).

Cuando se estudian las bacteriemias por *E. coli* con BLEE adquiridas en la comunidad aparecen como factores de riesgo en el análisis multivariante son: el sondaje urinario y el tratamiento antibiótico previo, particularmente con fluoroquinolonas, lo que supone un dato preocupante dado el uso frecuente de estos compuestos en el tratamiento de diversas infecciones en régimen ambulatorio (Rodríguez-Baño *et al.*, 2010).

En nuestra área sanitaria se han analizado los factores de riesgo de pacientes adultos ingresados con bacteriemia por *E. coli* BLEE siendo éstos el consumo previo de antibióticos, índice de Winston ≤ 2 y adquisición relacionada a cuidados sanitarios. La mortalidad relacionada fue del 21%, apareciendo como factores de riesgo: neoplasia de base, gravedad de enfermedad de base (según índice de McCabe) y gravedad al diagnóstico (según índice de Winston). El tratamiento empírico inadecuado fue más frecuente en pacientes con bacteriemia por *E. coli* BLEE (García-Hernández *et al.*, 2011).

No existe unanimidad entre los diferentes estudios en cuanto al pronóstico de este tipo de bacteriemias. Algunos estudios postulan que pacientes con infecciones por microorganismos con BLEE tienen peor pronóstico y otros, no encuentran asociación significativa entre la presencia de BLEE y una mayor tasa de fracasos terapéuticos o mortalidad. Así, la tasa de mortalidad cruda por bacteriemias por *E. coli* BLEE es muy variable con cifras desde un 0 % de mortalidad asociada hasta el 61% (Metan *et al.*, 2005; Bin *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2008; Mezler y Petersen, 2007).

A pesar de estas disparidades, en todos los trabajos los peores resultados de evolución se han relacionado más con la enfermedad de base grave o con el fracaso terapéutico debido a la instauración de un tratamiento inadecuado.

3.5. 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* (Ron, 2010).

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* (Johnson *et al.*, 2010; Ron, 2010). En la tabla 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 Mokady *et al.*, 2005.

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

3.6. Resistencia a antibióticos en cepas de *E. coli* invasivas: Datos del informe EARSS 2015.

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 2015 se han incluido cerca de 90.000 aislamientos de *E. coli* procedentes de 30 países. A continuación, se resumen los principales datos de este último informe (EARSS, 2015).

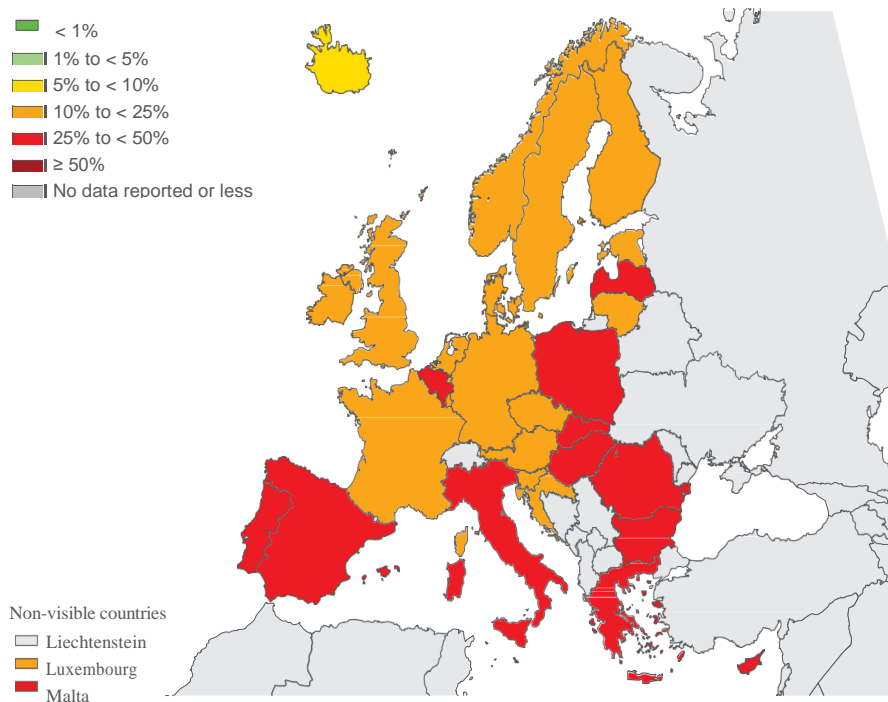
3.6.1. Resistencia a aminopenicilinas.

La resistencia a aminopenicilinas fue muy elevada con un porcentaje medio ponderado del 57,2%, y un rango entre el 34,1% de Suecia hasta el 73,0% de Rumania. En España fue del 63,9%, con un incremento del 7,4% en los últimos 12 años dado que según los datos de 2003 la resistencia se situaba en torno al 58% (Tabla 4).

3.6.2. Resistencia a fluoroquinolonas.

El porcentaje medio ponderado de resistencia a fluoroquinolonas fue del 22,8% con una variación desde el 6,8% (Islandia) hasta el 45,5% (Chipre). La mayoría de los países con porcentajes de resistencia del 25% o más se localizaban en el sur y sureste Europa (Figura 12).

Según los datos de este informe la resistencia a fluorquinolonas en España fue del 31,6%. A pesar de la tendencia decreciente observada en los últimos años (2012-2015), el incremento de la resistencia a fluoquinolonas en los últimos 11 años ha aumentado de forma alarmante ya que en los datos de 2003 la resistencia se situaba en torno al 21% (Tabla 4).



¹ **Figura 12.** Porcentaje de cepas de *E. coli* invasivas resistentes a fluoroquinolonas (EARSS, 2015).

3.6.3. Resistencia a cefalosporinas de tercera generación.

En cuanto a las resistencias a cefalosporinas de tercera generación, los datos del informe EARSS 2015 describen un aumento significativo en el período 2012- 2015, pasando del 11,9% en 2012 a 13,1% en 2015. Los porcentajes de aislados resistentes variaron desde el 1,7% (Islandia) hasta el 38,5% (Bulgaria) (**Figura 13**).

En España fue del 11,6%. A pesar de la tendencia decreciente observada en nuestro país entre los años 2012-2015, la resistencia a esta familia se ha incrementado un 7,6% en los últimos 12 años lo que supone que la resistencia actual casi triplica la de 2003 que se situaba en el 4% (**Tabla 4**).

La mayoría de los aislamientos de *E. coli* resistentes a cefalosporinas de tercera generación fueron por producción de BLEEs (88,6%).

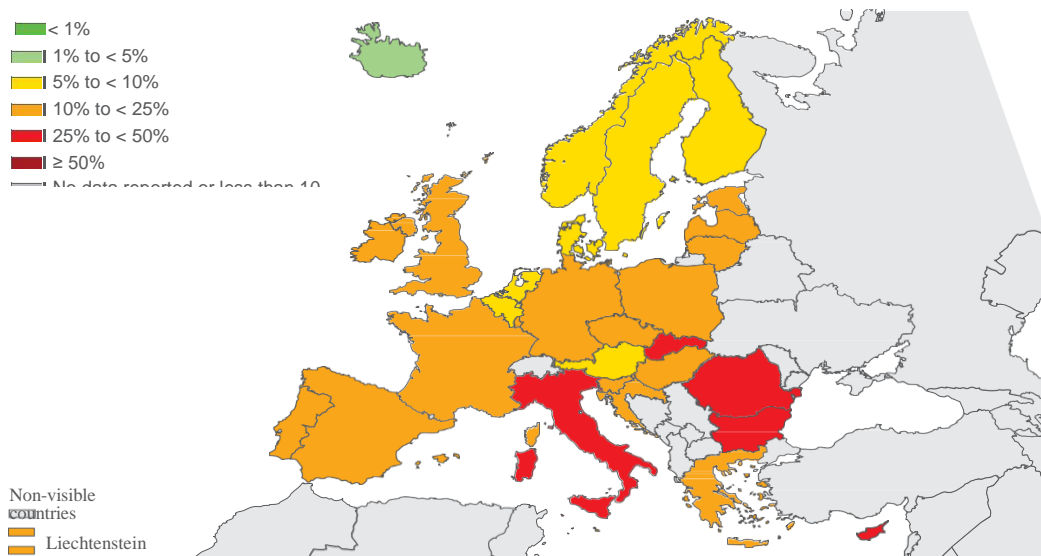


Figura 13. Porcentajes de cepas de *E. coli* invasivas resistentes a cefalosporinas de tercera generación (EARSS, 2015).

3.6.4. Resistencia a aminoglucósidos.

Las estimaciones de resistencia a aminoglucósidos se basaron principalmente en gentamicina o tobramicina siendo la media ponderada de resistencia a aminoglucósidos en la UE del 10,4% con un rango entre el 2,9% de Islandia al

24,2% de Eslovaquia (**Figura 14**). En España fue del 14,7% habiéndose duplicado en los últimos 11 años dado que según los datos de 2003 la resistencia se situaba en torno al 7% (**Tabla 4**).

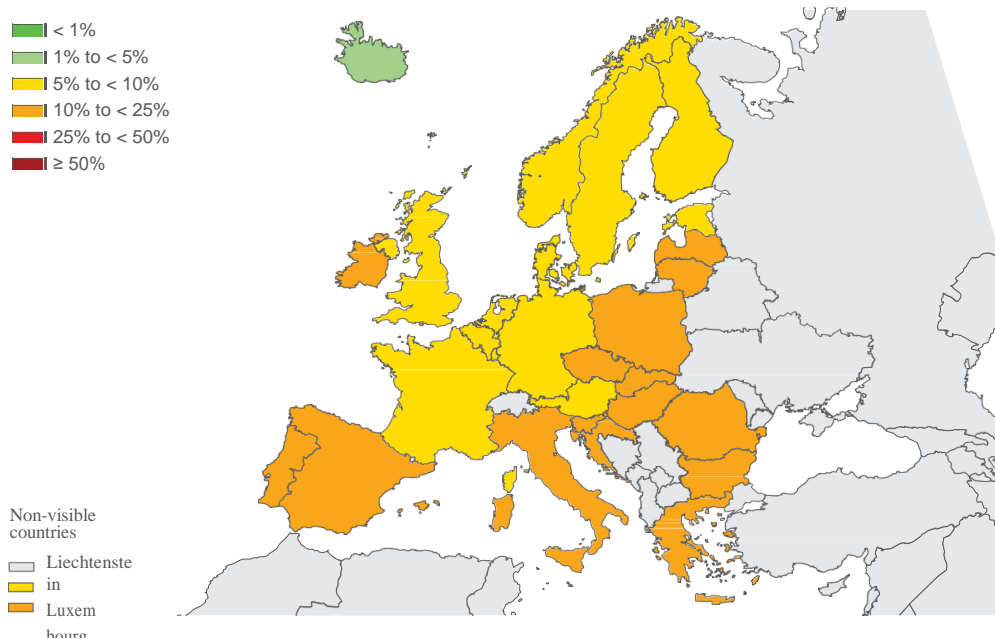


Figura 14. Porcentaje de cepas de *E. coli* invasivas resistentes a aminoglucósidos (EARSS, 2015).

3.6.5. Resistencia a carbapenems.

El porcentaje medio ponderado en la UE para de resistencia a carbapenems fue del 0,1%. Sólo dos países, Grecia (1,2%) y Rumanía (1,9%), registraron porcentajes superiores al 1% (**Figura 15**). En España fue inferior al 0,1% manteniéndose estable durante el periodo 2003-2011 (**Tabla 4**).

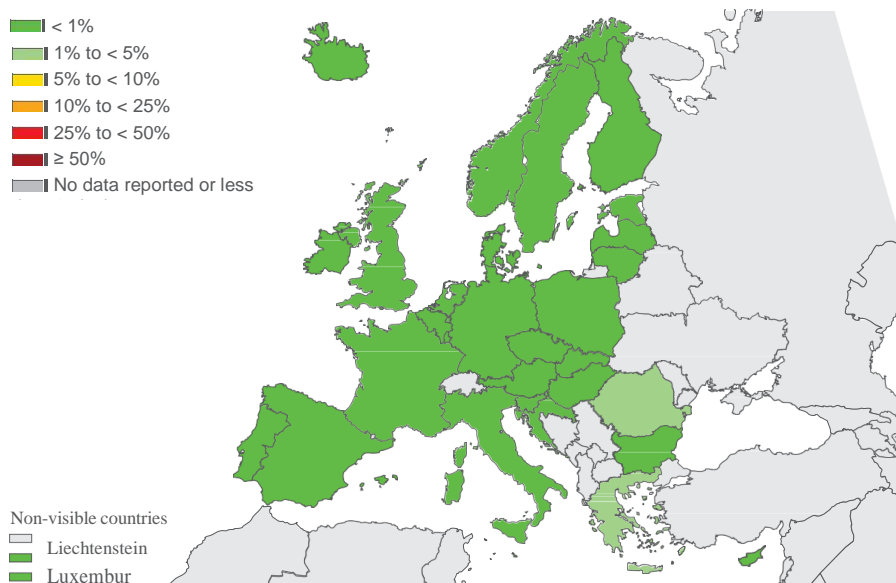


Figura 15. Porcentaje de cepas de *E. coli* invasivas resistentes a carbapenems. (EARSS, 2015).

Tabla 4. Evolución de los porcentajes de resistencia de cepas de *E. coli* invasivas a diferentes familias de antibióticos entre 2003 y 2015 en España (EARSS, 2014). AMI: Aminopenicilinas; AMIG: Aminoglucósidos; FQ: Fluorquinolonas; CEF3^ºG: Cefalosporinas de tercera generación; CARBA: Carbapenems. Modificado de EARSS, 2014.

Grupo antimicrobi	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
AMI	58	60	62	64	62	63	65	65	66	65	65	65	64
AMIG	7	7	10	9	10	11	13	14	15	16	15	15	15
FQ	21	25	28	28	30	33	31	33	34	34	35	34	32
CEF3 ^º G	4	7	8	7	7	9	11	12	12	14	13	12	12
CARBA	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1

3.7. Estructura poblacional de *E. coli* productores de bacteriemia.

Los datos de estudios internacionales sobre la distribución de STs de cepas de *E. coli* productores de bacteriemia basados en el esquema de MLST de Achtman demuestran gran diversidad de ExPEC. Sin embargo, el predominio mundial de los ST 69, 73, 95 y 131 es claramente evidente. (Riley, 2014).

En un estudio realizado por Adams-Sapper *et al.*, observaron que cinco STs representaron el 65% de los *E. coli* productores de bacteriemias tipificados. ST131 fue el más frecuentemente aislado con el 23%, seguidos por ST95 (18%) (Adams-Sapper *et al.*, 2013). Los datos del Horner *et al.* también muestran hallazgos similares dado que los ST 69, 73, 95 y 131 representaron el 55% del total de los aislamientos. ST131 y ST73 se asociaron con bacteriemias nosocomiales y comunitarias, así como con focos urinarios, hepatobiliares y gastrointestinales de la infección. Los aislamientos BLEE positivos fueron predominantemente ST131 (60%) (Horner *et al.*, 2014). En el reciente trabajo de Day *et al.* de 448 identificados 5 STs representaron el 58,4% de los aislados: CC73 fue el más común (20,7%), seguido de CC131 (13,9%), CC95 (11,3%), CC69 (6,9%) y CC12 (5,5%). Los aislamientos del CC131 tuvieron unas tasas de multirresistencia más elevadas que otros ST aumentando del 2,9% de los aislamientos en 2001 al 20,5% -20,7% en 2007-08 y luego se redujeron al 14,3% en 2010. Las tasas de resistencia a cefalosporinas, aminoglucósidos y

fluoroquinolonas se mantuvieron por debajo del 10% en los otros complejos clonales mayoritarios (Day *et al.*, 2016).

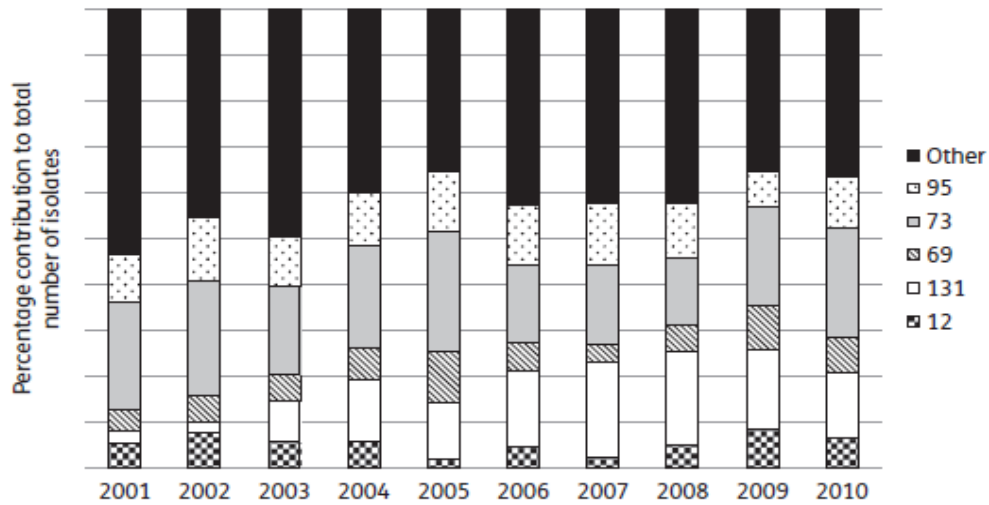


Figura 16. Proporciones de los distintos ST de aislado de *E. coli* procedentes de bacteriemia durante los años 2001-2010. EL apartado (Other) incluye 902 aislamientos que representan 443 ST, con no más de 65 aislamientos pertenecientes a cualquier CC y con 96 aislamientos como ST únicos. Extraído de Day *et al.*, 2016.

En cuanto a la estructura poblacional de bacteriemias por *E. coli* productor de BLEE en España, un reciente estudio de Merino *et al.* realizado en 8 hospitales de la geografía española entre 2010 y 2011 ha analizado un total de 425 bacteriemias de origen urinario por *E. coli*. De estas, 39 (9,2%) cepas fueron productoras de BLEE y se encontraron 15 ST distintos. ST131 fue el clon más prevalente representando el 54% de los aislamientos. Además, todos los aislados ST131 fueron ExPEC y presentaron los mayores índices de virulencia, pero mostraron menor diversidad en FV que otros STs (Merino *et al.*, 2016).

Tabla 5. Estudios que describen la estructura poblacional de *E. coli* productores de bacteriemias.

Lugar (n aislados)	Año realización	Ámbito de estudio	ST más prevalentes
San Francisco, USA (246)	2007-2010	Hospitalario	131, 95, 73, 69, 12, 10, 405, 38
Yorksire, UK (770)	2010-2012	Laboratorio clínico	73, 131, 69, 95, 12, 404, 10, 127, 141
UK (Multicentrico) (2166)	2001-2010	Hospitalario	73, 131, 95, 69, 12

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

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 son los Sequence Type (STs) 69, 73, 95 y especialmente ST131.

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.

En España existen trabajos a nivel nacional que han estudiado las características clínicas, microbiológicas y moleculares de las bacteriemias por *E. coli*. Sin embargo, los datos referidos a la Región de Murcia son escasos. 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.

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

OBJETIVOS.

El objetivo principal de nuestro trabajo es estudiar las características epidemiológicas, clínicas y moleculares de *Escherichia coli* 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. Conocer la incidencia de la bacteriemia por *E. coli* en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA) durante el periodo de 1 año.
2. Describir las características epidemiológicas y clínicas de la bacteriemia por *Escherichia coli*.
3. Estudiar la sensibilidad a antibióticos de las cepas de *E. coli* procedentes de bacteriemias.
4. Realizar la caracterización molecular de las Betalactamasas de espectro extendido (BLEE).
5. Estudiar la diversidad filogenética de los aislados.
6. Analizar los factores de virulencia en aislados de *E. coli* productores de bacteriemias.
7. Determinar la estructura poblacional ("Sequence type", ST) de *E. coli* pertenecientes a los grupos filogenéticos B2 y D.
8. Determinar la estructura poblacional de los aislamientos de *E. coli* productores de BLEE.
9. Describir las características clínicas y microbiológicas de bacteriemias por los STs más frecuentes.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Características del hospital

El estudio se llevó a cabo en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca adscrito a la Universidad de Murcia. Es un hospital de tercer nivel con 873 camas, de las que 611 corresponden al Hospital General y 262 al Hospital Materno-Infantil. Atiende a una población aproximada de 450.000 personas. Es hospital de referencia de la Comunidad Autónoma de Murcia en determinadas especialidades como Neurocirugía, Unidad de Quemados, Cirugía Cardiovascular y Unidad de Trasplantes (**Figura 17**).



Figura 17. Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca. Imagen extraída de <http://www.murciasalud.es>.

2. Tipo y periodo de estudio

Se realizó de un estudio retrospectivo y observacional 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). 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. Por otra parte, se realizó un estudio microbiológico-molecular donde se recuperaron y estudiaron los aislamientos clínicos consecutivos de *E. coli*. Se incluyó un solo aislamiento por episodio de bacteriemia.

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.

3. Datos clínicos y epidemiológicos

3.1. Criterios de inclusión/exclusión.

Se incluyeron aquellos pacientes que presentaron al menos un episodio de bacteriemia entre el 1 de enero el 31 de diciembre de 2013. Se excluyeron del estudio clínico aquellos pacientes cuya historia clínica estaba incompleta y los pacientes derivados a otros hospitales. Se excluyeron los episodios que se sucedieron en los 30 días posteriores al considerarse reinfección o continuación del episodio anterior.

3.2. Metodología de recogida de la información

Para la obtención de estos datos se realizó una revisión sistemática de la historia clínica y del sistema informático de laboratorio (SIL) del Servicio de Microbiología del Hospital.

3.3. Características epidemiológicas y clínicas

Para el estudio clínico-epidemiológico se analizaron las características en las poblaciones de ADULTOS (≥ 12 años) y NIÑOS (≤ 11 años) por separado.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

- Se recogieron datos demográficos del paciente, como el género y edad de pacientes ADULTOS.
- Adquisición de la bacteriemia por *E. coli* en pacientes: Se consideró 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. En NEONATOS se consideró de adquisición vertical la bacteriemia neonatal con hemocultivo positivo que se desarrolló durante las primeras 72 h de vida.
- Los servicios clínicos de procedencia del hemocultivo y donde se encontraba el paciente en el momento de la extracción se clasificaron en los siguientes grupos:
 - En pacientes ADULTOS:
 - Servicios médicos: Medicina Interna y especialidades médicas.
 - Unidades de Críticos: Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), Unidad de Reanimación (REA) y Unidad de Quemados.
 - Servicios Quirúrgicos.
 - Urgencias.
 - Hemodiálisis.

- En NIÑOS
 - Neonatología.
 - Urgencias.
 - Oncología Infantil.
 - Unidad de Infectología pediátrica “Aislados”.

- Origen de la bacteriemia en ADULTOS y NIÑOS: La clasificación según el foco o el origen primario de bacteriemia se ajustó a lo definido por “*The Centers for Disease Control and Prevention*” (Garner *et al.*, 1988). 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. En NEONATOS se incluyeron las bacteriemias de transmisión vertical como de foco neonatal.

- Enfermedades de base y estudio de la comorbilidad que pudiera tener importancia pronóstica en pacientes ADULTOS y NIÑOS No-neonatos como: diabetes mellitus, enfermedad cardíaca, neoplasia, enfermedad pulmonar crónica, cirrosis hepática e insuficiencia renal crónica.

- Factores de riesgo que pudieran influir en la adquisición de la infección en pacientes ADULTOS y NIÑOS No-neonatos como ser portador de sonda vesical, diálisis, ventilación mecánica, traqueotomía, sonda nasogástrica y el haber recibido antibioterapia en los 3 meses previos.

- Factores de gravedad como el desarrollo de Shock séptico y mortalidad en pacientes ADULTOS y NIÑOS No-neonatos.

4. Estudio microbiológico

4.1. Procesamiento de hemocultivos

Los hemocultivos se procesaron con el sistema automático de monitorización continua BacT/Alert (bioMerieux® La Balme Les Grottes, France) (Wilson *et al.*, 1994; Horvath *et al.*, 2004; Flayhart *et al.*, 2007) siguiendo los protocolos del Servicio de Microbiología.

Tras la detección de crecimiento por el sistema automatizado y posterior subcultivo en medios sólidos, la identificación inicial se realizó mediante tinción de gram. Con la identificación presuntiva de Bacilo gramnegativo se emitió un informe preliminar verbal al médico responsable del paciente. Tras 24 horas de incubación a 37°C se observó la presencia en las placas de agar sangre y MacConkey (bioMerieux® La Balme Les Grottes, France) de colonias características (**Figura 18**). La identificación definitiva se realizó mediante el sistema automatizado Vitek2 (bioMerieux®) con las tarjetas GN (Gram Negativos).

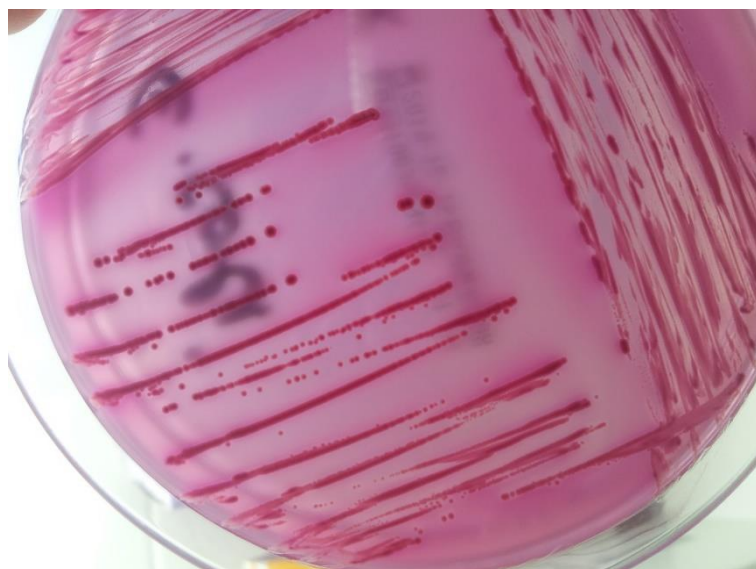


Figura 18. Colonias de *Escherichia coli* en agar Mackonkey.

4.2. Estudio de sensibilidad antibiótica

Para estudiar la sensibilidad antibiótica se utilizó la tarjeta AST-243 del sistema semiautomatizado Vitek 2® (Biomerieux), que incluye los siguientes antibióticos: amoxicilina-clavulánico, piperacilina-tazobactam, cefuroxima, cefotaxima, ceftazidima, cefepime, imipenem, ertapenem, ácido nalidíxico, ciprofloxacino, gentamicina, amikacina, tigeciclina y cotrimoxazol. La interpretación de los resultados se realizó siguiendo las recomendaciones del “*Clinical Laboratory Standards Institute*” 2013 (CLSI, 2013).

Se sospechó la presencia de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en las cepas en las que las concentraciones mínimas inhibitorias para cefotaxima y ceftazidima fueron iguales o superiores a 2 µg/ml mediante Vitek 2® (Biomerieux). Las BLEEs de estas cepas se confirmaron fenotípicamente mediante el método de sinergia con doble disco basado en el efecto inhibitorio del ácido clavulánico de acuerdo con el CLSI (CLSI, 2013). Para ello, se preparó una suspensión del microorganismo en solución con una concentración equivalente a 0,5 de McFarland. Se sembró en una placa de medio Müller Hinton (MH) en la que se colocaron discos con carga estándar (30 µg) de cefotaxima, ceftazidima, cefuroxima y aztreonam dispuestos a una distancia de 25-30 mm de discos de amoxicilina/ácido clavulánico (20/10 µg) (**Figura 19**). Se incubó 24h a 37° C, y se realizó la lectura considerando sinergia positiva y, por tanto, presencia de una BLEE, cuando se observó una ampliación del halo de inhibición en alguna de las cefalosporinas o del aztreonam.

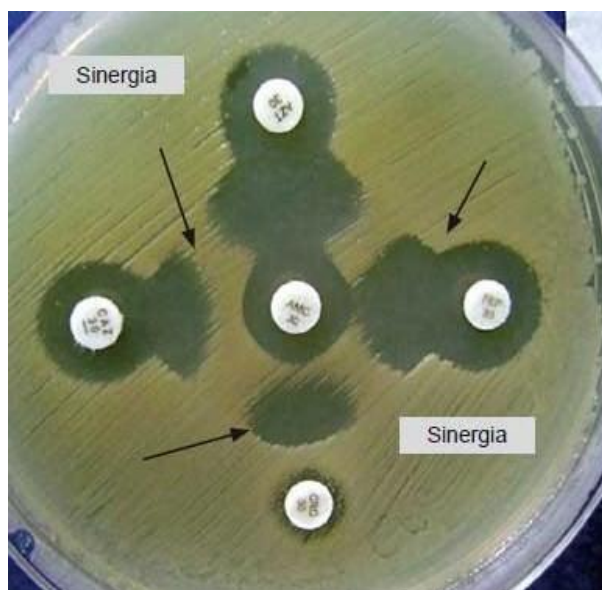


Figura 19. Método de doble difusión con discos para la confirmación fenotípica de la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Distorsión del halo de inhibición debido a la inhibición de la BLEE por la acción del ácido clavulánico.

5. Estudio molecular

5.1. Extracción de ADN

Se realizó la extracción del ADN total en todos los aislamientos a partir de una resiembra de las colonias puras en el medio de cultivo sólido agar Mueller-Hinton (*bioMérieux, 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 μ l 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.

5.2. 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 y controles negativos (agua libre de nucleasas). Para determinar el tipo específico de cada BLEE amplificada, los amplicones obtenidos fueron enviados a secuenciar tal como se expone en el apartado 3.5.6 y las secuencias analizadas utilizando la herramienta informática BLAST. Las condiciones de PCR para la detección de cada tipo de BLEE fueron las siguientes:

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

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

Gen	Iniciadores	Secuencia (5`-3`)	Tamaño fragmento (pb)
<i>bla_{TEM}</i>	TEM.f	ATGAGTATTCAACATTTCCGTG	931
	TEM.r	TTACCAATGCTTAATCAGTGAG	
<i>bla_{SHV}</i>	SHV.f	ATGCGTTATATTCGCCTGTG	868
	SHV.r	TTAGCGGTTGCCAGTGCTC	
<i>bla_{CTX-M}</i>	CTXM.f	GCGATGTGCAGCACCAGTAA	909
	CTXM.r	CCGCAATATGATTGGTGGTG	

5.3. Caracterización filogenética.

La determinación del grupo filogenético de *E. coli* se realizó basándose en el protocolo descrito por Clermont *et al.* que permite la clasificación en siete grupos filogenéticos (A, B1, B2, C, D, E y F), según la presencia de los cuatro genes de ADN, *chuA*, *yjaA*, TspE.4C2 y el fragmento de ADN *arpA* (Clermont *et al.*, 2013). Para la amplificación de estos marcadores se utilizaron los iniciadores que figuran en la **Tabla 7** y las condiciones fueron las siguientes: 1 ciclo de 5

III. MATERIAL Y MÉTODOS

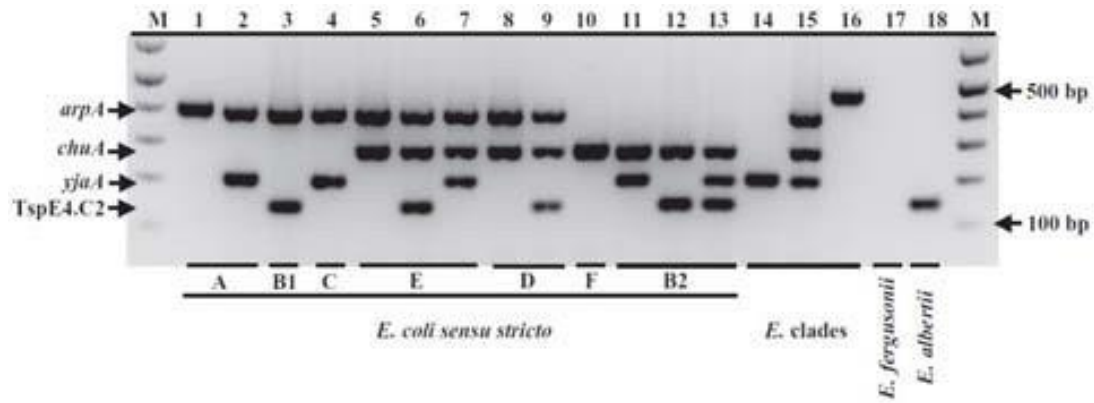
minutos a 94°C, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C; extensión 30 segundos a 72°C, y finalmente 1 ciclo de 7 minutos a 72°C.

Tabla 7. Iniciadores utilizados para la determinación de los grupos filogenéticos según Clermont *et al.* y temperaturas de hibridación para la PCR (Clermont *et al.*, 2013)

Reacción de PCR	Iniciadores	Diana	Secuencia iniciador (5' - 3')	Tamaño (pb)
Cuádruple	<i>chuA. 1b</i>	<i>chuA</i>	ATGGTACCGGACGAACCAAC	288
	<i>chuA.2</i>		TGCCGCCAGTACCAAAGACA	
	<i>yjaA.1b</i>	<i>yjaA</i>	CAAACGTGAAGTGTCAGGAG	211
	<i>yja.2b</i>		AATGCGTTCCTCAACCTGTG	
	<i>TspE4C2.1b</i>	<i>TspE4.C2</i>	CACTATTCGTAAGGTCATCC	152
	<i>TspE4C2.2b</i>		AGTTTATCGCTGCGGGTGC	
	<i>Acek.f</i>	<i>arpA</i>	AACGCTATTCGCCAGCTTGC	400
<i>ArpA1.r</i>	TCTCCCATAACCGTACGCTA			
Grupo E	<i>ArpAgpE.f</i>	<i>arpA</i>	GATTCATCTTGTCAAAATATGCC	301
	<i>ArpAgpE.r</i>		GAAAAGAAAAAGAATTCCAAGAG	
Grupo C	<i>trpAgpC.1</i>	<i>trpA</i>	AGTTTTATGCCAGTGCGAG	219
	<i>trpAgpC.2</i>		TCTGCGCCGGTACGCCC	
Control interno	<i>trpBA.f</i>	<i>trpA</i>	CGGCGATAAAGACATCTTCAC	489
	<i>trpBA.r</i>		GCAACGCGCCTGGCGGAAG	

Los resultados se interpretaron en función de su perfil de bandas (**Figura 20**). En algunos casos existieron perfiles que coincidieron para los filogrupos A/C o D/E. En estos casos se realizó una segunda PCR específica para determinar los grupos filogenéticos C y E respectivamente. Las condiciones de amplificación, fueron diferentes según fuera el gen amplificado:

- PCR para determinar el filogrupo C: 1 ciclo de 5 minutos a 94°C, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 59°C; extensión 30 segundos a 72°C, y 1 ciclo de 7 minutos a 72°C.
- PCR para determinar el filogrupo E: 1 ciclo de 5 minutos a 94°C, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C; extensión 30 segundos a 72°C, y 1 ciclo de 7 minutos a 72°C.



Quadruplex genotype				Phylo-group	Next step
<i>arpA</i> (400 bp)	<i>chuA</i> (288 bp)	<i>yjaA</i> (211 bp)	TspE4.C2 (152 bp)		
+	-	-	-	A	
+	-	-	+	B1	
-	+	-	-	F	
-	+	+	-	B2	
-	+	+	+	B2	
-	+	-	+	B2	Could be confirmed by testing <i>ibeA</i> gene ^a
+	-	+	-	A or C	Screen using C-specific primers. If C+ then C, else A
+	+	-	-	D or E	Screen using E-specific primers. If E+ then E, else D
+	+	-	+	D or E	Screen using E-specific primers. If E+ then E, else D
+	+	+	-	E or clade I	Screen using E-specific primers. If E- then clade I, confirm using cryptic clade primers ^b
-	-	+	-	Clade I or II	Confirm using cryptic clade primers ^b
-	(476) ^c	-	-	Clade III, IV or V	Confirm using cryptic clade primers ^b
-	-	-	+	Unknown	Perform MLST
-	-	+	+	Unknown	Perform MLST
+	-	+	+	Unknown	Perform MLST
+	+	+	+	Unknown	Perform MLST
-	-	-	-	Unknown	Confirm <i>Escherichia</i> identification using <i>uidA</i> or <i>gadA/B</i> ^d . If positive screen using cryptic clade primers ^b and/or perform MLST

Figura 20. Patrones de bandas obtenidos (arriba) y tabla de interpretación (abajo) por la PCR cuádruple de Clermont en 2013 que diferencia los grupos filogenéticos de *E. coli*. Figura extraída de Clermont *et al.*, 2013

5.4. Detección de genes de virulencia.

Se estudiaron 6 genes de virulencia: *papA* (que codifica para la subunidad estructural de la fimbria P), *papC* (montaje de fimbria P), *sfa/foc DE* (región consenso de la fimbria S y F1C), *afa/dra BC* (adhesinas de la familia Dr), *iutA*, (aerobactina), y *KpsMT-II* (síntesis de la cápsula del grupo II). La detección de estos genes de virulencia se realizó mediante 2 reacciones de amplificación múltiple según el protocolo previamente descrito por Johnson y Stell (Johnson y Stell, 2000). Para la amplificación de estos genes se utilizaron los iniciadores que figuran en la **Tabla 8**.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 8. Iniciadores utilizados para la amplificación de los genes que codifican diferentes factores de virulencia. (Johnson y Stell, 2000)

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>	GGCTGGACATCATGGGAACTGG	302
	<i>iutA.r</i>	CGTCGGGAACGGGTAGAAATCG	
<i>KpsMT-II</i>	<i>Kps MT II.f</i>	GCGCATTTGCTGATACTGTTG	272
	<i>Kps MT II.r</i>	CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	
<i>papA</i>	<i>papA.f</i>	ATGGCAGTGGTGTCTTTTGGTG	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: Una 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). La amplificación se realizó con las siguientes 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.

5.5. Tipificación molecular.

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

Se realizó una PCR para determinar los Sequence Types (STs) 69, 73, 95 y 131 a todos aquellos aislados pertenecientes a los filogrupos B2 y D según el protocolo descrito por Doumith *et al.* (Doumith *et al.*, 2015). Las secuencias de los iniciadores utilizados se muestran en la **Tabla 9** 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 9. Iniciadores utilizados en la caracterización molecular de los STs 69,73, 95 y 131(Doumith *et al.*, 2015).

Gen	Iniciadores	Secuencia (5`-3`)	Tamaño fragmento (pb)
ST73	ST73.f	TGGTTTTACCATTTTGTTCGGA	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 (**Figura 21**).

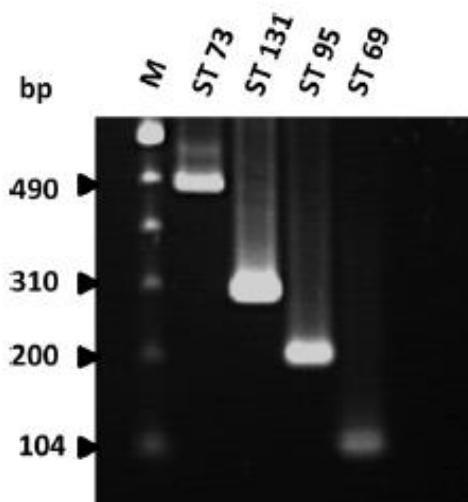


Figura 21: Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de ADN generados en la PCR multiplex que detecta los 4 principales STs de *E. coli*. Extraído de: Doumith *et al.*, 2015.

5.5.2 Tipificación molecular mediante *Multilocus Sequence Typing* (MLST).

La tipificación mediante MLST se realizó a todos los aislados de *E. coli* productores de BLEE y a todos los del grupo filogenético B2 que no pertenecían a los ST determinados mediante PCR (ST73, ST131 y ST95).

La técnica de “*Multilocus Sequence Typing*” (MLST) según el esquema de Achtman, utiliza las secuencias de fragmentos internos amplificados por PCR de 7 genes altamente conservados (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*) que definen el perfil alélico o secuencia tipo para cada cepa (Wirth *et al.*, 2006). Para la amplificación genética y secuenciación se usaron iniciadores especificados para MLST en *E. coli* del sitio web (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>) (**Tabla 10**). Se realizaron 3 reacciones de PCR distintas. En la primera se amplificaron los genes *adk*, *icd*, *purA* y *fumC*, (PCR1). La segunda contenía los iniciadores de los genes *gyrB* y *mdh* (PCR2) y en la tercera se amplificó *recA* (PCR3) con las siguientes condiciones:

- **PCR1:** 1 ciclo de 2 minutos a 95°C, 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 54°C; 2 minutos a 72°C, y finalmente 1 ciclo de 5 minutos a 72°C.
- **PCR2:** 1 ciclo de 2 minutos a 95°C, 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 60°C; 2 minutos a 72°C, y finalmente 1 ciclo de 5 minutos a 72°C.

- **PCR3:** 1 ciclo de 2 minutos a 95°C, 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 58°C; 2 minutos a 72°C, y finalmente 1 ciclo de 5 minutos a 72°C.

Tabla 10. Iniciadores utilizados en la técnica de MLST según el esquema de Achtman (Wirth *et al.*, 2006).

Genes	Iniciadores	Secuencia oligonucleótida 5' - 3'	Tamaño (pb)
<i>adk</i> (adenylate kinase)	<i>adkF</i> <i>adkR</i>	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG CCGTCAACTTTTCGCGTATTT	583
<i>fumC</i> (<i>fumarate hydratase</i>)	<i>fumCF</i> <i>fumCR</i>	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC GTACGCAGCGAAAAAGATTC	806
<i>gyrB</i> (DNA gyrase)	<i>gyrBF</i> <i>gyrBR</i>	TCGGCGACACGGATGACGGC ATCAGGCCTTCACGCGCATC	911
<i>icd</i> (<i>isocitrate/ isopropylmalate dehydrogenase</i>)	<i>icdF</i> <i>icdR</i>	ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA GGACGCAGCAGGATCTGTT	878
<i>mdh</i> (<i>malate dehydrogenase</i>)	<i>mdhF</i> <i>mdhR</i>	ATGAAAGTCGCAGTCCTCGGCGCTGCTGGCGG TAACGAACTCCTGCCCCAGAGCGATATCTTTCTT	932
<i>PurA</i> (adenylosuccinate dehydrogenase)	<i>purAF</i> <i>purAR</i>	CGCGCTGATGAAAGAGATGA CATACGGTAAGCCACGCAGA	816
<i>recA</i> (<i>ATP/GTP binding motif</i>)	<i>recAF1</i> <i>recAR1</i>	ACCTTTGTAGCTGTACCACG AGCGTGAAGGTAAAACCTGTG	780

Cada fragmento amplificado fue secuenciado determinándose el alelo correspondiente a cada gen. 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*.

5.6. Detección y separación de los amplificados en gel de agarosa. Purificación, secuenciación e interpretación de los amplificados.

5.6.1. Detección y separación de los amplificados

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) a una concentración de 10000x como agente intercalante fluorescente entre las dos cadenas de ADN en el momento de fusión de la agarosa. Una vez solidificado el gel, se cargaron los pocillos con las muestras, constituidas por 10 µL del amplificado con 10 µL del tampón de carga Blue/Orange Loading Dye 6X (Promega, Madison, WI, USA), previamente diluido según instrucciones del fabricante. 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.

5.6.2. Purificación de los amplificados

Tras la amplificación por PCR, permanecen en la mezcla de reacción junto con las copias del amplificado muchos dNTPs y oligonucleótidos sin consumir. Todos estos restos pueden interferir en la posterior reacción de secuenciación. Para evitarlo, los amplificados fueron purificados mediante un preparado comercial que hidroliza todos estos restos utilizando enzimas hidrolíticas, una exonucleasa y fosfatasa alcalina (ExoSAP-IT® Clean up, USB Corporation, Ohio, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.6.3. Secuenciación de los amplificados

La secuenciación automática de los amplificados se realizó según el método de Sanger, mediante electroforesis capilar y terminadores fluorescentes BigDye™ de Applied Biosystems en un laboratorio externo (Sistemas Genómicos®, Valencia).

5.6.4. Interpretación de las secuencias obtenidas.

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, National Center for Biotechnology).

6. Análisis estadístico.

Se realizó un estudio descriptivo en el que las variables cuantitativas se describieron como medias \pm 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).

IV. RESULTADOS

1. Incidencia de bacteriemias por *E. coli*

Durante el periodo del estudio comprendido del 1 de enero a 31 de diciembre de 2013, se identificaron en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca 222 episodios de bacteriemia por *E. coli* (BEC) correspondientes a 215 pacientes. Las bacteriemias por *E. coli* supusieron el 12,5% del total de bacteriemias en el año 2013. La incidencia de episodios BEC en el año 2013 en nuestra área sanitaria fue de 86,5 episodios por 100000 habitantes/año.

Del total de *E. coli* aislados, 22 fueron cepas productoras de betalactamasa de espectro extendido (BLEEs), por tanto, la prevalencia de *E. coli* productores de BLEEs en bacteriemias durante el periodo de estudio fue de 9.9%.

La distribución temporal de los aislamientos de *E. coli* en hemocultivos tanto productores de BLEE como no BLEE durante el año 2013 se muestra en la **Figura 22**.

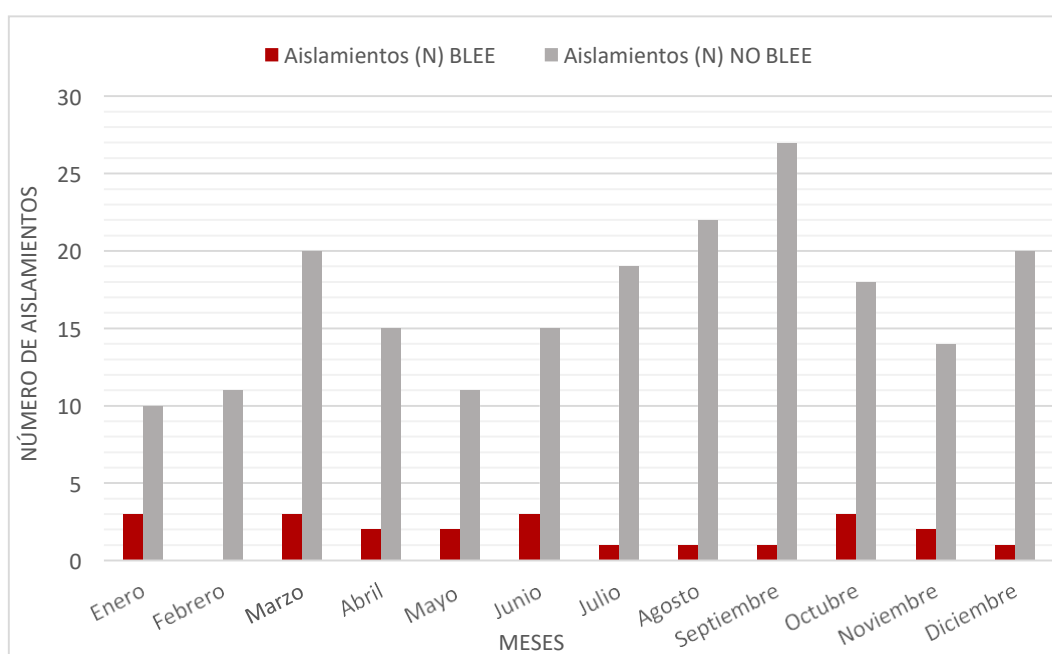


Figura 22. Distribución temporal de los aislamientos de *Escherichia coli* procedentes de hemocultivos en 2013.

2. Características epidemiológicas y clínicas de la bacteriemia por *Escherichia coli* (BEC).

Del total de pacientes con episodios de BEC se analizaron por separado aquellos correspondientes a la población adulta (194 pacientes y 200 episodios, 90% del total de episodios) incluyendo en este grupo a pacientes ingresados en el Hospital General con edades superiores a 11 años y a la población infantil, que incluyó a niños menores de 11 años ingresados en el Hospital Materno-Infantil (21 pacientes y 22 episodios). Dentro de este grupo se consideraron neonatos a los pacientes con edad \leq 1 mes (12 pacientes).

En estos 2 grupos poblacionales se estudiaron las siguientes características epidemiológicas y clínicas: edad, sexo, servicio de procedencia del hemocultivo, comorbilidades de los pacientes, dispositivos biomédicos asociados, antibioterapia previa, gravedad del episodio, mortalidad, tipo de adquisición y foco de la bacteriemia. Adicionalmente, estas características fueron estudiadas y comparadas entre los episodios y pacientes con bacteriemia originadas por cepas de *E. coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BEC-BLEE) y bacteriemias por *E. coli* resistentes a ciprofloxacino (BEC-CIP R). Se consideraron variables propias de los pacientes la edad, sexo y comorbilidades, mientras que las variables relacionadas con los dispositivos, antibioterapia previa, gravedad, desenlace, foco de la bacteriemia y tipo de adquisición se relacionaron con el episodio.

2.1. Características de BEC en la población adulta.

La media de edad en los adultos fue de 63,9 años, con un rango entre 13-94 años y una desviación estándar de 23,31 años. La mediana en este grupo de población fue de 70 años. El 61% de estos pacientes (132/194) tenían más de 65 años. La distribución por sexo fue de 94 varones (48%) y 100 mujeres (52%). No se encontraron diferencias entre la edad media de los hombres (64,1 años, rango 14-93) y las mujeres (64,2, rango 13-94). La distribución por edad y sexo se refleja en la **Figura 23**.

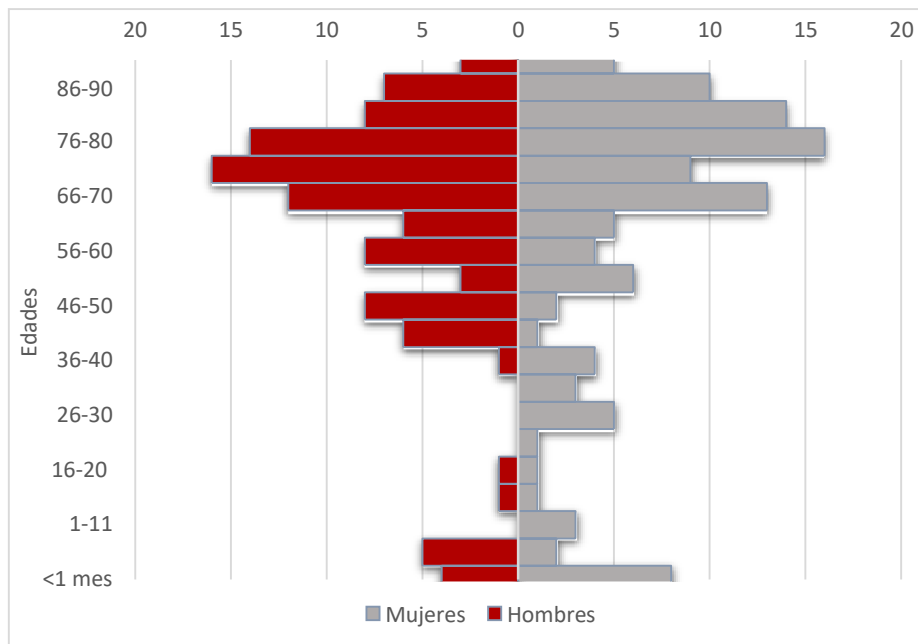


Figura 23. Distribución por sexos y edades de los episodios de bacteriemia por *Escherichia coli*

Entre los pacientes adultos con bacteriemia por *E. coli*, un porcentaje elevado (72,8%; 141/194) presentaron alguna patología subyacente o comorbilidad que quedan reflejadas en la **Figura 24**. La cardiopatía previa (27,3%; 53/194), diabetes mellitus (26,3%; 51/194) y enfermedad neoplásica (24,7%; 48/194) fueron las enfermedades de base más frecuentes.

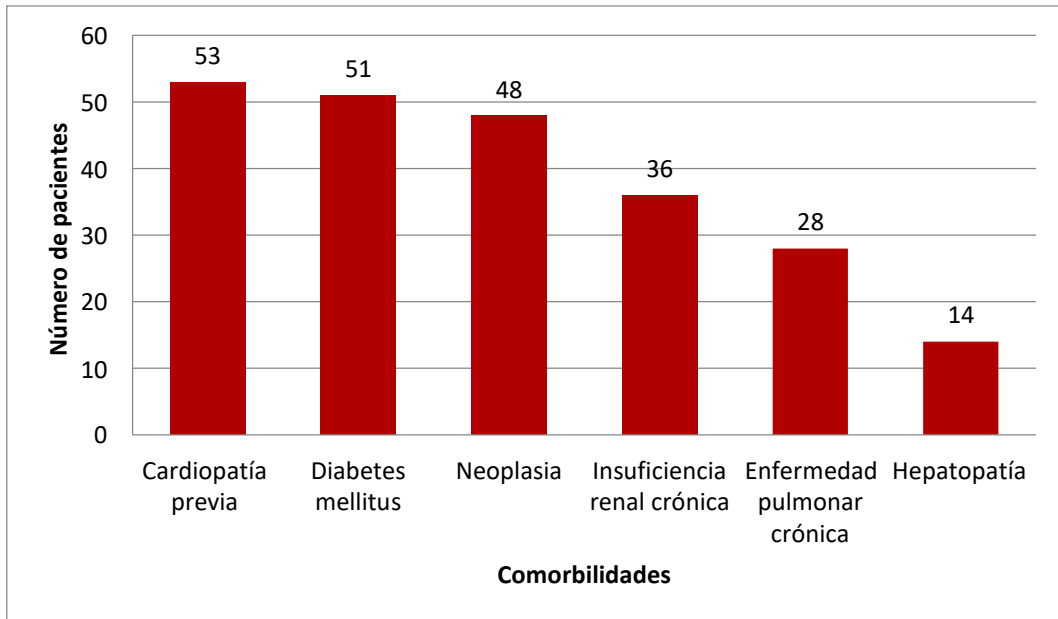


Figura 24. Comorbilidades en pacientes adultos con bacteriemia por *Escherichia coli*.

Los pacientes presentaron, al menos, un factor extrínseco predisponente de bacteriemia en el 18% de los casos. Entre estos, la presencia de sonda urinaria (17,5%) fue el más frecuente (Tabla 11). La exposición previa a antimicrobianos fue constatada en un tercio de los episodios estudiados (32%, 64/200).

Tabla 11. Dispositivos en pacientes adultos con bacteriemia por *Escherichia coli*.

Dispositivos	Número de pacientes
Sondaje urinario	35
Ventilación mecánica/traqueotomía	12
Sonda nasogástrica	6

En cuanto a la gravedad de los episodios estudiados, en el 19,5% (39/200) se desarrolló shock séptico asociado al proceso. Casi la mitad de estos pacientes presentaban como enfermedad de base neoplasia (48,7%; 19/39) y/o habían recibido antibioterapia previa (41%; 16/39). Un 28,2% fueron portadores de sonda urinaria (11/39). La mortalidad asociada fue del 12,5% (25/200), siendo también más frecuente en pacientes con neoplasia (64%; 16/25) y cardiopatía previa (40%;

IV. RESULTADOS

10/25). Un 48% de los pacientes que fallecieron habían recibido antibióticos.
(Tabla 12).

Tabla 12. Factores de riesgo de los pacientes con evolución desfavorable del episodio de BEC.

FACTOR DE RIESGO	Shock séptico (%, N=39)	Mortalidad (%, N=25)
COMORBILIDADES		
Cardiopatía previa	28,2% (11)	40% (10)
Diabetes mellitus	15,4% (6)	12% (3)
Neoplasia	48,7% (19)	64% (16)
Insuficiencia renal crónica	12,8% (5)	20% (5)
Enfermedad pulmonar crónica	20,5% (8)	24% (6)
Hepatopatía	10,3% (4)	20% (5)
DISPOSITIVOS		
Sondaje urinario	28,2% (11)	32% (8)
Ventilación mecánica/traqueotomía	15,4% (6)	20% (5)
Sonda nasogástrica	5,1% (2)	4% (1)
ATB previa	41% (16)	48% (12)

La distribución de los servicios clínicos en los que se encontraba ingresado el paciente en el momento de extracción del hemocultivo quedan reflejados en la **Figura 25**. El principal servicio fue el de Urgencias (73%) seguido de otros servicios médicos (11%).

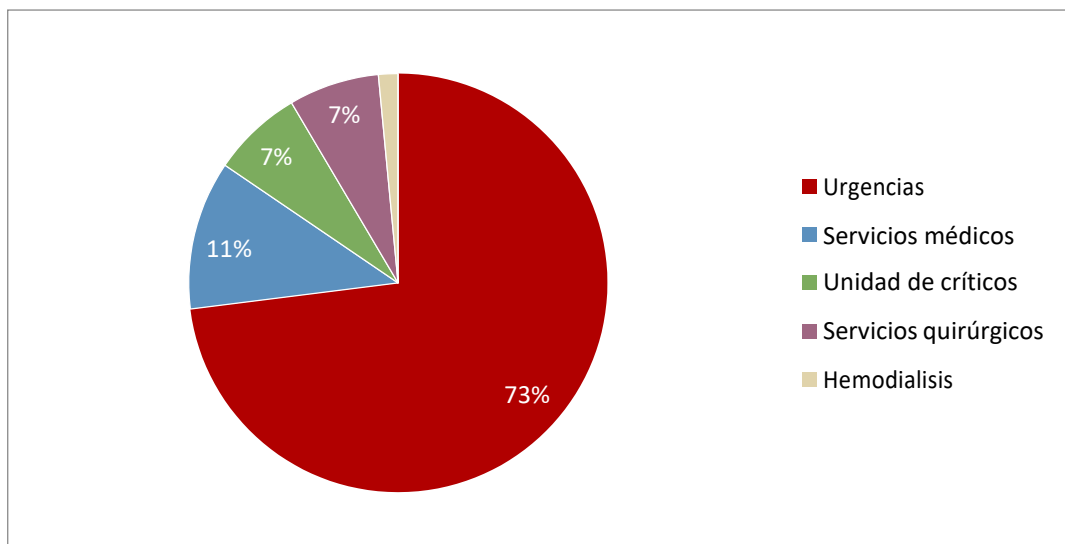


Figura 25. Distribución de los principales servicios con bacteriemia por *Escherichia coli* en población adulta.

Más de la mitad de los episodios de BEC en la población adulta fueron considerados de origen comunitario (58,5%, 117/200). En el 21,5% (43/200) la adquisición fue relacionada con la asistencia sanitaria (RAS) y la infección nosocomial supuso el 20% (40/200) de los episodios.

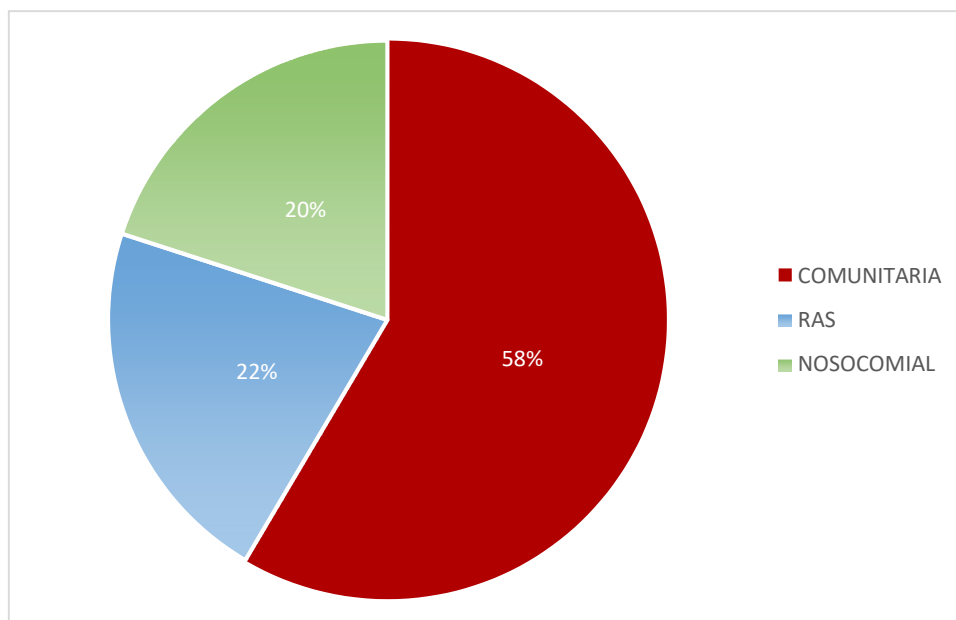


Figura 26. Tipo de adquisición de la bacteriemia en pacientes adultos.

IV. RESULTADOS

Como puede observarse en la **Figura 27**, el foco de origen más frecuente de la bacteriemia en los pacientes adultos fue el urinario (59,5%; 119/200), seguido del foco abdominal (23,5%; 47/200). En el 9,5% (19/200) de los casos no se identificó la causa o esta era de origen mixto, por lo que se consideró como bacteriemia de origen desconocido o bacteriemia primaria. En un 6% (12/200) de los episodios la bacteriemia se atribuyó a un foco respiratorio, en el 1% (2/200) a infección de piel y partes blandas y en un 0,5% (1/200) se consideró la bacteriemia relacionada con catéter (BRC).

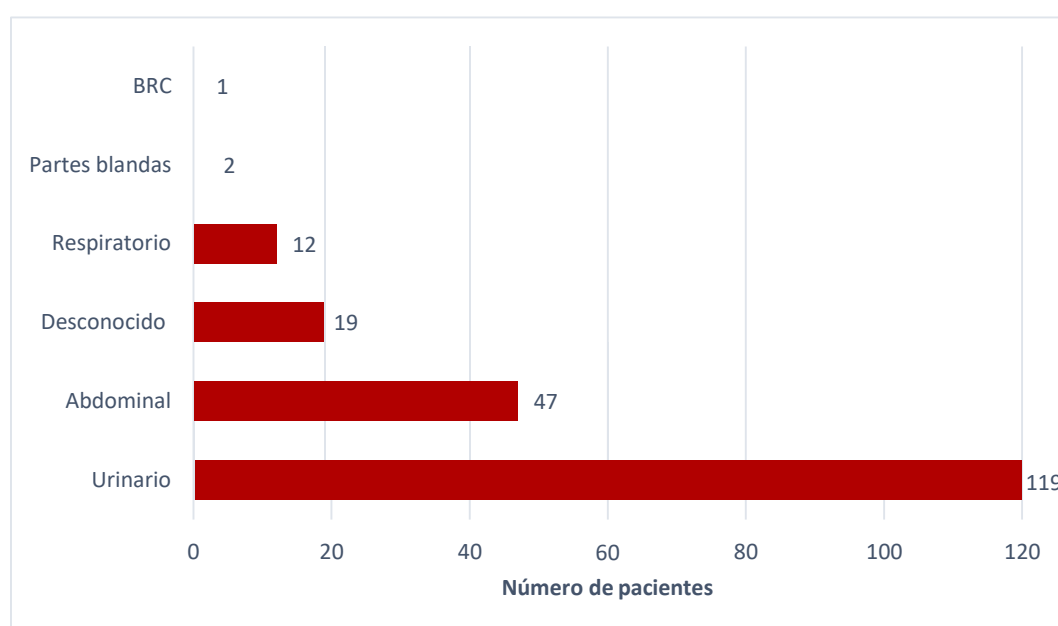


Figura 27. Origen de la bacteriemia en pacientes adultos.

Tanto en las bacteriemias comunitarias como nosocomiales el origen más frecuente fue el urinario (80/117 y 14/40 respectivamente) seguido del abdominal (31/117 y 13/40). No obstante, en las bacteriemias RAS, el segundo en frecuencia tras el foco urinario (25/43) fueron las bacteriemias primarias de origen desconocido (9/43) (**Figura 28**).

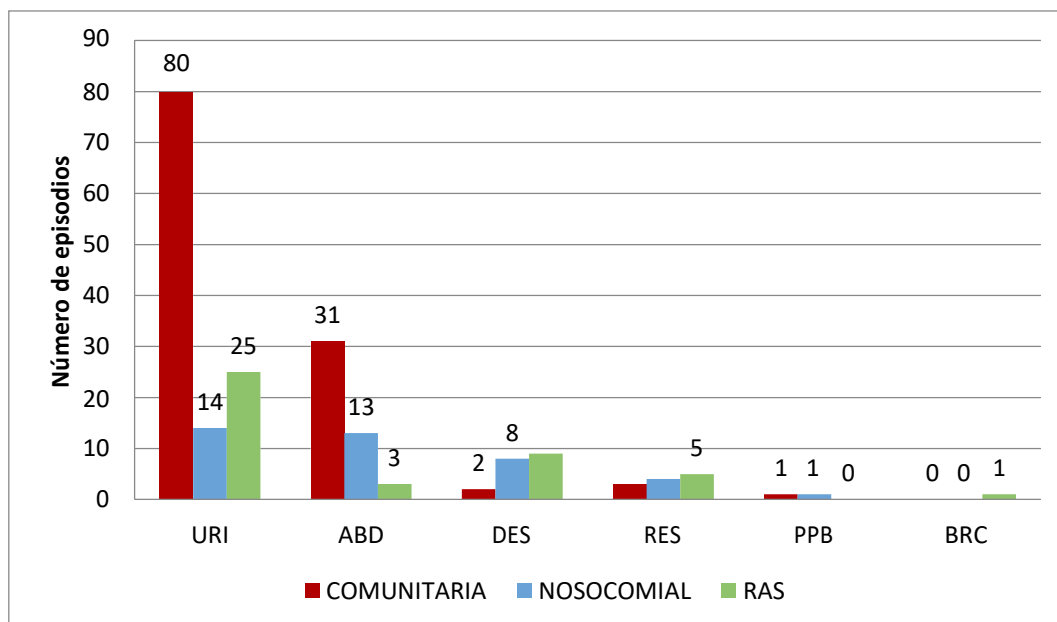


Figura 28. Foco de origen y tipo de adquisición de la bacteriemia en población adulta. URI: Urinario; ABD: Abdominal; DES: Desconocida; PPB: Partes blandas; BRC: Bacteriemia relacionada con catéter.

2.2. Características de las bacteriemias por *E. coli* en niños.

El grupo de pacientes ingresados en el Hospital Materno-Infantil supuso un 10% del total de episodios (21 pacientes y 22 episodios), siendo más de la mitad (12; 55%) neonatos. La media de edad fue de 10,4 meses con una desviación estándar de 29,8 meses y un rango de edades comprendido entre 1 día y 11 años. La mediana fue de 1 mes y se observó un predominio de mujeres (62%).

En el servicio de neonatología se extrajeron más de la mitad de los hemocultivos (55%), seguido del servicio de urgencias (32%) y oncología infantil (9%). De la unidad de enfermedades infecciosas pediátricas procedían el 4% de los hemocultivos (**Figura 29**).

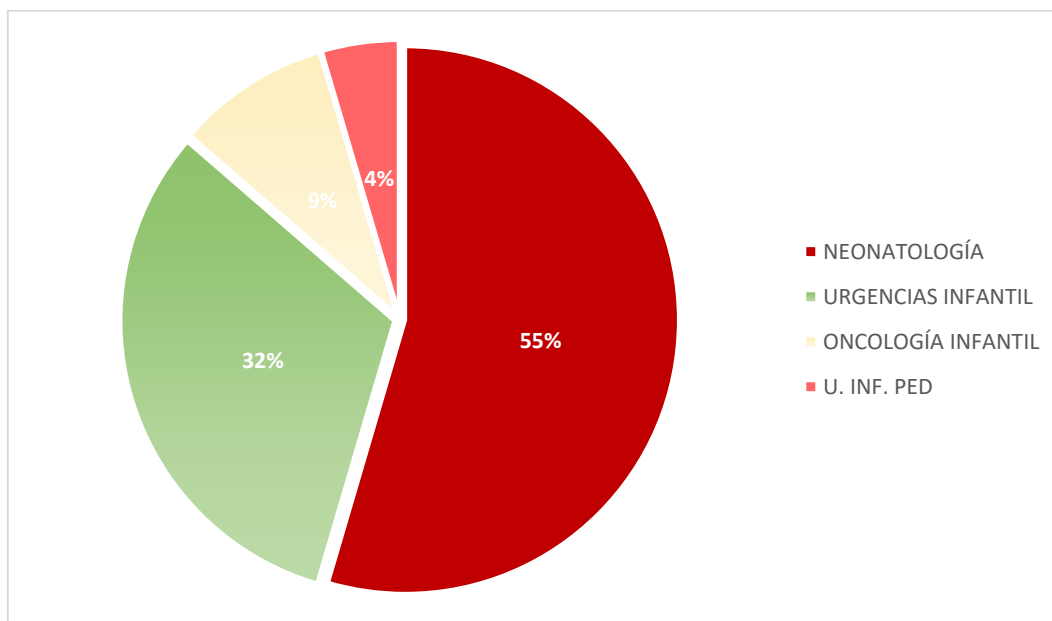


Figura 29. Procedencia por servicios de los hemocultivos en la población infantil.

Si se excluye el grupo de neonatos (54,5% de los niños) en los que los episodios de bacteriemias se pueden considerar de transmisión vertical o adquiridas en el hospital, en el resto de niños la mayoría de las BEC fueron de adquisición comunitaria (27,3%; 6/22), seguida de adquisición nosocomial (13,6%; 3/22) y relacionadas con la asistencia sanitaria (4,6%; 1/22) (**Figura 30**). Los orígenes más frecuentes fueron el urinario (36%) y las bacteriemias de origen desconocido (9%).

Entre los pacientes en edad pediátrica fuera del periodo neonatal (9) las enfermedades de base encontradas fueron enfermedad neoplásica en el 22,2% (2/9) y enfermedad renal en el 11,1% (1/9). Además, el 11,1% (1/9) tuvieron como factor de riesgo externo ser portadores de sonda vesical y en el 33,3% (3/9) habían estado expuestos previamente a antibióticos. No se observó mortalidad relacionada con la bacteriemia entre la población infantil.

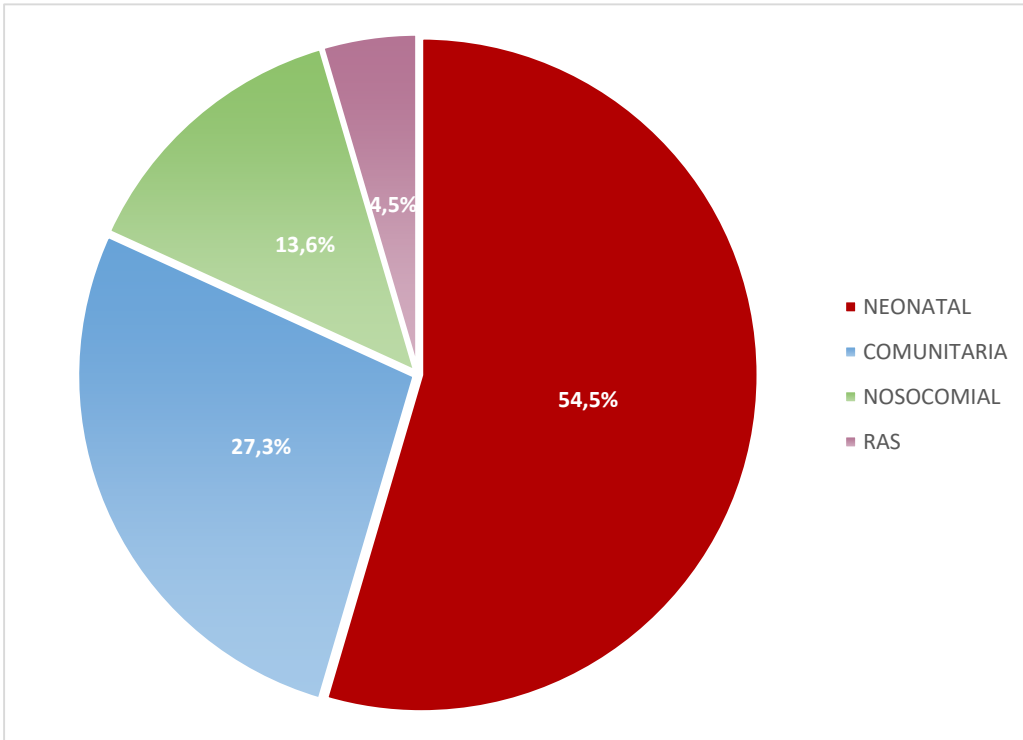


Figura 30. Tipo de adquisición de la bacteriemia por *E. coli* en pacientes pediátricos.

Además, al igual que en la población adulta la mayoría de las infecciones de origen urinario fueron de adquisición comunitaria y las de origen desconocido fueron en los dos casos nosocomiales, presentes en niños con neoplasias hematológicas ingresados en oncología infantil.

3. Características generales de los aislamientos de *E. coli*.

Se realizó estudio de sensibilidad a 222 cepas de *E. coli* aisladas de hemocultivos de 215 pacientes. La caracterización molecular se realizó en 187 cepas (168 cepas de pacientes adultos y 19 cepas de pacientes pediátricos).

3.1. Estudio de sensibilidad a antibióticos.

Los resultados de la sensibilidad antibiótica de las cepas incluidas en el estudio se muestran en la **Tabla 13**. La ampicilina fue el betalactámico menos activo con un 64,8% de las cepas resistentes. La resistencia a cefuroxima fue del 18%. En cuanto a las cefalosporinas de tercera generación (cefotaxima y ceftazidima) se objetivó una resistencia del 12,1%, mientras que la resistencia a 102

IV. RESULTADOS

cefepime fue del 9,9%. Los porcentajes de resistencia para amoxicilina-clavulánico y piperacilina-tazobactam fueron del 38,2% y 8,1% respectivamente. No se observaron resistencias a los carbapenems y la tasa global de aislados productores de betalactamasas tipo AmpC y BLEE fue del 2,2% y del 9,9%, respectivamente. Un alto porcentaje de cepas fueron resistentes a quinolonas. Un 41,4% de los aislados fueron resistentes al ácido nalidíxico y un 39,6% a ciprofloxacino. Los aminoglucósidos presentaron una buena actividad frente a los microorganismos estudiados con una tasa de resistencia a gentamicina del 9,6% y a amikacina del 0,5%. La resistencia a tigeciclina fue del 0,5% y la de cotrimoxazol se elevó hasta el 36,5%.

Cuando se compararon los porcentajes de resistencia entre las cepas productoras de BLEEs y no productoras se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la mayoría de los antibióticos excepto para piperacilina/tazobactam, siendo las tasas de resistencias claramente superiores en las cepas productoras de BLEEs. Destaca una resistencia del 77,3% ($p=0,000$) a amoxicilina/clavulánico, 86,4% ($p=0,00$) a ciprofloxacino y el 68,2% ($p=0,000$) a cotrimoxazol. Los antibióticos más activos frente a *E. coli*, tanto productores de BLEEs como no productores, fueron piperacilina/tazobactam (9,1% vs 8%; $p=0,431$), amikacina y tigeciclina (4,5% vs 0%; $p= 0,008$ y $p= 0,005$ respectivamente). Todas las cepas estudiadas fueron sensibles a carbapenems (**Tabla 13**).

La resistencia global a ciprofloxacino fue del 39,6%. En la **Tabla 13** se muestra la diferencia de resistencia entre las cepas resistentes y sensibles a este antibiótico apareciendo diferencias estadísticamente significativas para prácticamente todos los antibióticos estudiados, siendo las tasas de resistencias superiores en las cepas resistentes a ciprofloxacino. La resistencia a ampicilina en cepas resistentes a ciprofloxacino fue del 80,7% ($p=0,000$). La resistencia a cefalosporinas fue del 38,6% para cefuroxima ($p=0,000$), del 27,3% ($p=0,000$) a cefotaxima y ceftazidima y del 21,6% ($p=0,00$) a cefepime. La tasa de BLEEs fue del 21,6% y la de AmpC del 5,7%. Se observó una tasa de resistencia del 21,6% para

gentamicina mientras la resistencia a tigeciclina fue del 1,1% ($p=0,026$). La resistencia a cotrimoxazol se elevó hasta el 57,9% ($p=0,000$) de las cepas. Los únicos antibióticos analizados donde no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de cepas resistentes y sensibles a ciprofloxacino fueron piperacilina-tazobactam (10,2%; $p=0,214$) y amikacina (1,1%; $p=0,215$).

Tabla 13. Resistencia de las cepas de *E. coli* procedentes de bacteriemias a diferentes antibióticos. Resistencia de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE y no productoras de BLEE procedentes de bacteriemias a diferentes antibióticos. Resistencia de las cepas de *E. coli* resistentes y sensibles a ciprofloxacino procedentes de bacteriemias a diferentes antibióticos

% RESISTENCIA (N)	<i>E. coli</i>		<i>E. coli</i>		<i>E. coli</i>		
	N=222	BLEE (N=22)	No BLEE (N=200)	<i>p</i>	Resistent e CIP (N=88)	Sensible CIP (N=134)	<i>p</i>
Ampicilina	64,8%(144)	100% (22)	61% (122)	0,005	80,7% (71)	54,5%(73)	0,000
Amoxicilina-clavulánico	38,2% (85)	77,3%(17)	34% (68)	0,000	53,4% (47)	28,3%(38)	0,000
Piperacilina-tazobactam	8,1% (18)	9,1% (2)	8% (16)	0,431	10,2% (11)	6,7% (9)	0,214
Cefuroxima	18% (40)	100% (22)	9% (18)	0,000	38,6% (34)	4,5% (6)	0,000
Cefotaxima	12,1% (27)	100% (22)	2,5% (5)	0,000	27,3% (24)	2,2% (3)	0,000
Ceftazidima	12,1% (27)	100% (22)	2,5% (5)	0,000	27,3% (24)	2,2% (3)	0,000
Cefepime	9,9% (22)	100% (22)	0	0,000	21,6% (19)	2,2% (3)	0,000
Ácido nalidíxico	41,4% (92)	86,4%(19)	36,5%(73)	0,000	100% (88)	3,7% (5)	0,000
Ciprofloxacino	39,6% (88)	86,4%(19)	34,5%(69)	0,00	100% (88)	0	0,000
Gentamicina	9,6% (21)	27,2% (6)	7,5% (15)	0,001	21,6% (19)	1,5% (2)	0,000
Amikacina	0,5% (1)	4,5% (1)	0	0,008	1,1% (1)	0	0,215
Tigeciclina	0,5 (1)	4,5% (1)	0	0,005	1,1% (1)	0	0,026
Cotrimoxazol	36,5% (81)	68,2%(15)	33% (66)	0,009	57,9% (51)	22,4%(30)	0,001

3.1.1. Características epidemiológicas y clínicas de las bacteriemias por *Escherichia coli* según presencia de BLEE y sensibilidad a ciprofloxacino en adultos.

Los porcentajes de resistencia de las cepas de *E. coli* procedentes de la población adulta se recogen en la **Tabla 14**. Dado que la mayoría de los episodios

IV. RESULTADOS

se produjeron en esta población no se observaron grandes diferencias con los datos globales.

Tabla 14. Resistencia de las cepas de *E. coli* procedentes de bacteriemias a diferentes antibióticos en población adulta. Resistencia de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE y no productoras de BLEE procedentes de bacteriemias a diferentes antibióticos en población adulta. Resistencia de las cepas de *E. coli* resistentes y sensibles a ciprofloxacino procedentes de bacteriemias a diferentes antibióticos en población adulta.

% RESISTENCIA (N)	<i>E. coli</i>		<i>E. coli</i>		<i>E. coli</i>		
	(N=200)	BLEE (N=22)	No-BLEE (N=178)	p	CIP R (N=83)	CIP S (N=117)	p
Ampicilina	65%(130)	100%(22)	60,7%(108)	0,006	80,7%(67)	53,9%(63)	0,000
Amoxicilina-clavulánico	40% (80)	77,2%(17)	35,4% (63)	0,000	55,4%(46)	29,1% (34)	0,000
Piperacilina-tazobactam	8,5% (17)	9,1% (2)	8,4% (15)	0,242	10,8% (9)	6,8% (8)	0,103
Cefuroxima	19,5% (39)	100% (22)	9,6% (17)	0,000	39,8% (33)	5,1% (6)	0,000
Cefotaxima	13% (26)	100% (22)	2,2% (4)	0,000	27,7%(23)	2,6% (3)	0,000
Ceftazidima	13% (26)	100% (22)	2,2% (4)	0,000	27,7%(23)	2,6% (3)	0,000
Cefepime	11% (22)	100% (22)	0	0,000	22,9%(19)	2,6% (3)	0,000
Imipenem	0	0	0	----	0	0	----
Ertapenem	0	0	0	----	0	0	----
Ácido nalidíxico	43,5%(87)	86,4%(19)	37,6% (67)	0,000	100% (83)	3,4% (4)	0,000
Ciprofloxacino	41,5%(83)	86,4%(19)	36% (64)	0,00	100% (83)	0	0,000
Gentamicina	10% (20)	27,2% (6)	7,9% (14)	0,001	21,7%(18)	1,7% (2)	0,000
Amikacina	0,5% (1)	4,5% (1)	0	0,011	1,2% (1)	0	0,237
Tigeciclina	0,5% (1)	4,5% (1)	0	0,007	1,2% (1)	0	0,035
Cotrimoxazol	37%(74)	68,2%(15)	33,1% (59)	0,019	59% (40)	21,4%(25)	0,000

Se compararon las características clínicas y epidemiológicas de las bacteriemias producidas por cepas productoras de BLEEs (BEC-BLEE) y no productoras (BEC-NO BLEE). Todas las bacteriemias por *E. coli* productor de BLEE fueron en pacientes adultos. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos en cuanto a la media de edad y el sexo de los pacientes (**Tabla 15**).

Respecto a la relación entre comorbilidad de los pacientes con BEC, únicamente se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos en pacientes con enfermedad pulmonar crónica que fueron más frecuentes en el grupo de bacteriemias producidas por cepas BLEE (27,3% BEC-BLEE vs 12,8% BEC-NO BLEE), siendo la diferencia estadísticamente significativa ($p=0,029$), el Odds Ratio (OR) fue de 1,168 (IC95%: 0,958-1,423) (**Tabla 15**). Otro factor que apareció en el análisis univariado como factor de riesgo independiente para la adquisición de bacteriemia por *E. coli* BLEE fue la administración de antibioterapia previa ($p=0,021$; OR, 1,168; IC95%: 1,030-1,315). Aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa, se observó una tendencia en la variable éxito $p=0,058$ (OR, 1,155; IC95%: 0,936-1,124) y en los factores ventilación mecánica/traqueotomía donde se obtuvo una $p=0,072$ (OR, 1,213; IC95%: 0,872-1,686) (**Tabla 15**).

Tabla 15. Datos clínicos de los episodios de bacteriemias por *E. coli* productor de BLEE (BEC-BLEE) y no productor de BLEE (BEC-NO BLEE) y por *E. coli* resistente a ciprofloxacino (BEC-CIP R) y sensible a ciprofloxacino (BEC-CIP S).

% (N)	BEC (N=194)	BEC-BLEE (N=22)	BEC-NO BLEE (N=172)	P valor BLEE	BEC-CIP R (N=82)	BEC-CIP S (N=112)	p valor CIP R
EDAD	64±23,3(13A-94A)	64±23,4 (14A-90A)	64±23,6 (13-94A)		64±23,3 (13A-90A)	64±23,2 (14A-94A)	
SEXO				0,794			0,129
Hombres	94 (48%)	12 (55%)	82 (48%)		45 (55%)	50 (45%)	
Mujeres	100 (52%)	10 (45%)	90 (52%)		37 (45%)	62 (55%)	
COMORBILIDADES							
Diabetes mellitus	51 (26,3%)	5(22,7%)	46 (26,7%)	0,699	18 (22,0%)	33 (29,5%)	0,245
Cardiopatía previa	53 (27,3%)	7(31,8%)	46(26,7%)	0,670	22(26,8%)	31(28,6%)	0,447
Enfermedad pulmonar crónica	28 (14,4%)	6(27,3%)	22 (12,8%)	0,029	17(20,7%)	11 (9,8%)	0,067
Insuficiencia renal crónica	36 (18,6%)	6(27,3%)	30 (17,4%)	0,492	19(23,2%)	17(15,2%)	0,210
Hepatopatía	14 (7,2%)	2 (9,1%)	12 (7,0%)	0,622	8 (9,8%)	6 (5,4%)	0,226
Neoplasia	48 (24,7%)	5(22,7%)	43 (25,0%)	0,708	20(24,4%)	28(25,0%)	0,463

IV. RESULTADOS

En cuanto al tipo de adquisición de la bacteriemia no se encontraron diferencias estadísticamente significativas siendo la adquisición comunitaria mayoritaria en ambos subgrupos, aunque su porcentaje fue más elevado en el subgrupo de bacteriemias producidas por cepas no BLEEs. Sin embargo, la adquisición RAS y nosocomial fueron predominantes en el subgrupo de BLEEs (**Tabla 16**).

Tabla 16. Análisis univariado de los dispositivos, antibioterapia previa, gravedad y mortalidad para la adquisición de bacteriemia por *E. coli* productor de BLEE (BEC-BLEE) y no productor de BLEE (BEC-NO BLEE) y por *E. coli* resistente a ciprofloxacino (BEC-CIP R) y sensible a ciprofloxacino (BEC- CIP S) en la población adulta

N (%)	BEC (N=200)	BEC-BLEE (N=22)	BEC-NO BLEE (N=178)	p valor BLEE	BEC-CIP R (N=83)	BEC-CIP S (N=117)	p valor CIP R
DISPOSITIVOS							
Sondaje urinario	35(17,5%)	6(27,3%)	29(16,3%)	0,584	19(22,9%)	16(13,7%)	0,228
Ventilación mecánica/traqueotomía	12 (6%)	3 (13,6%)	9 (5,1%)	0,072	5 (6%)	7 (6%)	0,737
Sonda nasogástrica	6 (3%)	0 (0%)	6 (3,4%)	0,406	1 (1,2%)	5 (4,3%)	0,215
ATB previa	64 (32%)	13(59,1%)	51(28,7%)	0,021	34 (41%)	30(25,6%)	0,055
Shock séptico	39(19,5%)	5 (22,7%)	34(19,1%)	0,914	16(19,3%)	23(19,7%)	0,809
Exitus	25(12,5%)	5 (22,7%)	20(11,2%)	0,058	12(14,5%)	13(11,1%)	0,623

Aunque las diferencias no fueron significativas, se encontró una mayor proporción de BEC-NO BLEE entre los pacientes que procedían del Servicio de urgencias en contraste con los episodios producidos por cepas BLEE que procedían en mayor proporción de Servicios de hospitalización como son los Servicios médicos, quirúrgicos y Unidades de alto riesgo (**Tabla 17**). Los 3 episodios de pacientes de hemodiálisis pertenecieron fueron producidos por cepas no BLEE.

Tabla 17. Tipo de adquisición y servicios de procedencia de los hemocultivos en bacteriemias por *E. coli* productor de BLEE (BEC-BLEE) y no productor de BLEE (BEC-NO BLEE) y por *E. coli* resistente a ciprofloxacino (BEC-CIP R) y sensible a ciprofloxacino (BEC-CIP S) en la población adulta.

N (%)	BEC (N=200)	BEC-BLEE (N=22)	BEC-NO BLEE (N=178)	p valor BLEE	BEC-CIP R (N=83)	BEC-CIP S (N=117)	p valor CIP R
PROCEDENCIA				0,173			0,094
Comunitaria	117(58,5%)	8 (36,4%)	109 (61,2%)		43 (36,4%)	74 (63,3%)	
Nosocomial	40 (20,0%)	7 (31,8%)	33 (18,5%)		23(31,8%)	17 (14,5%)	
RAS	43 (21,5%)	7 (31,8%)	36 (20,2%)		17(31,8%)	26 (22,2%)	
SERVICIOS				0,269			0,287
Urgencias	146 (73,0%)	11 (50%)	135 (75,8%)		54 (65,1%)	92 (78,6%)	
U. Críticos	14 (7,0%)	3 (13,6%)	11 (6,2%)		6 (7,2%)	8 (6,8%)	
S. Médicos	23 (11,5%)	4 (18,2%)	19 (10,6%)		12 (14,5%)	11 (9,4%)	
S. Quirúrgicos	14 (7,0%)	4 (18,2%)	10 (5,6%)		10 (12,1%)	4 (3,4%)	
Hemodialisis	3 (1,5%)	0 (0%)	3 (1,7%)		1 (1,2%)	2 (1,7%)	

En cuanto al foco de origen de la BEC, en ambos grupos el foco urinario fue el más frecuente. Destaca que en las BEC-BLEE el segundo en frecuencia fueron los focos respiratorio y desconocido (13,6%) a diferencia del grupo de BEC-NO BLEE que fue el foco abdominal (**Tabla 18**).

Tabla 18. Origen de la infección en bacteriemias por *E. coli* productor de BLEE (BEC-BLEE) y no productor de BLEE (BEC-NO BLEE), así como resistentes y sensibles a quinolonas en episodios de población adulta.

FOCO INFECCIÓN N(%)	BEC (200)	BEC-BLEE (22)	BEC-NO BLEE (178)	p valor BLEE	BEC-CIP R (83)	BEC-CIP S (117)	p valor CIP R
Urinario	119(59,5%)	14(63,6%)	105(59,0%)	0,483	50 (60,2%)	69 (59,0%)	0,401
Desconocido	19 (9,5%)	3(13,6%)	16 (9,0%)	0,483	9 (10,8%)	10 (8,5%)	0,401
Respiratorio	12 (6,0%)	3(13,6%)	9 (5,1%)	0,483	5 (6,0%)	7 (6,0%)	0,401
Abdominal	47 (23,5%)	2 (9,2%)	45(25,3%)	0,483	16 (19,4%)	31 (26,5%)	0,401
Partes blandas	2 (1,0%)	0 (0%)	2 (1,1%)	0,483	2 (2,4%)	0 (0%)	0,401
BRC	1 (0,5%)	0 (0%)	1 (0,5%)	0,483	1 (1,2%)	0 (0%)	0,401

Entre los episodios de bacteriemias producidos por cepas de *E. coli* resistentes a ciprofloxacino (BEC-CIP R) se observó un ligero predominio de hombres (55%) a diferencia del subgrupo producido por cepas sensibles (BEC-CIP S) que este ligero predominio lo fue de mujeres (55%).

IV. RESULTADOS

El único factor de riesgo independiente para la adquisición de BEC-CIP R fue la utilización previa de antibióticos ($p=0,055$; OR, 1,168; IC95%: 1,030-1,315). Al igual que ocurrió con las cepas productoras de BLEEs y, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa, se observó una tendencia en pacientes con enfermedad pulmonar crónica en el grupo de cepas resistentes, (20,7% BEC-CIP R vs 9,8% BEC-CIP S) con significación ($p=0,067$). El Odds Ratio (OR) fue de 1,168 (IC95%: 0,958-1,423). En el resto de comorbilidades analizadas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (**Tabla 15**). En los episodios de BEC-CIP R se encontró una mayor proporción de pacientes con sondaje urinario y que presentaban ventilación mecánica, sin observarse diferencias estadísticamente significativas. Cabe destacar que ni el desarrollo de shock séptico ni la variable fallecimiento mostraron diferencias estadísticamente significativas en los episodios producidos por cepas resistentes (**Tabla 16**).

En cuanto al tipo de adquisición, aunque las diferencias no fueron significativas, entre los episodios producidos por cepas resistentes se observó una tendencia, siendo la adquisición comunitaria proporcionalmente superior en el subgrupo BEC-CIP S mientras que la adquisición RAS y las bacteriemias de origen nosocomial predominaron proporcionalmente en el grupo BEC-CIP R ($p= 0,094$; OR, 1,168; IC95%: 1,030-1,31) (**Tabla 17**).

3.1.2. Características epidemiológicas y clínicas de la bacteriemia por *Escherichia coli* según sensibilidad a ciprofloxacino en población pediátrica.

Como se observa en la **Tabla 19** las resistencias en la población pediátrica fueron inferiores a las encontradas en la población adulta. Destacan un 63,6% de resistencia a ampicilina, un 31,8% a cotrimoxazol y un 22,7% a amoxicilina-clavulánico y ciprofloxacino. La resistencia a cefalosporinas de segunda y tercera generación se situó en el 4,6% (pertenecientes a cepas AmpC) y no se encontraron resistencias ni a cefepime ni a carbapenems. Comparando las resistencias de BEC-CIP R frente a BEC-CIP S encontramos diferencias estadísticamente significativas en ampicilina, cefalosporinas, ciprofloxacino, gentamicina y cotrimoxazol. Curiosamente piperacilina-tazobactam fue más resistente en el grupo BEC-CIP S que en BEC-CIP R.

Tabla 19. Porcentajes de resistencia a diferentes antibióticos de las cepas de *E. coli* procedentes de bacteriemias resistentes y sensibles a quinolonas en episodios de niños.

<i>E. coli</i>				
% RESISTENCIA (N)	(N=22)	CIP R (N=5)	CIP S (N=17)	<i>p</i>
Ampicilina	63,6% (14)	80% (4)	58,8% (10)	0,006
Amoxicilina-clavulánico	22,7% (5)	20% (1)	23,5% (4)	0,233
Piperacilina-tazobactam	4,6% (1)	0	5,9% (1)	0,000
Cefuroxima	4,6% (1)	20% (1)	0	0,000
Cefotaxima	4,6% (1)	20% (1)	0	0,000
Ceftazidima	4,6% (1)	20% (1)	0	0,000
Cefepime	0	0	0	----
Imipenem	0	0	0	----
Ertapenem	0	0	0	----
Ácido nalidíxico	27,2% (6)	100% (5)	5,9% (1)	0,000
Ciprofloxacino	22,7% (5)	100% (5)	0	0,000
Gentamicina	4,6% (1)	20% (1)	0	0,000
Amikacina	0	0	0	----
Tigeciclina	0	0	0	----
Cotrimoxazol	31,8% (7)	40% (2)	29,4% (5)	0,023

IV. RESULTADOS

La mayor parte de las cepas resistentes a ciprofloxacino (4/5, 80%) procedían de neonatos con sólo un aislado procedente de la comunidad. En éste aislado el foco fue urinario. Cuando se estudió la adquisición de las cepas sensibles, aproximadamente la mitad se aislaron en neonatos (47,1%), seguida de adquisición comunitaria (29,4%), adquisición nosocomial (17,7%) y por último la RAS. En un 42% de estos episodios BEC-CIP S el foco fue urinario y en un 11,8% de origen desconocido.

Por tanto, entre las BEC en neonatos un 33% fueron por cepas resistentes a quinolonas.

Tabla 20. Tipo de adquisición y origen de la infección de los hemocultivos en bacteriemias por *E. coli* resistente a ciprofloxacino (BEC-CIP R) y sensible a ciprofloxacino (BEC-CIP S) en la población pediátrica.

N (%)	BEC (N=22)	BEC-CIP R (N=5)	BEC-CIP S (N=17)
ADQUISICIÓN			
Neonatos	12(54,5%)	4 (80%)	8 (47,1%)
Comunitaria	6 (27,3%)	1 (20%)	5 (29,4%)
Nosocomial	3 (13,6%)	0 (0%)	3 (17,7%)
RAS	1 (4,6%)	0 (0%)	1 (5,8%)
ORIGEN			
Urinario	8 (36,4%)	1 (20%)	7 (41,2%)
Desconocido	2 (9,1%)	0 (0%)	2(11,8%)
Neonatos	12 (54,6%)	4 (80%)	8(47,1%)

3.2. Caracterización molecular de las BLEE.

Se llegó a la caracterización de las BLEE en 15 cepas de las 18 estudiadas. En las tres restantes no se obtuvo amplificado para ninguna de las tres familias incluidas. Las familias de BLEE detectadas se muestran en la **Tabla 21**. La más frecuente fue la CTX-M (12 cepas) lo que supuso un 80% del total de BLEE, seguida de SHV (3 cepas; 20%). No se encontró ninguna cepa productora de BLEE de la familia TEM aunque en ocho aislados se amplificó la betalactamasa tipo TEM-1. Dentro de la familia CTX-M, 7 cepas se caracterizaron como CTX-M15 (46,7%), 3 como CTX-M1 (20%) y 2 como CTX-M14 (13,3%). Todas las SHV caracterizadas correspondieron a SHV-12.

Tabla 21. Familias de BLEEs producidas por las cepas estudiadas de *E. coli* productores de BLEE.

BLEE	NÚMERO CEPAS/TOTAL (%)
CTX-M	12/15 (80%)
CTX-M15	7/15 (46,7%)
CTX-M1	3/15 (20%)
CTX-M14	2/15 (13,3%)
SHV	3/15 (20%)
SHV 12	3/15 (20%)

3.3. Diversidad genética de los aislados de *E. coli*.

Se determinó el grupo filogenético en un total de 187 cepas de *E. coli* disponibles para el estudio molecular, 168 cepas procedentes de pacientes adultos y 19 cepas de pacientes pediátricos. El filogrupo mayoritario fue el B2 con un 52,9% (99/187) de los aislamientos, seguido en frecuencia por el filogrupo D con un 13,4% (25/187). Los grupos filogenéticos B1, F y A representaron un 9,6% (18/187), 8,6% (16/187) y 8,0% (15/187) respectivamente. Los menos frecuentes fueron los filogrupos C y E con 4,8% (9/187) y 2,1% (4/187) respectivamente. Un aislado no pudo ser clasificado mediante la PCR Cuadruplex y se consideró como desconocido (DES) (**Figura 31**).

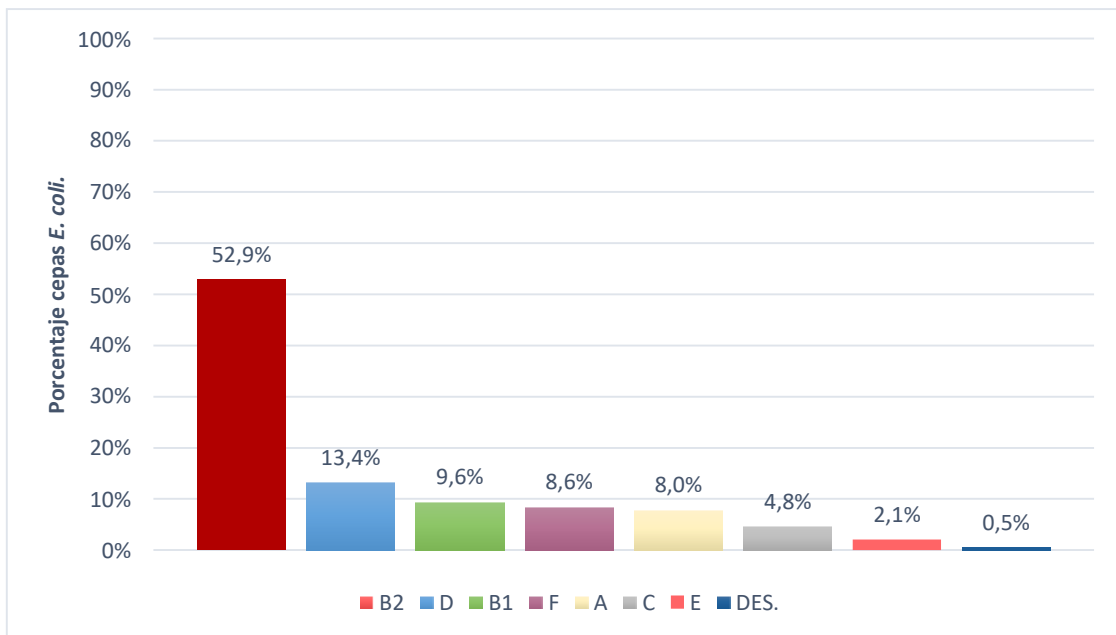


Figura 31. Distribución de grupos filogenéticos en aislamientos de *E. coli* productores de bacteriemia.

Las cepas de *E. coli* productoras de BLEE pertenecieron de forma mayoritaria al grupo filogenético B2 con un 44,4% (8/18) de los aislamientos, seguido en frecuencia por los filogrupos A y B1 con un 22,2% (4/18) y un 16,7% (3/18) de los aislamientos respectivamente. Cabe destacar que no se observaron cepas pertenecientes a los grupos D, el segundo grupo en frecuencia entre las cepas de *E. coli* globales, ni E (**Figura 32**).

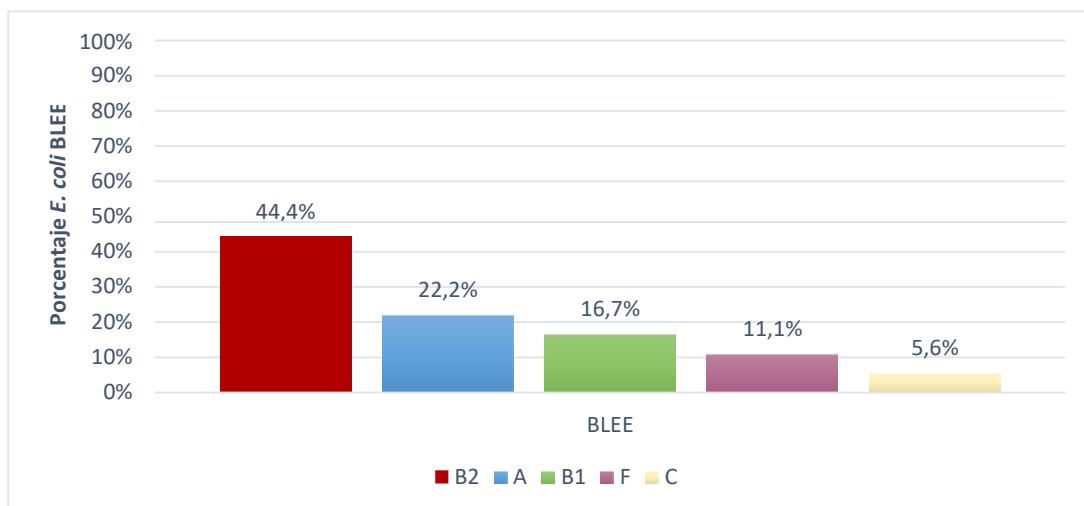


Figura 32. Distribución de grupos filogenéticos en aislamientos de *E. coli* BLEE productores de bacteriemia.

Entre las cepas productoras del enzima CTX-M 15, a excepción de un aislado que perteneció al grupo A, el resto pertenecieron al filogrupo B2 (6/7). De igual modo encontramos un predominio del filogrupo B2 en cepas CTX-M 14 (2/2). No obstante, en las 3 cepas productoras de CTX-M 1 y SHV-12 observamos una mayor disparidad dado que en ambas los aislamientos pertenecieron a los filogrupos A, B1, F (1/3 respectivamente) (**Tabla 22**).

Tabla 22: Relación entre grupo filogenético y el tipo de BLEE. ND: No determinado

CEPA	FILOGRUPO	CTX-M	SHV
1	B1	ND	ND
2	B1	CTX-M 1	ND
3	B2	CTX-M 14	ND
4	F	CTX-M 1	ND
5	A	CTX-M 1	ND
6	F	ND	SHV-12
7	B1	ND	SHV-12
8	B2	CTX-M 15	ND
9	B2	CTX-M 15	ND
10	B2	CTX-M 15	ND
11	B2	CTX-M 14	ND
12	B2	CTX-M 15	ND
13	A	ND	SHV-12
14	B2	CTX-M 15	ND
15	A	ND	ND
16	A	CTX-M 15	ND
17	C	ND	ND
18	B2	CTX-M 15	ND

La relación entre el tipo de adquisición y los grupos filogenéticos en la población adulta se encuentra en la **Tabla 23**. Cabe destacar que independientemente del tipo de adquisición el filogrupo B2 fue predominante. A éste le siguieron el grupo D en el caso de adquisición comunitaria, el grupo D y B1 en las bacteriemias relacionadas con la asistencia sanitaria y el segundo en frecuencia en las de adquisición nosocomial fue el B1. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

En la población infantil la mayor parte de los casos en neonatos pertenecieron al filogrupo B2 (72,7%) seguido de los grupos filogenéticos A, B1 y D con un 9,1% cada uno. En las de origen comunitario los filogrupos B2 y D representaron el 40% de los casos cada uno seguidos del grupo F con el 20%. La

adquisición nosocomial contó con dos casos en la población pediátrica de los cuales uno perteneció al grupo A y otro al B2 y el único episodio de RAS en este grupo de edad perteneció a un aislado del grupo B2 (**Tabla 23**).

Tabla 23. Tipo de adquisición en función de los filogrupos en población adulta.

N (%)	A (N=15)	B1 (N=18)	B2 (N=99)	C (N=9)	D (N=25)	E (N=4)	F (N=16)	DES. (N=1)	TOT.	p valor
Adultos								1.		0,307
Comunitarias	9 (9,6%)	5 (5,3%)	49 (52,1%)	5 (5,3%)	13 (13,3%)	3 (3,2%)	9 (9,6%)	1 (1,1%)	94	
RAS	2(5,3%)	5(13,2%)	21 (55,3%)	3 (7,8%,)	5 (13,2%)	1 (2,6%)	1 (2,6%)	0	38	
Nosocomiales	2 (5,6%)	7 (19,4%)	17 (44,7%)	1 (2,8%)	4 (11,1%)	0	5 (13,9%)	0	36	
Niños										
Comunitarias	0	0	2 (40%)	0	2 (40%)	0	1 (20%)	0	5	
RAS	0	0	1 (100%)	0	0	0	0	0	1	
Nosocomiales	1 (50%)	0	1 (50%)	0	0	0	0	0	2	
Neonatos	1 (9,1%)	1 (9,1%)	8 (72,7%)	0	1 (9,1%)	0	0	0	11	

La relación entre el foco de la bacteriemia y los grupos filogenéticos se refleja en la **Tabla 24**. Se observó un predominio del filogrupo B2 en todos los orígenes a excepción de la cepa cuyo origen fue la infección en piel y partes blandas que perteneció al grupo filogenético A. El grupo filogenético D fue el segundo más frecuente en infecciones de orígenes urinario y abdominal con un 15,6% y 14,6% de los aislados respectivamente. Los filogrupos A y B1, en principio poco patógenos, aparecen con porcentajes variables en diferentes orígenes. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupo filogenético y foco de origen de la bacteriemia.

En la población pediátrica, de los 11 casos de bacteriemias neonatales el 72,7% correspondieron al filogrupo B2 y el 9,1% de los casos a los grupos filogenéticos A, B1 y D. De los 6 casos de foco urinario, el 50% pertenecieron al grupo B2, el 33,3% al grupo D y el 14,3% a los grupos F. De los 2 aislamientos correspondiente a bacteriemias de origen desconocido uno perteneció al filogrupo A y otro al grupo B2 (**Tabla 24**).

IV. RESULTADOS

Tabla 24. Origen de la infección en función de los filogrupos en población adulta y niños.

N (%)	A (N=15)	B1 (N=18)	B2 (N=99)	C (N=9)	D (N=25)	E (N=4)	F (N=16)	DES. (N=1)	TOT.	P valor
ADULTOS										1,000
Urinario	6 (6,2%)	10 (10,3%)	51 (52,6%)	5 (5,2%)	15 (15,5%)	1 (1%)	8 (8,2%)	1 (1%)	97	
Desconocido	0	2 (11,1%)	12 (66,7%)	1 (5,6%)	0	1 (5,6%)	2 (11,1%)	0	18	
Respiratorio	0	1 (10%)	5 (50%)	1 (10%)	1 (10%)	1 (10%)	1 (10%)	0	10	
Abdominal	6 (14,6%)	4 (9,8%)	18 (43,9%)	2 (4,9%)	6 (14,6%)	1 (2,4%)	4 (9,8%)	0	41	
PPB	1 (100%)	0	0	0	0	0	0	0	1	
BRC	0	0	1 (100%)	0	0	0	0	0	1	
NIÑOS										
Urinario	0	0	3 (50%)	0	2 (33,3%)	0	1 (16,7%)	0	6	
Desconocido	1 (50%)	0	1 (50%)	0	0	0	0	0	2	
Neonatal	1 (9,1%)	1 (9,1%)	8 (72,7%)	0	1 (9,1%)	0	0	0	11	

La relación entre comorbilidades de los pacientes y el grupo filogenético de los aislados de *E. coli* causantes del episodio de bacteriemia se observa en la **Tabla 25**. En este caso también se encontró un predominio del filogrupo B2 en todas las comorbilidades analizadas excepto en los pacientes con hepatopatía donde el grupo filogenético mayoritario fue el B1 (27,3%; 3). El filogrupo D fue el segundo en frecuencia en todos los grupos, a excepción de los pacientes con enfermedad pulmonar crónica donde el segundo más frecuente fue el grupo filogenético B1 con un 23,1% de los aislados y en los pacientes con hepatopatía donde en segundo lugar se encontraron los filogrupos B1, B2 y F con un 18,2% respectivamente. Cabe destacar que sólo se observaron aislados del filogrupo E en pacientes con diabetes mellitus (4,6%) y enfermedad neoplásica concomitante (2,4%). No se observaron diferencias estadísticamente significativas.

En cuanto a los dispositivos, en los pacientes con sondaje urinario casi la mitad de los aislamientos pertenecieron al filogrupo B2 (46,7%) y también en este filogrupo se encontraron la mayoría de cepas procedentes de pacientes sometidos a ventilación mecánica/traqueotomía o con sondaje nasogástrico (**Tabla 25**).

Tabla 25. Comorbilidades y dispositivos en función de los filogrupos en población adulta.

N (%)	A (N=15)	B1 (N=18)	B2 (N=99)	C (N=9)	D (N=25)	E (N=4)	F (N=16)	TOTAL	p valor
COMORBILIDADES									
Diabetes mellitus	6,8% (3)	6,8% (3)	47,4% (21)	6,8% (3)	18,2% (8)	4,6% (2)	9,1% (4)	44	0,750
Cardiopatía previa	9,5% (4)	11,9% (5)	47,6% (20)	4,8% (2)	16,7% (7)	0	9,5% (4)	42	0,801
Enfermedad Pulmonar Crónica	3,8% (1)	23,1% (6)	46,2% (12)	3,8% (1)	12,5% (3)	0	11,5% (3)	26	0,551
Insuficiencia Renal Crónica	7,1% (2)	14,3% (4)	39,3% (11)	7,1% (2)	17,9% (5)	0	14,3% (4)	28	0,605
Hepatopatía	9,1% (1)	27,3% (3)	18,2% (2)	18,2% (2)	9,1% (1)	0	18,2% (2)	11	0,490
Neoplasia	9,8% (4)	12,2% (5)	46,3% (19)	12,2% (5)	9,8% (4)	2,4% (1)	7,3% (3)	41	0,833
DISPOSITIVOS									
Sonda urinaria	3,3% (1)	13,3% (4)	46,7% (14)	6,7% (2)	16,7% (5)	0	13,3% (4)	30	0,567
Ventilación mecánica/traqueotomía	9,1% (1)	0	72,7% (8)	0	19,1% (1)	0	19,1% (1)	11	0,833
Sonda nasogástrica	16,7% (1)	0	66,7% (4)	0	16,7% (1)	0	0	6	0,952

Como se observa en la **Figura 33** en pacientes con administración de antibióticos previo al episodio, el filogrupo B2 (43,6%) fue mayoritario seguido del filogrupo B1. En cuanto a los pacientes que desarrollaron shock séptico a raíz del episodio, más de la mitad de los aislados pertenecieron al filogrupo B2 (56,7%) al que le siguieron el grupo filogenético A y F con un 16,7% y 10% respectivamente. Entre los pacientes que fallecieron durante el proceso se observó que el 59,1% de los aislamientos pertenecían al filogrupo B2 siguiéndole en importancia el filogrupo A con un 18,2% de los aislados. Cabe destacar que tanto en los pacientes que desarrollaron shock séptico como en los que fallecieron por el episodio, el filogrupo A fue el tercero en frecuencia por detrás del B1 y no se observaron aislamientos pertenecientes al grupo filogenético E. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

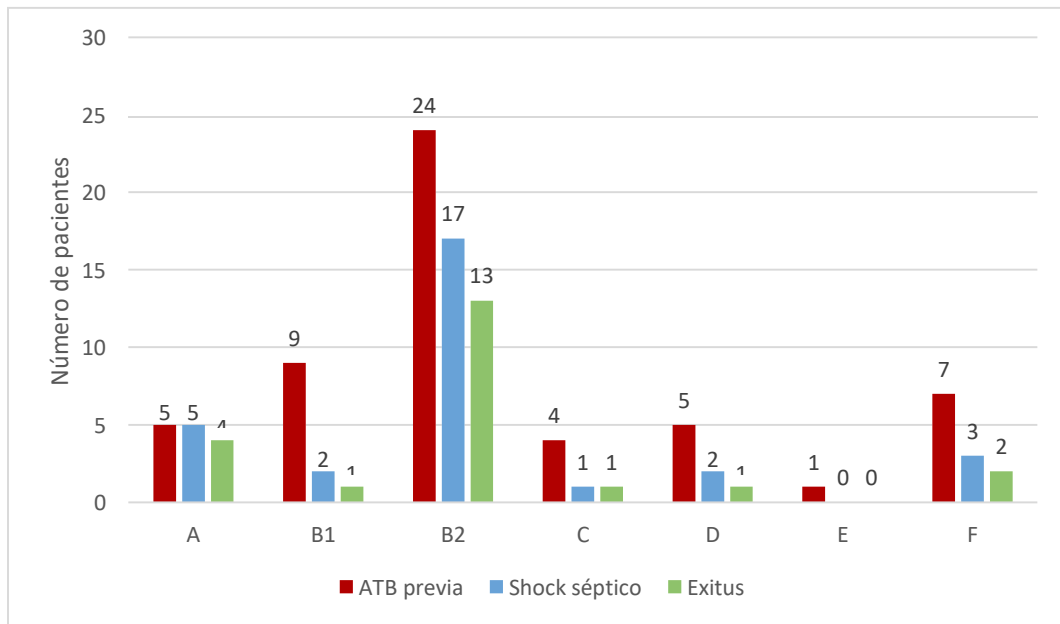


Figura 33. Antibioterapia previa, desarrollo de shock séptico y mortalidad en función de los filogrupos en la población adulta.

Las diferencias de resistencias antimicrobianas entre las cepas de *E. coli* pertenecientes a los diferentes grupos filogenéticos se muestran en la **Tabla 26**. Aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, en general las cepas pertenecientes a los filogrupos A y C fueron las más resistentes con más del 30% de sus cepas resistentes a 6 de los antibióticos testados. Le siguieron los filogrupos B1 y D en los cuales los porcentajes de resistencias fueron mayores al 30% en cuatro de los antibióticos. En los filogrupos B2, E y F sólo para tres de los antibióticos las tasas de resistencia fueron superiores al 30%. Se encontraron grandes diferencias de sensibilidad a los diferentes antibióticos entre los diferentes filogrupos excepto para ampicilina, que en todos los filogrupos los porcentajes fueron superiores al 50% con un rango entre 50% de cepas resistentes en el grupo F y un 87,5% en el grupo B1. En cuanto a la resistencia a amoxicilina-clavulánico fue superior al 25% en todos los filogrupos observándose las mayores tasas de resistencia en el filogrupo E (50%) seguido de los grupos A (46,7%), C (44,4%) y B2 (43%). El menor porcentaje de cepas resistentes aparecieron en el filogrupo F (25%). La tasa de resistencia a piperacilina-tazobactam fue muy

variable destacando un 46,7% en el grupo filogenético A y la ausencia de cepas resistentes en los filogrupos B1 y E.

En cuanto las cefalosporinas, se observaron tasas de resistencia a cefotaxima superiores al 30% en los filogrupos A (33,3%) y E (50%) siendo en el resto inferiores al 20%. Entre las resistencias a cefepime se observaron porcentajes inferiores al 30% entre los que destacó un 26,7% en cepas pertenecientes al filogrupo A (**Tabla 26**).

Las tasas de resistencia a ciprofloxacino fueron muy elevadas, superiores al 30% en todos los filogrupos, con rangos entre el 66,7 % en el filogrupo C y el 30,8% en el D. Para gentamicina destaca una resistencia del 33,3% en las cepas pertenecientes el filogrupo C mientras que en el resto de los filogrupos fueron inferiores al 20%. Por último, para cotrimoxazol también los porcentajes de resistencia fueron muy altos, superiores al 30% en todos los filogrupos excepto en el E (25%).

Tabla 26. Porcentaje de resistencia a diferentes antibióticos en función del filogrupo.

N(%)	A (N=15)	B1 (N=18)	B2 (N=99)	C (N=9)	D (N=25)	E (N=4)	F (N=16)
AMP	9 (60%)	14 (87,5%)	63 (64,3%)	5 (55,6%)	21 (84%)	3 (75%)	8 (50%)
XLD	7 (46,7%)	7 (38,9)	43 (43%)	4 (44,4%)	9 (34,6%)	2 (50%)	4 (25%)
PTC	7 (46,7%)	0	6 (6,1%)	3 (33,3%)	4 (15,4%)	0	1 (6,2%)
FOT	5 (33,3%)	3 (16,7%)	8(8,1%)	1(11,1%)	1 (3,8%)	2 (50%)	3 (18,8%)
CEF	4 (26,7%)	3 (16,7%)	8 (8,1%)	1 (11,1%)	0	0	2 (12,5%)
CIP	7 (46,7%)	11 (61,1%)	32 (32%)	6 (66,7%)	8 (30,8%)	2 (50%)	7 (44,7%)
GEN	2 (15,5%)	3 (18,7%)	6 (6,1%)	3 (33,3%)	2(8%)	0	2 (12,5%)
COT	6 (46,2%)	9 (56,2%)	25 (25,5%)	4 (44,4%)	13 (52%)	1 (25%)	5 (31,2%)

AMP, ampicilina; XLD, amoxicilina- ácido clavulánico; PTC, piperacilina-tazobactam; FOT, cefotaxima; CEF, cefepime; CIP, ciprofloxacino; GEN, gentamicina; COT, Cotrimoxazol.

3.4. Estudio de factores de virulencia en aislados de *E. coli* productores de bacteriemias.

Mediante PCR múltiple se detectó la presencia de 6 genes que codifican para diferentes factores de virulencia en cepas de *E. coli*: *sfa/foc* (codifica fimbrias S y F1C), *papA* y *papC* (subunidades estructurales de fimbrias), *afa/dra* (adhesinas Dr), *iutA* (aerobactina) y *kpsMT II* (síntesis de la cápsula). La presencia de ≥ 2 de estos factores permitió clasificar las cepas de *E. coli* en cepas patógenas extraintestinales, ExPEC (“*extraintestinal pathogenic Escherichia coli*”), según los criterios de Johnson y Stell (Johnson y Stell, 2000).

En el 12,2% (23/187) de los aislados no se amplificó ningún gen de virulencia y en el 17,1% (32/187) se detectó 1 factor de virulencia. El número de cepas de *E. coli* con ≥ 2 genes de virulencia supusieron el 69,8% (132/187) de las cepas por lo que, atendiendo al criterio de Johnson, este fue el porcentaje de cepas ExPEC en nuestro estudio. Entre las cepas ExPEC, el 17,7%(33) presentaron 2 genes de virulencia, el 16% (30) 3, el 27,8% (52) 4 factores de virulencia y el 9,1% (17) a 5 factores de virulencia. (Figura 34). En ninguna se detectaron los 6 genes.

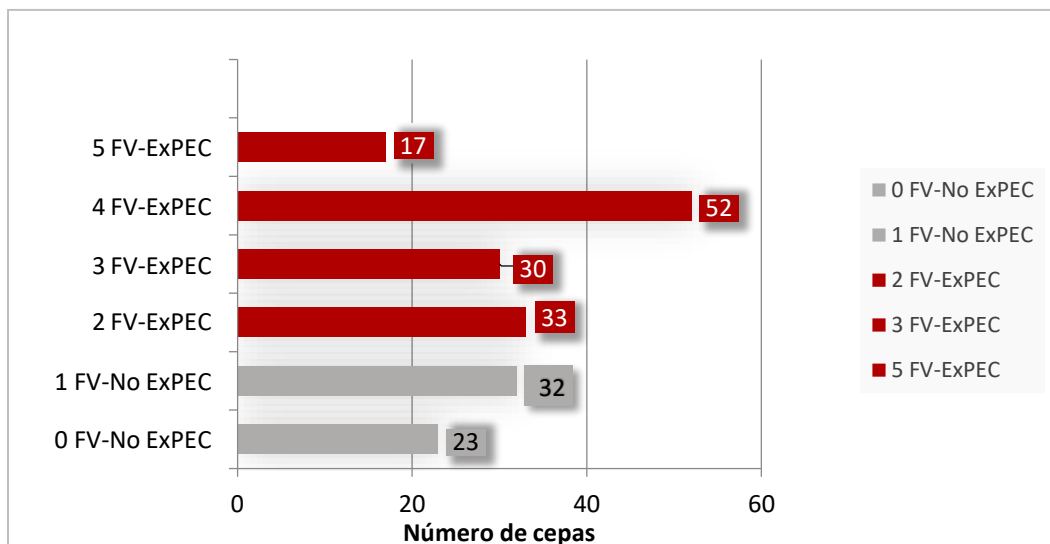


Figura 34. Distribución por número de factores de virulencia en aislamientos de *E. coli* productores de bacteriemia.

El gen de virulencia detectado con más frecuencia fue *iutA* siendo el 70,1 % de las cepas fueron portadoras de ese gen. También fueron frecuentes *kpsMTII*

detectándose en el 56,7% y el gen *papC*, que junto con el *papA* forman parte de subunidades estructurales de fimbrias, y se detectaron en el 54% y 46% de las cepas de *E. coli* respectivamente. Por el contrario, el gen *afa/dra* fue el gen de virulencia menos detectado presente en sólo el 5.9% de las cepas (**Tabla 27**).

Tabla 27. Distribución por tipo de genes de virulencia en aislamientos de *E. coli* productores de bacteriemia, cepas ExPEC, No-ExPEC y *E. coli* BLEE.

Gen (Factor de virulencia)	Nº de cepas de <i>E. coli</i> (187) N (%)	Nº de cepas ExPEC (132) N (%)	Nº de cepas No-ExPEC (55) N (%)	Nº de cepas BLEE (18) N (%)
<i>iutA</i>	131 (70,1%)	110(83,3%)	21 (38,2%)	15 (83,3%)
<i>kpsMT II</i>	106 (56,7%)	96 (72,7%)	10 (18,2%)	10 (55,6%)
<i>papC</i>	101 (54%)	101(76,5%)	0	8 (44,4%)
<i>papA</i>	86 (46%)	86(65,2%)	0	6 (33,3%)
<i>sfa/foc</i>	50 (26,7%)	49(37,1%)	1 (1,8%)	4 (22,2%)
<i>afa/dra</i>	11 (5,9%)	11 (8,3%)	0	0

Destacar que entre las cepas No-ExPeC, excepto en una en la que se amplificó el gen *sfa/foc* que codifica para fimbrias S y F1C, no se detectaron genes codificantes del resto de adhesinas y fimbrias estudiadas. En el 38% se detectó el gen *iutA*, (*aerobactina*) y en el 18,2% el gen que codifica la cápsula. Entre las cepas ExPec el gen detectado con más frecuencia fue también el gen *iutA*, presentando un porcentaje muy elevado el resto de genes, excepto los genes *sfa/foc* y *afa/dra* que sólo aparecen en el 37,1 y 8,3% de las cepas respectivamente. Los porcentajes se mantienen en las cepas BLEEs

Entre las 132 cepas de *E. coli* clasificadas como ExPEC la distribución en grupos filogenéticos fue la siguiente: un 62,1% de las cepas (82) pertenecieron al

IV. RESULTADOS

filogrupo B2, un 15,2% de las cepas (20) pertenecieron al filogrupo D, un 7,6% (10) al filogrupo F, un 5,3% (7) al filogrupo A, un 4,6% (6) al filogrupo C, un 3% (4) de las cepas pertenecieron al filogrupo E y finalmente el 1,5% (2) al filogrupo B1.

Por tanto, el 77,3% de las cepas ExPEC de nuestro estudio estuvieron incluidas en los grupos filogenéticos B2 y D, considerados como los filogramos más virulentos.

Entre las 55 cepas de *E. coli* clasificadas como No-ExPEC la distribución en grupos filogenéticos fue la siguiente: un 30,9% de las cepas (17) pertenecieron al filogrupo B2, un 29,1% (16) al filogrupo B1, un 14,5% (8) al filogrupo A, un 10,9% (6) al filogrupo F, el 9,1% de las cepas (5) pertenecieron al filogrupo D y un 5,5% (3) al filogrupo C.

Las 23 cepas en las que no se detectaron ninguno de los factores de virulencia estudiados, pertenecieron en su mayoría a los filogramos A y B1 (34,8% respectivamente), seguidas de los filogramos B2, y F, con un 17,4% y 13% respectivamente. Sin embargo, en el grupo de las 32 cepas con un factor de virulencia detectado, el filogrupo mayoritario volvió a ser el B2 con un 40,6%, a éste le siguieron el filogrupo B1 y D con un 25% y 15,6% respectivamente, seguidos de C y F, ambos con un 9,4%.

En la **Figura 35** se detallan la distribución de cepas ExPEC y No-ExPEC en los distintos grupos filogenéticos. Se observó un elevado porcentaje cepas ExPEC en lo filogramos B2 (82%; 82/99), D (76,9%; 20/25), C (66,7%; 6/9), F (62,5%; 10/16), alcanzando el 100% de los aislamientos en el filogrupo E (4/4). En contraposición las cepas No-ExPEC predominaron en los grupos filogenéticos A (53,3%; 8/15) y, especialmente, el B1 en el que el 88,9% (16/18) de los aislamientos fueron No-ExPEC.

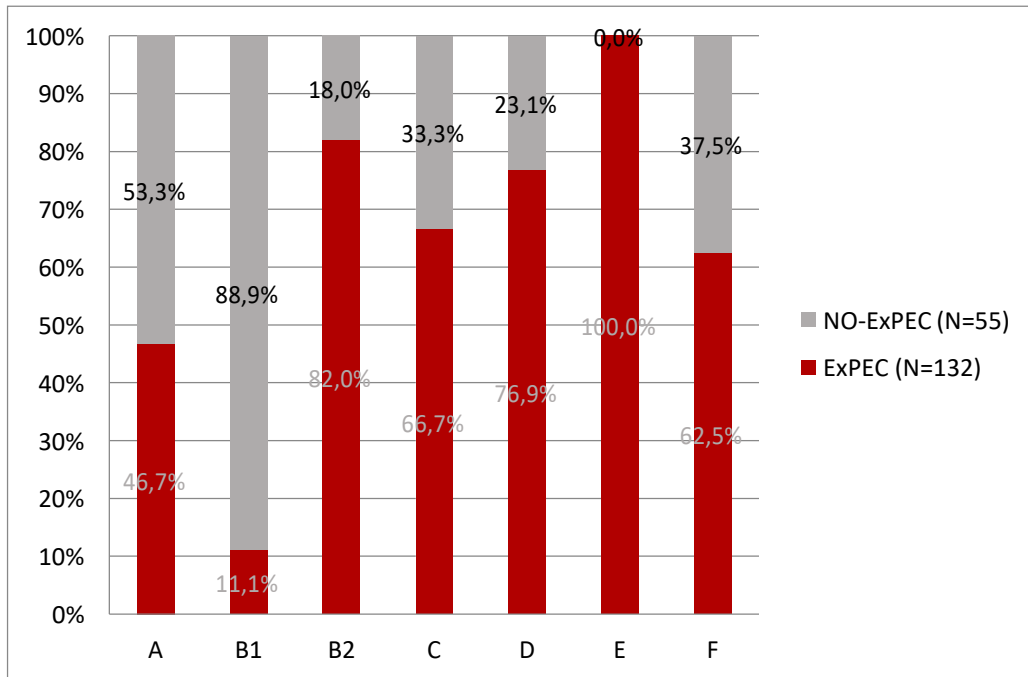


Figura 35. Distribución en porcentaje de cepas ExPEC y No-ExPEC en los distintos grupos filogenéticos.

El 77,8 % de cepas de *E. coli* productor de BLEE fueron clasificadas como ExPEC. La distribución de los factores de virulencia en estas cepas se muestra en la **Tabla 27**. Al igual que en el resto de cepas de *E. coli*, el gen de virulencia más frecuente fue *iutA*, (83,3%), seguido de *kpsMTII* (55,6%), destacando la ausencia de los genes de virulencia *sfa/focDE*.

La relación entre los genes de virulencia en los diferentes grupos filogenéticos se detalla en la **Tabla 28**. No se observó la presencia de un mismo gen en todas las cepas de un mismo filogrupo a excepción de los genes *papC* e *iutA* en el grupo filogenético E (en el que solo teníamos 4 cepas). Se encontró una gran diversidad en cuanto a la proporción específica de los genes en los distintos filogrupos entre las que destacaron las bajas tasas de los filogrupos A y B1

IV. RESULTADOS

Tabla 28. Distribución de genes de virulencia en función del grupo filogenético.

N (%)	A	B1	B2	C	D	E	F	DES
<i>papA</i>	3 (20%)	1 (5,6%)	54 (54,5%)	5 (55,6%)	17 (68%)	0	5 (31,3%)	1 (100%)
<i>papC</i>	4 (26,7)	1 (5,6%)	62 (62,6%)	5 (55,6%)	18 (72%)	4 (100%)	6 (37,5%)	0
<i>iutA</i>	7 (46,7)	10 (55,6%)	71 (71,7%)	8 (88,9%)	21 (84%)	4 (100%)	9 (56,3%)	1 (100%)
<i>kpsMT II</i>	3 (20%)	2 (11,1%)	73 (73,7%)	1 (11,1%)	15 (60%)	0	11 (68,8%)	1 (100%)
<i>afa/dra</i>	1 (6,7)	0	9 (9,1%)	0	0	0	1 (6,3%)	0
<i>sfa/foc</i>	1 (6,7)	0	44 (44,4%)	0	4 (16%)	1 (25%)	0	0
Total	15	18	99	9	25	4	16	1

En la población adulta, cuando se relaciona la patogenicidad de las cepas de *E. coli* con el tipo de adquisición de las bacteriemias se comprobó que un 76,6% de las BEC adquiridas en la comunidad estuvieron originadas por cepas ExPEC. En las BEC relacionadas con la asistencia sanitaria la tasa de ExPEC fue del 68,4% y, por último, en las BEC de adquisición nosocomial sólo la mitad de los aislamientos fueron ExPEC (52,8%). Aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas, se observó una tendencia estadística entre el tipo de adquisición y la presencia de cepas ExPEC ($p=0,057$).

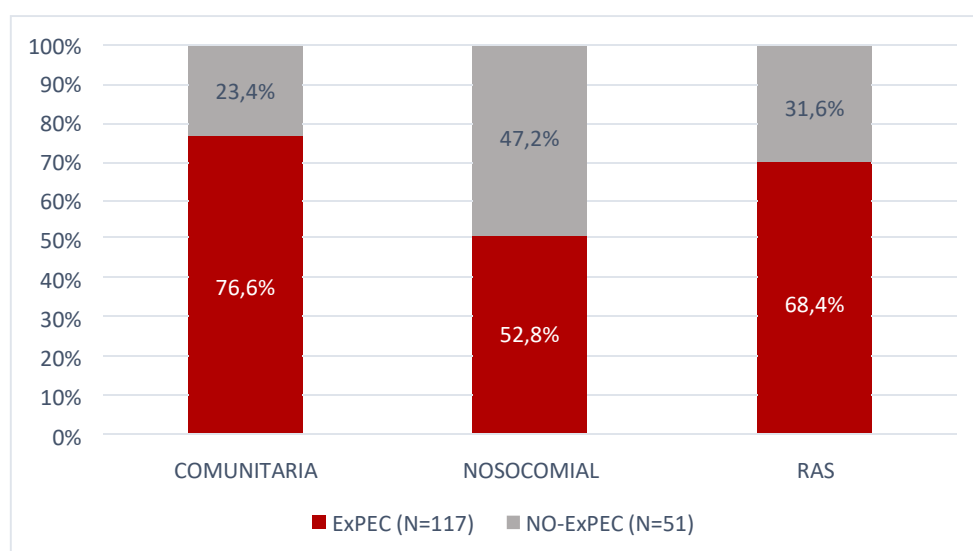


Figura 36. Distribución de cepas ExPEC y No-ExPEC en función del tipo de adquisición en la población adulta.

En la población infantil el 79% (15/19) de los aislados fue clasificado como ExPEC. En las BEC de transmisión vertical el 72,7% (8/11) de las cepas fueron ExPEC y entre las BEC comunitarias supusieron un 80%(4/5). En las BEC relacionadas con la asistencia sanitaria (1/1) y nosocomiales (2/2) todas las cepas fueron ExPEC.

En la **Figura 37** Se muestran la distribución de las cepas ExPEC según el foco de origen de la BEC en adultos. En las BEC de foco urinario las cepas ExPEC supusieron un 75,3%, en las de foco abdominal y desconocido el porcentaje fue ligeramente superior al 50% (56,1 y 57,9%, respectivamente) y existió un claro predominio de las cepas ExPEC como productoras de BEC de origen respiratorio.

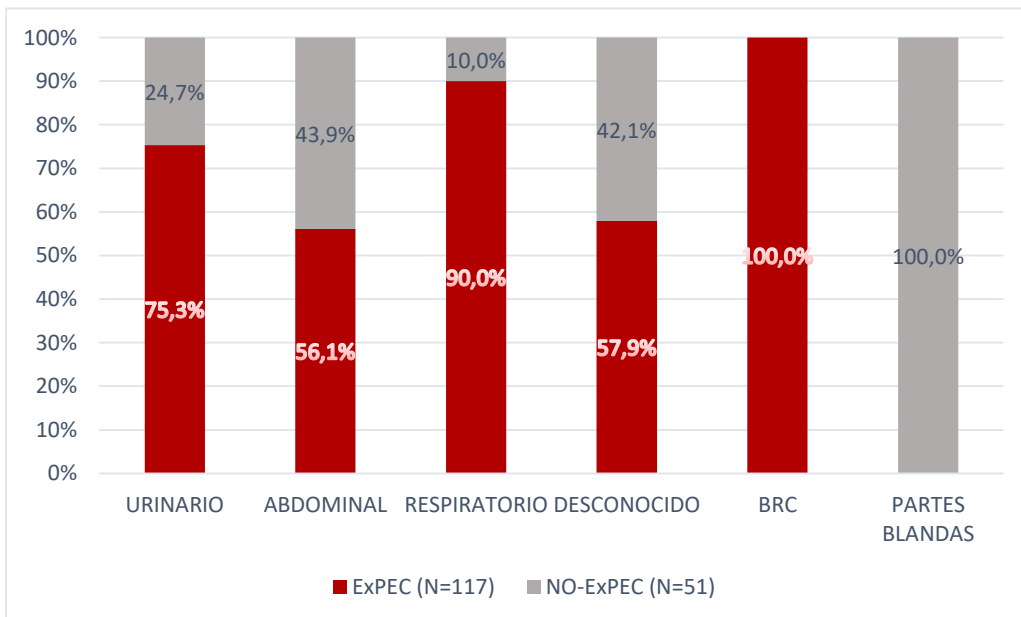


Figura 37. Distribución de cepas ExPEC y No-ExPEC en función del origen de la bacteriemia en población adulta (%).

En la población infantil las cepas ExPEC supusieron un 83,3% (5/6) de los aislamientos en las bacteriemias por *E. coli* de foco urinario, un 72,7% (8/11) en el foco vertical, un y un 100% (2/2) de las bacteriemias con origen desconocido

IV. RESULTADOS

La proporción de bacteriemias por cepas ExPEC fue superior a la de cepas No-ExPEC independientemente de la enfermedad de base del paciente a excepción de los pacientes con hepatopatía donde la proporción de No-ExPEC fue superior (63,6% No-ExPEC vs 36,4% ExPEC) y en la que se observó una tendencia estadística ($p= 0,094$). En cuanto al resto de comorbilidades no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, siendo las mayores tasas de ExPEC las encontradas en pacientes con diabetes mellitus con un 77,3 % (**Figura 38**).

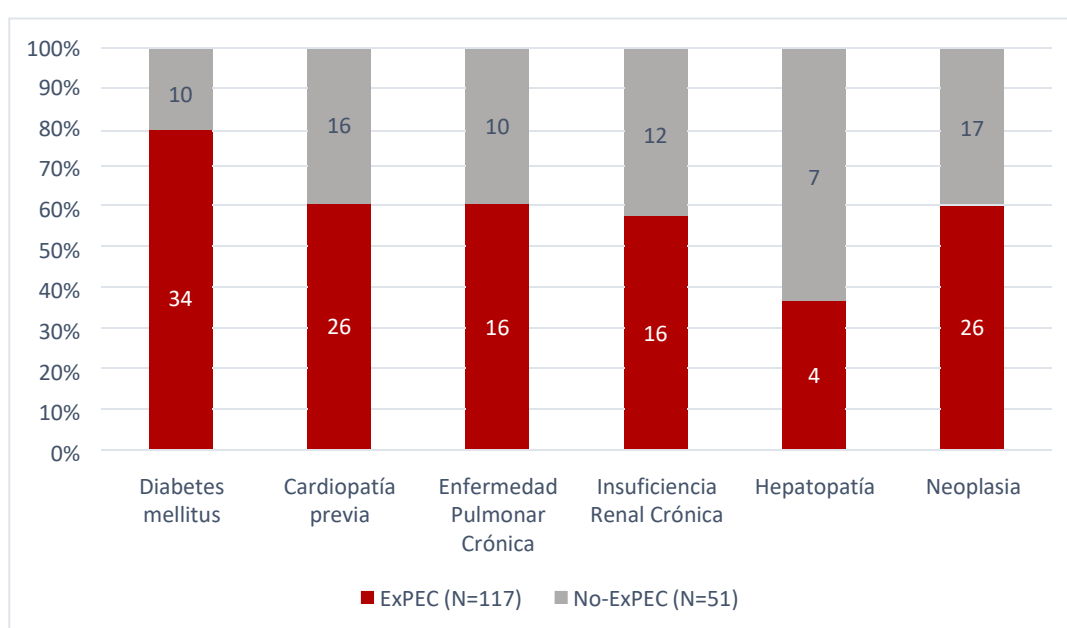


Figura 38. Distribución de cepas ExPEC y No-ExPEC en función de las comorbilidades en pacientes adultos (N).

En cuanto a la proporción de BEC producidas por cepas ExPEC según los diferentes factores de riesgo asociados a dispositivos biomédicos destacaron un 72,7% en pacientes sometidos a ventilación mecánica y/o traqueostomizados y un 56,7% de los pacientes con sondaje urinario. No se observaron diferencias significativas. En cuanto a la toma de antibióticos previa al episodio en el 58,2% de los casos estuvo implicado una cepa de *E. coli* de tipo ExPEC observándose una tendencia a la significación ($p=0,090$). Entre los pacientes que desarrollaron shock

séptico la tasa de ExPEC fue del 66,7% y en los pacientes que fallecieron a causa del episodio de BEC la proporción se elevó al 77,2% (**Figura 39**).

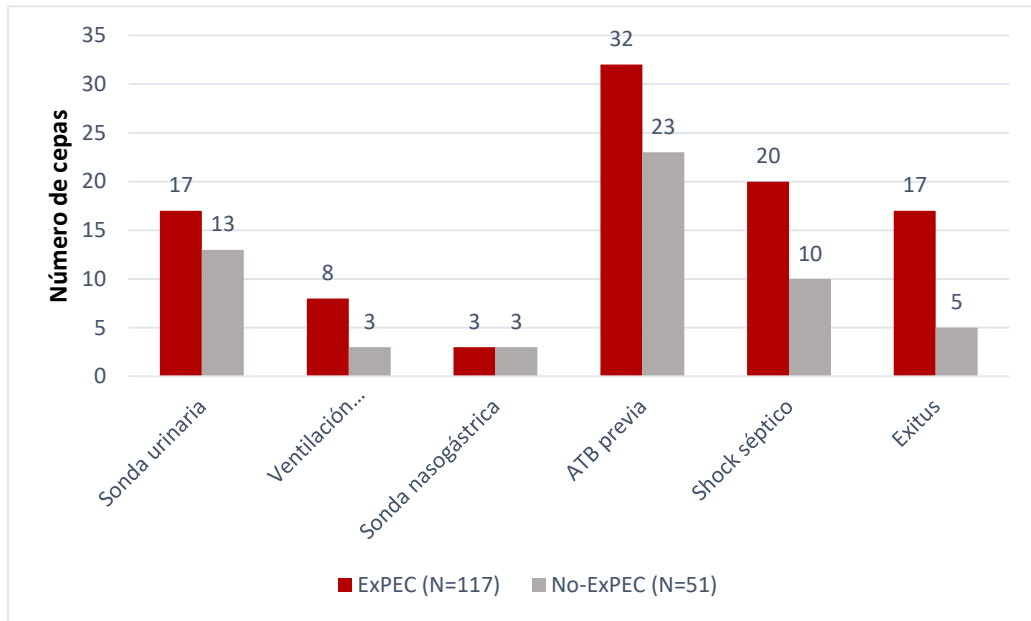


Figura 39. Distribución de cepas ExPEC y No-ExPEC en función de factores de riesgo y desenlace del episodio en población adulta.

Las diferencias de sensibilidad entre los *E. coli* clasificados ExPEC y No-ExPEC se reflejan en la **Figura 40**. En todos los betalactámicos estudiados se observaron mayores porcentajes de resistencia de las cepas ExPEC frente a las No-ExPEC. Sin embargo, para el resto de antibióticos los porcentajes de resistencia fueron superiores en las cepas No-ExPEC: ciprofloxacino (52,7% No-ExPEC vs 32,6% ExPEC), gentamicina (10,1% No-ExPEC vs 8,4% ExPEC) y cotrimoxazol (33,1% No-ExPEC vs 34,6% ExPEC).

IV. RESULTADOS

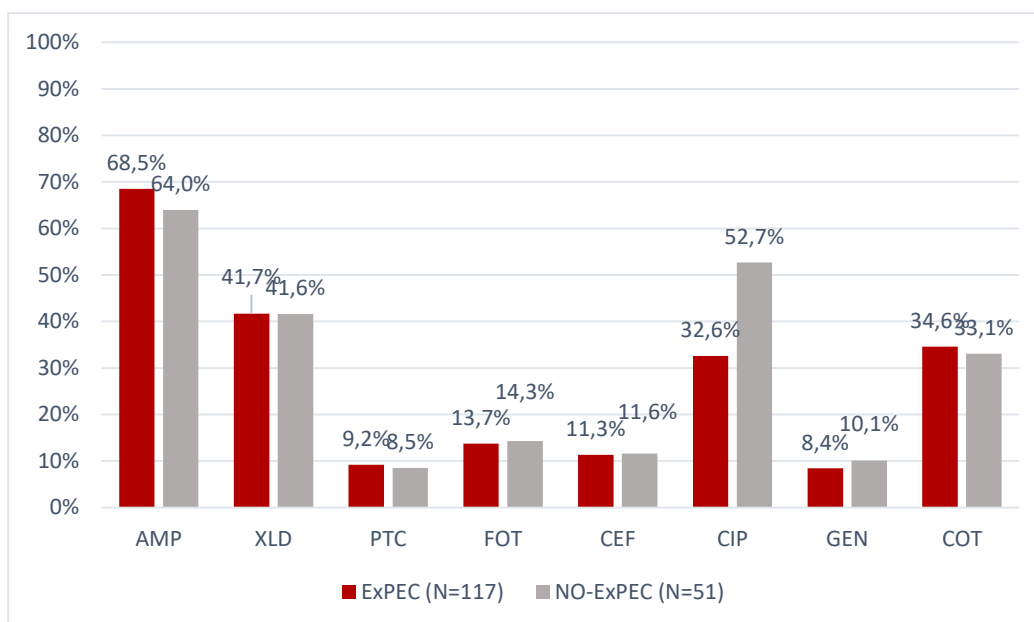


Figura 40. Porcentaje de resistencia a diferentes antibióticos en cepas ExPEC y No-ExPEC. * AMP, ampicilina; XLD, amoxicilina- ácido clavulánico; PTC, piperacilina-tazobactam; FOT, cefotaxima; CEF, cefepime; CIP, ciprofloxacino; GEN, gentamicina; COT, trimetoprim- sulfametoxazol.

3.5. Tipificación molecular.

3.5.1. Detección de STs en *E. coli* pertenecientes a los grupos filogenéticos B2 y D.

La caracterización clonal se realizó a los aislamientos incluidos en los filogrupos B2 y D (126 de los 187 aislamientos, 67,4%) mediante una PCR inicial que permite caracterizar los STs más prevalentes en bacteriemias (ST69, ST73, ST95 y ST131). Como se ha comentado en apartados anteriores los complejos clonales ST73, ST95 y ST131 se asocian al grupo filogenético B2 y el complejo clonal ST69 se relaciona con el filogrupo D. Adicionalmente, se completó el estudio mediante MLST a todos los aislados de grupo B2 (27 cepas) e igualmente se caracterizaron todas las cepas de *E. coli* productoras de BLEE no caracterizados previamente (11 cepas).

Dentro de las cepas del grupo filogenético B2 (n=99) el clon mayoritario fue el ST95 que supuso el 28,3% (28/99) de los aislamientos, seguido de ST73 con un 24,2% (24/99) de aislamientos y el clon pandémico ST131 con un 20,2% (20/99). En el resto de aislamientos se encontró una gran diversidad de STs entre los que destacó, a mucha distancia de los anteriores, un 3% (3/99) aislamientos pertenecientes a ST569. (**Tabla 29**)

Tabla 29. Estructura poblacional de aislamientos de *E. coli* B2.

ST % (N)	TOTAL % (N=99)
ST95	28,3% (28)
ST73	24,2% (24)
ST131	20,2% (20)
ST569	3% (3)
ST14	2% (2)
ST127	2% (2)
ST141	2% (2)
ST428	2% (2)
ST5328	2% (2)
ST404	2% (2)
ST357	1% (1)
ST59	1% (1)
ST550	1% (1)
ST2844	1% (1)
ST355	1% (1)
ST83	1% (1)
ST775	1% (1)
ST117	1% (1)
ST388	1% (1)
ST2736	1% (1)
ST5748	1% (1)
DESCONOCIDO	1% (1)

De las 25 cepas del filogrupo D, 16 pertenecieron al clon ST69 (64%). El resto no fueron caracterizadas. Cabe destacar que en ninguno de los aislamientos del filogrupo B2 pertenecieron al clon ST69, así como en ningún aislamiento del filogrupo D se caracterizó como perteneciente a los complejos clonales ST73, ST95 y ST131.

Entre las 18 cepas de *E. coli* productoras de BLEE estudiadas destaca el elevado porcentaje de cepas BLEE del linaje ST131, que supusieron el 38,9% del total, seguido del ST 155 con un 11,1% (2/18) del total de *E. coli* BLEE. El resto de STs aparecieron con una frecuencia del 5,6% (**Tabla 30**). Como era de esperar, todos los aislamientos pertenecientes al clon ST131 eran del filogrupo B2. Destacar que las dos cepas del ST155 pertenecieron al filogrupo B1. Estos aislamientos ST155 procedieron de un episodio de adquisición nosocomial en un paciente ingresado en cirugía general con una bacteriemia de foco abdominal y de un paciente con un episodio comunitario de foco urinario

Tabla 30. Estructura poblacional de aislamientos de *E. coli* productores de BLEE.

Filogrupo (N)	ST	TOTAL BLEE % (N=18)
B2 (8)	ST131	38,9 %
	ST404	5,6%
B1 (3)	ST155	11,1%
	ST1844	5,6%
A (4)	ST23	5,6%
	ST34	5,6%
	ST44	5,6%
	ST93	5,6%
C (1)	ST88	5,6%
F (2)	ST354	5,6%
	ST457	5,6%

En cuanto a la relación entre los STs y el tipo de BLEE cabe destacar que todas las cepas correspondientes al clon ST131 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-M14. En el aislamiento correspondiente a ST404 se observó CTX-M 14 y en ST44 CTX-M 15. Las 3 BLEEs caracterizadas como CTX-M 1 procedieron de los STs 34, 457 y 1844.

3.6. Características clínicas y microbiológicas de bacteriemias por los STs más frecuentes.

Se analizaron 14 episodios de bacteriemias por *E. coli* ST69 (BEC-ST69) y 154 episodios a bacteriemias por *E. coli* de clones distintos a ST69 (BEC-NOST69). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la edad, sexo, comorbilidades, dispositivos y gravedad entre cepas ST69 y No-ST69 (Tabla 31).

Tabla 31. Distribución por edad, sexo, comorbilidades, dispositivos, antibioterapia previa, gravedad y mortalidad en pacientes con episodio de BEC-ST69 y BEC-NOST69.

N (%)	BEC-ST69 (N=14)	BEC-NOST69 (N=149)	p valor
EDAD	63±24,2 (34A-91A)	63±23,8 (13-94A)	
SEXO			0,625
Hombres	6 (43%)	50 (34%)	
Mujeres	8 (57%)	62 (55%)	
COMORBILIDADES			
Diabetes mellitus	4 (28,6%)	40 (26,9%)	0,878
Cardiopatía previa	5 (35,7%)	37 (24,8%)	0,365
Enfermedad pulmonar crónica	1 (7,1%)	25 (16,8%)	0,351
Insuficiencia renal crónica	4 (28,6%)	24 (16,1%)	0,232
Hepatopatía	0 (0%)	11 (7,4%)	0,294
Neoplasia	3 (21,4%)	38 (25,5%)	0,708
DISPOSITIVOS			
Sondaje urinario	3 (21,4%)	27 (17,5%)	0,716
Ventilación mecánica/traqueotomía	1 (7,1%)	10 (6,5%)	0,920
Sonda nasogástrica	1 (7,1%)	5 (3,2%)	0,448
ATB previa	3 (21,4%)	52 (33,8%)	0,346
Shock séptico	1 (7,1%)	29 (18,9%)	0,278
Exitus	0 (0%)	22 (14,3%)	0,131

Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al tipo de adquisición ni el origen de la infección entre los dos grupos. No obstante, la proporción de bacteriemias de origen comunitario fue mayoritaria en el grupo BEC-ST69 alcanzando el 71,4% de los episodios frente al 54,6% en BEC-

STNO69 mientras que la tasa de adquisición nosocomial y RAS en BEC-ST69 fue inferior con respecto a BEC-NOST69 (**Tabla 32**).

Tabla 32. Tipo de adquisición y foco de infección de BEC-ST69 y BEC-NOST69 en episodios de población adulta.

N (%)	BEC-ST69 (N=14)	BEC-NOST69 (N=154)	p valor
PROCEDENCIA			0,462
Comunitaria	10 (71,4%)	84 (54,6%)	
Nosocomial	2 (14,3%)	34 (22,1%)	
RAS	2 (14,3%)	36 (23,4%)	
FOCO INFECCIÓN			0,434
Urinario	10 (71,4%)	87 (56,5%)	
Desconocido	0 (0%)	18 (11,7%)	
Respiratorio	2 (14,3%)	8 (5,2%)	
Abdominal	2 (14,3%)	39 (25,3%)	
Partes blandas	0 (0%)	1 (0,7%)	
BRC	0 (0%)	1 (0,7%)	

En cuanto a las resistencias antibióticas, destacan la mayor resistencia a ampicilina en el grupo BEC-ST69 frente a BEC-NOST69 (92,9% vs 61,7%) y a piperacilina-tazobactam (14,3% vs 8,4%), no observando diferencias estadísticamente significativas. La resistencia a cotrimoxazol fue superior en cepas ST69 (64,3 % en BEC-ST69 frente a 31,8% en BEC-STNO69) observándose diferencias estadísticamente significativas ($p=0,050$). Sin embargo, se observan tasas menores de resistencia para ciprofloxacino (14,3 % en BEC-ST69 frente a 42,2% en BEC-STNO69), siendo esta diferencia también estadísticamente significativa ($p= 0,044$) (**Tabla 33**).

IV. RESULTADOS

Tabla 33. Porcentajes de resistencia a diferentes antibióticos en cepas ST69 y No-ST69.

<i>E. coli</i>			
Resistencia N (%)	ST69 (N=14)	No-ST69 (N=154)	<i>p</i> valor
Ampicilina	13 (92,9%)	95 (61,7%)	0,134
Amoxicilina-clavulánico	6 (42,9%)	64 (41,6%)	0,039
Piperacilina-tazobactam	2 (14,3%)	13 (8,4%)	0,574
Cefotaxima	0	22 (14,3%)	0,131
Cefepime	0	18 (11,7%)	0,177
Ciprofloxacino	2 (14,3%)	65 (42,2%)	0,044
Gentamicina	2 (14,3%)	15 (9,7%)	0,666
Cotrimoxazol	9 (64,3%)	49 (31,8%)	0,050

La proporción de ExPEC fue superior en cepas ST69 frente a las NoST69 (78,6% vs 68,8%). En cuanto a los genes de virulencia analizados en cepas ST69 *iutA* se observó en el 100% ($p=0,014$) de los aislamientos, *papC* en el 78,6% ($p=0,064$) y *papA* en el 71,4% ($p= 0,059$) de los aislamientos siendo estas tasas superiores a la de las cepas No ST69, siendo estadísticamente significativos en el caso del gen *iutA* y observándose una tendencia estadística en los genes *papA* y *papC*. En contraposición los genes menos presentes en aislamientos ST69 fueron *KpsMTII* en un 28,6% ($p=0,042$) de los aislamientos y *sfa/foc* en un 7,1%, ambos con tasas inferiores a cepas No-ST69, siendo estadísticamente significativas en el caso de *KpsMTII*. No se observaron aislamientos con el factor de virulencia *afa/dra* (Tabla 34).

Tabla 34. Distribución de ExPEC y genes de virulencia en cepas ST69 y No-ST69.

FV N (%)	BEC (N=168)	BEC-ST69 (N=14)	BEC-NOST69 (N=154)	<i>p</i> valor
ExPEC	117 (69,4%)	11 (78,6%)	106 (68,8%)	0,456
<i>papA</i>	80 (47,6%)	10 (71,4%)	70 (45,5%)	0,059
<i>papC</i>	93 (55,4%)	11 (78,6%)	82 (53,2%)	0,064
<i>iutA</i>	120 (71,4%)	14 (100%)	106 (68,8%)	0,014
<i>kpsMTII</i>	91 (54,2%)	4 (28,6%)	87 (56,5%)	0,042
<i>sfa/foc</i>	43 (25,6%)	1 (7,1%)	42 (27,3%)	0,101
<i>afa/dra</i>	11 (6,6%)	0	11 (7,1%)	0,303

Se encontraron 22 episodios correspondientes a 21 pacientes adultos de Bacteriemias por *E. coli* ST73 (BEC-ST73) y 146 episodios en 142 pacientes adultos de Bacteriemias por *E. coli* de clones distintos a ST73 (BEC-NOST73). En este caso tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a edad, sexo, dispositivos y comorbilidades de los pacientes, aunque las tasas de comorbilidades en el grupo de BEC-ST73 fueron considerablemente inferiores a las del grupo de BEC-NOST73. No obstante, la exposición previa a antibióticos fue superior en el grupo BECSNOT73 frente a BEC-ST73 siendo la diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos (35,6% BEC-NOST73 vs 13,6% BEC-ST73; $p=0,039$). La tasa de pacientes que desarrollo shock séptico fue levemente superior en el grupo BEC-ST73 y la mortalidad fue similar en ambos grupos (13,6% BEC-ST73 vs 13% BEC-NOST73) (**Tabla 35**).

Tabla 35. Distribución por edad, sexo, comorbilidades, dispositivos, antibioterapia previa, gravedad y mortalidad en pacientes con episodio de BEC-ST73 y BEC-NOST73.

N (%)	BEC (N=163)	BEC-ST73 (N=21)	BEC-NOST73 (N=142)	p valor
EDAD	64±23,3 (13-94A)	64±24,0 (42A-93A)	63±23,8 (13-94A)	
SEXO				0,713
Hombres	56 (48%)	10 (43%)	46 (34%)	
Mujeres	70 (52%)	12 (57%)	58 (55%)	
COMORBILIDADES				
Diabetes mellitus	44 (27,0%)	3 (14,3%)	41 (28,9%)	0,165
Cardiopatía previa	42 (25,8%)	3 (14,3%)	39 (27,5%)	0,203
Enfermedad pulmonar crónica	26 (16,0%)	1 (4,8%)	25 (16,3%)	0,136
Insuficiencia renal crónica	28 (17,2%)	2 (9,5%)	26 (18,3%)	0,325
Hepatopatía	11 (6,8%)	0 (0%)	11 (7,7%)	0,188
Neoplasia	41 (25,2%)	4 (19,1%)	37 (26,1%)	0,461
DISPOSITIVOS				
Sondaje urinario	30 (17,9%)	3 (13,6%)	27 (17,5%)	0,579
Ventilación mecánica/traqueotomía	11 (6,5%)	3 (13,6%)	8 (5,5%)	0,146
Sonda nasogástrica	6 (3,6%)	2 (9,1%)	4 (2,7%)	0,132
ATB previa	55 (32,7%)	3 (13,6%)	52 (35,6%)	0,041
Shock séptico	30 (17,9%)	5 (22,7%)	29 (19,8%)	0,513
Exitus	22 (13,1%)	3 (13,6%)	19 (13,0%)	0,926

IV. RESULTADOS

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto tipo de adquisición ni origen de la infección, pero la proporción de bacteriemias de origen comunitario fue superior en el grupo BEC-ST73 con un 63,6% de los episodios frente al 54,8% en BEC-STNO73. La tasa de adquisición nosocomial en BEC-ST73 fue inferior con respecto a BEC-NOST73 mientras las de RAS fueron similares en ambos grupos (**Tabla 36**).

Tabla 36. Tipo de adquisición y foco de infección de BEC-ST73 y BEC-NOST73 en episodios de población adulta.

N (%)	BEC (N=168)	BEC-ST73 (N=22)	BEC-NOST73 (N=146)	<i>p</i> valor
PROCEDENCIA				0,583
Comunitaria	94 (56,0%)	14 (63,6%)	80 (54,8%)	
Nosocomial	36 (21,4%)	3 (13,6%)	33 (22,6%)	
RAS	38 (22,6%)	5 (22,8%)	33 (22,6%)	
FOCO INFECCIÓN				0,910
Urinario	97 (57,7%)	12 (54,6%)	85 (58,2%)	
Desconocido	19 (11,3%)	4 (18,2%)	15 (10,3%)	
Respiratorio	12 (7,1%)	1 (4,5%)	11 (7,5%)	
Abdominal	47 (28,0%)	5 (22,7%)	42 (28,8%)	
Partes blandas	2 (1,2%)	0 (0%)	1 (0,7%)	
BRC	1 (0,6%)	0 (0%)	1 (0,7%)	

Destacaron menores porcentajes de resistencia que fueron estadísticamente significativos en cepas ST73 frente a cepas No-ST73 en los antibióticos ciprofloxacino ($p= 0,017$) y cotrimoxazol ($p= 0,022$). No se observaron resistencias a cefotaxima, cefepime y gentamicina en cepas ST73 y la resistencia amoxicilina-clavulanico fue levemente superior frente a cepas No-ST73 sin observarse diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los antibióticos (**Tabla 37**).

Tabla 37. Porcentajes de resistencia a diferentes antibióticos en cepas ST73 y No-ST73.

<i>E. coli</i>				
Resistencia N(%)	(N=168)	ST73 (N=22)	No-ST73 (N=146)	<i>p</i> valor
Ampicilina	108 (64,3%)	15 (68,2%)	93 (63,7%)	0,772
Amoxicilina-clavulánico	70 (41,7%)	11 (50,0%)	59 (40,4%)	0,137
Piperacilina-tazobactam	15 (8,9%)	2 (9,1%)	13 (8,9%)	0,915
Cefotaxima	22 (13,1%)	0	22 (15,1%)	0,052
Cefepime	18 (10,7%)	0	18 (12,3%)	0,082
Ciprofloxacino	67 (39,9%)	3 (13,6%)	64 (43,8%)	0,017
Gentamicina	17 (10,1%)	0	17 (11,1%)	0,136
Cotrimoxazol	58 (34,5%)	1 (4,5%)	57 (39,0%)	0,002

El porcentaje de ExPEC entre aislamientos pertenecientes al clon ST73 fue del 95,5%, observándose diferencias estadísticamente significativas frente cepas No-ST73 ($p=0,050$). También los porcentajes de los factores de virulencia fueron superiores en cepas ST73, observándose diferencias estadísticamente significativas en todos los genes a excepción de *iutA* ($p=0,100$) y *afa/dra* ($p= 0,303$) que no se encontró en cepas ST73 (Tabla 38).

Tabla 38. Distribución de ExPEC y genes de virulencia en cepas ST73 y No-ST73.

FV N (%)	BEC (N=168)	BEC-ST73 (N=22)	BEC-NOST73 (N=146)	<i>p</i> valor
ExPEC	117 (69,4%)	21 (95,5%)	96 (65,8%)	0,050
<i>papA</i>	80 (47,6%)	18 (81,8%)	62 (42,5%)	0,001
<i>papC</i>	93 (55,4%)	20 (91%)	73 (50%)	0,000
<i>iutA</i>	120 (71,4%)	19 (86,4%)	101 (69,2%)	0,100
<i>kpsMTII</i>	91 (54,2%)	17 (77,3%)	74 (50,7%)	0,021
<i>sfa/foc</i>	43 (25,6%)	19 (86,4%)	24 (16,4%)	0,000
<i>afa/dra</i>	11 (6,6%)	0	11 (7,5%)	0,185

Se produjeron 22 episodios en adultos de bacteriemias por *E. coli* ST95 (BEC-ST95) y 146 episodios a Bacteriemias por *E. coli* de clones distintos (BEC-NOST95). En este caso tampoco se observaron diferencias

IV. RESULTADOS

estadísticamente significativas entre los grupos BEC-ST95 y BENOST95 en cuanto a la edad, sexo, comorbilidades, dispositivos ni gravedad (**Tabla 39**).

Tabla 39. Distribución por edad, sexo, comorbilidades, dispositivos, antibioterapia previa, gravedad y mortalidad en pacientes con episodio de BEC-ST95 y BEC-NOST95.

N (%)	BEC (N=163)	BEC-ST95 (N=20)	BEC-NOST95 (N=143)	p valor
EDAD	64±23,3 (13-94A)	63±24,4 (20A-85A)	63±23,8 (13-94A)	
SEXO				0,172
Hombres	56 (48%)	7 (35%)	49 (34%)	
Mujeres	70 (52%)	13 (65%)	57 (66%)	
COMORBILIDADES				
Diabetes mellitus	44 (27,0%)	7 (35%)	37 (25,9%)	0,379
Cardiopatía previa	42 (25,8%)	6 (30%)	36 (25,2%)	0,631
Enfermedad pulmonar crónica	26 (16,0%)	3 (15%)	23 (16,1%)	0,911
Insuficiencia renal crónica	28 (17,2%)	1 (5%)	27 (18,9%)	0,126
Hepatopatía	11 (6,8%)	0 (0%)	11 (7,7%)	0,201
Neoplasia	41 (25,2%)	4 (20%)	37 (25,8%)	0,540
DISPOSITIVOS				
Sondaje urinario	30 (17,9%)	2 (9,1%)	28 (19,2%)	0,249
Ventilación mecánica/traqueotomía	11 (6,5%)	1 (4,6%)	10 (6,9%)	0,689
Sonda nasogástrica	6 (3,6%)	0 (0%)	6 (4,1%)	0,335
ATB previa	55 (32,7%)	5 (22,7%)	50 (34,3%)	0,283
Shock séptico	30 (17,9%)	3 (13,6%)	27 (18,5%)	0,588
Exitus	22 (13,1%)	3 (13,6%)	19 (13,0%)	0,926

Las bacteriemias de origen comunitario fueron predominantes en ambos grupos, pero superiores en el grupo BEC-ST95 frente a BEC-STNO95 mientras que la adquisición nosocomial y RAS fue menor en BEC-ST95 frente a BEC-NOST95 (**Tabla 40**). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos BEC-ST95 y BENOST95 en cuanto al tipo de adquisición ni el foco de la infección (**Tabla 40**).

Tabla 40. Tipo de adquisición y foco de infección de BEC-ST95 y BEC-NOST95 en episodios de población adulta.

N (%)	BEC (N=168)	BEC-ST95 (N=22)	BEC-NOST95 (N=146)	p valor
PROCEDENCIA				0,425
COMUNITARIA	94 (56,0%)	15 (68,2%)	79 (54,1%)	
NOSOCOMIAL	36 (21,4%)	3 (13,6%)	33 (22,6%)	
RAS	38 (22,6%)	4 (18,2%)	34 (23,3%)	
FOCO DE INFECCIÓN				0,556
Urinario	97 (57,7%)	16 (72,7%)	81 (55,5%)	
Desconocido	19 (11,3%)	1 (4,6%)	18 (12,3%)	
Respiratorio	12 (7,1%)	2 (9,1%)	10 (6,9%)	
Abdominal	47 (28,0%)	3 (13,6%)	44 (30,1%)	
Partes blandas	2 (1,2%)	0 (0%)	1 (0,7%)	
BRC	1 (0,6%)	0 (0%)	1 (0,7%)	

Los porcentajes de resistencia antibióticos de cepas ST95 fueron inferiores a las de cepas no pertenecientes a este linaje a excepción de las combinaciones de betalactámico-inhibidor de betalactamasas como amoxicilina-clavulánico (50% en cepas ST95 vs 40,4% en cepas No-ST95) y piperacilina-tazobactam (19,1% en cepas ST95 vs 7,5% en cepas No-ST95) observándose en este último caso diferencias estadísticamente significativas ($p=0,025$). En este caso tampoco se observaron resistencias a cefotaxima, cefepime ni gentamicina en cepas ST95, no obstante, la resistencia a ciprofloxacino en cepas No-ST95 fue superior a las ST95 siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0,028$) (**Tabla 41**).

Tabla 41. Porcentajes de resistencia a diferentes antibióticos en cepas ST95 y No-ST95.

<i>E. coli</i>				
RESISTENCIA N(%)	(N=168)	ST95 (N=22)	No-ST95 (N=146)	p valor
Ampicilina	108 (64,3%)	14 (63,6%)	94 (64,4%)	0,753
Amoxicilina-clavulánico	70 (41,7%)	11 (50%)	59 (40,4%)	0,434
Piperacilina-tazobactam	15 (8,9%)	4 (18,1%)	11(7,5%)	0,025
Cefotaxima	22 (13,1%)	0	22 (15,1%)	0,052
Cefepime	18 (10,7%)	0	18 (12,3%)	0,082
Ciprofloxacino	67 (39,9%)	7 (31,8%)	60 (41,1%)	0,028
Gentamicina	17 (10,1%)	0	17 (12,1%)	0,136
Cotrimoxazol	58 (34,5%)	2 (9,1%)	56 (38,4%)	0,010

IV. RESULTADOS

Todos los aislamientos pertenecientes al linaje ST95 fueron considerados ExPEC ($p=0,001$) siendo la presencia de los genes de virulencia *papC*, *iutA* y *papA* del 95,5%, 86,4% y 81,8% respectivamente. Las tasas de los genes de virulencia analizados fueron superiores en cepas ST95 frente a No-ST95 encontrándose diferencias estadísticamente significativas en todos los genes a excepción de *afa/dra* que estuvo presente en el 4,6% ($p=0,689$) de las cepas y el gen *iutA* ($p=0,100$) (Tabla 42).

Tabla 42. Distribución de ExPEC y genes de virulencia en cepas ST95 y No-ST95.

FV N(%)	BEC (N=168)	BEC-ST95 (N=22)	BEC-NOST95 (N=146)	<i>p</i> valor
ExPEC	117 (69,4%)	22 (100,0%)	95 (65,1%)	0,001
<i>papA</i>	80 (47,6%)	18 (81,8%)	62 (42,5%)	0,001
<i>papC</i>	93 (55,4%)	21 (95,5%)	72 (49,3%)	0,000
<i>iutA</i>	120 (71,4%)	19 (86,4%)	101 (69,2%)	0,100
<i>kpsMTII</i>	91 (54,2%)	17 (77,3%)	129 (50,7%)	0,021
<i>sfa/foc</i>	43 (25,6%)	11 (50,0%)	32 (21,9%)	0,005
<i>afa/dra</i>	11 (6,6%)	1 (4,6%)	10 (6,9%)	0,689

En cuanto a la epidemiología clínica de bacteriemias por *E. coli* ST131 (BEC-ST131) en adultos se observaron 18 episodios en 18 pacientes y 150 episodios de bacteriemias por *E. coli* No-ST131 (BEC-NOST131) en 145 pacientes. En cuanto 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; $p=0,031$) (Tabla 43).

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 43**).

Tabla 43. Distribución por edad, sexo, comorbilidades, dispositivos, antibioterapia previa, gravedad y mortalidad en pacientes con episodio de BEC-ST131 y BEC-NOST131.

N (%)	BEC (N=163)	BEC-ST131 (N=18)	BEC-NOST131 (N=145)	P valor
EDAD	64±23,3 (13-94A)	64±23,9 (13A-89A)	63±23,9 (14-94A)	
SEXO				0,563
Hombres	56 (48%)	10 (56%)	49 (34%)	
Mujeres	70 (52%)	8 (44%)	57 (66%)	
COMORBILIDADES				
Diabetes mellitus	44 (27,0%)	1 (5,6%)	43 (29,7%)	0,031
Cardiopatía previa	42 (25,8%)	3 (16,7%)	39 (26,9%)	0,357
Enfermedad pulmonar crónica	26 (16,0%)	4 (22,2%)	22 (15,2%)	0,433
Insuficiencia renal crónica	28 (17,2%)	3 (16,7%)	25 (17,2%)	0,961
Hepatopatía	11 (6,8%)	1 (5,6%)	10 (6,9%)	0,836
Neoplasia	41 (25,2%)	5 (27,8%)	36 (24,8%)	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 RCS en BEC-ST131, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (**Tabla 44**). 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 44**).

Tabla 44. 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)	<i>p valor</i>
PROCEDENCIA				0,131
COMUNITARIA	94 (56,0%)	6 (33,3%)	88 (58,7%)	
NOSOCOMIAL	36 (21,4%)	6 (33,3%)	30 (20,0%)	
RAS	38 (22,6%)	6 (33,3%)	32 (21,3%)	
FOCO DE INFECCIÓN				0,105
Urinario	97 (57,7%)	9 (50,0%)	88 (55,5%)	
Desconocido	19 (11,3%)	4 (22,2%)	15 (12,3%)	
Respiratorio	12 (7,1%)	2 (11,1%)	10 (6,9%)	
Abdominal	47 (28,0%)	2 (11,1%)	45 (30,1%)	
Partes blandas	2 (1,2%)	0 (0%)	2 (1,3%)	
BRC	1 (0,6%)	1 (5,6%)	0 (0%)	

Las resistencias antibióticas de cepas ST131 y No-ST131 se encuentran en la **Tabla 45**. 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 ($p=0,522$), dado que todas las cepas de ST131 fueron sensibles y a cotrimoxazol ($p=0,113$). Entre las resistencias observadas destacan un 82,4% ($p=0,016$) de resistencia a ampicilina, un 72,2% ($p=0,003$) de resistencia a amoxicilina-clavulánico y un 38,8% ($p=0,000$) de resistencia a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación. La resistencia ciprofloxacino ($p=0,000$) se elevó al 83,3% de los aislamientos ST131 mientras que a gentamicina fue del 29,4% ($p=0,024$).

Tabla 45. Porcentajes de resistencia a diferentes antibióticos en cepas ST131 y No-ST131.

E. coli				
RESISTENCIA N (%)	(N=168)	ST131 (N=18)	No-ST131 (N=150)	<i>p</i> 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%)	0,000
Ciprofloxacino	67 (39,9%)	15 (83,3%)	52 (34,7%)	0,000
Gentamicina	17 (10,1%)	5 (27,8%)	12 (8%)	0,024
Cotrimoxazol	58 (34,5%)	9 (55,6%)	49 (32,7%)	0,113

La tasa de ExPEC en cepas ST131 fue del 72,2%, porcentaje similar en cepas No-ExPEC (69,3%; $p=0,814$). En cuanto al papel de los genes de virulencia, se observaron mayores porcentajes con respecto a cepas No-ST131 en *iutA*/*kpsMTII* y *afa/dra* siendo en este último las diferencias encontradas estadísticamente significativa ($p=0,040$). 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 ($p=0,000$) (Tabla 46).

Tabla 46. Distribución de ExPEC y genes de virulencia en cepas ST131 y No-ST131.

FV N(%)	BEC (N=168)	BEC-ST131 (N=18)	BEC-NOST131 (N=150)	<i>p</i> 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%)	0,000

V. DISCUSIÓN

1. Incidencia de bacteriemias por *E. coli*.

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 tasa de mortalidad asociada alta (Laupland *et al.*, 2008). La incidencia de bacteriemias por *E. coli* varía en los diferentes estudios en oscilando entre 30-60 episodios por 100000 habitantes y año (Laupland *et al.*, 2008; Bou-Antoun *et al.*, 2016). La incidencia de episodios BEC en nuestra área sanitaria en el año 2013 fue 86,5 episodios por 100000 habitantes/año, más elevada que la encontrada en estos estudios. Esta cifra es desalentadora, aunque como se ha comentado la incidencia varía debido a las características metodológicas y particularidades de cada estudio. En nuestro caso creemos que puede deberse a que se incluyó a los pacientes independientemente que en ese momento se decidiera su ingreso por lo que se encontraron cifras de BEC superiores a estudios que valoraron solo episodios en pacientes que finalmente ingresaron.

2. Características epidemiológicas y clínicas de la bacteriemia por *Escherichia coli* (BEC).

Las características clínicas y epidemiológicas de la población adulta incluida en este estudio en términos absolutos fueron mujeres y hombres en una proporción similar, de edad avanzada y con importante comorbilidad que presentaron un episodio de bacteriemia por *E. coli* de origen comunitario y foco urinario.

Multitud de estudios han relacionado un mayor riesgo de las bacteriemias por *E. coli* en pacientes con edad avanzada y con predominio en mujeres (Uslan *et al.*, 2007; Laupland *et al.*, 2008; Kennedy *et al.*, 2008, Bou-Antoun *et al.*, 2016). Estos datos se encuentran en concordancia con la elevada edad media de la población incluida en nuestro estudio, con casi el 61% de la misma ≥ 65 años y el discreto predominio de mujeres observado.

La infección en las vías urinarias como puerta de entrada mayoritaria en los episodios de BEC se encuentra ampliamente respaldada en la bibliografía. El foco urinario es el principal origen de la infección de BEC en la mayoría de series comunitarias u hospitalarias, con porcentajes que varían entre el 41,1%-71% (Laupland *et al.*, 2008; Kennedy *et al.*, 2008; Abernethy *et al.*, 2015; Bou-Antoun *et al.*, 2016). En nuestra serie, se observan datos similares dado que más de la mitad de los casos el foco de la bacteriemia fue urinario (59,5%).

El segundo origen en importancia en nuestro estudio fue el abdominal que supuso casi una cuarta parte de los casos, y que concuerda con los datos obtenidos por Kennedy *et al.* donde el 28% de las bacteriemias por *E. coli* fueron de origen abdominal (Kennedy *et al.*, 2008). No obstante, se encontraron porcentajes inferiores de BEC de foco abdominal como el 11,4% de los episodios (Bou-Antoun *et al.*, 2016), e incluso el 1% (Olesen *et al.*, 1995; Abernethy *et al.*, 2015) a expensas de otros focos de origen como el desconocido, que en nuestro estudio supuso el 9,5% de los episodios. Las diferencias obtenidas entre las diferentes series pueden deberse principalmente a diferencias en el diseño y/o población de los distintos trabajos.

El tipo de adquisición comunitaria se encuentra fuertemente asociada a BEC en la literatura, al que le siguen la adquisición RAS y por último la infección nosocomial. En series generales de bacteriemias por *E. coli*, como el estudio poblacional de Laupland *et al.*, el 53% de los episodios fueron bacteriemias adquiridas en la comunidad, el 32% fue relacionado con la asistencia sanitaria y el que el 15% fue nosocomial (Laupland *et al.*, 2008). En nuestra serie se encontró que más de la mitad de los episodios eran comunitarios (58,5%), seguido de un 22% de episodios relacionados con los cuidados sanitarios y el 20% de adquisición nosocomial. No obstante, en otros trabajos se observa un importante peso de los episodios nosocomiales, como el de Bou-Auntoun *et al.* que observaron un 38,8 % de adquisición nosocomial, aunque cabe destacar que estos autores no tuvieron en consideración los episodios relacionados con la asistencia sanitaria (Bou-Antoun *et al.*, 2016).

Tanto en nuestro estudio como en el de Laupland *et al.* el elevado porcentaje de casos comunitarios se explica porque en ambos se incluyeron episodios independientemente de si el paciente requirió ingreso hospitalario o no, encontrándose porcentajes inferiores en estudios donde únicamente se incluyeron pacientes que finalmente ingresaron (Friedman *et al.*, 2002; Raymond *et al.*, 2006; Rodríguez-Baño *et al.*, 2010).

La elevada comorbilidad de los pacientes es otro factor asociado a las BEC ampliamente descrito en la literatura. Varios estudios han sugerido que comorbilidades como, diabetes, malignidad, enfermedad pulmonar crónica, cirrosis y enfermedades cardíacas, pueden aumentar el riesgo de bacteriemia por *E. coli* (Olesen *et al.*, 1995; Peralta *et al.*, 2007; Melzer y Petersen, 2007; Laupland *et al.*, 2008).

Laupland *et al.* encontraron que el 22% de los pacientes presentaban algún tipo de enfermedad neoplásica sólida, el 21% enfermedad cardíaca, el 19% diabetes mellitus y el 8% enfermedad pulmonar crónica (Laupland *et al.*, 2008). En nuestro estudio, el 72,8% de los pacientes presentó algún tipo de comorbilidad. Las comorbilidades encontradas con mayor frecuencia fueron cardiopatía previa (27,3% de los pacientes) seguido de diabetes mellitus (26,3%) y enfermedad neoplásica (24,7%). El elevado porcentaje de pacientes con este tipo de comorbilidades parece estar asociado a la elevada edad media de los pacientes.

Debemos resaltar que existen otros factores de riesgo relacionados con la bacteriemia de *E. coli* que no se evaluaron en nuestro estudio, como por ejemplo inmunosupresión, trasplante, cirugía abdominal, incontinencia urinaria u otras anomalías del tracto urinario, y esto supone una limitación. Tampoco se desglosaron los factores de riesgo por sexos. En este sentido, Jackson *et al.* llevaron a cabo un estudio de BEC de comunitarias en pacientes de edad avanzada y encontraron que el cateterismo urinario y la incontinencia eran factores de riesgo en varones, y que el cáncer, la insuficiencia renal, la enfermedad cardíaca y

la incontinencia urinaria eran factores de riesgo en mujeres (Jackson et al., 2005). En nuestro estudio, un elevado porcentaje de los pacientes también presentó sondaje urinario previo al episodio de BEC (18%).

La mortalidad asociada a BEC varía enormemente en los distintos trabajos oscilando del 5% al 30% (Olesen *et al.*, 1995; Laupland *et al.*, 2008; Skjot-Rasmussen *et al.*, 2013) (Abernethy *et al.*, 2015; Bou-Antoun *et al.*, 2016). La tasa de mortalidad en nuestra serie fue del 12,9%. Este dato se encuentra dentro de lo esperado, aunque en el límite bajo, al igual que en otros estudios como el de Laupland *et al.* (11%). Como se ha comentado anteriormente esta baja mortalidad frente a otros estudios también puede ser debido a causas metodológicas dado el importante número de pacientes con bacteriemias comunitarias de origen urinario que en el momento de consulta y, sin conocerse el resultado del hemocultivo, no fueron ingresados incluidos en este trabajo.

La epidemiología clínica de la BEC en niños no se encuentra tan estudiada como en los pacientes adultos. Burdet *et al.*, en un trabajo basado en los datos del estudio COLIBAFI, en el que participaron 84 niños con bacteriemia por *E. coli* observó un predominio en varones con episodios de adquisición comunitaria (70%) y de foco urinario (66,2%) (Burdet *et al.*, 2014). En nuestros datos, entre las características de las BEC en población pediátrica se obtuvo un claro predominio de mujeres (62%), dato que contrasta con el estudio anterior y otros de este tipo (Burdet *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2015).

El 54,5% de las bacteriemias en niños se produjeron en neonatos y se consideraron de transmisión vertical o adquiridas en el hospital. En cuanto a los niños estudiado fuera del periodo neonatal se observó un predominio de bacteriemias de adquisición comunitaria y foco urinario similares al tipo de adquisición y origen de la infección propios de los pacientes adultos. Entre éstos niños, predominó la enfermedad neoplásica como enfermedad subyacente más frecuente. Greenberg *et al.*, en la serie que realizó sobre niños oncológicos con neutropenia febril encontró que *E. coli* es uno de los principales microorganismos

productores de bacteriemias en esta población (Greenberg *et al.*, 2005). Afortunadamente no se observó mortalidad en nuestra población infantil, no obstante, en otros estudios similares como el realizado por Bonaro *et al.*, en la década de los 90 la mortalidad fue del 13% y en estudios donde se analizaron BEC específicamente en neonatos como el trabajo realizado por Shakir *et al.*, la mortalidad ascendió al 37,5% (Bonaro *et al.*, 1991; Shakir *et al.*, 2014).

3. Características generales de los aislamientos de *E. coli*.

3.1. Estudio de sensibilidad a antibióticos.

El alarmante incremento de la resistencia bacteriana a los antibióticos es, sin duda, uno de los mayores problemas actuales de salud pública ya que estos fármacos constituyen una de las principales herramientas para controlar y tratar las infecciones bacterianas. La emergencia de bacterias resistentes a los antibióticos ha ido paralela a la incorporación de los mismos al arsenal terapéutico. Esta “batalla” la han ganado casi siempre las bacterias dado que la resistencia a los antibióticos es un extraordinario modelo de evolución biológica.

En muchas bacterias de interés clínico se han producido cambios importantes en los fenotipos de resistencia a los antibióticos, y este fenómeno ha sido especialmente relevante en los últimos años para algunas asociaciones bacteria-antibiótico. Este hecho ha tenido especial relevancia en *Escherichia coli* y adquiere una mayor trascendencia cuando se asocia a infecciones graves como las bacteriemias.

En la última década se ha producido un incremento alarmante en la prevalencia de cepas clínicas de *E. coli* productoras de BLEEs, siendo especialmente importante la emergencia de enzimas de tipo CTX-M. Las cepas de *E. coli* productoras de BLEEs suelen presentar un fenotipo de multiresistencia que incluye otros antibióticos de gran relevancia clínica como son las fluorquinolonas.

La prevalencia de *E. coli* productor de BLEE (EC-BLEE) en bacteriemias ha aumentado de forma dramática en los últimos años. Denis *et al.* encontraron un

incremento significativo en la prevalencia de EC-BLEE que pasó del 5,4% en 2006 al 13,8% en 2009 siendo la prevalencia media del 7,1% y Kang *et al.* observaron un incremento desde el 3,6% (2006) al 14,3% (2011) con una prevalencia media del 10,6% (Kang *et al.*, 2013; Denis *et al.*, 2015). En España, Rodríguez-Baño *et al.*, observaron que el 8,8% de las bacteriemias por *E. coli* se originaron por cepas productoras de BLEE (Rodríguez-Baño *et al.*, 2006), un porcentaje levemente inferior al encontrado en nuestra serie (9,9%). La resistencia a cefalosporinas de tercera generación supuso un 12,5% de los aislamientos. En otros estudios coincidentes en el tiempo se observan porcentajes similares de resistencia a cefalosporinas de tercera generación como el de Horner *et al.* (12%) o el de Bou-Antoun *et al.* (10,4%) (Horner *et al.*, 2014; Bou-Antoun *et al.*, 2016). En otros estudios anteriores en el tiempo como el de Laupland *et al.* observaron valores inferiores, con un 4% de resistencia a ceftriaxona entre 2000 y 2006 (Laupland *et al.*, 2008). Esta discordancia no hace más que demostrar la subida exponencial de las resistencias a cefalosporinas en los últimos años. Esta evolución se constata en el informe EARSS 2014 donde se observa que la resistencia a cefalosporinas de tercera generación en España pasó del 4% en 2003 al 12% en 2014 (EARSS, 2014).

Respecto a la resistencia quinolonas, en nuestra serie se observó una resistencia a ciprofloxacino del 39,6%. Este preocupante dato difiere de estudios recientes donde se observan tasas de resistencia a ciprofloxacino inferiores, que oscilaron entre el 14-27% (Horner *et al.*, 2014; Bou-Antoun *et al.*, 2016; Adam-Sapper *et al.*, 2013). No obstante, el informe EARSS 2015 sitúa la resistencia a quinolonas en España en el año 2015 en un 34%, que se aproxima a nuestras cifras. Las causas de estas cifras que sitúan, según el informe anteriormente citado, a España muy por encima de la media europea (22,4%) pueden ser el abuso realizado en la utilización de quinolonas, lo que repercute en que en nuestro ámbito 4 de cada 10 episodios no deban tratarse con este antibiótico de uso frecuente. Un dato más que apoya el abuso en España de la utilización de quinolonas en las últimas décadas es el incremento de la resistencia que aporta el informe dado que en el año 2003 la resistencia se situaba en torno al 21%. (EARSS, 2014)

Otro problema creciente en las enterobacterias en general, y en *E. coli* en particular, es la resistencia a carbapenems. Estudios como los Horner y Bou-Antoun encontraron en sus series porcentajes del 0,1% y 0,21% respectivamente, y los datos aportados por el informe EARSS 2015 encontraron tasas de resistencias a carbapenems en cepas invasivas de *E. coli* inferiores al 1% en España. En nuestro estudio, afortunadamente, no se observaron resistencias a carbapenems, dato compartido por otras series como la Adam-Sapper *et al.* (Adam-Sapper *et al.*, 2013). No obstante, la tendencia indica un aumento de las resistencias a esta familia de antibióticos, a pesar del fortalecimiento de las medidas de control de la infección nosocomial, a expensas del reciente fenómeno de las carbapenemasas (Horner *et al.*, 2014; EARSS, 2015; Bou-Antoun *et al.*, 2016).

El porcentaje de resistencia a piperacilina-tazobactam fue 8,2%, dato elevado pero que concuerda con el obtenido recientemente por Bou-Antoun *et al.* (10,2%) (Bou-Antoun *et al.*, 2016). La mayoría de estudios cifran la resistencia a gentamicina en el 10% (Adam-Sapper *et al.*, 2013; Horner *et al.*, 2014). En nuestra serie se observó una resistencia del 9,8% que coincide con la resistencia media en Europa observada en el informe EARSS. No obstante, en este mismo informe se refleja una resistencia a aminoglucósidos en España del 15% por lo que en este caso nuestra resistencia se sitúa por debajo que la media nacional (EARSS, 2015).

Por último, cabe destacar la elevada resistencia a cotrimoxazol, que se situó en torno al 38% de las cepas procedentes de BEC, y que concuerda con otros estudios similares como los de Horner *et al.* y Adam-Sapper *et al.*, donde encontraron porcentajes todavía más elevados (40 y 44% respectivamente) (Adam-Sapper *et al.*, 2013; Horner *et al.*, 2014). Estos datos son también alarmantes dado que se trata de un antibiótico de amplio espectro comúnmente utilizado en el tratamiento de infecciones por *E. coli*.

El fenómeno de corresponsencia de cepas productoras de BLEE y resistentes a ciprofloxacino (CIP R) con antimicrobianos de otras familias y la coexistencia de

mecanismos adicionales de resistencia en estas cepas se encuentra ampliamente contrastado y actualmente supone un grave problema terapéutico (Paterson *et al.*, 2005; Martínez-Martínez, 2007). En este estudio, cuando se compararon los porcentajes de resistencia, tanto en cepas productoras de BLEEs y no productoras, como en cepas resistentes a quinolonas y sensibles se encontraron diferencias estadísticamente significativas, siendo las tasas de resistencias claramente superiores en las cepas productoras de BLEEs y CIP R para la mayoría de antibióticos.

Esta situación es especialmente problemática en el caso de la corresponsión de cepas productoras de BLEE y resistentes a quinolonas (Rodríguez-Baño *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2004). En nuestro estudio, el 81,8% de las cepas productoras de BLEE fueron resistentes a ciprofloxacino. Entre las cepas resistentes a ciprofloxacino, la tasa de BLEE fue del 21%.

3.1.1. Características epidemiológicas y clínicas de la bacteriemia por *Escherichia coli* productor de Betalactamasas de espectro extendido (BEC-BLEE).

En la mayoría de series epidemiológicas de bacteriemias por *E. coli* BLEE (BEC-BLEE) se observa un mayor riesgo en pacientes de edad avanzada y asociadas al sexo masculino (Rodríguez-Baño *et al.*, 2006; Pitout *et al.*, 2009; Chung *et al.*, 2012; Rodríguez-Baño *et al.*, 2012; Denis *et al.*, 2015). En nuestra serie, también se observa este predominio en pacientes de edad avanzada ($\mu= 63, 9$ años) y una mayor proporción de hombres.

En cuanto a los factores de riesgo para la adquisición de bacteriemias por cepas de *E. coli* productoras de BLEE, como se ha comentado anteriormente se observa una gran disparidad de factores, aunque la exposición previa a antimicrobianos se considera el principal factor (Metan *et al.*, 2005; Bin *et al.*, 2006; Mezler y Peterson *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2008; Ortega *et al.* 2009; Rodríguez-Baño *et al.*, 2010; García-Hernández *et al.*, 2011). En nuestro estudio la

administración de antibioterapia previa apareció como factor de riesgo independiente para la adquisición de bacteriemia por *E. coli* BLEE ($p=0,02$).

En algunos estudios también se ha observado que la enfermedad de base grave también puede ser un factor de riesgo para la adquisición de BEC-BLEE (Ho *et al.*, 2002). En nuestro estudio se encontraron diferencias estadísticamente significativas en pacientes con enfermedad pulmonar crónica ($p=0,029$), y una tendencia en pacientes que habían sido asistidos mediante ventilación mecánica/traqueotomía ($p=0,072$). Estos datos no se han podido contrastar con la bibliografía y creemos que puedan deberse a marcadores subrogados que reflejen la presencia de factores como antibioterapia previa y/o peor gravedad del cuadro de base típicos en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y bronquiectasias en nuestro ámbito de estudio. También podría deberse a un sesgo debido al limitado tamaño muestral de pacientes con episodio BEC-BLEE de nuestro trabajo, por lo que debería confirmarse en futuros estudios aumentando el tamaño muestral.

La tasa de mortalidad asociada a BEC-BLEE varía ampliamente en los diferentes estudios entre el 0-61% (Metan *et al.*, 2005; Bin C. *et al.*, 2006; Mezler y Peterson *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2008; Rodríguez-Baño *et al.*, 2010). La mortalidad cruda de pacientes con BEC-BLEE en nuestro estudio fue del 22,7% y se observó una tendencia estadística de esta variable frente a BEC-NO BLEE ($p=0,058$). Como se ha comentado con anterioridad la relación entre la adquisición de una BEC-BLEE y una mayor mortalidad es un tema controvertido ya que existen estudios que postulan que pacientes con infecciones por microorganismos con BLEE tienen peor pronóstico, y otros no encuentran asociación significativa entre la presencia de BLEE y una mayor tasa de fracasos terapéuticos o mortalidad. En nuestro caso serían necesarios posteriores estudios para determinar si la tendencia que se ha encontrado se traduce en significación aumentando el tamaño muestral.

Las bacteriemias por *E. coli* BLEE a diferencia de otros microorganismos multirresistentes, que históricamente han sido un problema de los hospitales, poseen un componente comunitario a tenor de lo que se observa en la mayoría de estudios que han analizado este tipo de adquisición (Hernández *et al.*, 2003; Pitout *et al.*, 2005; Rodríguez-Baño *et al.*, 2008). No obstante, es importante destacar el papel de la adquisición Relacionada con la Asistencia Sanitaria (RAS) en BEC-BLEE, dado que en los últimos años se ha descrito de forma global la aparición de cepas clonales de *E. coli* productor de BLEE (particularmente, de CTX-M-15) en centros sociosanitarios como residencias de ancianos, hospitales de crónicos, unidades de hemodiálisis. Este fenómeno hace que debamos estar atentos al creciente papel de este tipo de infecciones en los sistemas de salud (Oteo *et al.*, 2006; Rodríguez-Baño *et al.*, 2010). En nuestra serie la adquisición comunitaria de BEC-BLEE fue mayoritaria, aunque de una forma discreta (36,4%), prácticamente equiparada a los tipos de adquisición RAS y nosocomial (31,8% de los episodios respectivamente) confirmando el carácter comunitario, pero también el importante peso de las infecciones RAS y nosocomiales de las BEC-BLEE.

El foco origen de las BEC-BLEE se ha relacionado principalmente con el urinario seguido de infecciones abdominales (Bin *et al.*, 2006; Melzer y Paterson, 2007; Kang *et al.*, 2008). En nuestro caso el foco urinario también fue el más frecuente (59% de los episodios), no obstante, se encontró una elevada proporción de bacteriemias con origen respiratorio y desconocido con un 13,6% de los episodios respectivamente. La importancia de las BEC-BLEE de foco respiratorio en nuestro estudio se hace patente una vez más atendiendo a que enfermedad pulmonar crónica y pacientes sometidos a ventilación mecánica fueron los factores de riesgo más destacados.

3.1.2. Características epidemiológicas y clínicas de la bacteriemia por *Escherichia coli* resistente a quinolonas (BEC-CIP R).

La utilización previa de antibióticos, especialmente quinolonas, está ampliamente descrito como el principal factor de riesgo para la adquisición de una

BEC-CIP R en numerosos estudios que han analizado los factores de riesgo para la adquisición de una BEC-CIP R en particular (Cheong *et al.*, 2001; Livermore *et al.*, 2003; Blázquez *et al.*, 2007), así como en estudios donde se analizan bacteriemias por enterobacterias resistentes a quinolonas en general (Brigmon *et al.*, 2015). La utilización previa de antibiótico también se mostró como factor de riesgo independiente para la adquisición de BEC-CIP R en nuestra serie ($p=0,05$). Sin embargo, ni el desarrollo de shock séptico ni la variable fallecimiento durante el proceso se mostraron estadísticamente significativas en este subgrupo.

También ciertos autores han encontrado la presencia de proceso neoplásico como un factor de riesgo de adquisición de BEC-CIP R (Cheong *et al.*, 2001; Livermore *et al.*, 2003). En nuestro caso, con respecto a las comorbilidades y dispositivos de los pacientes, al igual que en el grupo BEC-BLEE, únicamente se observó una tendencia con significación en pacientes con enfermedad pulmonar crónica (EPC) ($p=0,067$). Podemos achacar este dato a las características particulares de nuestra muestra en la que como se ha comprobado en las BEC-BLEE, se observa un importante componente de pacientes con patologías respiratorias crónicas por lo que solo se podría confirmar dicha tendencia en nuestra población con posteriores estudios con mayor tamaño muestral.

La adquisición relacionada con la asistencia sanitaria (RAS) y las bacteriemias de origen nosocomial predominaron proporcionalmente en el grupo BEC-CIP R, observándose una tendencia a la significación ($p= 0,094$). Estos datos, de igual forma que sucede en BEC-BLEE no sorprenden dada la asociación que tienen las bacterias resistentes con el ámbito hospitalario y los servicios relacionados con la asistencia sanitaria. No obstante, es de destacar que la adquisición comunitaria fue la principal vía de adquisición también en el subgrupo BEC-CIP R. Estos datos concuerdan con los obtenidos en otros estudios (Cheong *et al.*, 2001; Brigmon *et al.*, 2015).

En cuanto al foco de origen en el grupo BEC-CIP R, el origen urinario fue predominante con un 60,2% de los episodios, seguido del foco abdominal con un

19,4%. Los orígenes desconocido y respiratorio supusieron un 10,8% y 6% respectivamente. Estos datos contrastan con el estudio de Cheong *et al.* donde se obtuvieron como principales focos la bacteriemia primaria (25%) seguido de bacteriemias de origen urinario y abdominal (23%) (Cheong *et al.*, 2001). No obstante, estudios posteriores como el de Brigmon *et al.* donde analizaron las características epidemiológicas de bacteriemias producidas por enterobacterias resistentes a quinolonas (de las cuales la mayoría de los aislamientos eran de *E. coli*) observaron datos similares a los nuestros (Brigmon *et al.*, 2015).

3.2. Caracterización molecular de las BLEE.

Como se ha comentado anteriormente, a partir del año 2000 se ha observado a un importante incremento a nivel mundial de enterobacterias productoras de BLEEs en general y en cepas de *E. coli* en particular, a expensas de BLEEs pertenecientes a la familia CTX-M, llegándose a definir como una pandemia. La importancia de esta familia en cepas de *E. coli* procedentes de bacteriemias se observa en numerosos estudios internacionales donde CTX-M supusieron entre el 85-95% del total de BLEEs (Pitout *et al.*, 2009; Courpon-Claudinon *et al.*, 2011; Day *et al.*, 2016). Estudios nacionales confirman estas cifras, como el de Merino *et al.* donde el 87% de aislados de BEC-BLEE de origen urinario pertenecieron a la familia CTX-M (Merino *et al.*, 2016). En nuestro estudio un 80% de las BLEEs caracterizadas fueron de la familia CTX-M.

En gran medida el importante incremento de la familia CTX-M a nivel mundial se ha asociado a enzimas del subtipo CTX-M 15, especialmente relacionadas con el clon pandémico ST131. En el estudio de Pitout *et al.* entre las enzimas de tipo CTX-M, el 48% fueron CTX-M-15 (Pitout *et al.*, 2009) y en un estudio multicéntrico francés representaron la mitad de las enzimas de esta familia (Courpon-Claudinon *et al.*, 2011). En nuestra serie dentro de la familia CTX-M, más de la mitad de las enzimas pertenecieron al subgrupo CTX-M-15 (58,3%).

En la mayoría de trabajos, CTX-M 15 precede en frecuencia a CTX-M 14, e incluso algunos autores han observado un claro predominio de este enzima

(Rodríguez-Baño *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2013). En nuestro estudio, CTX-M 14 supuso un 16,7% del total de esta familia por detrás en frecuencia de CTX-M 1 (25%). A pesar del poco peso que tiene la subfamilia CTX-M 1 en la mayoría de estudios, Day *et al.*, observó que el 96% de las BLEE pertenecientes a la familia CTX-M fueron del subgrupo CTX-M 1 (Day *et al.* 2016). Estos datos denotan, que más allá de las tendencias generales, las particularidades de cada región determinan en gran medida la epidemiología de las BLEE.

El 20% de cepas restante en nuestro estudio pertenecieron a la familia SHV, más concretamente a SHV-12. Cabe destacar que SHV-12 es el subtipo más frecuente dentro de la familia SHV (Peirano *et al.*, 2012). En este sentido el estudio realizado por Rodríguez-Baño *et al.* en el área norte de Sevilla describe que de 37 cepas caracterizadas para establecer el tipo de BLEE, 12 fueron productoras de SHV y 10 de éstas SHV-12 (Rodríguez-Baño *et al.*, 2006).

3.3. Filogenia de los aislados de *E. coli* procedentes de bacteriemias.

E. coli ha divergido formando diferentes grupos filogenéticos, siendo el filogrupo B2 y en menor medida D, los que abarcan generalmente a los aislados patógenos extraintestinales de *E. coli* (ExPEC). La virulencia de estos aislados de *E. coli* se debe a que presentan un mayor número de factores de virulencia, los cuales pueden ir asociados a determinantes de resistencia en un mismo plásmido, como es el caso del clon pandémico de *E. coli* ST131 (Da Silva *et al.*, 2012).

En este trabajo se analizaron los grupos filogenéticos para conocer la filogenia de los aislados y su relación con la virulencia en cepas de *E. coli* productoras de bacteriemias. Clermont *et al.* en el año 2000, describieron un método rápido y sencillo basado en una PCR múltiple para detectar los principales grupos filogenéticos (A, B1, B2 y D) (Clermont *et al.*, 2000), pero la detección de incongruencias en los resultados y la falta de especificidad hicieron que otros grupos desarrollaran PCRs alternativas (Gordon *et al.*, 2008; Doumith *et al.*, 2012). En el año 2013, Clermont *et al.* modificaron su técnica anterior para mejorar la

especificidad y detectar otros grupos filogenéticos (A, B1, B2, C, D, E y F) (Clermont *et al.*, 2013) y ésta fue la técnica con la cual se obtuvieron los resultados de esta parte del estudio.

En estudios previos, los grupos filogenéticos considerados virulentos (B2 y D), se han relacionado con *E. coli* productor de bacteriemias, aunque la mayoría de estos estudios se basan en la distribución de 4 filogrupos descrita por Clermont *et al.* en el año 2000 (Clermont *et al.*, 2000). En el estudio de Jaureguy *et al.* el 50% de los aislados fueron del filogrupo B2, el 23% del grupo D (Jaureguy *et al.*, 2008) y Skjot-Rasmussen *et al.* encontraron que el 66% de los aislados fueron del filogrupo B2 y el 22% del grupo D, representando el A y B1 únicamente el 4% (Skot-Rasmussen *et al.*, 2012).

Existen pocos estudios de bacteriemias por *E. coli* donde se haya utilizado el nuevo sistema de clasificación de siete filogrupos propuesto en el año 2013, no obstante, en un reciente trabajo realizado por Clermont *et al.*, se compararon 243 *E. coli* productores de bacteriemias con 243 cepas comensales. Entre los aislamientos bacteriémicos encontraron una distribución de filogrupos donde predominaba el filogrupo B2 con un 53,1% de los aislamientos, seguido del grupo D con un 14,4%, A (13,6%), C (7,8%), B1 (7,4%) y F (3,7%) no observándose aislados pertenecientes al grupo E (Clermont *et al.*, 2016). En nuestro estudio observamos un predominio similar en la frecuencia de los filogrupos mayoritarios B2 y D, así como una baja proporción del grupo E. No obstante, en su estudio predominan los filogrupos A y C frente a nuestros datos en los que son más frecuentes los grupos F y B1.

En algunos estudios que han determinado los grupos filogenéticos en *E. coli* BLEE procedentes de bacteriemias también han encontrado un predominio de los filogrupos más virulentos (B2 y D), así como una baja prevalencia de los grupos más comensales y poco virulentos (A y B1) (Leistner *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016). Sin embargo, también se observan trabajos donde se destaca la importancia de estos grupos A y B1 (Brisse *et al.*, 2012; Rodríguez-Baño *et al.*,

2009; Rodríguez-Baño *et al.*, 2012). En nuestra serie de BEC-BLEE el grupo filogenético mayoritario fue el B2 con un 44,4% de los aislamientos, pero a este le siguieron los filogrupos A (22,2%) y B1 (16,7%), no observando cepas pertenecientes al grupo D. Estos resultados resaltan el papel de los filogrupos considerados comensales en cepas más resistentes.

En cuanto a la relación entre el tipo de BLEE y el grupo filogenético, Leistner *et al.* y Wang *et al.* observaron un predominio de las enzimas CTX-M15 entre aislados pertenecientes al grupo filogenético B2 (Leistner *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016). Esta relación también se ha observado en nuestro trabajo donde CTX-M15 se encontró en casi la mitad de los aislamientos del filogrupo B2 productores de BLEE (46.2%).

La relación entre los distintos grupos filogenéticos y el tipo de adquisición de la BEC ha sido analizada por estudios como el de Skjot-Rasmussen *et al.* que han observado un predominio de los filogrupos B2 y D en todos los orígenes de infección y en todos los tipos de adquisición (Skjot-Rasmussen *et al.*, 2012). En nuestro caso, el filogrupo B2 fue el grupo principal en los 3 tipos de adquisición y en todos los orígenes. No obstante, en infecciones RAS y nosocomiales se observó un predominio del grupo filogenético B1.

En la población pediátrica también se observa un predominio de los grupos filogenéticos, considerados patógenos (B2 y D) tanto en niños, como en neonatos (Burdet *et al.*, 2014; Chmielarczyk *et al.*, 2015). Datos similares observamos en nuestra población pediátrica donde la mayor parte de los casos de tanto en neonatos como en No-neonatos fueron producidos por estos filogrupos.

Se encontró un predominio del filogrupo B2 seguido del filogrupo D en todas las comorbilidades y dispositivos analizados excepto en los pacientes con cirrosis hepática, donde el grupo filogenético mayoritario fue el B1 y en pacientes con EPC donde el segundo más frecuente. El papel de un filogrupo no invasivo como el B1 en estas patologías puede deberse a la falta de inmunidad y/o

mecanismos de defensa a nivel local que se dan en este tipo de pacientes y pueden favorecer la invasión de cepas consideradas como menos virulentas.

Por último, en lo que respecta a la relación del filogrupo con la resistencia a antimicrobianos destacamos que, en líneas generales, los filogrupos A y B1 presentaron mayores porcentajes de resistencia, mientras los grupos filogenéticos B2 y D fueron los más sensibles, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Esta tendencia ha sido similar en otros estudios, como se ha comentado anteriormente, y apoya la teoría que promueve que la adquisición horizontal de mecanismos de resistencia está comúnmente asociada a un coste biológico y una pérdida de "fitness" (Andersson *et al.*, 2010).

3.4. Estudio de factores de virulencia en aislados de *E. coli* productores de bacteriemias. Cepas ExPEC.

Se detectaron 6 genes de virulencia descritos por Johnson *et al.* que permitieron clasificar el estatus ExPEC (patógena extra intestinal) de una cepa de *E. coli* basándose en la presencia de ≥ 2 de estos factores. Atendiendo a los criterios de Johnson *et al.* el 69,8% de los aislados de nuestro estudio fueron clasificados como ExPEC. Este dato es similar al encontrado por Mamani en su serie de bacteriemias realizado en el Hospital Universitario Locus Agustín entre 2010-2011 donde las cepas ExPEC supusieron un 63%. (Mamani, 2014).

Como se ha comentado los perfiles de factores de virulencia asociados a las cepas de *E. coli* productoras de bacteriemias son muy variables, aunque diversos autores coinciden en que los sistemas de adquisición de hierro y los mecanismos de resistencia al suero son esenciales para las cepas de *E. coli* productoras de bacteriemias (Johnson *et al.*, 2010; Ron, 2010). El gen de virulencia más frecuente a nivel global en nuestro estudio fue *iutA* (70,4%). El gen *iutA* codifica el receptor de aerobactina por lo que no es de extrañar la elevada prevalencia de este gen dado que se trata de uno de los sistemas de adquisición de hierro más frecuentes en *E. coli* (Ron, 2010).

A este le siguieron *kpsMTII* en el 56,1%, *papC/A* que se detectaron en el 53,4% y 45,5% de las cepas de *E. coli* respectivamente, siendo los menos frecuentes *sfa/foc* cuya prevalencia fue del 26,5% y *afa/dra* presente en sólo el 5.8% de las cepas. Estos datos concuerdan con los obtenidos por Mora-Rillo *et al.*, en los que *iutA* tuvo una presencia del 69,2%, *kpsMTII* del 55%, *pap C* del 48% seguido de *sfa/foc* cuya presencia fue del 20% y *afa/dra* presente en el 2,5% de las cepas (Mora-Rillo *et al.*, 2015). No obstante, en el estudio de bacteriemias de origen urinario realizado por Skot-Ramunssen *et al.* obtuvieron una mayor prevalencia de *kpsMTII* (83%) *iutA* (75%) y *sfa/foc* (34%) respecto a nuestro estudio (Skot-Ramussen *et al.*, 2012). Cabe destacar que ambos autores también encontraron una alta prevalencia de los genes *fimH*, *ompT* y *fyuA* que no se incluyeron en nuestro estudio (Skot-Ramussen *et al.*, 2012; Mora-Rillo *et al.*, 2015).

En cepas No-ExPEC no se no se detectaron genes codificantes del resto de adhesinas y fimbrias estudiadas, excepto en una en la que se amplificó el gen *sfa/foc* que codifica para fimbrias S y F1C. Esta situación puede deberse a que la adherencia supone el paso inicial en la patogénesis de *E. coli* y por tanto parece tener sentido que las cepas comensales posean menores porcentajes de estos factores de virulencia. Sin embargo, en el estudio de Clermont *et al.*, en el que comparaban cepas bacteriémicas con cepas comensales no encontraron diferencias en cuanto a *papC* entre ambos grupos (Clermont *et al.*, 2016).

El 77,8% de las cepas de EC-BLEE se consideraron como ExPEC, porcentaje superior al obtenido en el grupo de cepas en general. El gen de virulencia más frecuente en este grupo también fue *iutA* y no se detectó *sfa/focDE* en ninguno de los aislamientos de *E. coli* portadores de BLEE. Rodríguez-Baño *et al.* encontraron también una elevada prevalencia del gen *iutA* (82%) en cepas de BEC-BLEE, siendo el segundo más frecuente después del gen *fimH*. En este estudio, *sfa/foc* obtuvo una prevalencia del 2% por lo que la ausencia de éste en nuestro caso parece atender al bajo tamaño muestral del grupo BEC-BLEE dada la baja prevalencia del gen (Rodríguez-Baño *et al.*, 2012).

La relación entre las cepas pertenecientes a los grupos filogenéticos B2 y en menor medida D con un contenido más elevado de factores de virulencia ha sido establecida en varios estudios de BEC, así como una mayor proporción de los filogrupos A y B1 en cepas No-ExPEC (Johnson y Stell, 2000; Bingen-Bidois *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2002; Sannes *et al.*, 2004; Moreno *et al.*, 2005). El 77,3% de las cepas ExPEC de nuestro estudio estuvieron incluidas en los grupos filogenéticos B2 y D, considerados como los filogrupos más virulentos. En cuanto a las cepas No-ExPEC la mayoría de cepas sin factores de virulencia perteneció a los filogrupos A y B1.

La mayor proporción de ExPEC en relación al tipo de adquisición se encontró en las BEC adquiridas en la comunidad (76,6%) de los aislamientos, en contraposición a las BEC nosocomiales donde el porcentaje de cepas ExPEC apenas superó el 50%. Entre estos datos se observó una tendencia estadística ($p=0,057$). Esta relación también se encuentra en otros estudios que han analizado la virulencia con la adquisición en BEC y quizás pueda explicarse porque los pacientes con BEC nosocomiales generalmente poseen un mayor índice de morbilidad por lo que cepas consideradas como no patógenas podrían producir patología con mayor facilidad debido a una disminución en los mecanismos de defensa del hospedador (Cooke *et al.*, 2010).

Los mayores valores de aislados con estatus ExPEC en relación con el foco de origen de la bacteriemia se encontraron en BEC de origen respiratorio donde los ExPEC supusieron el 90% de los aislamientos y las de foco urinario (75,3%). En contraposición, en las de origen hepatobiliar y desconocido solo obtuvieron unos porcentajes de cepas ExPEC del 56,1% y 57,9% respectivamente. Estos datos son corroborados en estudios anteriores donde observaron unos mayores índices de factores de virulencia en cepas procedentes de BEC con origen respiratorio o urinario frente a BEC de otros focos de origen y puede deberse a que estas cepas requieren un mayor número de FV para acceder al torrente circulatorio desde estas vías de entrada (Johnson *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002; Leflort *et al.*, 2011).

La proporción de cepas ExPEC fue superior a la de cepas No-ExPEC en todos los grupos de comorbilidades y dispositivos invasivos de la población adulta a excepción de los pacientes con cirrosis hepática, donde la proporción de No-ExPEC fue superior y en la que se denotó una tendencia estadística ($p= 0,094$). Esta tendencia se ha observado en otros estudios de BEC en pacientes cirróticos y puede deberse a que los pacientes cirróticos tienen alteraciones en los mecanismos de depuración hepatoesplénica y un mayor riesgo de bacteriemia causada por cepas poco virulentas que colonizan el tracto digestivo (Thulstrup *et al.*, 2000; Campillo *et al.*, 2002).

La relación entre resistencia antibiótica y cepas ExPEC se observa en estudios como el de Clermont *et al.* donde también se compararon las tasas de resistencia de cepas de *E. coli* comensales frente a bacteriémicas a antibióticos de uso frecuente y se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las cepas más resistentes (bacteriémicas) y las menos resistentes (comensales) a todos los antibióticos testados (Clermont *et al.*, 2016). En nuestro caso se observaron mayores tasas de resistencia de cepas ExPEC a todos los betalactámicos estudiados. No obstante, para ciprofloxacino, gentamicina y cotrimoxazol los porcentajes de resistencia fueron superiores (aunque estadísticamente no significativos) en cepas No-ExPEC. No tenemos explicación para estos datos y solo cabría ampliar el estudio para comprobar si realmente son una peculiaridad de nuestra población.

3.5. Estructura poblacional de aislamientos de *E. coli*.

En los últimos años la tipificación mediante “*MultiLocus Sequence Typing*” (MLST), ha mejorado nuestra comprensión sobre los linajes ExPEC, y varios estudios internacionales han informado del predominio de los “*Sequence Types*” (STs) 69, 73, 95 y 131 entre las grandes colecciones de infecciones en el ser humano por cepas ExPEC, especialmente en bacteriemias e infecciones del tracto urinario (ITUs) (Tartoff *et al.*, 2005; Jauregui *et al.*, 2007; Banerjee *et al.*, 2013; Adams-Sapper *et al.*, 2013). En este estudio, con el fin de conocer la prevalencia

de los STs 69, 73, 95 y 131 en aislados procedentes de BEC se ha utilizado una técnica desarrollada por Doumith *et al.* Este nuevo método de PCR permite detectar y distinguir rápidamente estos 4 linajes y los autores establecieron un 100% de sensibilidad y un 99.5% de especificidad comparado con MLST (Doumith *et al.*, 2015). En nuestro estudio no se comparó esta técnica de PCR con MLST en todas las cepas, no obstante, sí que se caracterizó una cepa de cada linaje obteniendo una concordancia del 100%.

Por otro lado, con el fin de conocer un poco más en profundidad (más allá de los STs más prevalentes) la estructura poblacional de *E. coli* productores de bacteriemias, se caracterizaron mediante MLST todos los aislados procedentes del filogrupo mayoritario B2 y los aislados de EC-BLEE no tipificados previamente por el método desarrollado por Doumith *et al.* (Doumith *et al.*, 2015). En total se caracterizaron 127 cepas que supusieron el 67,2 % del total de aislados. A pesar del elevado número de aislamientos caracterizados somos conscientes de que no tenemos una visión global a la hora de conocer la estructura poblacional de BEC en nuestra área, así como la limitación que ello supone, dado que podría existir alguna clon prevalente en nuestra población englobado entre las 62 cepas restantes que correspondiese a cepas pertenecientes a los filogrupos minoritarios A, B1, C, E, F o D no-ST69.

3.5.1. Estructura poblacional de *E. coli* BLEE productores de bacteriemias.

Existen numerosos estudios que han analizado la estructura clonal de *E. coli* productor de BLEE que se resumen en la **Tabla 47** y muestran un contundente predominio del linaje ST131-B2. En estos estudios la prevalencia varía entre el 19,7%-59,4% (Peirano *et al.*, 2012; Ha *et al.*, 2013; Kang *et al.*, 2013; Hansen *et al.*, 2014; Merino *et al.*, 2016). En nuestro caso ST131-B2 supuso el 38,9 % de los aislamientos.

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 (Banerjee *et al.*, 2014; Nicolas-Chanoine *et al.*, 2014; Riley *et al.*,

2014; Schembri *et al.*, 2015; Stoesser *et al.*, 2016). En nuestro estudio se observan datos similares dado que todas las cepas correspondientes al clon ST131 expresaron enzimas del tipo CTX-M, de las cuales el 85,7% fueron del tipo CTX-M 15.

El segundo grupo clonal de nuestra serie de ECBLEE fue ST155, perteneciente al filogruppo B1, con un 11,1% del total de los aislamientos. ST155 no se ha asociado a BEC-BLEE en ninguno de los principales estudios analizados, no obstante sí que se ha descrito en estudios sobre infecciones en general por ECBLEE (Rodrigues *et al.*, 2015), en voluntarios sanos, tanto adultos (Ben Salem *et al.*, 2014) como niños (Ferjani *et al.*, 2017) y en animales, especialmente en aves tanto de cría (Börjesson *et al.*, 2013) como salvajes (Alcalá *et al.*, 2014) donde en todos los casos se ha asociado a enzimas de tipo CTX-M, especialmente CTX-M1 aunque también hay estudios españoles que lo relacionan con CTX-M14 (Valverde *et al.*, 2009). En nuestro caso en ninguno de los 2 aislamientos pudimos caracterizar el tipo de BLEE.

Otros clones como ST10, ST38, ST405 y ST648 han prevalecido en varios estudios. Así ST10 supuso el 40% de los aislamientos BEC-BLEE en una serie realizada en Rumania, aunque si bien es cierto, el tamaño muestral era bajo (15 aislados) como en nuestro caso. No obstante, en otros estudios con mayor tamaño muestral como el de Horner *et al.* ST10 alcanzó el 15% y en el estudio coreano de Ha *et al.*, la prevalencia ascendió al 15,7%. ST405 supuso el 15% en el estudio realizado por Kang *et al.* en Corea y el 11,5% en un reciente estudio realizado en varios hospitales de Shangai (China) entre 2013-2014. En cuanto al clon ST648 se observó en el 10,5% de aislados en el estudio de Kang *et al.* y supuso el 8% del total de aislados en un estudio holandés realizado por Van der Bij *et al.* realizado entre 2008-2009 (Van der Bij *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2013; Ha *et al.*, 2013; Horner *et al.*, 2014; Usein *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016). En nuestro estudio no se obtuvo ningún aislamiento de estos clones relativamente prevalentes en estos estudios y el resto de STs caracterizados se obtuvieron en un único aislamiento.

Tabla 47: Estudios que describen la estructura poblacional de *E. coli* BLEE productores de bacteriemias.

Lugar (aislados)	Año realización	ST más prevalentes	Otros ST menos prevalentes	Referencia
Rotterdam Holanda (41)	2008-2009	ST131(32%), ST405 (8%), ST648(8%) ST38(4%),		(Van der Bij <i>et al.</i> , 2011)
Calgary Canadá (190)	2000-2010	ST131(59,4%), ST405(7,1%), ST10 (6,6%), ST38(5,6%), ST648(5,6%), ST315(4,6%), ST393(2,4%),		(Peirano <i>et al.</i> ,2012)
Seul Korea (69)	2011-2012	ST131 (23.5%), ST38(15.7%), ST405 (7.8%), ST10 (5.9%).		(Ha <i>et al.</i> , 2013)
Seul Korea (76)	2006-2011	ST131(19.7%), ST405(15.8%), ST648(10.5%).		(Kang <i>et al.</i> , 2013)
Dinamarca Multicentri (87)	2009	ST131(50%)	ST10, ST38, ST69, ST88, ST90, ST93, ST117, ST167, ST290, ST367, ST405, ST443, ST448, ST636, ST648, ST3666, ST3929	(Hansen <i>et al.</i> , 2014)
Rumania Multicentri (15)	2010-2012	ST131(26,7%), ST10(40%), ST410(2)	ST167, ST540, ST1275	(Usein <i>et al.</i> , 2016)
Yorksire, UK (62)	2010-2012	ST131 (30%), ST10 (15%),	ST69, ST95, ST404, ST141	(Horner <i>et al.</i> , 2014)
Shanghái China (61)	2013-2014	ST131(29.5%), ST405 (11.5%)	ST38(4.9%) ST648 (4.9%), ST2003 (4.9%)	(Wang <i>et al.</i> , 2016)
Madrid España (39)	2010-2011	ST131 (54%)	ST410, ST156, ST224, ST359, ST361, ST448, ST57, ST1011, ST167, ST405, ST69, ST453	(Merino <i>et al.</i> , 2016)
Murcia (Nuestro estudio) (18)	2013	ST131(38%), ST155(11,1%)	ST404, ST34, ST93, ST354, ST457, ST1844	

3.5.2. Estructura poblacional de *E. coli* productores de bacteriemias.

Estudios recientes han analizado la prevalencia de los STs 69, 73, 95 y 131 entre ExPEC procedentes bacteriemias. En estos estudios, estos 4 STs han supuesto más de la mitad de los aislamientos (52,9%-59%) (Adams-Sapper *et al.*, 2013; Horner *et al.*, 2014; Day *et al.*, 2016). En nuestro estudio, los filogrupos B2 y D supusieron el 66,7% de los aislamientos del estudio molecular y los STs 69, 73, 95 y 131 supusieron el 48,1% del total de aislados BEC.

En cuanto a los complejos clonales, en nuestro trabajo, predominó ST95 que supuso el 28,2% del total de aislamientos del filogrupo B2, seguido de ST73 (24,2%) y ST131 (20,2%). ST69 supuso el 64% de las cepas pertenecientes al filogrupo D. En los diferentes estudios podemos encontrar una variabilidad entre la predominancia de los principales STs tanto entre ellos como frente al nuestro. En el estudio de Adams-Sapper *et al.*, ST131 fue el más frecuentemente aislado seguido por ST95 (Adams-Sapper *et al.*, 2013) mientras que Horner *et al.* y Day *et al.* observaron un predominio de ST73 seguido de ST131 (Horner *et al.*, 2014; Day *et al.*, 2016). Este diferente predominio puede deberse a diferencias de la estructura poblacional de *E. coli* o incluso entre los criterios de selección de los casos, no obstante, de lo que no cabe duda es del elevado peso que tienen estos 4 complejos tienen como productores de bacteriemias. En la siguiente **Tabla 48** se comparan los distintos estudios sobre la estructura poblacional de BEC con nuestros propios datos.

En nuestro estudio, no se encontró ningún linaje más relacionado con una alta prevalencia en el grupo filogenético B2. A los ST más prevalentes le siguió en frecuencia, a mucha distancia, ST569 con un 3% de los aislamientos y el resto lo formaron 17 clones que se situaron en porcentajes $\leq 2\%$. En otros estudios que han analizado la estructura poblacional de BEC tampoco han encontrado prevalencias en otros clones que puedan compararse a la de los ST más prevalentes anteriormente descritos, no obstante, en algunos de ellos se repiten los clones minoritarios comentados en BEC-BLEE (ST10, ST38, ST405 y ST648) y el complejo clonal ST12. CC12 alcanzó un 6% en el estudio americano de Adam-

Sapper *et al.* (Adams-Sapper *et al.*, 2013) y alrededor de un 4% en los estudios de Day *et al.* y Horner *et al.* (Horner *et al.*, 2014; Day *et al.*, 2016). En nuestro estudio no se obtuvo ningún aislamiento del complejo clonal ST12 que podríamos achacar a la limitación de haber investigado únicamente en el filogrupo B2, no obstante, ST12 se ha relacionado precisamente con este filogrupo (Yun *et al.*, 2015) por lo que su ausencia se deba posiblemente a diferencias en cuanto los ST menos prevalentes a nivel local, que por otro lado también se manifiestan en otros estudios. Por último, destacar que ST de muy baja prevalencia en otros estudios como ST127, ST141 y ST404 sí que estuvieron presentes en baja frecuencia en nuestro estudio también.

Tabla 48. Estudios que describen la estructura poblacional de *E. coli* productores de bacteriemias.

Lugar (n aislados)	Año realización	ST más prevalentes	Otros ST prevalentes	Referencia
Clichy, Francia (110)*	1997-2006	ST95 (11,8%), ST73(7,3%),	ST88, ST131 ST69, ST10, ST14, ST12, ST550, ST1604 ST141, ST117 ST394, ST167, ST1312, ST1487	(Bert <i>et al.</i> , 2010)
Nothingamm, UK (140)	5 meses	ST131(21.4%) ST73(17.1%), ST95(9.3%)		(Alhashash <i>et al.</i> , 2013)
San Francisco, USA (246)	2007-2010	ST131(23%), ST95(18%), ST73(8%), ST69(9%), ST12(6%)		(Adam-Sapper <i>et al.</i> , 2013)
Yorksire, UK (770)	2010-2012	ST73(18,6%), ST131 (16,8%), ST69(10,5%), ST95 (9,5%),	ST12 (4%), ST404 (3,5%), ST10(3,4%), ST127(3,5%) ST141 (2,6%)	(Horner <i>et al.</i> , 2014)
UK (Multicentrico) (2166)	2001-2010	ST73(16.8%), ST131(12.0%), ST95(8.5%), ST69(5.4%) ST12(4.4%).		(Day <i>et al.</i> , 2016)
Shanghái China (90)	2013-2014	ST131 (22,2%), ST405(8,9%), ST69 (5,6%).		(Wang <i>et al.</i> , 2016)
Murcia (Nuestro estudio) (189)**, ***	2013	ST95(28,3%), ST73(24,2%), ST131(20,2%), ST69 (64%)		

* Muestras de sangre en su mayoría, pero también liquido ascítico.

**Basado en B2 y ST69-D.

***Basado en D.

3.6. Características clínicas y microbiológicas de bacteriemias por los STs más frecuentes en adultos.

Para realizar esta parte del trabajo nos limitamos a la población adulta dado que el escaso número de aislados caracterizados en BEC procedentes de niños y neonatos nos impediría realizar una comparativa adecuada. Para realizar esta comparativa se han utilizado únicamente los episodios de BEC a los que se ha podido realizar epidemiología molecular por lo que finalmente se obtuvieron un total de 168 aislamientos procedentes de 163 pacientes adultos con episodio de BEC. Para realizar la comparativa entre los episodios ocurridos por un clon concreto se ha utilizado como grupo comparativo el resto de episodios producidos por aislamientos no pertenecientes al clon de estudio (BEC-X vs BECNO-X).

El 13,1% de los episodios en adultos fueron producidos por BECST73 y BECST95 respectivamente, el 10,7% por BECST131 y el 8,3% por BECST69. La edad de los pacientes con episodio de BECST69, 73, 95 y 131 fue similar a la de sus grupos comparativos correspondientes. En cuanto al sexo se observó un predominio de mujeres frente a hombres en BECSTNO69, BECST73 y BECST95 mientras que en BECST131 se observó un discreto predominio de varones frente a mujeres. Day *et al.* encontraron una asociación entre el sexo del paciente y el ST, específicamente, y en comparación con ST73, ST131 y "otros" STs relacionándose significativamente en varones, mientras que ST69 se asoció con mujeres. Por el contrario, no encontraron diferencias entre la edad de los pacientes y los ST como sucedió en nuestro caso (Day *et al.*, 2016).

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 BECST131, especialmente en cepas ST131 productoras de BLEE, encontrando pocos factores de riesgo significativos (Chung *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2014; Cho *et al.*, 2015). En nuestro estudio no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las comorbilidades, dispositivos, administración previa de antimicrobianos ni mayor mortalidad en las BEC por los STs más prevalentes, a excepción de la baja presencia diabetes mellitus en

pacientes con BECST131 ($p=0,031$) y toma previa de antimicrobianos en BECST73 frente a sus grupos control. No se han encontrado las razones que pueden indicar que pacientes con diabetes mellitus y la toma previa de antimicrobianos aparezcan como factores protectores de BECST131 y BECST73 respectivamente, por lo que pensamos que el bajo número de casos en los subgrupos BECSTX 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 BECST69, 73 y 95 tuvieron asociación con el tipo de adquisición comunitario mientras que las BECST131 estuvieron asociadas a bacteriemias nosocomiales y RAS. La asociación entre los linajes ST69, ST73 y ST95 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 (Banerjee *et al.*, 2013; Horner *et al.*, 2014; Day *et al.*, 2016)

Algunos estudios han analizado a la relación de los STs 69, 73 o 95 y la resistencia a antimicrobianos. Day *et al.*, encontraron en los STs 69, 73 o 95 tasas de resistencia inferiores al 10% en la mayoría de antibióticos testados, a excepción de amoxicilina y amoxicilina/clavulánico (Day *et al.*, 2016). En el caso del linaje ST69 diversos autores lo han relacionado con una mayor resistencia a cotrimoxazol tanto en infecciones en general (Manges *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2011) como en bacteriemias (Gibreel *et al.*, 2012; Horner *et al.*, 2014). En cuanto al clon ST95 diferentes estudios han demostrado una frecuencia relativamente baja de multirresistencia en este linaje (Manges *et al.*, 2008; Adams-Sapper *et al.*, 2013; Gibreel *et al.*, 2013).

En nuestro estudio, en líneas generales las tasas de resistencia de los ST69, 73 y 95 fueron sustancialmente inferiores a las de sus respectivos grupos comparativos. En ninguno de estos 3 STs se observaron resistencias ni a cefotaxima ni a cefepime y se observaron menores tasas de resistencia a ciprofloxacino

estadísticamente significativas frente a sus grupos control y a cotrimoxazol para los STs 73 y 95. No obstante, en las cepas ST69 se observaron mayores porcentajes a cotrimoxazol estadísticamente significativos y que corroboran los datos de la bibliografía.

En cuanto a la relación entre cepas del clon ST131 se observa una situación completamente contraria a los filogrupos anteriores. Multitud de estudios han puesto de manifiesto la relación de este linaje infecciones por ExPEC resistentes a antibióticos a nivel mundial, especialmente cepas resistentes a betalactámicos de espectro extendido y fluoroquinolonas (Banerjee *et al.*, 2014; Nicolas-Chanoine *et al.*, 2014; Riley *et al.*, 2014; Schembri *et al.*, 2015; Stoesser *et al.*, 2016). Day *et al.* encontraron elevados porcentajes de resistencia a cefalosporinas, fluorquinolonas y aminoglucósidos en aislados del complejo ST131. (Day *et al.*, 2016) 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 BLEE positivas como BLEE negativas (Horner *et al.*, 2014).

En nuestro estudio se puso de manifiesto 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 y cotrimoxazol. Entre las resistencias destacan 82,4% de resistencia a ampicilina, un 72,2% de resistencia a amoxicilina-clavulánico y un 38,8% de resistencia a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación que correspondería a la proporción de cepas BLEE encontradas en este grupo pandémico. La resistencia ciprofloxacino se presentó en el 83,3% de los aislamientos ST131 y a gentamicina en el 29,4%.

Los STs 69,73, 95 y 131 se han asociado en numerosos estudios a cepas ExPEC y gran número de factores de virulencia dado que son los complejos clonales más prevalentes en infecciones invasivas y por tanto son patógenos bien adaptados a producir patología en el ser humano (Riley *et al.*, 2014). En nuestro estudio, en todos los linajes se encontraron mayores tasas de ExPEC frente a su

grupo comparativo siendo máximas en ST95 (100%), y mínimas en ST131, en el que aun 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 (Karfunkel *et al.*, 2013; Merino *et al.*, 2016).

En cuanto genes de virulencia concretos en los distintos clones, en ST69 *iutA* se observó en el 100% de los aislamientos. Los genes fimbriales *papA/C* se observaron en porcentajes superiores a los de las cepas No-ST69 mientras que *KpsMTII* se observaron en tasas inferiores. El que todos los aislamientos de ST69 de nuestra serie posean el gen *iutA* no es un hecho debido al azar. En el estudio realizado por Skjot-Rasmussen *et al.* *iutA* se observó en el 97% de los aislamientos. Otros genes ampliamente asociados a ST69 por numerosos autores y no analizados en el presente estudio son *fimH*, *sat*, *iucD* y *traT* (Johnson *et al.*, 2005; Manges *et al.*, 2006; Skjot-Rasmussen *et al.*, 2013). En cepas ST73 y ST95 se obtuvieron porcentajes de factores de virulencia marcadamente superiores frente a sus respectivos grupos comparativos en todos los casos excepto para el gen *afa/dra*.

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* (Johnson *et al.*, 2009; Blanco *et al.*, 2011; Karfunkel *et al.*, 2013; Olesen *et al.*, 2013). En estudios previos otros genes prevalentes en el linaje ST131 no incluidos en nuestro estudio fueron: *fimH*, F10, *sat*, *iucD*, *traT*, *malX* y *usp* (Johnson *et al.*, 2009; Blanco *et al.*, 2011; Karfunkel *et al.*, 2013; Olesen *et al.*, 2013).

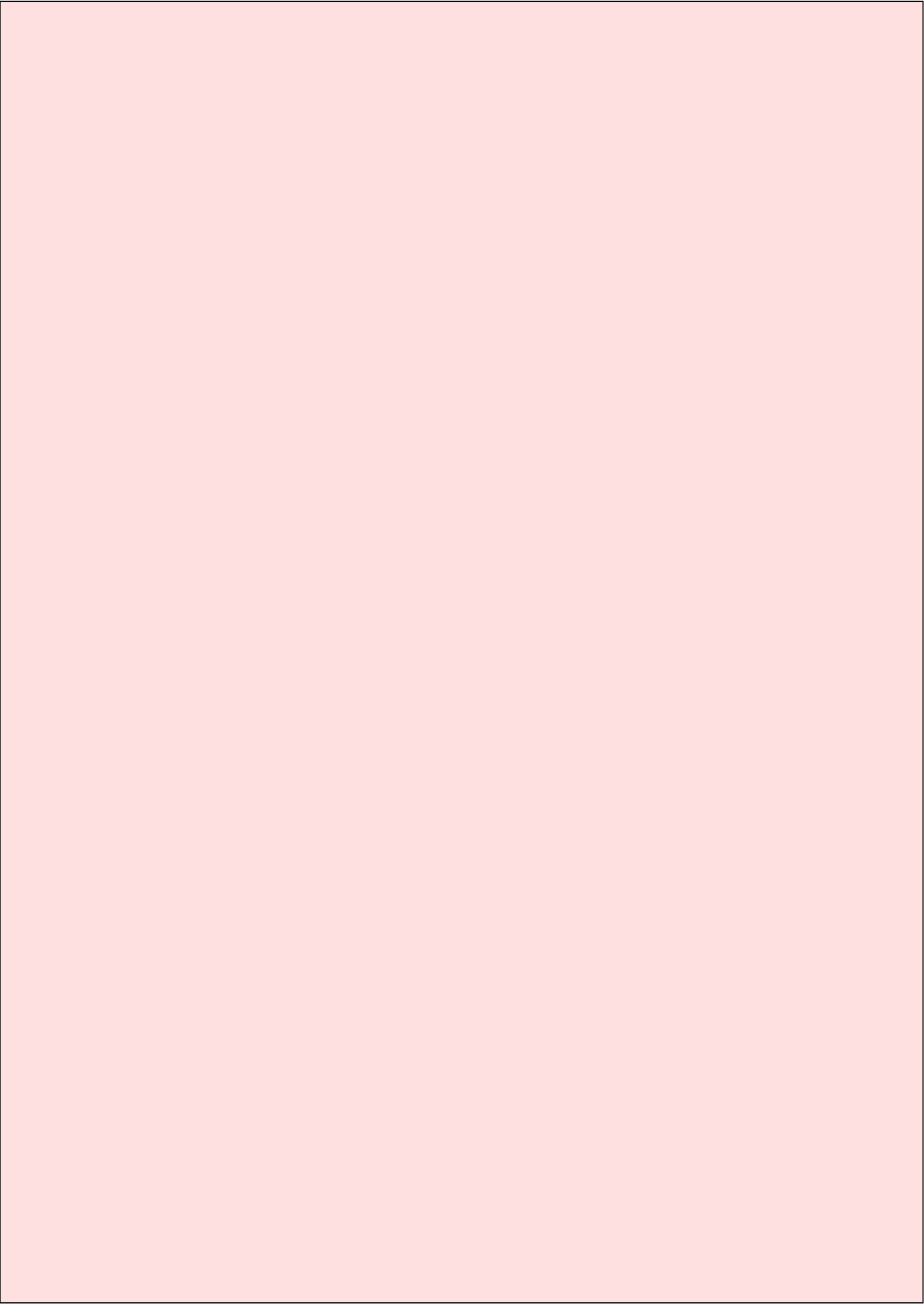
VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES.

1. La incidencia de bacteriemias por *E. coli* en el área sanitaria del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA) en el año 2013 fue de 86,5 episodios por 100000 habitantes/año. Las bacteriemias por *E. coli* supusieron el 12,5% del total de bacteriemias en el año 2013.
2. La edad media de pacientes adultos con bacteriemia por *E. coli* fue elevada. El 72,8% presentaron alguna comorbilidad. La edad media en niños fue de 29,8 meses. Las bacteriemias en ambos grupos fueron, de forma mayoritaria, de adquisición comunitaria y de origen urinario.
3. El 9.9% de las cepas de *E. coli* fueron productoras de BLEEs y la resistencia global a quinolonas fue del 39,6%. La presencia de BLEE y la resistencia a ciprofloxacino se asociaron a mayores tasas de resistencia a otras familias de antibióticos siendo las diferencias estadísticamente significativas.
4. Los factores de riesgo asociados a la adquisición de bacteriemia por *E. coli* BLEE fueron antibioterapia previa y enfermedad pulmonar crónica e igualmente, aunque no fueron estadísticamente significativos también se observó una tendencia en estos dos factores para la adquisición de una bacteriemia por cepas de *E. coli* resistentes a ciprofloxacino.
5. El 80% de las BLEEs pertenecieron a la familia CTX-M y un 46,7% fueron CTX-M-15.
6. El filogrupo mayoritario fue el B2 (52,9%) seguido del grupo D (13,4%). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas de filogrupo según el tipo de adquisición, el foco de origen de la bacteriemia, las comorbilidades del paciente, factores de riesgo asociados a dispositivos, antibioterapia previa, desarrollo de shock séptico ni mortalidad. No existieron diferencias estadísticamente significativas en la resistencia a antibióticos de los diferentes filogrupos.

7. El porcentaje de cepas ExPEC fue del 69,8% y el factor de virulencia más prevalente fue *iutA*. El 77,3% de las cepas ExPEC estuvieron incluidas en los grupos filogenéticos B2 y D. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las características clínicas y epidemiológicas de las bacteriemias según el estatus ExPEC, no obstante, se observó una mayor proporción de ExPEC en las BEC comunitarias y de origen respiratorio. La proporción de No-ExPEC fue superior en pacientes con cirrosis hepática. A excepción de los betalactámicos, los porcentajes de resistencia a diversos antibióticos fueron superiores en cepas No-ExPEC sin ser estadísticamente significativas.
8. Entre los aislados del filogrupo B2 el complejo clonal mayoritario fue ST95 (15%), seguido de ST73 (12,8%) y ST131(10,7%). ST69 supuso el 67% de aislamientos del filogrupo D.
9. Entre las cepas de *E. coli* productoras de BLEE un 38,9% pertenecieron al clon ST131, y de éstas un 85% portaban un enzima de tipo CTX-M 15. El 11,1% de las cepas de *E. coli* BLEE en nuestro medio pertenecieron a ST155.
10. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes ST en cuanto a las características clínicas y epidemiológicas de la bacteriemia excepto para la administración previa de antimicrobianos en pacientes con bacteriemias por *E. coli* ST73 y diabetes mellitus en pacientes con bacteriemias por *E. coli* ST131 que fueron factores protectores para su adquisición. Además, ST131 se asoció a las mayores tasas de resistencia.

VII. BIBLIOGRAFÍA



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**; 21(3): 251-258.

Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. Rev Infect Dis **1988**; 10(4): 677-678.

Adams-Sapper S, Diep BA, Perdreau-Remington F, Riley LW. Clonal composition and community clustering of drug-susceptible and resistant *Escherichia coli* isolates from blood stream infections. Agents Chemother **2013**; 57: 490–497.

Albert M, Yagüe G, Fernández M, Viñuela L, Segovia M, Muñoz JL. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in extended-spectrum β -lactamase-producing and -non-producing enterobacteria in Spain. Int J Antimicrob Agents. **2014**; 43(4):390-391.

Alcalá L, Alonso CA, Simón C, González-Esteban C, Orós J, Rezusta A, Ortega C, Torres C. Wild Birds. Frequent Carriers of Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL) Producing *Escherichia coli* of

CTX-M and SHV-12 Types. Microb Ecol **2016**; 72(4):861-869.

Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N. Mechanism of quinolone action and resistance. Biochemistry **2014**; 53:1565–1574.

Andersson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance Nat Rev Microbiol **2010**; 8(4): 260-327

Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance (WHO). WHO doc. Ref Genève. **2014**. ISBN: 978 92 4 156474 8.

Banerjee R, Johnston B, Lohse C, Chattopadhyay S, Tchesnokova V, Sokurenko EV, Johnson JR. The clonal distribution and diversity of extraintestinal *Escherichia coli* isolates vary according to patient characteristics. Antimicrob. Agents Chemother. **2013**; 57:5912–5917.

Banerjee R, Johnson JR. A new clone sweeps clean: the enigmatic emergence of *Escherichia coli* sequence type 131. Antimicrob Agents Chemother. **2014**; 58(9): 4997-5004.

Bauernfeind A, Grimm H, Schweighart S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection* **1990**; 18: 294-298.

Ben Sallem R, Ben Slama K, Rojo-Bezares B, Porres-Osante N, Jouini A, Klibi N, Boudabous A, Sáenz Y, Torres C. IncI1 plasmids carrying *bla*(CTX-M-1) or *bla*(CMY-2) genes in *Escherichia coli* from healthy humans and animals in Tunisia. *Microb Drug Resist.* **2014**; 20(5):495-500.

Berg RD. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol* **1996**; 4:430–435.

Bert F, Johnson JR, Ouattara, B Leflon-Guibout V, Johnston B, Marcon E, Valla D, Moreau R, Nicolas-Chanoine MH. Genetic diversity and virulence profiles of *Escherichia coli* isolates causing spontaneous bacterial peritonitis and bacteremia in patients with cirrhosis. *J Clin Microbiol* **2010**; 48: 2709–2714.

Bettelheim KA, Ismail N, Shinebaum R, Shooter RA, Moorhouse E, Farrell W. The distribution of serotypes of *Escherichia coli* in cow-pats and other animal material compared with serotypes of *E. coli* isolated from human sources. *J Hyg* **1976**; 76:403-406.

Bin C, Hui W, Renyuan Z, Yongzhong N, Xiuli X, Yingchun X, Yuanjue Z, Minjun C. Outcome of cephalosporin treatment of bacteremia due to CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **2006**; 56(4): 351-357.

Bingen-Bidois M, Clermont O, Bonacorsi S, Terki M, Brahimi N, Loukil C, Barraud D, Bingen E. Phylogenetic analysis and prevalence of urosepsis strains of *Escherichia coli* bearing pathogenicity island-like domains. *Infect Immun* **2002**; 70: 3216-3226.

Blanco J, Alonso MP, González EA, Blanco M, Garabal JI. Virulence factors of bacteraemic *Escherichia coli* with particular reference to production of cytotoxic necrotising factor (CNF) by P-fimbriate strains. *J Med Microbiol* **1990**; 31: 175-183.

Blanco J, Alonso MP, Blanco M, González EA. Pathogenetic mechanisms of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *Enferm Infecc Microbiol Clín* **1991**; 9: 640-651.

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**; 12: 191-198.

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. 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**; 66: 2011–2021.

Blázquez-Abellán A, Blázquez-Abellán E, García de Gadiana L, González, M, Hernández L, Ortiz S. Bacteriemia por *Escherichia coli* resistente a ciprofloxacino: factores de riesgo para resistencia a ciprofloxacino e impacto de recibir tratamiento empírico con este antibiótico. *Sanid. mil* **2007**; 63(4): 282-286.

Bonadio WA, Smith DS, Madagame E, Machi J, Kini N. *Escherichia coli* bacteremia in children. A review of 91 cases in 10 years. *Am J Dis Child* **1991**;145(6):671-674.

Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* **2004**; 48(1):1-14.

Börjesson S, Bengtsson B, Jernberg C, Englund S. Spread of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* isolates in Swedish broilers mediated by an *incl* plasmid carrying *bla(CTX-M-1)*. *Acta Vet Scand* **2013**; 55:3.

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**; 21(35):30-32.

Brigmon MM, Bookstaver PB, Kohn J, Albrecht H, Al-Hasan MN. Impact of fluoroquinolone resistance in Gram-negative bloodstream infections on healthcare utilization. *Clin Microbiol Infect.* **2015**; 21(9): 843-849.

Brisse S, Diancourt L, Laouenan C, Vigan M, Caro V, Arlet G, Drioux L, Leflon-Guibout V, Mentré F, Jarlier V, Nicolas-Chanoine MH; Coli β Study Group. 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* **2012**; 50: 2974–2981.

Burdet C, Clermont O, Bonacorsi S, Laouénan C, Bingen E, Aujard Y, Mentré F, Lefort A, Denamur E; COLIBAFI Group. *Escherichia coli* bacteremia in children: age and portal of entry are the main predictors of severity. *Pediatr Infect Dis J* **2014**; 33(8):872-879.

Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for betalactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* **1995**; 39(6): 1211-1233.

Bush K, Jacoby G. Updated functional classification of betalactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **2010**; 54: 969-979.

Calvo J, Cantón R, Fernández F, Mirelis B, Navarro F. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. En: Cercenado E, Cantón R, editores. *Procedimientos en Microbiología Clínica*. 2ª ed. Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; **2011**.

Campillo B, Richardet JP, Kheo T, Dupeyron C. Nosocomial spontaneous

bacterial peritonitis and bacteremia in cirrhotic patients: impact of isolate type on prognosis and characteristics of infection. *Clin Infect Dis* **2002**; 35: 1–10.

Canton R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, Coque TM. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect* **2008**. 14(1): 144-153.

Castellani A, Chalmers AJ. *Manual of tropical medicine*, 3rd ed. Williams Wood & Co., New York. **1919**. 941.

Cavaliere SJ, Zinder IS. Effect of *Escherichia coli* alpha-hemolysin on human peripheral leukocyte viability in vitro. *Infect Immun* **1982**; 36: 455- 461.

Cercenado E, Cantón R. Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología. *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. **2005**.

Chaibi EB, Sirot D, Paul G, Labia R. Inhibitor-resistant TEM beta-lactamases: phenotypic, genetic and biochemical characteristics. *J*

Antimicrob Chemother **1999**; 43(4):447-458.

Chang D-E, Smalley DJ, Tucker DL, Leatham MP, Norris WE, Stevenson SJ, Anderson AB, Grissom JE, Laux DC, Cohen PS, Conway T. Carbon nutrition of *Escherichia coli* in the mouse intestine. Proc Natl Acad Sci USA **2004**; 101: 7427–7432.

Chaudhuri R, Henderson I. The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. Infect Genet Evol **2012**; 12: 214–226.

Cheong HJ, Yoo CW, Sohn JW, Kim WJ, Kim MJ, Park SC. Bacteremia due to quinolone-resistant *Escherichia coli* in a teaching hospital in South Korea. Clin Infect Dis **2001**; 33(1): 48-53

Chi F, Jong T, Wang L, Ouyang Y, Wu C, Li W, Huang SH. Vimentin-mediated signalling is required for *IbeA+E. coli* K1 invasion of human brain microvascular endothelial cells. Biochem J **2010**; 427: 79-90.

Chmielarczyk A, Pobiega M, Wójkowska-Mach J, Romaniszyn D, Heczko PB, Bulanda M. Bloodstream Infections due to Enterobacteriaceae Among Neonates in Poland-Molecular

Analysis of the Isolates. Pol J Microbiol **2015**;64(3):217-225.

Cho SY, Kang CI, Cha MK, Wi YM, Ha YE, Chung DR. Clinical features and treatment outcomes of bloodstream infections caused by extended spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* sequence type 131. Microb Drug Resist **2015**;21: 463–469.

Chung HC, Lai CH, Lin JN, Huang CK, Liang SH, Chen WF, Shih YC, Lin HH, Wang JL. Bacteremia caused by extended-spectrum-beta-lactamaseproducing *Escherichia coli* sequence type ST131 and non-ST131 clones: comparison of demographic data, clinical features, and mortality. Antimicrob Agents Chemother **2012**; 56: 618-622.

Cisneros-Herreros JM, Cobo-Reinoso J, Pujol-Rojo M, Rodriguez-Baño J, Salavert-Lletí M. Guía para el diagnóstico y tratamiento del paciente con bacteriemia. Guías de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Enferm Infecc Microbiol Clin **2007**; 25(2):111-130.

Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. Appl Environ Microbiol **2000**; 66: 4555-4558.

Clermont O, Dhanji H, Upton M, Gibreel T, Fox A, Boyd D, Mulvey MR, Nordmann P, Ruppé E, Sarthou JL, Frank T, Vimont S, Arlet G, Branger C, Woodford N, Denamur E. Rapid detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* encompassing the CTX-M-15-producing strains. *J Antimicrob Chemother* **2009**; 64: 274–277.

Clermont O, Christenson J, Denamur E, Gordon D. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep* **2013**; 5: 58–65.

Clermont O, Gordon D, Denamur E. A guide to the various phylogenetic classification schemes for *Escherichia coli* and the correspondence among schemes. *Microbiol Read Engl* **2015**; 161:980-988.

Clermont O, Couffignal C, Blanco J, Mentré F, Picard B, Denamur E; COLIVILLE and COLIBAFI groups. Two levels of specialization in bacteraemic *Escherichia coli* strains revealed by their comparison with commensal strains. *Epidemiol Infect* **2016**; 28: 1-11.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational

supplement M100-S19. CLSI, **2013**, Wayne, PA 19087, USA.

Colomer-Lluch M, Mora A, López C, Mamani R, Dahbi G, Marzoa J, Herrera A, Viso S, Blanco JE, Blanco M, Alonso MP, Jofre J, Muniesa M, Blanco J. 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* **2013**; 68: 758–765.

Cooke NM, Smith SG, Kelleher M, Rogers TR. Major differences exist in frequencies of virulence factors and multidrug resistance between community and nosocomial *Escherichia coli* bloodstream isolates. *J Clin Microbiol* **2010**; 48: 1099–1104.

Coque TM, Novais A, Carattoli A, Poirel L, Pitout J, Peixe L, Baquero F, Cantón R, Nordmann P. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum betalactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis* **2008**; 14: 195–200.

Corvalán A, Aguayo F, Lévicán J, Corvalán I. Biología molecular en Infectología. Parte II: Diagnóstico molecular de agentes infecciosos. *Rev Chil Infect* **2003**; 20(1): 26-38.

Courpon-Claudinon A, Lefort A, Panhard X, Clermont O, Dornic Q, Fantin B, Mentré F, Wolff M, Denamur E, Branger C; COLIBAFI Group. Bacteraemia caused by third-generation cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in France: prevalence, molecular epidemiology and clinical features. *Clin Microbiol Infect* **2011**; 17: 557–565.

Da Silva GJ, Mendonça N. Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*. *Virulence* **2012**; 3: 18–28.

Dahbi G, Mora A, Lopez C, Alonso MP, Mamani R, Marzoa J, Coira A, García-Garrote F, Pita JM, Velasco D, Herrera A, Viso S, Blanco JE, Blanco M, Blanco J. Emergence of new variants of ST131 clonal group among extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases. *Int J Antimicrob Agents* **2013**; 42: 347–351.

Dale AP, Woodford N. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): disease, carriage and clones. *J Infect* **2015**; 71:615–626.

Dalmau D, Navarro F, Mirelis B, Blanco J, Garau J, Prats G. *Escherichia coli* bacteremia. Serotype O15:K52:H1 as a

urinary pathogen. *J Hosp Infect* **1996**; 34: 233-234.

Day M, Doumith M, Abernethy J, Hope R, Reynolds R, Wain J, Livermore DM, Woodford N. The population structure of *Escherichia coli* causing bacteraemia in the UK and Ireland between 2001 and 2010. *J Antimicrob Chemother* **2016**; 71(8): 2139-2142.

De Kraker ME a, Jarlier V, Monen JCM, Heuer OE, Van de Sande N, Grundmann H. The changing epidemiology of bacteraemias in Europe: trends from the European Antimicrobial Resistance Surveillance System. *Clin Microbiol Infect* **2012**; 19(9): 860-868.

Denis B, Lafaurie M, Donay JL, Fontaine JP, Oksenhendler E, Raffoux E, Hennequin C, Allez M, Socie G, Maziers N, Porcher R, Molina JM. Prevalence, risk factors, and impact on clinical outcome of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* bacteraemia: a five-year study. *Int J Infect Dis* **2015**; 39: 1-6.

Dias RC, Marangoni DV, Smith SP Alves EM, Pellegrino FL, Riley LW, Moreira BM. Clonal composition of *Escherichia coli* causing community-acquired urinary tract infections in the State of

Rio de Janeiro, Brazil. *Microb Drug Resist* **2009**; 15: 303–308.

Díaz MA, Hernández-Bello JR, Rodríguez-Baño J, Martínez-Martínez L, Calvo J, Blanco J, Pascual A; Spanish Group for Nosocomial Infections (GEIH). Diversity of *Escherichia coli* strain producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain: second nationwide study. *J Clin Microbiol* **2010**; 48: 2840-2845.

Doumith M, Day MJ, Hope R, Wain J, Woodford N. Improved multiplex PCR strategy for rapid assignment of the four major *Escherichia coli* phylogenetic groups. *J Clin Microbiol* **2012**; 50:3108–10.

Doumith M, Day M, Ciesielczuk H, Hope R, Underwood A, Reynolds R, Wain J, Livermore DM, Woodford N. Rapid identification of major *Escherichia coli* sequence types causing urinary tract and bloodstream infections. *J Clin Microbiol* **2015**; 53(1):160-6.

Dubois D, Delmas J, Cady A, Robin F, Sivignon A, Oswald E, Bonnet R. Cyclomodulins in urosepsis strains of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* **2010**; 48: 2122-2129.

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

European Antimicrobial Resistance Surveillance System. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. Surveillance Report, European Centre for Disease Prevention and Control **2015**.

European Antimicrobial Resistance Surveillance System. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015. Surveillance Report, European Centre for Disease Prevention and Control **2016**.

Fam N, Leflon-Guibout V, Fouad S, Fouad S, Aboul-Fadl L, Marcon E, Desouky D, El-Defrawy I, Abou-Aitta A, Klena J, Nicolas-Chanoine MH. CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clinical isolates in Cairo (Egypt), including isolates of clonal complex ST10 and clones ST131, ST73, and ST405 in both community and hospital settings. *Microb Drug Resist* **2011**; 17: 67–73.

Ferjani S, Saidani M, Hamzaoui Z, Alonso CA, Torres C, Maamar E, Slim AF, Boutiba BB. Community fecal carriage of broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli*

in Tunisian children. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2017**; 87(2):188-192.

Fernandez-Rodriguez A, Reguera JA, Perez-Diaz 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**;10(8): 456-461.

Flayhart D, Borek AP, Wakefield T, Dick J, Carroll KC. Comparison of BACTEC PLUS blood culture media to BacT/ALERT FA blood culture media for detection of bacterial pathogens in samples containing therapeutic levels of antibiotics. *J Clin Microbiol* **2007**; 45 (3): 816-821.

Friedman ND, Kaye KS, Stout JE, McGarry SA, Trivette SL, Briggs JP, Lamm W, Clark C, MacFarquhar J, Walton AL, Reller LB, Sexton DJ. Health care-associated bloodstream infections in adults: a reason to change the accepted definition of community-acquired infections. *Ann Intern Med* **2002**; 137: 791–797.

García Hernández A, García-Vázquez E, Gómez Gómez J, Canteras M, Hernandez-Torres A, Ruiz Gómez J. Predictive factors of ESBL versus non-ESBL *Escherichia coli* bacteraemia and influence of resistance on the mortality of the patients. *Med Clin* **2011**; 136(2):56-60.

Garénaux A, Caza M, Dozois CM. The ins and outs of siderophore mediated iron uptake by extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology* **2011**; 153: 89-98.

Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *Am J Infect Control* **1988**; 16:128–140.

Ghuysen JM. Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu Rev Microbiol* **1991**; 45: 37-67.

Gibreel TM, Dodgson AR, Cheesbrough J, Fox AJ, Bolton FJ, Upton M. Population structure, virulence potential and antibiotic susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* from Northwest England. *J Antimicrob Chemother* **2012**; 67: 346–356.

Gordon D, Cowling A. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology* **2003**; 149: 3575-3586

Gordon D, Clermont O, Tolley H, Denamur E. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environ Microbiol* **2008**; 10:2484–96.

Goto M, Al Hasan N. Overall burden of bloodstream infection and nosocomial bloodstream infection in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect* **2013**; 19, 501–509.

Gratia A. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de collibacille. *CR Soc Biol* **1925**; 93: 1041-1042.

Greenberg D, Moser A, Yagupsky P, Peled N, Hofman Y, Kapelushnik J, Leibovitz E. Microbiological spectrum and susceptibility patterns of pathogens causing bacteraemia in paediatric febrile neutropenic oncology patients: comparison between two consecutive time periods with use of different antibiotic treatment protocols. *Int J Antimicrob Agents* **2005**; 25(6):469-473.

Gutmann L, Ferre B, Goldstein FW, Rizk N, Pinto-Schuster E, Acar JF, Collatz E. SHV-5, a novel SHV-type beta-lactamase that hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins and monobactams. *Antimicrob Agents Chemother* **1989**; 33(6):951-956.

Guyer DM, Radulovic S, Jones FE, Mobley HL. Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney

epithelial cells. *Infect Immun* **2000**; 70: 4539-4546.

Ha YE, Kang CI, Cha MK, Park SY, Wi YM, Chung DR, Peck KR, Lee NY, Song JH. Epidemiology and clinical outcomes of bloodstream infections caused by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in patients with cancer. *Int J Antimicrob Agents* **2013**; 42(5):403-409.

Hansen F, Olsen SS, Heltberg O, Justesen US, Fuglsang-Damgaard D, Knudsen JD, Hammerum AM. Characterization of third-generation cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from bloodstream infections in Denmark. *Microb Drug Resist* **2014**;20(4):316-324.

Hernández JR, Pascual A, Díaz MA, Martínez-Martínez L, Rodríguez-Baño J; 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* **2003**; 21: 77-82.

Ho PL, Chan WM, Tsang KW, Wong SS, Young K. Bacteremia caused by *Escherichia coli* producing Extended-spectrum β -lactamases: a case control study of risk factors and outcomes. *Scand J Infect Dis* **2002**; 34: 567-573.

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**; 69: 91–100.

Horvath LL, George J, Murray CK, Harrison LS, Hospenthal DR. Direct comparison of the BACTEC 9240 and BacT/ALERT 3D automated blood culture systems for candida growth detection. *J Clin Microbiol* **2004**; 42 (1): 115-8.

Jaureguy F, Landraud L, Passet V, Diancourt L, Frapy E, Guigon G, Carbonnelle E, Lortholary O, Clermont O, Denamur E, Picard B, Nassif X, Brisse S. Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics* **2008**; 9:1–14.

Jackson LA, Benson P, Neuzil KM, Grandjean M, Marino JL. Burden of community-onset *Escherichia coli* bacteremia in seniors. *J Infect Dis* **2005**; 191: 1523–1529.

Javaloyas M, Garcia-Somoza D, Gudiol F. Bacteriemia por *Escherichia coli*: análisis epidemiológico y de la sensibilidad a los antibióticos en un hospital comarcal." *Medicina Clínica* **2003**; 120: 125-127.

Johnson JR, Stell AL. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host comprise. *J Infect Dis* **2000**; 181: 261-272.

Johnson JR, Delavari P, Kuskowski M, Stell AL. Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **2001**; 183(1):78-88.

Johnson J, Russo TA. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "The other bad E coli". *J Lab Clin Med* **2002**; 139: 155–156.

Johnson JR, Kuskowski MA, O'Bryan TT, Maslow JN. Epidemiological correlates of virulence genotype and phylogenetic background among *Escherichia coli* blood isolates from adults with diverse-source bacteremia. *Journal of Infectious Diseases* **2002b**; 185: 1439–1447.

Johnson JR, Murray AC, Gajewski A, Sullivan M, Snippes P, Kuskowski MA, Smith KE. Isolation and molecular characterization of nalidixic acid-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from retail chicken products. *Antimicrob Agents Chemother* **2003**; 47: 2161-2168.

Johnson JR, Owens K, Sabate M, Prats G. Rapid and specific detection of the O15:K52:H1 clonal group of *Escherichia coli* by gene-specific PCR. *J Clin Microbiol* **2004**; 42: 3841–3843.

Johnson JR, Johnston B, Clabots CR, Kuskowski MA, Roberts E, DeRoy C. Virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* serogroup O6 isolates from humans, dogs, and cats. *J Clin Microbiol* **2008**; 46: 417–422.

Johnson TJ, Wannemuehler YM, Nolan LK. Evolution of the *iss* gene in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **2008**;74: 2360–2369.

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**; 53: 2733–2739.

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**; 51: 286–294.

Johnson JR, Menard M, Lauderdale TL, Kosmidis C, Gordon D, Collignon P,

Maslow JN, Andrasević AT, Kuskowski MA; Trans-Global Initiative for Antimicrobial Resistance Analysis Investigators. Global distribution and epidemiologic Associations of *Escherichia coli* clonal Group A, 1998–2007. *Emerg Infect Dis* **2011**; 17: 2001–2009.

Johnson JR, Tchesnokova V, Johnston B, Clabots C, Roberts PL, Billig M, Riddell K, Rogers P, Qin X, Butler-Wu S, Price LB, Aziz M, Nicolas-Chanoine MH, Debroy C, Robicsek A, Hansen G, Urban C, Platell J, Trott DJ, Zhanel G, Weissman SJ, Cookson BT, Fang FC, Limaye AP, Scholes D, Chattopadhyay S, Hooper DC, Sokurenko EV. Abrupt emergence of a single dominant multidrug-resistant strain of *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **2013**; 207:919–928.

Johnson JR, Clermont O, Johnston B, Clabots C, Tchesnokova V, Sokurenko E, Junka AF, Maczynska B, Denamur E. Rapid and specific detection, molecular epidemiology, and experimental virulence of the O16 subgroup within *Escherichia coli* sequence type 131. *J Clin Microbiol* **2014**; 52:1358–1365

Jones GL, Warren RE, Skidmore SJ, Davies VA, Gibreel T, Upton M. Prevalence and distribution of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of *Escherichia coli* lacking extended-spectrum beta-

lactamases. *J Antimicrob Chemother* **2008**; 62: 1245–1251.

Kang CI, Kim SH, Kim DM, Park WB, Lee KD, Kim HB, Oh MD, Kim EC, Choe KW. Risk Factors for Ciprofloxacin Resistance in Bloodstream Infections Due to Extended-Spectrum beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Microb Drug Resist.* **2004**;10(1):71-76.

Kang CI, Cheong HS, Chung DR, Peck KR, Song JH, Oh MD, Choe KW. Clinical features and outcome of community-onset bloodstream infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **2008**; 27(1):85-88.

Kang CI, Cha MK, Kim SH, Ko KS, Wi YM, Chung DR, Peck KR, Lee NY, Song JH. Clinical and molecular epidemiology of community-onset bacteremia caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* over a 6-year Period. *J Korean Med Sci* **2013**; 28(7): 998-1004.

Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* **2004**; 2:123–140.

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**; 32: 513-521.

Kauffmann F. The serology of the Coli Group. *J Immunol* **1947**; 57: 71-100.

Kennedy K, Roberts J, Collignon PJ. *Escherichia coli* bacteriemia in Canberra: incidence and clinical features. *Med J Australia* **2008**; 188: 209-213.

Kong KF, Schneper L, Mathee K. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS* **2010**; 118: 1–36.

Korhonen TK, Valtonen MV, Parkkinen J, Väisänen-Rhen V, Finne J, Orskov F, Orskov I, Svenson SB, Mäkelä PH. Serotypes, hemolysin production, and receptor recognition of *Escherichia coli* strains associated with neonatal sepsis and meningitis. *Infect Immun* **1985**; 48: 486-491.

Kostakioti M, Stathopoulos C. Functional analysis of the Tsh autotransporter from an avian pathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **2004**; 72: 5548-5554.

Kruis W, Fric P, Pokrotnieks J, Lukás M, Fixa B, Kascák M, Kamm MA, Weismueller J, Beglinger C, Stolte M, Wolff C, Schulze J. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut*. **2004**; 53(11):1617-1623.

Laupland K.B., Gregson D.B., Church DL, Ross T, Pitout JD. Incidence, risk factors and outcomes of *Escherichia coli* bloodstream infections in a large Canadian region. *Clin Microbiol Infect* **2008**; 14: 1041-1047.

Leflon-Guibout V, Blanco J, Amaqdouf K, Mora A, Guize L, Nicolas-Chanoine MH. 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**; 46: 3900–3905.

Lefort A, Panhard X, Clermont O, Woerther PL, Branger C, Mentré F, Fantin B, Wolff M, Denamur E; COLIBAFI Group. Host factors and portal of entry outweigh bacterial determinants to predict the severity of *Escherichia coli* bacteremia. *Journal of Clinical Microbiology* **2011**; 49: 777–783.

Leistner R, Sakellariou C, Gürntke S, Kola A, Steinmetz I, Kohler C, Pfeifer Y,

Eller C, Gastmeier P, Schwab F. Mortality and molecular epidemiology associated with extended-spectrum β -lactamase production in *Escherichia coli* from bloodstream infection. *Infect Drug Resist* **2014**; 13 (7): 57-62.

Li B, Sun J, Han L, Huang X, Fu Q, Ni Y. Phylogenetic groups and pathogenicity island markers in fecal *Escherichia coli* isolates from asymptomatic humans in China. *Appl Environ Microbiol* **2010**; 76: 6698-6700.

Liakopoulos A, Mevius D, Ceccarelli D. A Review of SHV Extended-Spectrum β -Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous. *Front Microbiol* **2016**; 7: 1374.

Linder H, Engberg I, Baltzer IM, Jann K, Svanborg-Eden C. Induction of inflammation by *Escherichia coli* on the mucosal level: requirements for adherence and endotoxin. *Infect Immun* **1988**; 56: 1309-1313.

Linggood MA, Ingram PL. The role of alpha hemolysin in the virulence of *Escherichia coli* for mice. *J Med Microbiol* **1982**; 15: 23-30.

Livermore DM. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* **1995**; 8: 557–584.

Livermore DM, Yuan M. Antibiotic resistance and production of extended-

spectrum beta-lactamases amongst *Klebsiella* spp. from intensive care units in Europe. *J Antimicrob Chemother.* **1996**; 38(3): 409-424.

Livermore DM. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin Infect Dis* **2003**; 36:11–23.

Livermore DM, Nichols T, Lamagni TL, Potz N, Reynolds R, Duckworth G. Ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* from bacteraemias in England; increasingly prevalent and mostly from men. *J Antimicrob Chemother* **2003**; 52(6): 1040-1042.

Loza-Fernández E, Planes-Reig A, Rodríguez-Créixems M. Hemocultivos. Procedimientos en Microbiología Clínica Recomendaciones de Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). **2003**; 1-20.

Lüthje P, Brauner A. Virulence factors of uropathogenic *E. coli* and their interaction with the host. *Adv Microb Physiol* **2014**; 65:337-72.

Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. Multilocus sequence typing: a portable approach

to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* **1998**; 95: 3140-3145.

Mamani Huarani, R. Caracterización Molecular de Cepas de *Escherichia coli* del Grupo Clonal O25b:H4-B2-ST131 y de otros Clones Causantes de Infecciones Extraintestinales en Seres Humanos. Genes de Virulencia y de Resistencia. Tesis Doctoral **2014**. Universidad de Santiago de Compostela.

Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Eds. *Principles and practice of Infectious Diseases*. Philadelphia. Churchill Livingstone. 7th Edition, **2010**.

Manges AR, Johnson JR, Foxman B, O'Bryan TT, Fullerton KE, Riley LW. Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal group. *N Engl J Med* **2001**; 345: 1007–1013.

Manges AR, Perdreau-Remington F, Solberg O, Riley LW. Multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal groups causing community-acquired bloodstream infections. *J Infect* **2006**; 53: 25–29.

Manges AR, Tabor H, Tellis P, Vincent C, Tellier PP. Endemic and epidemic lineages of *Escherichia coli* that cause

urinary tract infections. *Emerg Infect Dis* **2008**; 14: 1575–1583.

Manges AR, Johnson JR. Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* **2012**; 55:712-719.

Marín M, Gudiol F. Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2003**; 21: 42–55.

Martínez-Martínez L. Asociación de BLEE con otros mecanismos de resistencia. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2007**; 25 (2): 38-47.

Martinez-Medina M, Mora A, Blanco M, López C, Alonso MP, Bonacorsi S, Nicolas-Chanoine MH, Darfeuille-Michaud A, Garcia-Gil J, Blanco J. Similarity and divergence among adherent-invasive *Escherichia coli* and extraintestinal pathogenic *E. coli* strains. *J Clin Microbiol* **2009**; 47: 3968–3979.

Mathers AJ, Peirano G, Pitout JD. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev* **2015**; 28:565–591.

Matsumura Y, Yamamoto M, Nagao M, Hotta G, Matsushima A, Ito Y, Takakura S, Ichiyama S; Kyoto-Shiga Clinical Microbiology Study Group. 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**; 67: 2612–2620.

Melzer M, Petersen I. Mortality following bacteraemic infection caused by extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *E. coli* compared to non-ESBL producing *E. coli*. *J Infect* **2007**; 55: 254-259.

Merino I, Shaw E, Horcajada JP, Cercenado E, Mirelis B, Pallarés MA, Gómez J, Xercavins M, Martínez-Martínez L, De Cueto M, Cantón R, Ruiz-Garbajosa P; ITUBRAS-GEIH-SEIMC Group. CTX-M-15-H30Rx-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**; 71(8): 2125-2130.

Metan G, Zarakolu P, Cakir B, Hascelik G, Uzun O. Clinical outcomes and therapeutic options of bloodstream infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents* **2005**; 26:254–257.

Mobley HL, Green DM, Trifillis AL, Johnson DE, Chippendale GR, Lockatell CV, Jones BD, Warren JW. Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains. *Infect Immun* **1990**; 58: 1281–1289.

Mokady D, Gophna U, Ron EZ. Virulence factors of septicemic *Escherichia coli* strains. *Int J Med Microbiol*. **2005**; 295(6-7):455-462.

Mora A, Lopez C, Dabhi G, Blanco M, Blanco JE, Alonso MP, Herrera A, Mamani R, Bonacorsi S, Moulin-Schouleur M, Blanco J. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O1:K1:H7/NM from human and avian origin: detection of clonal groups B2 ST95 and D ST59 with different host distribution. *BMC Microbiol* **2009**; 9: 132.

Mora A, Blanco M, Lopez C, Mamani R, Blanco JE, Alonso MP, García-Garrote F, Dabhi G, Herrera A, Fernández A, Fernández B, Agulla A, Bou G, Blanco J. 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. *Int J Antimicrob Agents* **2011**; **37**: 16–21.

Mora A, Viso S, Lopez C, Alonso MP, García-Garrote F, Dabhi G, Mamani R, Herrera A, Marzoa J, Blanco M, Blanco JE, Moulin-Schouleur M, Schouler C, Blanco J. Poultry as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O45:K1:H7-B2-ST95 in humans. *Vet Microbiol* **2013**; 167: 506–512.

Mora-Rillo M, Fernandez-Romero N, Navarro-San Francisco C, Diez-Sebastian J, Romero-Gomez MP, Arnalich Fernandez F., Arribas Lopez JR, Mingorance J. Impact of virulence genes on sepsis severity and survival of *Escherichia coli* bacteremia. *Virulence* **2015**; 6(1):93-100;

Moreno E, Planells I, Prats G, Planes AM, Moreno G, Andreu A. 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* **2005**; 53: 93-99.

Muñoz-Bellido JL, Alonzo MM, Martínez Andrés JA, Gutiérrez Zufiaurre MN, Ortiz G, Segovia Hernández M, García-Rodríguez JA. Efflux pump-mediated quinolone resistance in *Staphylococcus aureus* strains wild type for *gyrA*, *gyrB*, *griA*, and *norA*. *Antimicrob Agents Chemother* **1999**; 43: 354-356.

Nicolas-Chanoine MH, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MP, Caniça MM, Park YJ, Lavigne JP, Pitout J, Johnson JR. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother.* **2008**; 61(2): 273-281

Nicolas-Chanoine MH, Bertrand X, Madec JY. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clin Microbiol Rev.* **2014**; 27(3): 543-74.

Nolan LK, Horne SM, Giddings CW, Foley SL, Johnson TJ, Lynne AM, Skyberg J. Resistance to serum complement, iss, and virulence of avian *Escherichia coli*. *Vet Res Commun* **2003**; 27: 101-110.

Novais A, Viana D, Baquero F, Martinez-Botas J, Canton R, Coque TM. 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 *qnrS1* genes. *Antimicrob Agents Chemother* **2012**; 56:2763–2766.

Nuesch-Inderbilen MT, Kayser FH, Hachler 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**; 41(5):943-949.

Ochman H, Selander RK. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J Bacteriol* **1984**; 157: 690-693.

Olesen B, Kolmos HJ, Orskov F, Orskov I. A comparative study of nosocomial and community-acquired strain of *Escherichia coli* causing bacteriemia in a Danish University Hospital. *J Hosp Infect* **1995**; 31: 295- 304.

Olesen B, Scheutz F, Menard M, Skov MN, Kolmos HJ, Kuskowski MA, Johnson JR. Three-decade epidemiological analysis of *Escherichia coli* O15:K52:H1. *J Clin Microbiol* **2009**; 47: 1857– 1862.

Olesen B, Hansen DS, Nilsson F, Frimodt-Møller J, Leihof RF, Struve C, Scheutz F, Johnston B, Krogfelt KA, Johnson JR. 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**; 51: 1779–1785.

Olson AB, Silverman M, Boyd DA, McGeer A, Willey BM, Pong-Porter V, Daneman N, Mulvey MR. 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**; 49(5):2112-2115.

Orden JA, Domínguez-Bernal G, Martínez-Pulgarín S, Blanco M, Blanco JE, Mora A, Blanco J, Blanco J, de la Fuente R. Necrotoxicogenic *Escherichia coli* from sheep and goats produce a new type of cytotoxic necrotizing factor (CNF3) associated with the *eae* and *ehxA* genes. Int Microbiol **2007**; 10: 47-55.

Ortega M, Marco F, Soriano A, Almela M, Martínez A, Muñoz A. Analysis of 4.758 *Escherichia coli* bacteraemia episodes: predictive factors for isolation of an antibiotic-resistant strain and their impact on the outcome. J Antimicrob Chemother **2009**; 63: 568-574.

Oteo J, Navarro C, Cercenado E, Delgado-Iribarren A, Wilhelmi I, Orden B, García C, Miguelañez S, Pérez-Vázquez M, García-Cobos S, Aracil B, Bautista V, Campos J. 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 **2006**; 44: 2359-2366.

Palmer C, Bik EM, Digiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the

human infant intestinal microbiota. Plos Biol **2007**. 5: 1556-1573.

Parret AH, De Mot R. *Escherichia coli*'s uropathogenic-specific protein: a bacteriocin promoting infectivity. Microbiology **2002**; 148: 1604-1606.

Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum B-lactamases: a Clinical Update. J Clin Microbiol Rev **2005**; 18:657-686.

Peirano G, van der Bij AK, Gregson DB, Pitout JD. 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 **2012**; 50:294–299.

Peirano G, van der Bij AK, Freeman JL, Poirel L, Nordmann P, Costello M, Tchesnokova VL, Pitout JD. Characteristics of *Escherichia coli* sequence type 131 isolates that produce extended-spectrum -lactamases: global distribution of the H30-Rx sublineage. Antimicrob Agents Chemother **2014**; 58:3762–3767.

Peralta G, Sanchez MB, Garrido JE, De Benito I, Cano ME, Martínez-Martínez L, Roiz MP. Impact of antibiotic

resistance and of adequate empirical antibiotic treatment in the prognosis of patients with *Escherichia coli* bacteraemia. *J Antimicrob Chemother* **2007**; 60: 855–863.

Pereira C, Dias A, Oliveira H, Rodrigues F. *Escherichia coli* bacteraemia in a pediatric emergency service (1995-2010). *Acta Med Port* **2011**; 24 (2):207-212.

Petty NK, Ben Zakour NL, Stanton-Cook M, Skippington E, Totsika M, Forde BM, Phan MD, Gomes Moriel D, Peters KM, Davies M, Rogers BA, Dougan G, Rodriguez-Baño J, Pascual A, Pitout JD, Upton M, Paterson DL, Walsh TR, Schembri MA, Beatson SA. Global dissemination of a multidrug resistant *Escherichia coli* clone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2014**; 111(15): 5694-5699.

Phillips I, Eykyn S, King A, Gransden WR, Rowe B, Frost JA, Gross RJ. Epidemic multiresistant *Escherichia coli* infection in West Lambeth Health District. *Lancet.* **1988**; 1(8593):1038-1041.

Picard B, Garcia JS, Gouriou S, Duriez P, Brahimi N, Bingen E, Elion J, Denamur E. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect Immun.* **1999**; 67(2): 546-553.

Pitout JD, Church DL, Gregson DB, Chow BL, McCracken M, Mulvey MR, Laupland KB. Molecular epidemiology of CTX-M-producing *Escherichia coli* in the Calgary Health Region: emergence of CTX-M-15-producing isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **2007**; 51: 1281–1286.

Pitout JD, Gregson DB, Campbell L, Laupland KB. 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* **2009**; 53: 2846–2851.

Platell JL, Cobbold RN, Johnson JR, Heisig A, Heisig P, Clabots C, Kuskowski MA, Trott DJ. Commonality among fluoroquinolone-resistant sequence type ST131 extraintestinal *Escherichia coli* isolates from humans and companion animals in Australia. *Antimicrob Agents Chemother* **2011**; 55(8): 3782–3787.

Prats G. Microbiología y Parasitología médicas. Editorial Médica Panamericana, Madrid. **2013**.

Price LB, Johnson JR, Aziz M, Clabots C, Johnston B, Tchesnokova V, Nordstrom L, Billig M, Chattopadhyay S, Stegger M, Andersen PS, Pearson T,

Riddell K, Rogers P, Scholes D, Kahl B, Keim P, Sokurenko EV. The epidemic of extended-spectrum--lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 is driven by a single highly pathogenic subclone, H30-Rx. *mBio* **2013**; 4(6): e00377-13.

Raymond NJ, Blackmore TK, Humble MW, Jones MR. Bloodstream infections in a secondary and tertiary care hospital setting. *Intern Med J* **2006**; 36:765-772.

Reimer LG, Wilson ML, Weinstein MP. Update on detection of bacteremia and fungemia. *Clin Microbiol Rev* **1997**; 10(3): 444-465.

Riley LW. Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect* **2014**; 20: 380–390.

Robin F, Delmas J, Schweitzer C, Tournilhac O, Lesens O, Chanal C, Bonnet R. Evolution of TEM-type enzymes: biochemical and genetic characterization of two new complex mutant TEM enzymes, TEM-151 and TEM-152, from a single patient. *Antimicrob Agents Chemother* **2007**; 51(4):1304-1309.

Rodrigues C, Machado E, Pires J, Ramos H, Novais Â, Peixe L. Increase of widespread A, B1 and D *Escherichia coli* clones producing a high diversity of

CTX-M-types in a Portuguese hospital. *Future Microbiol* **2015**; 10(7):1125-1131.

Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Romero L, Martínez-Martínez L, Muniain MA, Perea EJ, Pérez-Cano R, Pascual A. Epidemiology and Clinical Features of Infections Caused by Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Nonhospitalized Patients. *J Clin Microbiol* **2004**; 42(3):1089-1094.

Rodríguez-Baño J, Navarro DM, Romero L, Muniain MA, de Cueto M, Ríos MJ, Hernández JR, Pascual A. Bacteremia Due to extended-spectrum betalactamase-producing *Escherichia coli* in the CTX-M era: A new clinical challenge. *Clin Infect Dis* **2006**; 43(11): 1407-1414.

Rodríguez-Baño J, Picón E, Gijón P, Hernández JR, Ruiz M, Peña C. Community-onset bacteremia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: risk factors and prognosis. *Clin Infect Dis* **2010**; 50: 40-48.

Rodríguez-Baño J, López-Prieto MD, Portillo MM, Retamar P, Natera C, Nuño E, Herrero M, del Arco A, Muñoz A, Téllez F, Torres-Tortosa M, Martín-Aspas A, Arroyo A, Ruiz A, Moya R, Corzo JE, León L, Pérez-López JA; SAEI/SAMPAC Bacteraemia Group.

Epidemiology and clinical features of community-acquired, healthcare-associated and nosocomial bloodstream infections in tertiary-care and community hospitals. *Clin Microbiol Infect* **2010b**; 16(9): 1408–1413

Rodríguez-Baño J, Mingorance J, Fernández-Romero N, Serrano L, López-Cerero L, Pascual A; ESBL-REIPI Group. Virulence profiles of bacteremic extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: association with epidemiological and clinical features. *PLoS One* **2012**; 7(9): e44238.

Rodríguez-Créixems M, Alcalá L, Muñoz P, Cercenado E, Vicente T, Bouza E. Bloodstream infections: evolution and trends in the microbiology workload, incidence, and etiology, 1985-2006. *Medicine* **2008**; 87:234–249.

Rodríguez-Martínez JM. Mecanismos de Resistencia a quinolonas mediada por plásmidos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2005**; 23(1): 25-31.

Ron EZ. Distribution and evolution of virulence factors in septicemic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol IJMM* **2010**; 300: 367-370.

Rossolini GM, Franceschini N, Lauretti L, Caravelli B, Riccio ML, Galleni M, Frère JM, Amicosante G. 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**; 43(9):2193-2199.

Russo TA, Johnson JR. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis* **2000**; 181(5):1753-1754.

Russo TA, Carlino UB, Johnson JR. Identification of a new iron-regulated virulence gene, *ire A*, in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. *Infect Immun* **2001**; 69: 6209-6216.

Russo TA, Johnson JR. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect* **2003**; 5(5): 449-456.

Sabaté M, Tarrago R, Navarro F, Miró E, Vergés C, Barbé J, Prats G. Cloning and sequence of the genes encoding a novel cefotaxime-Hydrolyzing beta-lactamasa (CTX-M-9) from *E. coli* in

Spain. Antimicrob Agents Chemother **2000**; 44(7): 1970-1973.

Salvador E, Wagenlehner F, Kohler CD, Mellmann A, Hacker J, Svanborg C, Dobrindt U. 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 **2012**; 80(2): 668-678

Sanders CC. Microbiology of fluoroquinolones. In: Sanders WE Jr, Sanders CC, editors. Fluoroquinolones in the treatment of infectious diseases. Glenview: Physicians and Scientists Publishing **1990**; 1-28.

Sannes MR, Kuskowski M, Owens K, Gajewski A, Johnson JR. Virulence factor profiles and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from veterans with bacteremia and uninfected control subjects. J Infect Dis **2004**; 190(12): 2121-2128.

Schembri MA, Zakour NL, Phan MD, Forde BM, Stanton-Cook M, Beatson SA. Molecular Characterization of the Multidrug Resistant *Escherichia coli* ST131 Clone. Pathogens. **2015**; 4(3):422-430.

Schulze J, Schiemann M, Sonnenborn U. 120 years of *E. coli* – its importance in research and medicine. Hagen, Germany: Alfred-Nissle-Gesellschaft. **2006**.

Shakir SM, Goldbeck JM, Robison D, Eckerd AM, Chavez-Bueno S. Genotypic and phenotypic characterization of invasive neonatal *Escherichia coli* clinical isolates. Am J Perinatol **2014**; 31(11):975-982.

Simarro E., Navarro F., Ruiz J, Miró E, Gómez J, Mirelis B. *Salmonella enterica* serovar Virchow with CTX-M like betalactamas in Spain. J Clin Microbiol **2000**. 38(12): 4647-4678.

Skaar EP. The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts. PLoS Pathog **2010**; 6(8): e1000949.

Skjot-Rasmussen L, Ejrnæs K, Lundgren B, Hammerum AM, Frimodt-Møller N. Virulence factors and phylogenetic grouping of *Escherichia coli* isolates from patients with bacteraemia of urinary tract origin relate to sex and hospital- vs. community-acquired origin. Int J Med Microbiol **2012**; 302(3):129-134.

Skjot-Rasmussen L, Olsen SS, Jakobsen L, Ejrnaes K, Scheutz F, Lundgren B, Frimodt-Møller N, Hammerum AM.

Escherichia coli clonal group A causing bacteraemia of urinary tract origin. Clin Microbiol Infect **2013**; 19(7): 656–661.

Skogberg K, Lytikainen O, Ollgren J, Nuorti JP, Ruutu P. Population based burden of bloodstream infections in Finland. Clin Microbiol Infect **2012**; 18: 170-176.

Smith JL, Fratamico PM, Gunther NW. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. Foodborne Pathog Dis **2007**; 4(2): 134-163.

Smith SP, Manges AR, Riley LW. Temporal changes in the prevalence of community-acquired antimicrobial-resistant urinary tract infection affected by *Escherichia coli* clonal group composition. Clin Infect Dis **2008**; 46: 689–695.

Smithson A, Muñoz A, Suarez B, Soto SM, Perello R, Soriano A, Martinez JA, Vila J, Horcajada JP, Mensa J, Lozano F. Association between mannose-binding lectin deficiency and septic shock following acute pyelonephritis due to *Escherichia coli*. Clin Vaccine Immunol **2007**; 14(3):256-261.

Sogaard M, Norgaard M, Dethlefsen C, Schonheyder HC. Temporal changes in the incidence and 30-day mortality

associated with bacteremia in hospitalized patients from 1992 through 2006: a population-based cohort study. Clin Infect Dis **2011**; 52: 61–69.

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 **1988**; 10(4):879-884.

Staley C, Weingarden AR, Khoruts A, Sadowsky MJ. Interaction of gut microbiota with bile acid metabolism and its influence on disease states. Appl Microbiol Biotechnol **2017**; 101(1):47-64.

Stoesser N, Sheppard AE, Pankhurst L, De Maio N, Moore CE, Sebra R, Turner P, Anson LW, Kasarskis A, Batty EM, Kos V, Wilson DJ, Phetsouvanh R, Wyllie D, Sokurenko E, Manges AR, Johnson TJ, Price LB, Peto TE, Johnson JR, Didelot X, Walker AS, Crook DW. Evolutionary History of the Global Emergence of the *Escherichia coli* Epidemic Clone ST131. Modernizing Medical Microbiology Informatics Group (MMMIG). MBio **2016**; 7(2): e02162.

Sukupolvi S, O'Connor D. TraT lipoproteina, a plasmid-specified mediator of interactions between

gram-negative bacteria and their environment. *Microbiol Rev* **1990**; 54: 331-341.

Sun J, Deng Z, Yan A. Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochem Biophys Res Commun* **2015**; 465(1): 165.

Suzuki S, Shibata N, Yamane K, Wachino J, Ito K, Arakawa Y. Change in the prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan by clonal spread. *J Antimicrob Chemother* **2009**; 63: 72–79.

Svanborg C, Godaly G. Bacterial virulence in urinary tract infection. *Infect Dis Clin North Am* **1997**; 513-529.

Tartof SY, Solberg OD, Manges AR, Riley LW. Analysis of a uropathogenic *Escherichia coli* clonal group by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* **2005**; 43: 5860–5864

Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* **2010**; 8: 207–217.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting

chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* **1995**; 33(9): 2233–2239.

Thulstrup, AM, Sorensen HT, Schonheyder HC, Moller JK, Tage-Jensen U. Population-based study of the risk and short-term prognosis for bacteremia in patients with liver cirrhosis. *Clin Infect Dis* **2000**; 31: 1357–1361

Tojo R, Suárez A, Clemente MG, de los Reyes-Gavilán CG, Margolles A, Gueimonde M, Ruas-Madiedo P. Intestinal microbiota in health and disease: role of bifidobacteria in gut homeostasis. *World J Gastroenterol* **2014**; 20(41): 15163-15176

Urbach C, Fastrez J, Soumillion P. A new family of cyanobacterial Penicillin-binding proteins. A missing link in the evolution of class A beta-lactamases. *J Biol Chem* **2008**; 283:32516–32526.

Uslan DZ, Crane SJ, Steckelberg JM, Cockerill FR, 3rd, St Sauver JL, Wilson WR, Baddour LM. Age- and sex-associated trends in bloodstream infection: a population-based study in Olmsted County, Minnesota. *Arch Intern Med* **2007**; 167:834–839

Valverde A, Cantón R, Garcillán-Barcia MP, Novais A, Galán JC, Alvarado A, de la Cruz F, Baquero F, Coque TM. 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* **2009**;53(12):5204-12.

Van der Bij AK, Peirano G, Goessens WH, van der Vorm ER, van Westreenen M, Pitout JD. Clinical and molecular characteristics of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* causing bacteremia in the Rotterdam Area, Netherlands. *Antimicrob Agents Chemother* **2011**; 55(7):3576-8.

Wang MC, Tseng CC, Chen CY, Wu JJ, Huang JJ. The role of bacterial virulence and host factors in patients with *Escherichia coli* bacteremia who have acute cholangitis or upper urinary tract infection. *Clinical Infectious Diseases* **2002**; 35(10): 1161–1166.

Wang S, Niu C, Shi Z, Xia Y, Yaqoob M, Dai J, Lu C. Effects of *ibeA* deletion on virulence and Biofilm formation of Avian Pathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **2011**; 79(1): 279-287.

Wang S, Zhao SY, Xiao SZ, Gu FF, Liu QZ, Tang J, Guo XK, Ni YX, Han LZ. Antimicrobial Resistance and

Molecular Epidemiology of *Escherichia coli* Causing Bloodstream Infections in Three Hospitals in Shanghai, China. *PLoS One* **2016**; 11(1): e0147740.

Weissman SJ, Chattopadhyay S, Aprikian P, Obata-Yasuoka M, Yarova-Yarovaya Y, Stapleton A, Ba-Thein W, Dykhuizen D, Johnson JR, Sokurenko EV. Clonal analysis reveals high rate of structural mutations in fimbrial adhesins of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **2006**; 59(3): 975–988.

Weissman SJ, Johnson JR, Tchesnokova V, Billig M, Dykhuizen D, Riddell K, Rogers P, Qin X, Butler-Wu S, Cookson BT, Fang FC, Scholes D, Chattopadhyay S, Sokurenko E. High-resolution two-locus clonal typing of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **2012**; 78(5):1353-1360

Wiles T, Kulesus R, Mulvey MA. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol* **2008**; 85: 11–19.

Willmott CJ, Maxwell A. A single point mutation in the DNA gyrase A protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the gyrase-DNA

complex. *Antimicrob Agents Chemother* **1993**; 37: 126-127.

Wilson ML, Weinstein MP, Reller LB. Automated blood culture system. *Clin Lab Med* **1994**; 14 (1): 149-169.

Wilson J, Elgohari S, Livermore DM, Cookson B, Johnson A, Lamagni T, Chronias A, Sheridan E. Trends among pathogens reported as causing bacteraemia in England, 2004–2008. *Clin Microbiol Infect* **2011**; 17(3): 451–458

Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler LH, Karch H, Reeves PR, Maiden MC, Ochman H, Achtman M. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol* **2006**; 60(5): 1136-1151.

Wiselka MF. Bacterial and host factors in the pathogenesis of urinary tract infections. In: Cattell WR, ed. *Infections of the kidney and urinary tract*. New York: Oxford, **1996**: 8–33.

Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* **2004**; 39: 309–317.

Woodford N, Ward ME, Kaufmann ME, Turton J, Fagan EJ, James D, Johnson AP, Pike R, Warner M, Cheasty T, Pearson A, Harry S, Leach JB, Loughrey A, Lowes JA, Warren RE, Livermore DM. Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother* **2004**; 54(4): 735–743.

Wu YH, Cheng MF, Lai CH, Lin HH, Hung CH, Wang JL. The role of sequence type (ST) 131 in adult community-onset non-ESBL-producing *Escherichia coli* bacteraemia. *BMC Infect Dis* **2014**; 14:579.

Yan F, Polk D. Commensal bacteria in the gut: learning who our friends are. *Curr Opin Gastroenterol* **2004**; 20(6): 565–571.

Yun KW, Kim DS, Kim W, Lim IS. Molecular typing of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from Korean children with urinary tract infection. *Korean J Pediatr* **2015**; 58(1):20-27.

VIII. LISTA DE TABLAS

I. INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Factores de virulencia de <i>E. coli</i> . Modificada de Dale <i>et al.</i> , 2015	21
Tabla 2. Clasificación de las BLEE tipo CTX-M en grupos en función de su secuencia aminoacídica y enzimas más representativas de cada grupo. Modificado de Bonnet <i>et al.</i> , 2004	29
Tabla 3. Factores de virulencia asociados a <i>E. coli</i> septicémicos. Modificado de Mokady <i>et al.</i> , 2005.....	59
Tabla 4. Evolución de los porcentajes de cepas de <i>E. coli</i> invasivas resistentes a diferentes familias de antibióticos entre 2003 y 2014 en España. Modificado de EARSS, 2014.	62
Tabla 5. Estudios que describen la estructura poblacional de <i>E. coli</i> productores de bacteriemias.	65

III. MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 6. Iniciadores utilizados en la caracterización molecular de las BLEEs.	82
Tabla 7. Iniciadores utilizados para la determinación de los grupos filogenéticos según Clermont <i>et al</i> y temperaturas de hibridación para la PCR.....	83
Tabla 8. Iniciadores utilizados para la amplificación de los genes que codifican diferentes factores de virulencia.	85
Tabla 9. Iniciadores utilizados en la caracterización molecular de los STs 69,73, 95 y 131.....	86
Tabla 10. Iniciadores utilizados en la técnica de MLST según el esquema de Achtman.....	88

IV. RESULTADOS

Tabla 11. Dispositivos en pacientes adultos con bacteriemia por <i>Escherichia coli</i>	96
Tabla 12. Factores de riesgo de los pacientes con evolución desfavorable de la BEC.	97
Tabla 13. Resistencia de las cepas de <i>E. coli</i> procedentes de bacteriemias a diferentes antibióticos. Resistencia de las cepas de <i>E. coli</i> productoras de BLEE y no productoras de BLEE procedentes de bacteriemias a diferentes antibióticos. Resistencia de las cepas de <i>E. coli</i> resistentes y sensibles a ciprofloxacino procedentes de bacteriemias a diferentes antibióticos ..	104
Tabla 14. Resistencia de las cepas de <i>E. coli</i> procedentes de bacteriemias a diferentes antibióticos en población adulta. Resistencia de las cepas de <i>E. coli</i> productoras de BLEE y no productoras de BLEE procedentes de bacteriemias a diferentes antibióticos en población adulta.	

Epidemiología clínica y molecular de BEC en el HCUVA

Resistencia de las cepas de <i>E. coli</i> resistentes y sensibles a ciprofloxacino procedentes de bacteriemias a diferentes antibióticos en población adulta.....	105
Tabla 15. Datos clínicos de los episodios de bacteriemias por <i>E. coli</i> productor de BLEE (BEC-BLEE) y no productor de BLEE (BEC-NO BLEE) y resistente a ciprofloxacino (BEC-CIP R) y sensible a ciprofloxacino (BEC-CIP S).	106
Tabla 16. Análisis univariado de los dispositivos, antibioterapia previa, gravedad y mortalidad para la adquisición de bacteriemia por <i>E. coli</i> productor de BLEE (BEC-BLEE) y no productor de BLEE (BEC-NO BLEE). resistente a ciprofloxacino (BEC-CIP R) y sensible a ciprofloxacino (BEC-CIP S) en la población adulta.	107
Tabla 17. Tipo de adquisición y servicios de procedencia de los hemocultivos en bacteriemias por <i>E. coli</i> productor de BLEE (BEC-BLEE) y no productor de BLEE (BEC-NO BLEE). resistente a ciprofloxacino (BEC-CIP R) y sensible a ciprofloxacino (BEC-CIP S) en la población adulta.	108
Tabla 18. Origen de la infección en bacteriemias por <i>E. coli</i> productor de BLEE (BEC-BLEE) y no productor de BLEE (BEC-NO BLEE), así como resistentes y sensibles a quinolonas en episodios de población adulta.....	108
Tabla 19: Porcentajes de resistencia a diferentes antibióticos de las cepas de <i>E. coli</i> procedentes de bacteriemias resistentes y sensibles a ciprofloxacino en episodios de niños.....	110
Tabla 20. Tipo de adquisición y origen de la infección de los hemocultivos en bacteriemias por <i>E. coli</i> resistente a ciprofloxacino (BEC-CIP R) y sensible a ciprofloxacino (BEC-CIP S) en la población pediátrica.....	111
Tabla 21. Familias de BLEEs producidas por las cepas estudiadas de <i>E. coli productores</i> de BLEE.	112
Tabla 22: Relación entre grupo filogenético y el tipo de BLEE.	115
Tabla 23. Tipo de adquisición en función de los filogrupos en población adulta.	116
Tabla 24. Origen de la infección en función de los filogrupos en población adulta y niños....	117
Tabla 25. Comorbilidades y dispositivos en función de los filogrupos en población adulta. ..	118
Tabla 26. Porcentaje de resistencia a diferentes antibióticos en función del filogrupo.	120
Tabla 27. Distribución por tipo de genes de virulencia en aislamientos de <i>E. coli</i> productores de bacteriemia, cepas ExPEC, No-ExPEC y <i>E. coli</i> BLEE.	122
Tabla 28. Distribución de genes de virulencia en función del grupo filogenético.	124
Tabla 29. Estructura poblacional de aislamientos de <i>E. coli</i> B2.....	131

Tabla 30. Estructura poblacional de aislamientos de <i>E. coli</i> productores de BLEE.....	132
Tabla 31. Distribución por edad, sexo, comorbilidades, dispositivos, antibioterapia previa, gravedad y mortalidad en pacientes con episodio de BECST69 y BECNOST69.....	133
Tabla 32. Tipo de adquisición y foco de infección de BECST69 y BECNOST69 en episodios de población adulta.....	134
Tabla 33. Porcentajes de resistencia a diferentes antibióticos en cepas ST69 y No-ST69.	135
Tabla 34. Distribución de ExPEC y genes de virulencia en cepas ST69 y No-ST69.....	135
Tabla 35. Distribución por edad, sexo, comorbilidades, dispositivos, antibioterapia previa, gravedad y mortalidad en pacientes con episodio de BECST73 y BECNOST73.....	136
Tabla 36. Tipo de adquisición y foco de infección de BECST73 y BECNOST73 en episodios de población adulta.....	137
Tabla 37. Porcentajes de resistencia a diferentes antibióticos en cepas ST73 y No-ST73.	138
Tabla 38. Distribución de ExPEC y genes de virulencia en cepas ST73 y No-ST73.....	138
Tabla 39. Distribución por edad, sexo, comorbilidades, dispositivos, antibioterapia previa, gravedad y mortalidad en pacientes con episodio de BECST95 y BECNOST95.....	139
Tabla 40. Tipo de adquisición y foco de infección de BECST95 y BECNOST95 en episodios de población adulta.....	140
Tabla 41. Porcentajes de resistencia a diferentes antibióticos en cepas ST95 y No-ST95.	140
Tabla 42. Distribución de ExPEC y genes de virulencia en cepas ST95 y No-ST95.....	141
Tabla 43. Distribución por edad, sexo, comorbilidades, dispositivos, antibioterapia previa, gravedad y mortalidad en pacientes con episodio de BECST131 y BECNOST131.....	142
Tabla 44. Tipo de adquisición y foco de infección de BECST131 y BECNOST131 en episodios de población adulta.....	143
Tabla 45. Porcentajes de resistencia a diferentes antibióticos en cepas ST131 y No-ST131. ...	144
Tabla 46. Distribución de ExPEC y genes de virulencia en cepas ST131 y No-ST131.....	144

V. DISCUSIÓN

Tabla 47. Estudios que describen la estructura poblacional de <i>E. coli</i> BLEE productores de bacteriemias.....	168
---	-----

Tabla 48. Estudios que describen la estructura poblacional de *E. coli* productores de bacteriemias..... 170

IX. LISTA DE FIGURAS

I. INTRODUCCIÓN

Figura 1. Imagen de Theodor Escherich. Extraída de https://es.wikipedia.org	9
Figura 2. Estructura de la pared celular de <i>E. coli</i> . Figura extraída de http://cluster-divulgacioncientifica.blogspot.com.es	11
Figura 3. 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.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902012000100013) . .	17
Figura 4. Modelo de diferentes sistemas que contribuyen a la captación de hierro mediante sideróforos en <i>E. coli</i> . Extraído de Garenaux <i>et al.</i> , 2011.	20
Figura 5. Estructura tridimensional de una betalactamasa. Extraído de: http://www.ebi.ac.uk/pdbe	25
Figura 6. Mecanismos de resistencia a quinolonas. Extraída de Aldred <i>et al.</i> , 2014.	31
Figura 7. Diversidad filogenética de <i>E. coli</i> . Extraída de Jaureguy <i>et al.</i> , 2008.	37
Figura 8. Estructura poblacional del linaje ST131 <i>fimH30</i> de <i>Escherichia coli</i> , sublinajes H30 y otros linajes asociados con ST131. FQ-R, resistente a fluoroquinolonas; FQ-S, sensibles a fluoroquinolonas. Modificado de Mathers <i>et al.</i> , 2016.	44
Figura 9. Evolución de la etiología de la bacteriemia de 1985-2006. Extraído de Rodríguez-Créixems <i>et al.</i> , 2009.	50
Figura 10. Incidencia según edad y sexo de bacteriemia por <i>E. coli</i> en Reino Unido. Extraído de Bou-Antoun <i>et al.</i> , 2016.	52
Figura 11. Cambios en la prevalencia de BLEE (%) y los tipos de genes CTX-M durante seis años de episodios bacteriemia por <i>E. coli</i> adquiridas en la comunidad. Extraída de Kang <i>et al.</i> , 2013.	56
Figura 12. Porcentaje de cepas de <i>E. coli</i> invasivas resistentes a fluoroquinolonas (EARSS, 2015).....	60
Figura 13. Porcentajes de cepas de <i>E. coli</i> invasivas resistentes a cefalosporinas de tercera generación (EARSS, 2015).	61
Figura 14. Porcentaje de cepas de <i>E. coli</i> invasivas resistentes a aminoglucósidos (EARSS, 2015)	62

Figura 15. Porcentaje de cepas de *E. coli* invasivas resistentes a carbapenems. (EARSS, 2015).62

Figura 16. Proporciones de los distintos ST de aislado de *E. coli* procedentes de bacteriemia durante los años 2001-2010. Extraído de Day *et al.*, 2016. 64

III. MATERIAL Y MÉTODOS

Figura 17. Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca..... 75

Figura 18. Colonias de *Escherichia coli* en agar Mckonkey..... 79

Figura 19. Método de doble difusión con discos para la confirmación fenotípica de la producción de beta-lactamasa de espectro extendido (BLEE)..... 81

Figura 20. Patrones de bandas obtenidos (arriba) y tabla de interpretación (abajo) por la PCR cuádruple de Clermont en 2013 que diferencia los grupos filogenéticos de *E. coli*. 84

Figura 21: Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de ADN generados en la PCR multiplex que detecta los 4 principales STs de *E. coli*..... 87

IV. RESULTADOS

Figura 22. Distribución temporal de los aislamientos de *Escherichia coli* procedentes de hemocultivos en 2013. 93

Figura 23. Distribución por sexos en la población adulta. 95

Figura 24. Comorbilidades en pacientes adultos con bacteriemia por *Escherichia coli*. 96

Figura 25. Distribución de los principales servicios con bacteriemia por *Escherichia coli* en población adulta %. 98

Figura 26. Tipo de adquisición de la bacteriemia en pacientes adultos. 98

Figura 27. Origen de la bacteriemia en pacientes adultos..... 99

Figura 28. Foco de origen y tipo de adquisición de la bacteriemia en población adulta..... 100

Figura 29. Procedencia por servicios de los hemocultivos extraídos en la población infantil.. 101

Figura 30. Tipo de adquisición de la bacteriemia por *E. coli* en pacientes pediátricos (%). 102

Figura 31. Distribución de grupos filogenéticos en aislamientos de <i>E. coli</i> productores de bacteriemia.....	113
Figura 32. Distribución de grupos filogenéticos en aislamientos de <i>E. coli</i> BLEE productores de bacteriemia.....	114
Figura 33. Antibioterapia previa y gravedad en función de los filogrupos en la población adulta.....	119
Figura 34. Distribución por número de factores de virulencia en aislamientos de <i>E. coli</i> productores de bacteriemia.....	121
Figura 35. Distribución en porcentaje de cepas ExPEC y No-ExPEC en los distintos grupos filogenéticos.....	124
Figura 36. Distribución de cepas ExPEC y No-ExPEC en función del tipo de adquisición en la población adulta.....	125
Figura 37. Distribución de cepas ExPEC y No-ExPEC en función del origen de la bacteriemia en población adulta.....	126
Figura 38. Distribución de cepas ExPEC y No-ExPEC en función de las comorbilidades en pacientes adultos.....	127
Figura 39. Distribución de cepas ExPEC y No-ExPEC en función de factores de riesgo y desenlace del episodio en población adulta. Número de cepas (N).....	128
Figura 40. Porcentaje de resistencia a diferentes antibióticos en cepas ExPEC y No-ExPEC...	129