



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Participació dels factors de virulència extraintestinal d'
Escherichia coli en la seva acció uropatògena**

Memòria presentada per a optar al grau de

Doctora en Biologia

Eva Moreno Pujol

2015

Barcelona, Octubre 2015



Tesi Doctoral

Títol

Participació dels factors de virulència extraintestinal d' *Escherichia coli* en la seva acció uropatògena

Realitzada per

Eva Moreno Pujol

per optar al grau acadèmic de

Doctora

Treball realitzat en el Servei de Microbiologia de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron de Barcelona, Grup de Recerca de l'Institut de Recerca de l'Hospital Vall d'Hebron, sota la direcció de

Dra. Antònia Andreu Domingo

Tesi adscrita al Departament de Genètica i Microbiologia de la Universitat Autònoma de Barcelona

Eva Moreno Pujol

Antònia Andreu Domingo

Barcelona, Octubre 2015

Als meus pares

Agraïments

És tot un repte agrair en unes breus línies a totes aquelles persones que durant tants anys m'han ajudat en l'aportació científica del present treball.

En primer lloc, vull agrair a les dues persones responsables d'aquest treball. A la meva directora de tesi, la Dra. Antònia Andreu, per donar-me l'oportunitat de formar part de l'embrionari "equip de recerca", que després del seu esforç i perseverança s'ha anat ampliant en els darrers anys. Per compartir els seus coneixement científics i "atracció" als factors de virulència, a partir dels quals s'han creat nous projecte . Antònia, per fi, sortirà a la llum la tesi. Al Dr. Guillem Prats que gràcies al seu esperit crític i passió per la recerca fa que et qüestionis cada pas donat en les noves investigacions.

Als companys del Servei de Microbiologia de l'Hospital Vall d'Hebron, que gràcies a les seves aportacions i coneixements han fet possible la redacció de tots els treballs presentats en els darrers anys: Dra. Irene Planells i Dra. Anna Maria Planes. També agrair a la Dra. Rosa Bartolomé i Dra. Nieves Larrosa, que han estat presents en tota aquesta etapa. Agrair la recol·lecció de les mostres per part del Dr. Carles Pigrau. I no em vull oblidar de les grans contribucions enriquidores, noves visions per enfocar els estudis, i la seva experiència en la infecció urinària i els factors de virulència en *Escherichia coli* del Dr. James R. Johnson.

Susana, Juanjo, Montse, Teresa, Pep, Alfonso i Eli per ser com sou, no només per ser els companys de recerca, si no també per l'amistat que ens uneix. Una forta abraçada per tots !!!!

A la meva família, els meus pares i germans per estar sempre al meu costat. Jordi gràcies per el teu recolzament en totes les decisions preses i, donar-me l'empenta per tirar endavant. Lluna i Arlet per créixer dia a dia juntes , segur que jo aprenc més de "valtrus" que "valtrus" de mi, perquè les coses són més fàcils del què semblen vist amb els vostres ulls. Us estimo molt a tots!!!!

A tots vosaltres, GRÀCIES !

Glossari

°C,	Graus centígrads
µg,	microgram
µL,	microlitre
µM,	micromolar
ADN,	àcid desoxiribonucleic
<i>afa/draBC</i> ,	marcador de les adhesines de la Família DR
BMEC,	cèl·lules encefàliques microvasculars endotelials (en anglès, <i>brain microvascular endothelial cells</i>)
CGA,	grup clonal A (en anglès, <i>clonal group A</i>)
CIM,	concentració mínima inhibidòria
<i>cnf1</i> ,	marcador del factor citotòxic necrotitzant
DAF,	proteïna de membrana dels eritròcits reguladora de la cascada del complement (en anglès, <i>decay accelerating factor</i>)
DR,	repeticions directes (en anglès, <i>direct repeat</i>)
ECOR,	soques d' <i>Escherichia coli</i> de referència (en anglès, <i>Escherichia coli reference</i>)
ERIC-PCR,	PCR de les seqüències intergenètiques repetitives de les enterobacteriàcies (en anglès, <i>enterobacterial repetitive intergenic consensus</i>)
ExPEC,	<i>Escherichia coli</i> patogènica extraintestinal (en anglès, <i>extraintestinal pathogenic Escherichia coli</i>)
<i>fimH</i> ,	marcador de la molècula d'adhesina de la fimbria tipus 1
FQ,	fluoroquinolona
<i>fyuA</i> ,	marcador del receptor yersinbactina
h,	hores
<i>hlyA</i> ,	hemolisina
<i>ibeA</i> ,	marcador de l'invasor de l'endoteli cerebral
IL,	interleucina
IS,	seqüència d'inserció
ITU,	infecció del tracte urinari
<i>iutA</i> ,	marcador del sistema sideròfor aerobactina
Kb,	kilobase
<i>kpsMII</i> ,	marcador de la càpsula polisacàrida del grup II
L,	litre
LPS,	lipopolisacàrid
LREC,	"Laboratorio de referencia de <i>Escherichia coli</i> "
<i>malX</i> ,	marcador de l'illa de patogenicitat d' <i>E. coli</i> CFT073
mg,	mil·ligram
min,	minuts
mL,	mil·lilitre
MLEE,	electroforesi d'enzims multilocus (en anglès, <i>multilocus enzym electrophoresis</i>)
MLST,	tipificació multilocus de seqüències (en anglès, <i>multilocus sequence typing</i>)
mM,	milimolar
MRHA,	adhesina manosa resistent (en anglès, <i>mannose-resistant haemagglutinin</i>)
MSHA,	adhesina manosa sensible (en anglès, <i>mannose-sensitive haemagglutinin</i>)
PAI,	illes de patogenicitat (en anglès, <i>pathogenicity island</i>)
<i>papA</i> ,	subunitat estructural de la fimbria P
<i>papG</i> ,	molècula d'adhesina de la fimbria P

pb, parells de bases
PCR, reacció en cadena de la polimerasa
PFGE, electroforesi en camp polsant (en anglès, *pulsed fiel gel electrophoresis*)
Q, quinolona
SCR, repeticions consens curtes (en anglès, *short consensus repeat*)
Seg, segons
sfa/focDE, marcador de la fímbria S i fímbria F1C
SNP, polimorfisme de nucleòtids simple (en anglès, *single nucleotid polymorphism*)
SXT, trimetoprim / sulfametoxazol
traT, marcador de la proteïna de membrana associada a la resistència al sèrum
UFC, unitats formadores de colònies

Índex

Índex, **5**

1. Introducció, 9

1.1. *Escherichia coli* uropatògena, 10

1.1.1. Generalitats d' *Escherichia coli*, 10

1.1.2. Factors de virulència en *E. coli* causant d'infecció urinària, 11

1.2. Adhesines, 13

1.2.1. Fímbria tipus 1, 14

1.2.2. Fímbries P, 18

1.2.3. Família Dr, 22

1.2.4. Fímbria S i Fímbria F1C, 24

1.3. Toxines, 25

1.3.1. Hemolisina, 25

1.3.2. Factor citotòxic necrotitzant, 29

1.4. Càpsula polisacàrida, 29

1.4.1. Polisacàrids del grup II, 31

1.5. Resistència al sèrum, 35

1.5.1. Resistència associada a la presència de polisacàrids O, 36

1.5.2. Resistència associada a plasmidis, 36

1.6. Adquisició de ferro, 37

1.6.1. Aerobactina, 37

1.6.2. Yersinbactina, 39

1.7. Invasor de l'endoteli, 40

1.8. Illes de patogenicitat, 41

1.8.1. PAI I_{CFT073}, 43

1.9. Derives poblacionals d' *E. coli*, 43

1.10. Infecció urinària, 44

1.10.1. Infecció urinària, 44

1.10.2. Factors de risc associats a la infecció urinària, 47

1.10.3. Interaccions *Escherichia coli* – hoste en l'establiment de la infecció urinària, 51

1.10.4. Diagnòstic microbiològic de la infecció urinària, 52

1.10.5. Sensibilitat antimicrobiana 53

2. Objectius, 55

- 2.1.** Estudi 1: Caracteritzar els factors de virulència i el grup filogenètic de soques d'*E. coli* procedents de mostres clíniques de pacients amb diferents patologies, **55**
- 2.2.** Estudi 2: Avaluar la relació entre la resistència a quinolones, fluoroquinolones i trimetoprim/sulfametoxazole, el potencial virulent i el grup filogenètic de soques d'*Escherichia coli*, provinents de mostres clíniques, **56**
- 2.3.** Estudi 3: Conèixer l'estructura de les poblacions intestinals d'*E. coli* en dones sanes, per posteriorment poder-la comparar amb les poblacions intestinals de les dones amb infeccions urinàries causades per aquest mateix bacteri, **57**
- 2.4.** Estudi 4: Conèixer l'estructura de les poblacions fecals d'*E. coli* en dones amb infecció urinària, analitzant la seva relació amb la soca causant de la infecció. Analitzar les diferències entre les poblacions fecals d'*E. coli* en dones sanes i en dones amb infecció urinària, **58**

3. Material i Mètodes, 61

- 3.1.** Pacients i soques d'*Escherichia coli* corresponents a l'ESTUDI 1, **61**
- 3.2.** Pacients i soques d'*Escherichia coli* corresponents a l'ESTUDI 2, **62**
 - 3.2.1.** Estudi del grup clonal A entre les soques d'*E. coli* resistents a trimetoprim- sulfametoxazol, **63**
- 3.3.** Pacients i soques d'*Escherichia coli* corresponents a l'ESTUDI 3, **63**
 - 3.3.1.** Mostra fecal, **64**
- 3.4.** Pacients i soques d'*Escherichia coli* corresponents a l'ESTUDI 4, **64**
 - 3.4.1.** Mostra fecal, **65**
 - 3.4.2.** Relacions clonals entre la soca urinària i les soques fecals d'*E. coli*, **65**
 - 3.4.3.** Definicions; **66**
- 3.5.** Estudi de la sensibilitat als antimicrobians, **66**
- 3.6.** Mètodes moleculars, **67**
 - 3.6.1.** Factors de virulència, **67**
 - 3.6.2.** Definicions, **69**
 - 3.6.3.** Grup filogenètic, **69**
- 3.7.** Determinació dels antígens O, **70**
- 3.8.** Anàlisi clonal, **70**
- 3.9.** Mètodes estadístics, **71**

4. Resultats i discussió, 73

4.1. Estudi 1, 73

4.2. Estudi 2, 79

4.3. Estudi 3, 88

4.4. Estudi 4, 97

5. Conclusions, 109

5.1. Estudi 1, 109.

5.2. Estudi 2, 109

5.3. Estudi 3, 110

5.4. Estudi 4, 111

Taules i figures, **113**

Bibliografia, **115**

Annex I. Producció científica derivada de la tesi, **133**

Introducció

Escherichia coli és el principal agent d'infecció urinària (ITU). Segons l'informe EPINE (Estudio de prevalencia de las infecciones nosocomiales en España) 2010 i 2014, la infecció urinària es comporta com a la tercera causa d'infecció, tant en la comunitat com en l'hospital. Paradoxalment, *Escherichia coli* és també el principal component aeròbic integrant de la flora comensal de l'intestí en humans i altres animal ¹. En funció de les relacions de similaritat mitjançant tècniques d'electroforesi enzimàtica multilocus (MLEE) ²⁻⁴ i de tipificació de seqüències multilocus (MLST) s'han identificat quatre grans grups filogenètics dins l'espècie *E. coli*: A, B1, B2 i D. Les diferències entre les soques d'*E. coli* patògena i comensal s'atribueixen als antecedents filogenètics i a la virulència que promouen les funcions patogèniques com l'adherència, l'evasió als mecanisme de defensa de l'hoste, l'adquisició de ferro i la invasió cel·lular. *E. coli* patògena extraintestinal (ExPEC)⁵ deriva principalment del grup filogenètic B2, i en menys mesura del grup D. *E. coli* comensal pertany als grups filogenètics A i B1 ^{3,6}.

Tot i que les soques d'*E. coli* dels grups filogenètics A o B1 formen part de la flora comensal, en ocasions també s'ha trobat que han produït infeccions extraintestinals; i en molts casos amb un perfil de virulència semblant o igual que les soques d'*E. coli* dels grups filogenètics patògens B2 i D.

Taula 1. Classificació d' *Escherichia coli* segons la patologia

Comensal		
Patogen intestinal	ETEC	Enterotoxigènica
	STEC / EHEC	Productores de toxines / Enterohemorràgiques
	EPEC	Enteropatogènica
	EIEC	Enteroinvasiva
	EAEC	Enteroagregativa
	DAEC	Difusament adherent
Patogen extraintestinal (ExPEC)	UPEC	Uropatògena
	BMEC	Meningitis bacteriana

1.1. *Escherichia coli* uropatògena

1.1.1. Generalitats d'*Escherichia coli*

Escherichia coli juntament amb *E. albertis*, *E. blattae*, *E. faecalis*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* i *E. vuleneris*, forma el gènere *Escherichia*. Constitueix l'espècie dominant de la flora aeròbia del tub digestiu. Aquests bacteris integrants de la flora normal són els que poden causar en diverses situacions infeccions urinàries, septicèmies, meningitis, etc. Es defineix com *E. coli* uropatògena aquelles soques que produeixen infecció del tracte urinari. Recentment s'ha comprovat que *E. coli* uropatògena té les mateixes característiques que la resta de soques d'*E. coli* patògena extraintestinal.

Taula 2. Identificació bioquímica d'*Escherichia coli*

Prova Bioquímica	% de positivitat	Prova Bioquímica	% de positivitat
Oxidasa	0	Fermentació salicina	40
Producció d'índol	98	Fermentació adonitol	5
Vermell de metil	99	Fermentació inositol	1
Voges – Proskauer	0	Fermentació L-arabinosa	99
Citrat de Simmons	1	Fermentació rafinosa	50
H ₂ S (TSI)	1	Fermentació L-ramnosa	80
Hidròlisi d'urea	1	Fermentació maltosa	95
Utilització malonat	0	Fermentació D-xilosa	95
Àcid de glucosa	100	Fermentació de trealosa	98
Gas de glucosa	95	Fermentació celobiosa	2
Fenilalanina desaminasa	0	Fermentació de α-metil-D glucòsid	0
Lisina descarboxilasa	90	Fermentació d'eritritol	0
Arginina dihidrolasa	17	Hidròlisi d'esculina	35
Ornitina descarboxilasa	65	Fermentació melobiosa	75
Mobilitat a 36°C	95	Fermentació D-arabitol	5
Hidròlisi de gelatina a 22°C	0	Fermentació D-manosa	98
Creixement en KCN	3	Fermentació glicerol	75
Fermentació de lactosa	95	Nitrat a nitrit	100
Fermentació de sacarosa	50	Tartrat de Jordan	95
Fermentació D-manitol	98	Utilització Acetat	90
Fermentació D-sorbitol	94	Lipasa (oli de blat de moro)	0
Fermentació mucat	95	DNasa a 25°C	0
Fermentació ducitol	60	ONPG	95

El gènere *Escherichia* forma part de la família *Enterobacteriaceae*. Aquesta família es defineix per estar formada per bacils gramnegatius aerobis i anaerobis facultatius, no esporulats, que creixen bé en medis usuals, són oxidasa negatius, redueixen els nitrats a nitrits i són mòbils mitjançant flagels perífrics o immòbils. Les característiques més importants del gènere *Escherichia* són: ADN amb coeficient guanina-citosina entre el 49-52%, fermentació de la glucosa amb producció de gas i sense producció d'acetoïna, no utilització del citrat de Simmons, no producció d'enzims extracel·lulars com lipases, proteases ni DNases, no producció d'SH₂, no hidrolització d'urea, no desaminació de triptòfan ni de fenilalanina, fermentació d'arabinosa, manosa, manitol i maltosa però no d'inositol. I finalment, centrant-nos en *Escherichia coli*, aquest microorganisme és un bacil gramnegatiu aerobi i anaerobi facultatiu amb una grandària d'entre 1-2 µ d'ample i 2-6 µ de llarg. Té l'estructura característica dels bacils gramnegatius, amb un citoplasma ple de ribosomes; el material genètic està constituït per ADN bicatenari, que forma una anella circular covalentment tancada que constitueix el cromosoma, del qual només hi ha una còpia. Aquest cromosoma està condensat formant el nucleoide. Les característiques bioquímiques per a la identificació d'aquesta espècie es descriuen en la Taula 2. Des del punt de vista antigènic en *E. coli* s'han descrit més de 150 serotips O, que inclouen més de 170 antígens O diferents, més de 100 antígens K diferents i més de 56 variants flagelars.

1.1.2. Factors de virulència en *E. coli* causant d'infecció urinària

La virulència s'entén com el grau de patogenicitat en un organisme, o en altres paraules com la capacitat relativa del patogen per a causar una malaltia.

Els factors de virulència (Taula 3) tenen propietats específiques que disminueixen la vulnerabilitat del patogen enfront les defenses de l'hoste ⁷.

Els gens que codifiquen aquests factors de virulència es localitzen en el cromosoma bacterià o en plasmidis. Alguns d'aquests factors són exclusivament cromosòmics (per exemple, *pap* i *hly*, que codifiquen les fimbries P i l'hemolisina, respectivament); o bé exclusiva o principalment es troben associats a plasmidis (per exemple *traT*, que confereix resistència al sèrum); o es troben en ambdues localitzacions (per exemple, *afra/dra*, que codifica les adhesines de la família Dr.) ¹⁰. Els factors de virulència es poden transmetre entre bacteris de forma vertical o horitzontal.

A nivell epidemiològic, els putatius factors urovirulents són identificats mitjançant la comparació de les propietats bacterianes entre soques d' *Escherichia coli*

d'interès aïllades en l'orina vs. soques d' *E. coli* fecals de persones sanes. Es poden identificar d'una forma més precisa les propietats virulentes d'*E. coli* predominants i "exclusives" de diverses patologies, mitjançant l'estudi de prevalença de diferents soques d'*E. coli* provinents de diferents tipus d'infecció urinària. Addicionalment, la comparació entre diferents poblacions d'hostes (homes vs. dones, embarassades vs. no embarassades, pacients sense factors de risc vs. amb factors de risc o amb anormalitats del tracte urinari, etc..) permet aclarir la interacció entre l'hoste i el paràsit relacionant els particulars factors de virulència. Els resultats combinats de diferents estudis epidemiològics poden reflectir millor la veritable prevalença dels factors de virulència entre aïllats urinàris associats amb un tipus d'infecció urinària

Taula 3. Resum d'una selecció de factors de virulència d'*Escherichia coli* uropatògena

Categoria funcional	Nom	Gen	Funció del factor de virulència	Referència
Adhesina	Fímbria P	<i>papAH</i>	Adhesina, relacionada amb l'adhesió a l'uroteli i la invasió, relacionada amb pielonefritis	8,9
	Adhesina de la família Dr	<i>afa/draBC</i>	Adhesina, associada amb cistitis i pielonefritis, invasió de l'uroteli.	9,10
	Fímbria S / Fímbria SF1	<i>sfa/focDE</i>	Adhesina, associada amb cistitis i pielonefritis	9,11
	Fímbria tipus 1	<i>fimH</i>	Adhesina, relacionada amb l'adhesió a l'uroteli i la invasió, paper important en la formació de biofilms	12-14
Toxines	Alpha-hemolisina	<i>hlyD</i>	Lisi cel·lular, modulació de les rutes de senyals de l'hoste, dany tissular, exfoliació de l'uroepiteli	7,15,16
	Factor citotòxic necrotitzant 1	<i>cnf1</i>	Reorganització del citoesquelet, modulació de les senyals de les rutes	17,18
Protectines	Càpsula polisacàrida del grup II	<i>kpsM ii</i>	Protecció enfront la fagocitosis, resistència enfront a l'activitat bactericida del sèrum	7,19
	Resistència al sèrum	<i>traT</i>	Proteïna de membrana externa, resistència a l'activitat bactericida del sèrum	7,20
Captador de ferro	Receptor sideròfor aerobactina	<i>iutA</i>	Captador de ferro	21,22
	Receptor sideròfor Yersinbactina	<i>fyuA</i>	Captador de ferro	21
Miscel·lània	Invasió de l'endoteli cerebral	<i>ibeA</i>	Meningitis neonatal, invasió de l'endoteli	20,23
	Marcador associat a l'illa de patogenicitat CFT073	<i>malX</i>	Codifica diferents factors de virulència, marcador de PAIs	20

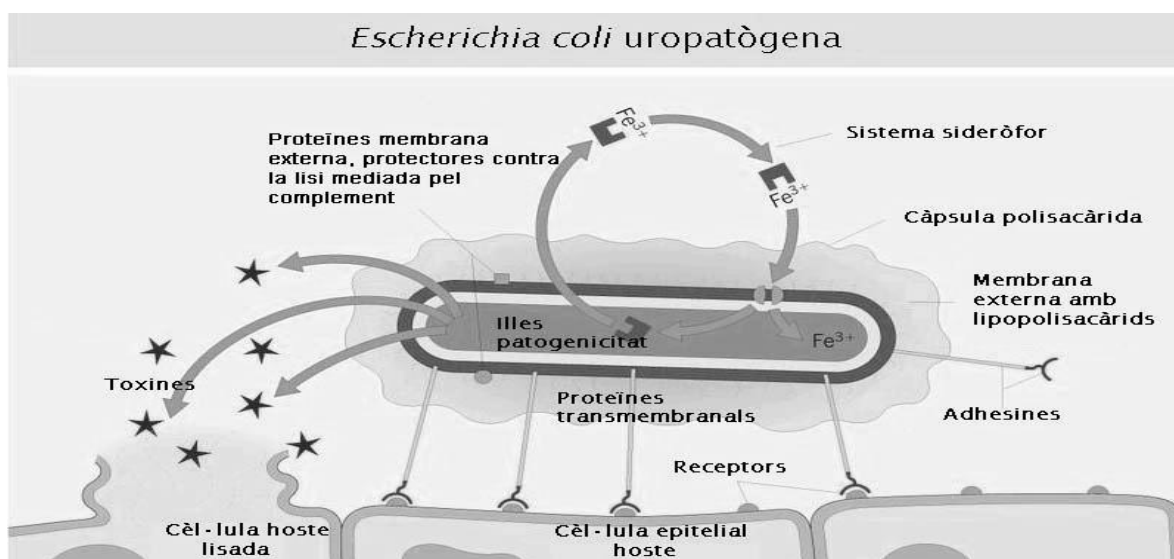
Els estudis epidemiològics humans poden identificar l'associació entre certes propietats bacterianes i la infecció urinària, però la valoració directe en la contribució de la virulència d'aquestes propietats requereix l'ús de models animals.

Finalment, els possibles mecanismes d'acció dels factors de virulència identificats a través d'estudis epidemiològics o en animals són comunament

determinants *in vitro* a nivell cel·lular o subcel·lular. Aquesta informació sovint té l'avantatge que una particular propietat juga un paper en la virulència i podria tenir diferents camins per interferint amb diferents funcions. Alguns dels factors de virulència d'*E. coli* són estructures discretes o productes (per exemple, fímbries, hemolisina...), que en el laboratori són de gran utilitat per clarificar el seu significat funcional. A diferència, altres factors de virulència són propietats funcionals (resistència al sèrum), en aquest cas el laboratori ha de determinar les estructures responsables o productes.

En *E. coli* causant d'infecció urinària intervenen com a factors de virulència: adhesines, toxines, síntesi de càpsula polisacàrida, resistència al sèrum i adquisició de ferro, entre d'altres (Figura 1). A continuació es descriuen els factors de virulència estudiats en el present treball.

Figura 1. Principals factors de virulència de les soques uropatògenes d' *Escherichia coli*



1.2. Adhesines

L'adherència microbiana és un primer pas essencial per a la colonització de les superfícies mucoses de l'hoste, i sovint precedeix a la infecció. Mitjançant l'adhesió a les estructures de l'hoste, els patògens poden evitar l'eliminació per part del flux normal dels teixits corporals, com la sang i l'orina.

Taula 4. Adhesines d'*Escherichia coli* uropatògena

GRUP	Tipus d'adhesina	Sinònim	Presència de fímbria	Receptor	Paper en l'ITU ^a
I	Manosa resistent ^b				
	A. P-relacionades	Gal-Gal; G-adhesines; GS			
	P (clàssica)	Gal-Gal; Pap; adhesines G classe I i II	+	Gal(α1-4)Gal Antígens grup sanguini P	+++ (especialment pielonefritis)
	F	Prs; Pap-2; ONAP; adhesina G classe III	+	Moltes estructures que contenen Gal(α1-4)Gal (ex. antigen Forssman, globo-A, SSEA-4, etc.)	++ (especialment cistitis)
	B. no-P ("X")				
	Família Dr				
	Dr	O75-X	-	Antigen grup sanguini Dr (DAF) ^c ; col·lagen tipus IV	++ (especialment cistitis)
	AFA I, AFA III		-	Antigen grup sanguini Dr (DAF) ^c	++
	S		+	Glicòsid sialil	+
	M		-	Antigen grup sanguini M	?
G		+	GlcNAc	?	
NFA-1 fins NFA-6		-	Antigen grup sanguini N (NFA-3); antigen grup sanguini M (NFA-4); altres desconeguts	?	
II	Manosa sensible ^d				
Fímbria tipus 1	Pili comú	+	Manòsids, +/- components hidrofòbics	?	
III	Altres ^e				
F1C	Pseudo tipus 1	+	N-acetil-lactosamina, àcid siàlic	?	

^a ITU, infecció tracte urinari; escala de + a +++, en ordre d'importància creixent en l'ITU humana, basat en models estudiats animals i humans. ^b Aglutinació manosa resistent a eritròcits humans. ^c Anàlegs a cloramfenicol i tirosina que inhibeixen l'adherència mediada per l'hemaglutinina Dr ("O75-X"), però no per AFA-I o AFA-III. DAF, *decay factor accelerating* ^d Aglutinació manosa sensible en eritròcits de cobais. ^e No hemaglutinen; s'han de considerar adhesines manosa resistent no-P ("X").

S'han identificat dos tipus d'adhesines (Taula 4): aquelles que aglutinen eritròcits en presència de manosa, anomenades Adhesines Manosa Sensible (MSHA), essent la fímbria tipus 1 la representant d'aquest grup, i aquelles adhesines que no aglutinen eritròcits en presència de manosa, anomenades Adhesines Manosa Resistent (MRHA), on es troben diferents tipus d'adhesines, en funció del receptor que reconeixen. En el present treball s'estudien la fimbries P, la fímbria S i la fímbria M. També s'inclou la Fímbria F1C, que es troba en el Grup III, tot i que es podia incloure dins del grup de "manosa resistent no-P"; a més, comparteix una regió consens amb la fímbria S.

1.2.1. Fímbria tipus 1

La fímbria tipus 1 d'*E. coli* és una estructura semblant a un cabell i es caracteritza per la seva capacitat d'unir-se als residus que contenen D-manosa. Va ser la primera fímbria descrita en bacteris i, ha estat la més estudiada. Té la capacitat d'unir-se a un gran ventall de cèl·lules, degut a l'afinitat per la D-manosa, el sucre més universal que compona les superfícies de les cèl·lules eucariotes. L'habilitat de les

fímbríes tipus 1 de reconèixer i unir-se a diferents cèl·lules mucoses i a cèl·lules inflammatòries és essencial per iniciar la infecció bacteriana en els animals.

Receptors

Els receptors de les fímbríes tipus 1 es troben presents en els eritròcits de moltes espècies. En les vies urinàries, el principal receptor és la proteïna Tamm-Horsfall ²⁴, principalment cèl·lules epitelials renals, que actuaria com a un mecanisme de defensa inespecífic unint-se la fímbrí tipus 1 d'*E. coli* de forma específica i evitaria que s'unissin els altres dos receptors que es troben en les vies urinàries (uroplaquina Ia i Ib), afavorint la seva eliminació amb l'orina.

Estructura i genètica

Una soca d'*E. coli* fimbriada expressa de 100 a 300 filaments fimbrials tipus 1, cadascun amb una amplada de 7 nm i una longitud de 0,2 a 2 µm. Un filament consta de centenars de còpies de la subunitat FimA polimertitzades helicoidalment, formant el nucli de la fímbrí tipus 1, a l'extrem distal de la fímbrí tipus 1 es localitza la molècula d'adhesina FimH. FimC i FimD ancoren el filament format per subunitats FimA a la membrana externa.

Els 8 gens estan involucrats en la biosíntesi, expressió i funció de la fímbrí tipus 1 heteropolimèrica d'*E. coli*, es troben formant un clúster (de tamany 9.5 kbp) en la posició 98 minuts del cromosoma d'*E. coli* (Figura 2).

Figura 2. Organització genètica de l'operó que codifica per a la fímbrí tipus 1 d'*Escherichia coli*.

<i>fimB</i>	<i>fimE</i>	<i>fimA</i>	<i>fimC</i>	<i>fimD</i>	<i>fimF</i>	<i>fimG</i>	<i>fimH</i>
Gens reguladors		Subunitat estructural	Assemblatge i ancoratge de la fímbrí			Molècula d'adhesina	

D'aquestes, com a mínim 4 codifiquen per a les subunitats que constitueixen el filament fimbrial. El gen *fimA* codifica el nucli del filament, la inactivació del qual dóna com a resultat la pèrdua de la fímbrí. Els mutants *fimA*⁻ expressen una petita estructura fibrilar a la superfície, que és el resultat del producte de 2 gens, *fimH* i *fimG*, localitzats a l'extrem distal del final del grup de gens *fim*. La inactivació de *fimH* dóna com a resultat una fímbrí sense capacitat per mediar la unió a la manosa. *fimG* és transcrit conjuntament amb *fimH*. El producte del gen *fimG* és un adaptador que permet que la proteïna FimH presenti una conformació funcionalment competent

en la fímbria i pugui unir-se correctament als receptors. La inactivació de *fimG* redueix la unió de la fímbria al seu receptor.

El gen *fimF* codifica per a una proteïna que regula la longitud de la fímbria la seva inactivació dóna com a resultat la formació d'una fímbria tipus 1 extraordinàriament llarga.

Les soques d'*E. coli* d'origen clínic només presenten una còpia de l'operó *fim*.

Els altres gens codifiquen per proteïnes relacionades amb la translocació i assemblatge de les subunitats fimbrials i en la regulació de l'expressió de la fímbria.

Els gens, *fimC* i *fimD*, jugen un paper important en la translocació i/o assemblatge de la fímbria. La pèrdua d'un dels dos gens dóna com a resultat la no formació de la fímbria tipus 1. El gen *fimC* codifica per una proteïna de 23kDa localitzada en el periplasma bacterià, la seva inactivació dóna com a resultat una ràpida degradació proteolítica de la subunitat major i menor de la fímbria en l'espai periplasmàtic. FimC és una xaperona que s'uneix a les subunitats sintetitzades quan entren en el periplasma des de la membrana interna. Les funcions d'aquesta xaperona són protegir les subunitats fimbrials dels enzims periplasmàtics, i mantenir les proteïnes naixents en una conformació competent pel seu assemblatge en la membrana externa. El producte del gen *fimD* és una proteïna de membrana externa de 88 kDa que forma la base a partir de la qual els filaments fimbrials seran formats.

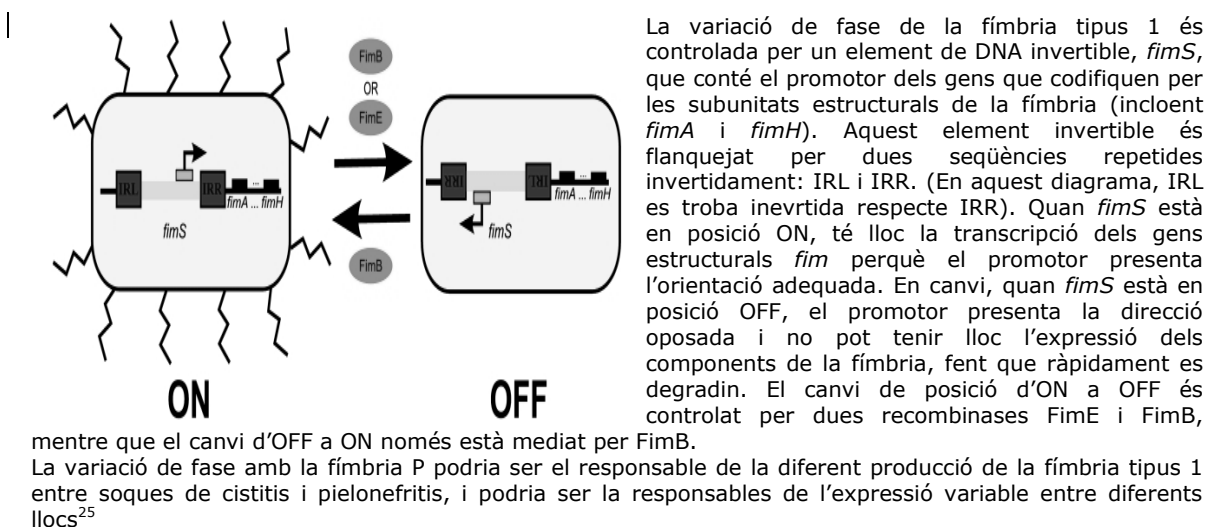
Els dos gens reguladors, *fimB* i *fimE*, codifiquen proteïnes semblants a histones que dirigeixen l'expressió fase-depenent del gen *fimA*, determinant si la fímbria és expressada o no en la superfície. El mecanisme de variació de fase inclou la inversió d'un segment d'ADN de 314 pb que conté el promotor del gen *fimA*. D'aquesta manera *fimA* s'expressa en l'orientació *on*, però no en l'orientació *off*. Aquest fenomen és un procés independent de *RecA* i necessita la funció de FimB per fer un canvi d'orientació tant en *on-off* com *off-on*. En canvi FimE només regula el canvi d'orientació d'*on* a *off*. Addicionalment als efectes moduladors de FimB i FimE, la variació de fase també es troba afectada per tres reguladors globals: Lrp (*leucine-responsive regulatory protein*), IHF (*integration host-factor*), i H-NS (*histone-like protein*).

Tot i que la fímbria tipus 1 és clarament important en l'adhesió a l'uroepiteli, altres factors de virulència són necessaris per a la subseqüent invasió de les cèl·lules epitelials i produir la infecció. L'expressió de la fímbria tipus 1 és co-regulada amb l'expressió de la fímbria P, la qual està associada amb la infecció urinària i pielonefritis. El bacteri és capaç d'activar o inactivar la producció d'un determinat factor de virulència, en funció de l'ambient i les necessitats bacterianes per a crear diferents fenotips²¹ (Figura 3). L'expressió del cluster del gen *fim* és controlat per *fimS*^{26,27} i, és co-regulat amb l'expressió de la fímbria P, on cada bacteri expressa una

fímbria o una altre en un moment determinat. *papB* (proteïna reguladora de la fímbria P) inhibeix l'activitat de *fimB* i incrementa l'activitat de *fimE*, els quals treballen junts per inhibir l'expressió de la fímbria tipus 1 ²⁷. La variació de fase permet l'expressió de la fímbria tipus 1 en diferents localitzacions anatòmiques.

S'han identificats diferents variacions al·lèliques del gen *fimH*, amb almenys tres fenotips amb una capacitat d'unió als receptors lleugerament diferent ^{28,29}. Encara que les fímbries tipus 1 es troben entre la majoria de soques d'origen comensal i soques patògenes, poden existir variacions al·lèliques entre aquests dos grups.

Figura 3. Variació de fase en l'expressió de la fímbria tipus 1 d'*Escherichia coli*.



Mentre que les fímbries tipus 1 tenen un paper important durant la colonització del tracte urinari, el seu paper en la colonització del tracte gastrointestinal és incert ²⁹⁻³¹. Aquestes fímbries es troben amb freqüència entre flora fecal i són importants perquè *E. coli* pugui dur a terme la colonització del tracte gastrointestinal ³².

FimH també és capaç d'adherir-se a diferents tipus de cèl·lules com ara eritròcits i macròfags ³³. Aquestes fímbries estimulen l'adhesió als fagòcits i la seva subseqüent fagocitosis ⁷; les soques amb fímbries tipus 1, un cop fagocitades poden viure dins la vacuola quan són opsonitzades ³⁴. Aquesta capacitat ajuda al bacteri a evadir les defenses de l'hoste i persistir en l'hoste per causar posteriorment la malaltia.

Epidemiologia

Les soques d'*E. coli* amb fímbries tipus 1 es troben en proporcions similars entre pacients amb infecció urinària i les aïllades en la femta de persones sanes, de fet

la fímbria tipus 1 és present en la majoria de membres de la família *Enterobacteriaceae*. En canvi, les soques d'*E. coli* que únicament expressen fimbries tipus 1 es troben associades a la producció de cistitis i bacteriúria asimptomàtica. Per tant, la fímbria tipus 1 jugaria un paper important en la colonització i infecció de la bufeta. La fímbria tipus 1 també contribueix a la persistència del bacteri en pacients cateteritzats.

1.2.2. Fimbries P

Receptors

L'adherència de les soques uropatògenes dotades de fimbries P a les cèl·lules epitelials humanes és deguda al reconeixement de receptors situats a les cèl·lules hostes que contenen Gal(α 1-4)Gal. (Taula 5) Les fimbries purificades aglutinen eritròcits i s'adhereixen a les cèl·lules epitelials dels fenotips humans P₁, P₂, i P^K. Els antigens P del grup sanguini són una família d'oligosacàrids que contenen Gal(α 1-4)Gal en posició interna o terminal, i es troben presents en algunes cèl·lules principalment de mamífers, com un component carbohidrat de glicosfingolípids (Taula 6). Concretament, es troben a les cèl·lules epitelials de la vagina, urèter, uretra, pelvis renal, túbul proximal i túbul col·lector^{35,36}, el que facilita l'ascens d'*E. coli* amb fimbries P fins el parènquima renal. L'antigen P₁ també es troba present en glicoproteïnes humanes.

Taula 5. Antigens P del grup sanguini i fenotips

Fenotip grup sanguini P	Antígens en els eritròcits	Freqüència en la població
P ₁	P ₁ , P (P ^K)	75 %
P ₂	P (P ^K)	25 %
P ^K ₁	P ₁ , P ^K	Estrany
P ^K ₂	P ^K	Estrany
p	Cap	Estrany

La majoria soques d' *E. coli* residents en adults sans contenen la fímbria P³⁰. La unió de la fímbria P al receptor desencadena l'alliberament de la ceramida, que actua com un agonista Toll - like receptor 4, activant la resposta immune cel·lular³⁷. L'activació de les cèl·lules epitelials condueix a la producció de citocines i quimiocines, com ara l'interleucina (IL) -6 , IL - 8 i neutròfils³⁸. Això a la vegada, desencadena una inflamació local i dolor associat amb la infecció del tracte urinari³⁸. Les soques causants d'infecció urinària asimptomàtica expressen menys fímbria P que les causants de cistitis i pielonefritis³⁹.

Taula 6. Estructures i nomenclatures dels oligosacàrids que contenen Gal(α 1-4)Gal

Antigen	Estructura de l'oligosacàrid	Nom	Símbol
P ^K	Gal(α 1-4)Gal(β 1-4)Glc-	Globotriosa	GbOse ₃ (Gb ₃)
P	GalNac(β 1-3)Gal(α 1-4)Gal(β 1-4)Glc-	Globotetraosa	GbOse ₄ (Gb ₄)
P ₁	Gal(α 1-4)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc-	Globòsid	
Forssman	GalNac(β 1-3)GalNac(β 1-3)Gal(α 1-4)Gal(β 1-4)Glc-		

Estructura i genètica

La fímbria P està formada aproximadament per 10^3 subunitats polimeritzades helicoidalment, amb una subunitat major (PapA) formant el nucli de la fímbria. Les tres subunitats petites (PapE, PapF i PapG) es troben en menys quantitat i es localitzen en l'extrem de la fímbria. Aquestes proteïnes fimbrials, i també les proteïnes accessòries, són codificades per un gen multicistronnic cromosomal anomenat *pap* (Figura 4). Altres designacions alternatives, com *fso* i *fst*, s'utilitzen per a diferents variants de les fimbries P.

Figura 4. Organització genètica de l'operó *pap* d'*Escherichia coli*

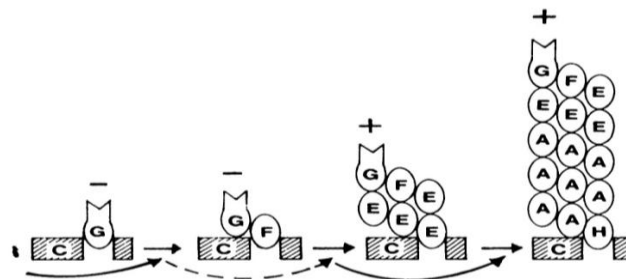
<i>papI</i>	<i>papB</i>	<i>papA</i>	<i>papH</i>	<i>papC</i>	<i>papD</i>	<i>papE</i>	<i>papF</i>	<i>papG</i>
Regulació		Subunitat major	Finalitzador	Formació base d'anclatge	Transportador	Subunitats petites		Adhesina

PapA, és la subunitat major, necessària per a la formació de la fímbria P, però no per a la seva adherència als receptors Gal-Gal. La formació de la fímbria P comença amb l'assemblatge de l'expressió mínima de l'adhesina (PapG-PapF): PapG surt a la superfície amb l'ajuda de PapC, seguit de les subunitats PapF, ambdues s'uniran per l'acció de PapE. Finalment, s'incorpora PapA com a nucli central d'ancoratge de la fímbria P, a la superfície cel·lular del bacteri i exten la fímbria P per travessar els lipopolisacàrids (Figura 5). En absència de PapA, el complex d'adhesina (PapF-PapG) es pot expressar a la superfície cel·lular. Les soques que no tenen lipopolisacàrid s'anomenen soques rugoses, aquestes soques rugoses amb *papA*⁻ no són fimbriades però poden adherir-se als receptors Gal-Gal, en canvi les soques amb lipopolisacàrids a la seva superfície (soques llises) no poden adherir-s'hi perquè el complex d'adhesina (PapF-PapG) queda amagat per el lipopolisacàrid. Per tant, l'extensió de les adhesines a la superfície cel·lular és important per a l'adherència quan hi ha present el lipopolisacàrid.

papEFG⁻ formen un fímbria aparentment normal, però sense l'adherència específica al receptor. PapF-PapG constitueixen la mínima expressió de l'adhesina, i es troben unides per PapE. PapG és la molècula d'adhesina responsable de l'especificitat d'unió a Gal-Gal. Hi ha tres variants de PapG, cadascun amb una capacitat d'unió

lleugerament diferents , aquests són PapG al·lel I, al·lel II ,i al·lel III ^{40,41}. La prevalença de l' al·lel I és escàs en les soques aïllades en mostres d'origen humà ⁴¹, mentre que els altres al·lells són habituals en els aïllats uropatògens ⁴². PapG al·lel II s'uneix a receptors localitzats en el ronyó humà ⁸ i, s'associa amb la pielonefritis aguda . La cistitis s'associa amb l'al·lel III de PapG, aquesta associació únicament a cistitis i no pas a pielonefritis o bacterièmia pot indicar que aquesta variant PapG no és suficient per a la invasió de la circulació sanguínia en hostes sense factor⁴¹. En l'estudi realitzat per Otto *et al* ⁴³, PapG al·lel II es va associar amb dones sanes de totes les edats, en canvi PapG al·lel III va ser més comú en els homes, encara que aquest estudi tenia una petita grandària de la mostra per a l'home amb infecció urinària. Durant la bacterièmia, PapG al·lel II ha demostrat que s'associa amb *E. coli* urosepsis, i l'al·lel III s'associa a persones amb factors afavoridors de la infecció, com ara en persones amb immunosupressió o anormalitats del tracte urinari ⁴¹. A més, PapG al·lel II ha estat identificat com la variant predominant en *E. coli* causant de bacterièmia ⁴¹.

Figura 5. Model d'estructura i assemblatge de la fímbria P.⁷



Els quatre estats successius d'assemblatge es troben d'esquerra a dreta.
 +, estructura que es pot unir al receptor
 -, estructura incapaç d'unir-se al receptor
 A, PapA; C, PapC; E, PapE; F, PapF; G, PapG.

PapF és molt important per a l'inici de la polimerització, ajudant a establir i a ancorar les següents subunitats.

PapD es troba present en l'espai periplasmàtic i forma un complex amb les subunitats fimbrials, estabilitzant-les durant la translocació des del periplasma fins a la membrana externa. PapC ajuda en el transport de les subunitats fora de la cèl·lula, i en l'assemblatge de la fímbria. PapH finalitza la polimerització de la fímbria i, ajuda a ancorar-la.

Regulació de l'expressió

L'expressió de la fímbria P es regula mitjançant una variació de fase influenciada per l'atzar i les condicions ambientals. *E. coli* pot expressar únicament

fímbries P, altres fímbries, o cap, en funció de les variacions ambientals. Amb poques excepcions, l'expressió de les fímbries P es troba afavorida en condicions de creixement a 37°C i en plaques d'agar, i s'inhibeix a 18 a 22°C i en brou. L'expressió de la fímbria P dependent de la temperatura es regula a nivell transcripcional mitjançant el determinant *papB*.

Les fímbries tipus 1 són importants per a la infecció inicial en les vies baixes del tracte urinari, les fímbries P estan involucrades en la colonització de la infecció urinària superior ^{26,31,44}. A més, les fímbries tipus 1 i les fímbries P estan inversament regulades, així doncs la soca d' *E. coli* expressa només un tipus de fímbria de foma seqüencial ²⁶. La regulació dels gens sembla estar relacionada amb la patogènesi, la qual permet una colonització seqüencial de diferents teixits del tracte urinari ⁴⁴. Per tant, totes dues fímbries exerceixen un paper important en la supervivència i la patogènesi de les soques UPEC, en primer lloc en la colonització del tracte gastrointestinal, i després en la invasió del tracte urinari ^{31,32}.

Epidemiologia

La presència de fímbria P és més comú en soques d' *E. coli* que pertanyen als grups filogenètics B2 i D, i es troben entre les soques causant d'infecció del tracte urinari ⁴⁵.

La possessió de fímbries P és superior en soques d'*E. coli* productores de pielonefritis (70%) respecte a les productores de bacteriúria asimptomàtica (24%), les productores de cistitis (36%) i les soques que formen part de la flora fecal (19%) ⁷. El percentatge de soques d'*E. coli* amb fímbries P productores de sèpsia urinària (71%) és superior que aquelles productores de sèpsia d'altres orígens (28%). Aquests resultats suggereixen que les fímbries P d'*E. coli* són claus en la patogènesi de les infeccions urinàries de les vies altes, a més contribueixen a la colonització i invasió de les vies altes del tracte urinari degut a la presència de receptors per aquestes.

Entre la flora fecal de persones sanes existeix un dipòsit de soques d' *E. coli* ExPEC, les quals deriven dels grups filogenètics B2 i D, amb una elevada capacitat de sobreviure i persistir en l'intestí humà ⁴⁶, i pot estendre's per causar la malaltia ⁴⁷. Curiosament, s'ha suggerit que l'expressió de la fímbria P millora la colonització en el tracte gastrointestinal ^{30,32,44}. Wold *et al.* ⁴⁶ van analitzar la prevalença de soques d' *E. coli* amb fímbries P entre la flora intestinal comensal d'individus sans, i la majoria presentaven fímbria P. Basant-se en aquests resultats, s'ha suggerit que la fímbria P ha evolucionat en soques d' *E. coli* per promoure la seva persistència a l'intestí adherint-se als receptors de les cèl·lules epitelials intestinals ^{32,48}. També han trobat que les fímbries tipus 1 s'uneixen a les cèl·lules del còlon, però, la fímbria P només

s'uneix a la substància associada lliurement i no les cèl·lules del colon ⁴⁸. Les cèl·lules epitelials de l'intestí gros amb els receptors de Gal-Gal pot proporcionar un nínxol per als bacteris que contenen adherències i per establir la colonització a l'intestí ⁴⁸. La unió de les soques d'*E. coli* amb els receptor Gal-Gal és forta, molt més que en les cèl·lules epitelials del colon, i aquesta unió persisteix tot i després d'una repetició de rentats, el que indica que la fímbria P esta ben adaptada per a l'adherència al tracte urinari. El predomini d'aquestes soques en el tracte gastrointestinal, i la presència de factors de virulència associats a la infecció urinària, suggereix que les soques d' *E. coli* del colon, que són persistents en el tracte gastrointestinal, tenen mecanismes associats amb la infecció del tracte urinari que poden estar involucrats en la colonització primerenca de la uretra ^{30,32,45,46}.

Associació amb altres factors de virulència

Les soques d'*E. coli* amb fimbries P, poden presentar dues o tres còpies de l'operó *pap*, o bé còpies parcials en soques d'*E. coli*, el determinant de la fímbria P amb freqüència es troba juntament amb el determinant de l'hemolisina.

1.2.3. Família Dr ⁴⁹

La Família d'adhesines Dr, inclou l'adhesina O75X (darrerament anomenada Hemaglutinina Dr) i les adhesines no fimbriades AFAI i AFAIII. El receptor de totes elles són diferents epítops de l'antigen Dr, i la diferència entre l'Hemaglutinina Dr i les Adhesines no fimbriades és que les primeres són inhibides en presència de cloranfenicol, per tant reconeixen un epítop de l'antigen Dr que té una estructura similar al cloranfenicol⁵⁰.

Receptors

Les adhesines de la Família Dr s'uneixen a l'antigen Dr present en el DAF (*decay-accelerating factor*), una proteïna de membrana que ajuda a regular la cascada del complement i protegeix als eritròcits de la lisi mediada pel complement, concretament en SCR3 (*short consensus repeat 3*) del DAF⁵¹.

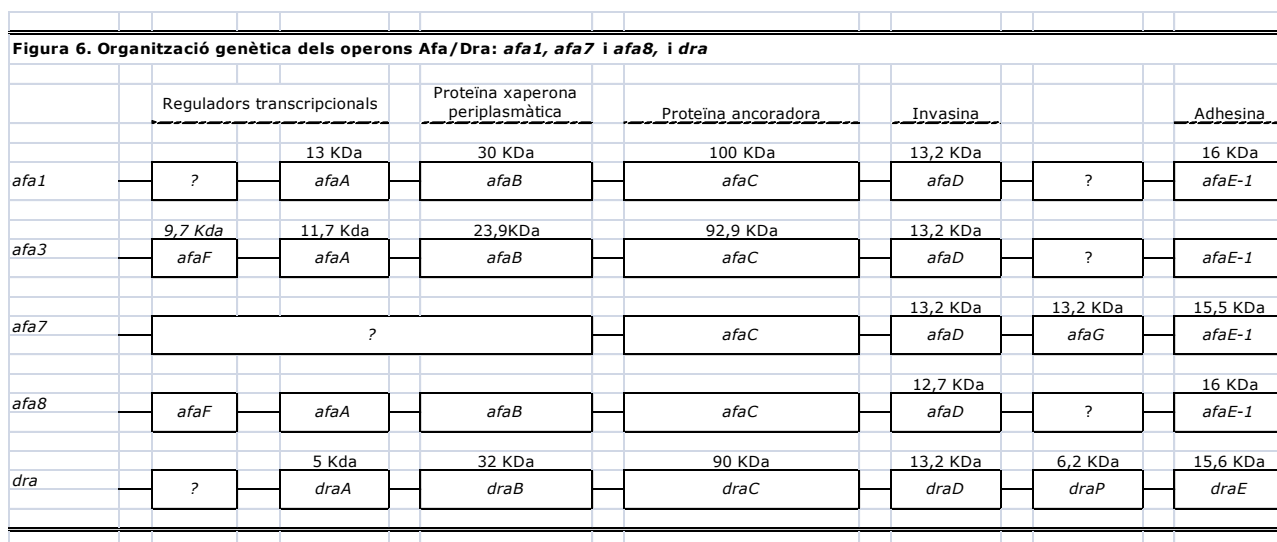
El receptor Dr es troba en diferents teixits humans, incloent diferents parts del tracte urinari. Aquests receptors faciliten l'ascens del tracte urinari perquè tingui lloc la colonització i, posteriorment, la infecció. En el cas de l'Hemaglutinina Dr els receptors localitzats en el tracte urinari es troben en l'interstici renal, càpsula de Bowman, membrana basal tubular, cèl·lules de l'epiteli uretral transicional, i a les cèl·lules epitelials exfoliades de l'orina.

L'hemaglutinina Dr és l'únic membre de la Família Dr que s'uneix a un altre receptor, el domini 7s del col·lagen tipus IV⁵².

Genètica

Els gens que codifiquen les diferents adhesines de la família Dr es troben organitzats de forma similar; un operó format per a cinc gens com a mínim, incloent el que codifica per a l'adhesina. Algunes soques tenen múltiples còpies d'un gen Dr, encara que una única còpia és el més comú.

Dels cinc gens que codifiquen l'Hemaglutinina Dr, quatre *draA*, *draC*, *draD*, i *draE*⁵³ són necessaris per a l'expressió del fenotip MRHA (adhesina manosa resistent). El gen *draA* codifica per a un polipèptid de 5 kDa, la seva pèrdua fa que no s'expressi ni tampoc pugui adherir-se al receptor, a diferència del gen *papA* en les fímbries P, que tot i perdre'l poden adherir-se. Els gens *draA*, *draD*, i *draE* estan relacionats amb l'exportació i assemblatge de la fimbria. L'organització dels gens de les adhesines afimbriades (AFA-I) és similar al clúster *dra*. Els productes dels gens *afaB*, *afaC* i *afaE* són necessaris per a l'expressió del fenotip manosa-resistent, codifiquen la xaperona perioplasmàtica, una proteïna ancorada a la membrana externa i l'adhesina, respectivament^{54,55} (Figura 6).



Epidemiologia

A diferència de les fímbries P, l'Hemaglutinin Dr es troba associada en soques d'*E. coli* productores de cistitis (entre el 26 i el 50%) respecte de pielonefritis (entre el 6 i el 26%), de bacteriúria asimptomàtica (6%) o respecte soques d'*E. coli* fecals (entre el 15 i el 18%). Si es comptabilitzen totes les adhesines de la família Dr, aquests

percentatges incrementen, fins un 78% en *E. coli* productors de cistitis, un 46% en pielonefritis, i un 75% en soques fecals. La contribució i el paper en la infecció de cada adhesina de la família Dr es desconeix, encara que la variant AFA-I és poc freqüent en soques d'*E. coli* aïllades de pacients amb infecció urinària⁷.

1.2.4. Fímbria S i Fímbria F1C

La Família d'adhesines fimbriades S es compon per:

- Fímbria S (Sfa), amb els subtipus SfaI i SfaII, aïllats en dues soques d'*E. coli* productores d'infecció urinària i meningitis, respectivament.
- Fímbria F1C (Foc)
- Fímbries S-F1C relacionades (Sfr)
- Fímbria AC/I (Fac)⁵⁵

Totes aquestes adhesines són molt similars en quant a l'organització dels determinants i la seqüència que codifica per les proteïnes, en canvi difereixen en el receptor i en l'especificitat pels teixits.

Receptors

Les fímbries S s'uneixen als residus de α -àcid siàlic-(2-3)- β -D-galactosa situats a la paret cel·lular de les cèl·lules eucariotes⁵⁶. En el cas de les vies urinàries s'uneixen a les cèl·lules epitelials del túbul distal i proximal, conductes col·lectors i al glomèrul. En canvi les fímbries F1C s'uneixen a la galactosilceramida present en tots els teixits del tracte urinari, excepte l'uretra, i també s'uneix a globotriaosilceramida present en el teixit renal⁵⁷.

Genètica

Els determinants genètics *sfa* i *foc*, que codifiquen per la fímbria S i la fímbria F1C, respectivament, presenten similituds en la composició de la seqüència d'ADN i presenten epítops comuns en les proteïnes fimbrials⁵⁸(Figura 7).

Figura 7. Organització genètica dels operons *sfa* i *foc*.

<i>sfaI, sfaII</i>	A	D	E	F	G	S	H
<i>foc</i>	A	I	C	D	F	G	H
	Subunitat major				Subunitats menors		

Epidemiologia

La fímbria S és un dels principals factors microbians en la patogènia de la meningitis neonatal⁵⁹. L'expressió de la fímbria S incrementa la unió d'*E. coli* a les cèl·lules microvasculars endotelials encefàliques, però aquesta unió no es relaciona amb la invasió de les cèl·lules encefàliques.

El paper de la fímbria F1C en la infecció urinària seria la de mantenir a *E. coli* adherit als teixits de les vies urinàries perquè la infecció pugui establir-se, també induiria la producció d'interleuquina-8, produint inflamació en la mucosa⁶⁰.

1.3. Toxines

L'ambient de la bufeta es troba limitat en nutrients, de manera que per tal de sobreviure i créixer en el tracte urinari, els uropatògens produeixen proteases i toxines que danyen els teixits de l'hoste i així s'alliberen els nutrients, i també proporcionen un nínxol per a la invasió i disseminació bacteriana.

1.3.1. Hemolisina⁶¹

L'hemolisina es produïda per un gran ventall de bacteris, en la majoria dels casos, epidemiològic i experimentalment relacionats amb la patogènia d'algunes infeccions.

La proteïna citolítica tòxica secretada per les soques d'*E. coli* hemolítiques es coneix com a alpha-hemolisina. Encara que també s'ha descrit la beta-hemolisina que es troba unida a la cèl·lula bacteriana⁶² i, altres hemolisines secretades diferents de l'alpha-hemolisina, la prevalença en clínica d'aquestes es desconeix⁶³.

Mecanisme d'α-hemolisina

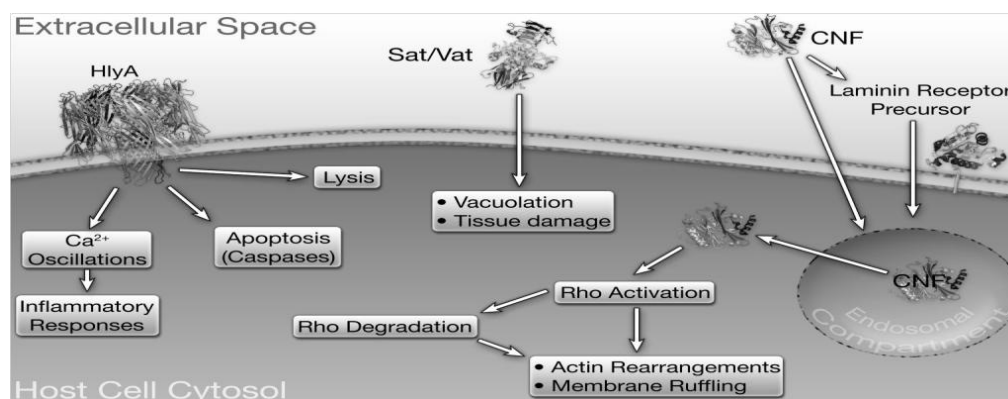
L'alpha-hemolisina lisa als eritròcits de moltes espècies diferents. Per fer-ho requereix calci que permet la modificació dels agregats d'hemolisina fent-la més competent hemolíticament, tot i que en absència de calci també produeix hemòlisi.

Les molècules d'hemolisina s'insereixen als components lipídics de la membrana produint un canal selectiu de cations de 2 nm de diàmetre, que incrementa la permeabilitat de les membranes dels eritròcits al Ca^{2+} , K^+ , manitol i sucrosa.

A part de lisar els eritròcits, l'hemolisina es comporta com una toxina per a les cèl·lules hostes ja que contribueix a la inflamació, al dany tissular, i la disrupció de les funcions fagocítiques⁶⁴. Amb la lisi dels eritròcits també s'allibera ferro, que pot ser utilitzat per el bacteri mitjançant el sistema dels sideròfors; per aquest motiu la

producció d'hemolisina sovint es troba regulada per la capacitat de captar ferro. L'exposició dels leucòcits polimorfonucleats humans a l'hemolisina estimula la quimioluminescència, la degranulació, i incrementa els nivells de leucotriens i d'ATP; causant una marcada alteració morfològica; i perjudica la quimiotaxis i la fagocitosis. L'efecte citotòxic de les soques hemolítiques d'*E. coli* està directament relacionat amb la quantitat d'hemolisina produïda. Els monòcits i granulòcits són molt sensibles a la citotoxicitat de l'hemolisina, mentre que els limfòcits són relativament resistents^{65,66}. La producció d'hemolisina es relaciona estretament amb la toxicitat als leucòcits polimorfonucleats humans. L'hemolisina estimula l'alliberament de l'anió superòxid i el peròxid d'hidrogen degut a un consum d'oxigen per part de les cèl·lules renals tubulars, i també a l'alliberament de l'histamina dels mastòcits i basòfils. L'hemolisina també desencadena una exfoliació, exposant les capes més profundes de l'uroepiteli permeten així la colonització bacteriana i la promoció de la propagació a altres llocs de l'hoste després de l'expulsió de cèl·lules en l'orina^{13,67-69}.

Figura 8. Toxines associades a *Escherichia coli* uropatògena: α -hemolisina (HlyA) i factor citotòxic necrotitzant 1 (CNF1).



A elevades concentracions, HlyA s'insereix en la membrana de la cèl·lula hoste i promou la seva lisi, mentre que a concentracions sublítiques HlyA pot modular una cascada de senyals afectant a la supervivència de la cèl·lula hoste i desencadenant una resposta inflamatòria. L'endocitosis de CNF1 té lloc mitjançant el receptor precursor de laminina, o mitjançant la formació d'un endosoma. Aquest últim activa la Rho GTPases induint la seva degradació³¹

Estructura i genètica

A diferència d'altres toxines, el gen *hlyA* s'expressa sense l'escissió de pèptids o lisi cel·lular⁷⁰. L'hemolisina és més activa durant la fase logarítmica de creixement, però l'activitat disminueix quan el bacteri arriba a la fase estacionària, tot i que continua la producció cel·lular. Aquesta disminució es deu principalment als efectes tòxics d'una producció excessiva per part d'*E. coli*⁷⁰. La producció d'hemolisina s'incrementa quan la concentració de ferro és baixa, i disminueix a mesura que les concentracions de ferro augmenten⁷¹. La producció d'hemolisina està codificada per

l'operó *hly* format per quatre gens (Figura 9). En soques d'*E. coli* aïllades en humans, l'operó *hly* es localitza en el cromosoma, i en soques d'*E. coli* d'origen animal la localització és plasmídica. Els determinants d'hemolisina localitzats al cromosoma o al plasmidi presenten diferències en les seqüències flanquejants, les seqüències reguladores i en la seqüència que codifica per a la subunitat estructural de la proteïna (HlyA).

L'operó *hly* es transcriu a partir d'un promotor en l'extrem 5' de *hlyC*, en el següent ordre *hlyCABD*. Diferents soques hemolítiques tenen diferents seqüències reguladores en aquesta regió, produint i secretant diferents quantitats d'hemolisina. Una producció excessiva d'hemolisina és letal per a les soques d'*E. coli*. La transcripció de l'operó *hly* sovint acaba prematurament donant lloc a transcrits de diferents tamanys a partir del mateix promotor.

Figura 9. Estructura del determinant de l'alpha-hemolisina en *E. coli*



La proteïna HlyA té 110 kDa i és única entre les toxines d'*E. coli*. És secretada a través de les dues membranes sense lisi cel·lular i sense el tallament d'un pèptid senyal. Per unir-se als eritròcits i tenir activitat hemolítica, HlyA s'ha d'activar abans de la seva secreció amb la proteïna intracel·lular HlyC. L'activació d'HlyA per HlyC necessita la presència de moltes seqüències repetides presents en l'extrem C-terminal de l'HlyA.

Secreció

El primer pas per a la secreció de l'hemolisina és un procés energia dependent on es troba involucrada la proteïna HlyB, mentre que l'alliberament cap a la membrana externa és un procés passiu i requereix de la proteïna HlyD. En els mutants *hlyB*, HlyA es queda en l'espai periplasmàtic, i dóna com a resultat un fenotip no hemolític, mentre que els mutants *hlyD* acumulen l'hemolisina a l'interior de la cèl·lula, donant lloc a petites zones clares en les plaques d'agar sang, encara que no allibera l'hemolisina en els sobrenedant dels cultius.

Regulació i expressió

En algunes soques, la producció d'hemolisina es suprimeix en condicions d'elevada concentració de ferro i s'incrementa en condicions de poca concentració de ferro.

Epidemiologia

L'hemolisina és present en soques d'*E. coli* associades amb les infeccions urinàries superiors com ara pielonefritis, i és més comú entre les soques invasives que en soques aïllades en pacients sans⁷. Aproximadament un 12% d'*E. coli* d'origen fecal produeixen hemolisina⁷². Les soques productores d'hemolisina són més freqüents entre els hosts sense factors afavoridors de la infecció, com ara dany renal o l'embaràs⁷.

El codi genètic en *hly* no és característic d'*E. coli*, i el contingut en G-C (40%) s'assembla més al de *Proteus* o *Pasteurella* spp.. Aquest fet, i la presència de determinants d'hemolisina genèticament relacionats a la regió *hly* d'*E. coli* en alguns *Proteus*, *Pasteurella*, i soques de *Morganella*, suggereix que els gens *hly* d'*E. coli* s'han pogut originar en alguns d'aquests gèneres. En canvi, en base al codi genètic i l'homologia en els aminoàcids, també s'ha postulat que HlyB pot tenir un origen mamífer en *mdr*, una glicoproteïna de membrana de 140 k-Da trobada en cèl·lules tumorals humanes que confereixen multi resistència a drogues per l'activació de components de transport fora de la cèl·lula, una funció similar a l'HlyB en la secreció de l'hemolisina. *mdr* és essencialment un repetició en tàndem d'HlyB, incloent els dominis de transmembrana conservats i un lloc d'unió a l'ATP a prop de l'extrem C terminal. En canvi, el gen dels mamífers podria tenir origen bacterià via un element transposable d'origen viral.

Associació amb altres factors de virulència

Les soques uropatògenes hemolítiques amb freqüència també expressen fimbries P. Les seqüències *hly* sovint es troben genèticament relacionades amb altres factors de virulència, incloent les fimbries P i altres adhesines, excloent AFA, encara que els diferents llinatges genètics en algunes soques indiquen que no sempre porten el mateix bloc de gens. La producció d'hemolisina també es troba associada a la resistència al sèrum, però no a la producció d'aerobactina. La producció d'hemolisina és especialment comú entre soques amb certs antígens O, per exemple, O4, O6, O18 i possiblement O75 i també amb certs antígens K, (K2, K5, K12 i K13). En canvi, és poc comú en soques O1, O2, O7 i O9. La majoria de soques dels serotips O4:K12:H5, O6:K2:H1 i O6:K13:H1 produeixen hemolisina, en canvi les soques dels serotips

O1:K1:H⁻, O2:K1:H4 i O2:K5:H4 la produeixen rarament o mai. Globalment, les soques hemolítiques es troben serològicament més relacionades, fins i tot si es comparen soques fecals i soques d'origen urinari, que les soques no hemolítiques. Això suggereix que les soques hemolítiques fecals constitueixen una població virulenta de la flora fecal amb capacitat d'ascendir a través del tracte urinari.

1.3.2. Factor citotòxic necrotitzant

El factor citotòxic necrotitzant 1 és una toxina de 115kDa amb homologia a les toxines de la Família Dermonecrotiques. Es troba codificada per el gen cromosòmic monocistrònic *cnf*, localitzat a l'extrem 3' del gen d'*hly*. *cnf* codifica una toxina que catalitza la desaminació de les GTPases Rho, Rac i Cdc42, activant-les i donant com a resultat la formació de fibres d'actina, lamelipodis i filopodis per part de la cèl·lula hoste. Aquesta reorganització del citoesquelet dóna lloc a l'apoptosi, i permet al bacteri l'entrada a la paret muscular de la bufeta, fent que la infecció sigui més severa i prolongada ^{18,73,74}.

El factor citotòxic necrotitzant és una toxina produïda per moltes soques hemolítiques d'*E. coli*^{75,76}. La producció de CNF es troba associada a la producció d'hemolisina i als serogrupos O2, O6 i O75, però és poc comú en els altres serogrupos i en soques no hemolítiques. Un 30% de soques d'*E. coli* d'origen urinari produeixen CNF, en canvi les soques d'*E. coli* d'origen fecal en produeixen rarament ^{75,77-79}.

1.4. Càpsula polisacàrida

Les càpsules són unes estructures polisacàrides que cobreixen al bacteri, protegint-los dels mecanismes de defensa no específics dels hostes, bàsicament de l'acció del complement i dels fagòcits⁸⁰. D'aquesta forma, sovint, un bacteri capsulat és més virulent que un no capsulat. Els anticossos K-específics, formats als últims estadis de la infecció, tenen la capacitat de superar l'acció protectora de les càpsules, però algunes càpsules no són reconegudes pels hostes, i com a resultat l'hoste és vulnerable al patogen.

Característiques químiques de l'antigen capsular

Els antigens capsulars són àcids polisacàrids amb una estructura regular, formada per unitats repetides d'oligosacàrids. Algunes soques expressen la càpsula a qualsevol temperatura de creixement (grup I), mentre que d'altres només l'expressen quan la temperatura és superior a 25°C (grup II) (Taula 7).

Les soques amb càpsules del Grup I (Taula 7) estan relacionades amb els serogrups O8, O9 i O20. Les seves càpsules es troben relacionades genèticament amb el *locus his*, i en algunes soques també amb el *locus trp*. L'àcid polisacàrid capsular del Grup I normalment està format per llargues unitats repetides, de quatre a sis polisacàrids, essent els components àcids més comuns l'àcid hexurònic i el piruvat. Aquest grup es pot subdividir en funció de la composició dels sucres: les càpsules del Grup Ia, no contenen amino sucres, mentre que les del Grup Ib, contenen un o dos amino sucres per unitat repetitiva. Els polisacàrids del grup Ia s'assemblen als polisacàrids de les càpsules de *Klebsiella*.

Les soques amb càpsules del Grup II, les quals no s'expressen per sota de 25°C, estan relacionades amb molts serogrups i la co-expressió amb el lipopolisacàrid no està regulada. Aquestes càpsules del Grup II d'*E. coli* estan cromosòmicament determinades per el cluster *kps*, que es troba molt relacionat amb *serA*. Els polisacàrids són petits, normalment de dos o tres sucres, i de la mateixa manera que en el Grup I, es repeteixen les unitats. A diferència de les càpsules del Grup I, les del Grup II tenen un gran ventall de components àcids, com per exemple, àcid hexurònic, àcid N-acetilneuramínic, àcid 3-deoxi-manno-D-octulosònic (KDO), àcid manosaminurònic o fosfat. Algunes càpsules polisacàrides del Grup II són similars a les de *Neisseria meningitidis* i *Haemophilus influenzae*, tant estructuralment com en les seves característiques generals. En les soques d'*E. coli* amb càpsules del Grup II hi ha un increment de l'activitat CKS (*cytidine 5'-monophosphate-KDO synthetase*).

Taula 7. Classificació de les càpsules polisacàrides d'*Escherichia coli*

	Grup de la càpsula polisacàrida	
	I	II
Component àcid	Àcid glucorònic Àcid galacturònic Piruvat	Àcid glucorònic NeuNAc KDO ManNAcA Fosfat
Expressió per sota de 20°C	Si	No
Co-expressió amb antígens O	O8, O9, O20	Molts antígens O
Residu lípids a l'extrem reductor	Core-lipid A	Àcid fosfatídic
Relacionat cromosòmicament	<i>rfb (his)</i> , <i>rfc (trp)</i>	<i>kpsA (ser)</i>
Increment de l'activitat CMP-KDO sintetasa	No	Si
Relacions intergenèriques	<i>Klebsiella</i> (Ia)	<i>H. influenzae</i> , <i>N. meningitidis</i>

CMP, 5'-monofosfat citidina; KDO, àcid 3'-deoxi-manno-D-octulosònic; NeuNAc, àcid N-acetilneuramínic; ManNAcA, àcid manosaminurònic.

Algunes soques d'*E. coli* tenen càpsules polisacàrides químicament semblants a les càpsules del Grup II, però que genèticament es troben a un lloc pròxim a *serA*, la seva regulació no és temperatura depenent, i l'activitat CKS (*cytidine 5'-monophosphate-*

KDO synthetase) d'aquestes soques no és gaire elevada. Aquestes càpsules (K3, K10, K11, K54, K96, K98) estan relacionades amb el grup II, i es classifiquen com a una subclasse del Grup II.

1.4.1. Polisacàrids del grup II

Les soques d'*E. coli* amb càpsules del Grup II, són portadores d'antígens K detallats a la Taula 6. Alguns d'aquests polisacàrids del grup II presenten un especial interès per la seva relació amb diverses infeccions. El polisacàrid K1 és un homopolímer d'àcid siàlic (NeuNAc), de 2 a 8 unitats i aleatòriament acetilat a la posició C-7 i C-9. La seva estructura és idèntica a la càpsula polisacàrida de *Neisseria meningitidis* grup B i relacionat amb els trisialongagliòsids humans que contenen una capa de NeuNAc-(2-8)NeuNAc.

Taula 6. Antígens capsulars del Grup II d'*Escherichia coli*

K1	K4	K7 (K57)	K14	K18	K22	K51	K74	K95
K2a	K5	K12	K15	K19	K23	K52	K92	K97
K2b	K6	K13	K16	K20	K24	K53	K93	K100

Mecanisme de virulència

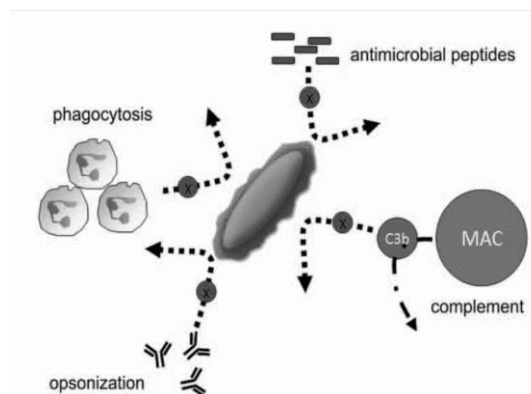
- Activitat antifagocítica i anticomplementari.

Amb algunes excepcions, les soques capsulades o K1⁺ són menys fagocitades per les hPMNLs (leucòcits polimorfonucleats humans) que les soques no capsulades o K1⁻. El grau de disminució en la fagocitosi és proporcional a la quantitat de polisacàrid. La fagocitosi de les soques K1 incrementa després de l'exposició a anticossos anti-K1 o després del trencament de la càpsula mitjançant ebullició. Les càrregues negatives i la hidroficitat de les càpsules polisacàrides K1 són intrínsecament antifagocítiques. A més, la càpsula polisacàrida bloqueja l'opsonització mitjançant l'interferència amb el complement. Els eritròcits coberts amb càpsules polisacàrides són menys cisats pel complement, fins i tot en presència d'anticossos anticapsulars. Les soques K1 activen pobrament la via alternativa del complement. Els efectes anticomplementaris de les càpsules polisacàrides podrien ser deguts en part a l'acció de l'àcid siàlic de la superfície bacteriana, que incrementa la unió a inhibidors de B1H de C3_b. D'aquesta manera és preveu la formació de convertasa C3 i es bloquejaria l'activació de la cascada del complement.

La interacció de la superfície cel·lular amb el sistema del complement és un mecanisme important, el qual és evadit pels bacteris (Figura 10). El resultat d'aquesta interacció perjudica la bacteriòlisi i/o fagocitosi, processos que tenen efecte en el complex d'atac terminal de la membrana (MAC) i el component C3b del complement, respectivament. Normalment, el sistema del complement s'activa per interacció amb els anticossos dels components de la superfície bacteriana (via clàssica) o per l'activació de la via alternativa.

La via clàssica del complement i l'alternativa es troben sotmeses a control i regulació. Hi ha moltes interferències amb les proteïnes reguladores per part de la càpsula polisacàrida que inhibeixen l'acció del complement. El component C3 del complement és un factor que la via clàssica i alternativa tenen en comú.

Figura 10. Funcions de la càpsula polisacàrida d'*Escherichia coli* uropatògena.



Durant la infecció, la càpsula polisacàrida protegeix al patògen dels mecanismes de resposta innata i adaptativa, incloent l'opsonització, fagocitosi i lisi mediada pel complement. L'encapsulament també juga un paper important en recollir pèptids antimicrobians per a neutralitzar la seva acció. *Escherichia coli* uropatògena generalment presenta una càpsula polisacàrida i els antígens més freqüents són K1, K5, K30 i K92

- Resistència al sèrum

L'activitat anticomplementària de la càpsula polisacàrida probablement també contribueix a l'increment de la supervivència de les soques en el sèrum. El grau de resistència al sèrum de les soques K⁺ és proporcional a la quantitat present de material capsular i també depèn del tipus de càpsula polisacàrida.

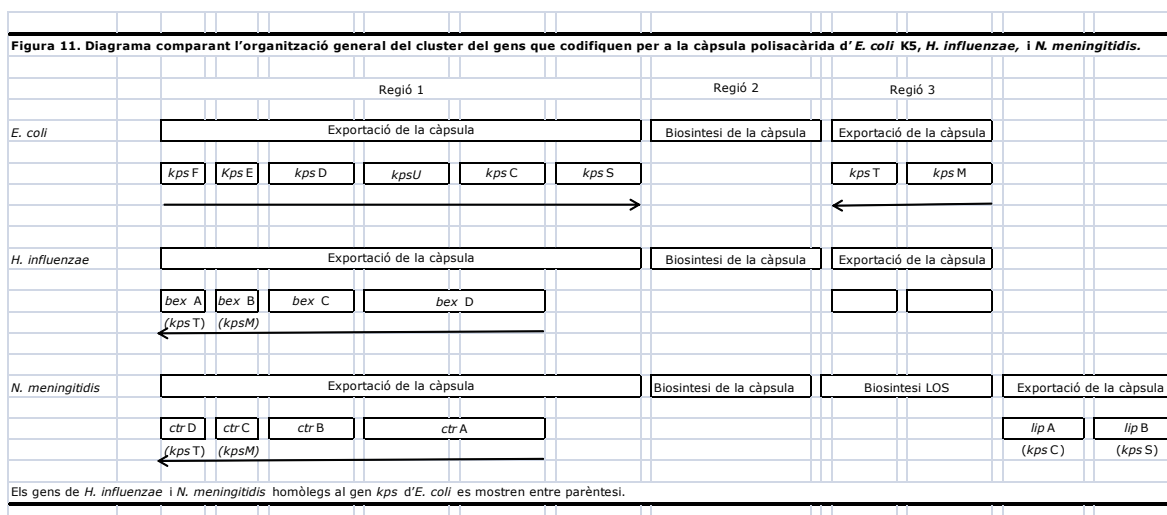
Genètica

El gen *kps* responsable de la síntesi i de l'expressió d'aquests polisacàrids ha estat molt estudiat en les soques d'*E. coli* K1 i K5. Aquest gen és troba en la posició

64 minuts, a prop del *locus serA* del cromosoma d'*E. coli*, i està organitzat en tres regions:

- Regió 2, la regió central, determina la polimerització dels respectius polisacàrids K. Entre soques es diferencia pels diferents tipus de càpsules, i el seu tamany depèn de l'estructura i el tamany de les unitats repetitives de polisacàrids. Aquest regió és específica pels diferents tipus de càpsules del grup II.

- Regió 1 i 3; la regió 2 es troba flanquejada per les regions 1 i 3, les quals contenen els gens que dirigeixen la translocació dels polisacàrids a través de la membrana citoplasmàtica i el seu transport a través del periplasma i la membrana externa fins arribar a la superfície cel·lular. Les regions de transport 1 i 3 funcionalment són les mateixes entre soques d'*E. coli* amb diferents càpsules polisacàrides.



Tot i la similitud de les càpsules polisacàrides d'*E. coli* K1 i *N. meningitidis* del grup B, no hi ha homologia entre els gens que codifiquen la síntesi capsular en aquests microorganismes (Figura 11).

L'expressió de la càpsula polisacàrida del grup II no està regulada per el sistema *rcs*, sinó que està sota el control dels gens *rfaH*, el producte dels quals (RfaH) afecta a la síntesi del nucli lipopolisacàrid.

Expressió

Els polisacàrids s'expressen en la superfície bacteriana en tres estats: translocació a través de la membrana interna o citoplasmàtica, transport a través del periplasma, i creuament de la membrana externa.

La translocació polisacàrida a través de la membrana citoplasmàtica depèn del mecanisme de polimerització: d'una banda per l'assemblatge dels polisacàrids

mitjançant la unió a un lípid intermediari, o bé per elongació contínua dels polisacàrids sense la formació d'un lípid intermediari. Els oligosacàrids units a lípids, formats al costat intern de la membrana citoplasmàtica, probablement creuen la membrana mitjançant un mecanisme de flip-flop i s'uneixen a la cara externa de membrana externa, sense necessitat de la translocació dels polisacàrids. Per a la completa polimerització dels polisacàrids al costat citoplasmàtic de la membrana, és necessària l'ajuda de proteïnes translocadores.

L'expressió de la càpsula polisacàrida K1 i K5 del Grup II és regulada per la temperatura, essent possible la formació *de novo* de la càpsula per canvis de les condicions. La sobtada aparició de les càpsules K1, K5 i K12 és pot observar als 25-30 minuts d'un canvi de temperatura. La càpsula polisacàrida novament formada apareix en la superfície cel·lular en llocs diferents, indicant la presència de llocs específics.

Epidemiologia

- Càpsula polisacàrida en general

Una gran proporció de soques d'*E. coli* humanes fecals són capsulades, i poden ser tipades utilitzant anticossos anti-antígens K. Alguns tipus de càpsules, incloent K1, K2, K3, K5, K12, K13, K20 i K51 es troben sobrerrepresentades entre les soques aïllades en pacients amb cistitis i especialment amb pielonefritis en comparació amb les soques aïllades en la femta de persones sanes. Els antígens capsulars K1 i K5 es troben en el 62% de les soques aïllades en dones amb pielonefritis, i els antígens capsular K1, K2, K3, K12 i K13 en el 70% de les soques aïllades en noies joves amb pielonefritis. L'associació de certs tipus de càpsules amb la infecció urinària és influenciada per l'antigen O, així per exemple mentre que les soques O18:K1 són infreqüents en la infecció urinària, les soques O18:K5 i O1:K1 són comuns.

- Càpsula K1.

La càpsula K1 és la càpsula més trobada entre soques aïllades en l'orina i en la femta. La prevalença de soques K1 fecals s'incrementa amb l'edat, des d'un 22% en infants prematurs fins a un 45% en dones adultes. La associació més coneguda de la càpsula és amb la meningitis, on el 79% dels *E. coli* aïllats posseeixen l'antigen K1. Moltes soques aïllades en bacterièmies neonatals expressen la càpsula K1; en canvi, en altres bacterièmies, les soques K1 només representen un 23%, la mateixa proporció que en les soques fecals (23%).

Les soques K1 són més comuns en pacients amb pielonefritis que en pacients amb altres tipus d'infecció urinària o que en la flora fecal. En canvi, no hi ha diferències entre les soques aïllades en pacients amb bacteriúria asimptomàtica, cistitis i fecals. Entre les soques K1, les aïllades en pacients amb infeccions urinàries severes

produeixen més quantitat de substància capsular que les aïllades en pacients amb infeccions lleus. Tot això fa pensar que la càpsula polisacàrida K1 contribueix al desenvolupament de meningitis, bacterièmia neonatal i pielonefritis però, no és particularment important en la patogènia de bacterièmia després de l'etapa neonatal o cistitis i bacteriúria asimptomàtica.

Associació amb altres factors de virulència.

La càpsula K1 es troba associada als serogrupos: O1, O2, O7, O16 i O18. La meitat de les soques aïllades en infeccions humanes són dels serogrupos: O1, O7 i O18. En canvi, és poc comú trobar la càpsula K1 en soques dels serogrupos O4, O6 i O75. La quantitat de polisacàrid K1 produït és similar entre soques que pertanyen a un mateix grup clonal.

La càpsula K5 es troba associada als serogrupos: O2, O6, O18 i O75, i la càpsula K12 a O4.

La càpsula K1 es troba associada a soques amb adhesines manosa resistent, especialment a soques dels serogrupos O1 i O2, però no O18. En els pacients amb pielonefritis, aquesta associació s'explica per l'associació de K1 i fimbries P. Existeix una associació entre la producció d'hemolisina i l'antigen K5, però no en amb el K1. Les soques K12 presenten una adherència incrementada a les cèl·lules uroepitelials, però això s'atribueix a altres factors de virulència.

1.5. Resistència al sèrum

Els bacteris són eliminats a través de l'activitat lítica del sistema del complement. La via alternativa és activada per el bacteri en absència d'antigen específic i juga un paper molt important en la capacitat del sèrum per eliminar els bacteris. El lípid A pot activar la via clàssica en absència d'anticossos, però la seva localització dins de la membrana externa probablement fa que sigui inaccessible als components del complement quan el bacteri està intacte. Els dos braços de la cascada del complement convergeixen en la formació del complex C₅₋₉ que ataca a la membrana (MAC), formant un curt cilindre foradat de 22nm de diàmetre. El MAC s'insereix en la membrana externa, formant un porus a través del qual la lisozima té accés a la paret permetent que els MAC s'insereixin a la membrana interna, i tingui lloc la lisi de la cèl·lula.

La sensibilitat dels bacteris al sèrum es mesura mitjançant el recreixement dels bacteris després de la seva inoculació en dilucions seriades de sèrum. Molts factors influeixen en els resultats, incloent la fase de creixement dels bacteris a l'hora

exposar-los al sèrum i, la dilució de sèrum utilitzada (dilucions més grans de 1/16 són insuficients per activar al complement). La resistència al sèrum resulta d'un efecte individual o combinat de la càpsula polisacàrida, de les cadenes laterals del polisacàrid O, i de les proteïnes de superfície.

1.5.1. Resistència associada a la presència de polisacàrid O

En general, les soques llises són més resistents al sèrum que les rugoses, i el grau de resistència al sèrum és proporcional a la quantitat de lipopolisacàrids continguts en aquestes soques llises. El lipopolisacàrid O és un component típic de les soques llises lipopolisacàrides. Les soques resistents al sèrum amb molt polisacàrid O sembla que activen i consumeixen el complement. Això suggereix que les cadenes laterals de l'antigen O protegeixen contra la lisi del complement, no bloquejant l'activació del complement sinó activant-lo en un lloc llunyà on es troba el lloc d'unió a la membrana.

1.5.2. Resistència associada a plasmidis.

Alguns plasmidis confereixen lleugerament un increment en la resistència al sèrum, especialment quan les soques hostes són parcialment resistents al sèrum. Els plasmidis incompatibles del grup F (ex. plasmidi ColV (F1) i plasmidis resistents R100 i R6-5 (FII) han estat els més estudiats, encara que plasmidis d'altres grups d'incompatibilitat (N, O, S, T i U) també confereixen un increment en la resistència al sèrum.

ColV i *iss*

traT. La proteïna de membrana TraT és una lipoproteïna de la membrana externa de 25 kDa que media l'exclusió superficial entre soques portadores de plasmidis F-like com R6-5, R100 i alguns plasmidis ColV. TraT és el component més gran de la membrana externa i confereix un grau moderat de resistència al sèrum per interferència amb el complement, possiblement per inactivació del MAC. El gen clonat *traT* incrementa la resistència al sèrum de soques no capsulades quan es troba present amb un número petit de còpies, mentre que en soques capsulades, calen moltes còpies de *traT* per tenir efectes sobre la resistència al sèrum. *traT* sempre es troba en un plasmidi IncF. Encara que *traT* és més comú en soques extraintestinals (58%) que en soques fecals (38%), no està clara la seva associació amb la resistència al sèrum, excepte possiblement en les soques causants d'infecció urinària.

Epidemiologia

En conjunt, les soques aïllades en pacients amb pielonefritis i cistitis són més resistents al sèrum que les soques aïllades en pacients amb bacteriúria asimptomàtica o els aïllaments fecals. Les soques productores de pielonefritis i de cistitis són molt similars respecte a la prevalença de la resistència al sèrum. Això suggereix que la resistència al sèrum és important en la patogènia de la infecció simptomàtica del tracte urinari.

Associació amb altres factors de virulència

La resistència al sèrum es troba associada als serogrupos O6, O7, O18 i O50, i és poc comú entre els serogrupos O1, O2, O4, O9, O16 i O75. L'origen clínic de les soques influeix en l'associació entre els antígens O i la resistència al sèrum, així les soques aïllades en pacients amb pielonefritis presenten nivells més alts de resistència al sèrum, que les soques aïllades en pacients amb bacteriúries asimptomàtiques.

1.6. Adquisició del ferro

El ferro és necessari per al metabolisme normal del bacteri⁷⁵. El ferro lliure en els hostes humans és limitat i no gaire accessible pel bacteri. El ferro en el cos normalment es troba com a hemoglobina o heme⁸¹. *E. coli* utilitza el ferro per a transportar i emmagatzemar l'oxigen, per la síntesi d'ADN, el transport d'electrons i el metabolisme de peròxids. El ferro en les cèl·lules hostes és captat amb elevada especificitat per proteïnes específiques com la transferrina i la lactoferrina, fent difícil l'adquisició de ferro per part dels bacteris. Però els bacteris que viuen en la superfície de les mucoses o dins de les cèl·lules de l'hoste tenen mecanismes especialitzats per a captar aquest ferro. En el cas d'*E. coli*, adquireix el ferro de l'hoste mitjançant la secreció de molècules (sideròfors) que uneixen el ferro amb més afinitat que les proteïnes específiques de l'hoste. La unió ferro - sideròfor és transportat pels bacteris mitjançant un sistema específic i després és utilitzat.

1.6.1. Aerobactina

L'aerobactina és una molècula petita (pes molecular 616 pb) formada en l'interior del bacteri a partir de la condensació de dues molècules de lisina amb un citrat. Després de la seva secreció, l'aerobactina extreu el Fe^{3+} de les proteïnes de l'hoste captadores de ferro, i l'interioritzen mitjançant una proteïna receptora de la membrana externa de 74 KDa, que també actua com a receptora de la cloacina (una toxina produïda per algunes soques d'*Enterobacter cloacae*). Les soques d'*E. coli*

dotades del sistema d'aerobactina tenen una gran avantatge, en ambients on la concentració de ferro és baixa, com és el cas del sèrum i l'orina. El sistema aerobactina té moltes més avantatges que altres sideròfors. *E. coli* pot utilitzar, però no pot sintetitzar ferricroma i no pot transportar suficient citrat per poder créixer en baixes concentracions de ferro en absència d'altres sideròfors.

Genètica

En la majoria de soques d'*E. coli*, el sistema d'aerobactina és codificat per un operó amb 5 gens (Figura 12); els quatre primers (*iucA*, *iucB*, *iucC* i *iucD*) codifiquen els enzims necessaris per a la síntesi d'aerobactina i el cinquè (*iutA*) codifica per la proteïna receptora de la membrana externa.

Els passos successius en la biosíntesi de l'aerobactina es troben catalitzats pels gens *iuc* en la següent seqüència DBAC, i impliquen:

- l'hidroxilació de la lisina
- l'acetilació del grup hidroxil per donar lloc a l'àcid hidroxàmic
- la condensació de dues molècules successives d'àcid hidroxàmic amb el citrat per donar lloc a l'aerobactina

Figura 12. Seqüència del determinant d'aerobactina d'*Escherichia coli*

<i>iucA</i>	<i>iucB</i>	<i>iucC</i>	<i>iucD</i>	<i>iutA</i>
63 K	33K	S	53K	74K
	Síntesi d'aerobactina			Proteïna membrana externa

Regulació

La producció d'aerobactina està regulada per la concentració de ferro intracel·lular mitjançant el producte del gen *fur* (*ferric uptake regulation*). Quan la concentració de ferro és suficientment elevada, el repressor fur forma un complex amb el ferro (o altres cations divalents) i s'uneix a la caixa de ferro en la regió promotora de l'operó de l'aerobactina (i en altres gens que regulen el ferro), bloquejant la transcripció. En baixes concentracions de ferro, el repressor fur és alliberat de la regió promotora i té lloc la transcripció.

Aerobactina plasmídica i cromosòmica

Els determinants de l'aerobactina es troben en els plasmidis i en el cromosoma bacterià. La localització cromosòmica és la predominant entre les soques aïllades de mostres clíniques humanes.

El sistema aerobactina més ben estudiat en *E. coli* és el del plasmidi conjugatiu pColV-K30. En pColV-K30 la regió d'aerobactina es troba flanquejada per una seqüència d'inserció semblant a IS1, que es troba unida per una seqüència de replicació. Altres plasmidis que codifiquen pel sistema aerobactina comparteixen molta homologia amb pColV-K30 dins de l'operó d'aerobactina i tenen unes seqüències similars que flanquegen la regió 3' (sovint incloent IS1 i una seqüència de replicació), en canvi hi ha molta heterogeneïtat en les seqüències que flanquegen la regió 5'. En les soques amb un sistema d'aerobactina cromosòmic, la regió que codifica l'aerobactina és idèntica a la trobada en els plasmidis. En canvi, les seqüències flanquejants divergeixen molt de les trobades en plasmidis, i les seqüències IS1 i de replicació són absents. Concordant amb les diferents seqüències flanquejants en 3', les regions d'aerobactina plasmídiques i cromosòmiques es regulen de manera diferent, tot i que utilitzen el repressor *fur*.

Epidemiologia

El sistema aerobactina es troba amb més freqüència en soques d'*E. coli* productores de cistitis (49%), pielonefritis (73%) o sèpsia (58%) que en soques productores de bacteriúria asimptomàtica (38%) o en soques fecals (41%). Segons aquests resultats l'aerobactina contribuiria a la virulència dins i fora del tracte urinari.

Associació amb altres factors de virulència

El sistema d'aerobactina i les fimbries P es troben freqüentment associats a soques d'*E. coli* productores de ITU i de sèpsia, encara que en les soques d'*E. coli* aïllades de pacients amb urosèpsia aquesta associació es troba amb l'aerobactina codificada cromosòmicament.

De forma similar, hi ha associació entre l'aerobactina cromosòmica i l'hemolisina en soques d'*E. coli* aïllades d'urosèpsia, però aquesta associació entre l'aerobactina i l'hemolisina es perd quan les soques amb aerobactina plasmídica i cromosòmica s'agrupen juntes. Això suggereix que l'aerobactina plasmídica i la cromosòmica no només difereixen en el seu entorn genètic, sinó també en l'associació amb altres factors de virulència. Altres propietats urovirulentes trobades amb més freqüència en soques productores d'aerobactina inclouen l'antigen capsular K, la resistència a fagocitosi i la supervivència al sèrum.

1.6.2. Yersinbactina

L'illa de patogenicitat de *Yersinia* (HPI, *high -pathogenicity island*) codifica per un sistema de captació de ferro mediada pel sideròfor yersinbactina (YBT) i confereix

la virulència a l'espècie *Yersinia*. Aquesta illa de patogenicitat es troba també àmpliament distribuïda en patògens humans de la família *Enterobacteriaceae*, sobretot en les soques d'*E. coli* que produeixen infeccions extraintestinals (ExPEC)⁸²⁻⁸⁷.

Genètica

En *Yersinia pestis* l'illa de patogenicitat es coneguda com el *locus pgm*, compren aproximadament 102 kb i inclou els següents gens relacionats amb la captació i emmagatzematge de ferro:

- (i) *locus* d'emmagatzematge d'hemin (*hms*)
- (ii) els gens *irp1* i *irp2* que codifiquen per les proteïnes d'elevat pes molecular repressores de ferro, relacionades amb la producció de yersinbactina
- (iii) els gens *fyuA* o *psn* (per la captació de ferro per part de la yersinbactina o la sensibilitat a pesticin) que codifiquen pel receptor yersinbactina FyuA que també serveix com a receptor de pesticin.

Les 102 kb de HPI de *Y. pestis* es troben flanquejades per còpies simples de l'element d'inserció IS100.

En canvi en *Y. enterocolitica*, en la majoria de soques de *Y. pseudotuberculosis*, i en les soques d'*E. coli*, HPI només inclou els gens *irp1-irp2* i *fyuA*.

1.7. Invasor de l'endoteli

La meningitis causada per *E. coli* és el resultat de la seva propagació en sang, de la invasió de les cèl·lules microvasculars endotelials encefàliques, de la reorganització de l'actina del citoesquelet d'aquestes cèl·lules encefàliques, i de les corresponents senyals, però no es coneix com circula el bacteri a través de la barrera hematoencefàlica, formada per cèl·lules encefàliques microvasculars endotelials (BMEC).

L'invasió per *E. coli* va precedida per l'adherència a les BMEC, com a pas crític en la patogènia d'*E. coli* causant de meningitis. La fímbria S és un dels factors microbians implicats en la patogènia de la meningitis neonatal. L'expressió de la fímbria S incrementa la unió d'*E. coli* a les cèl·lules encefàliques, però aquesta unió no està relacionada amb la invasió de les cèl·lules encefàliques⁵⁹.

En la invasió d'*E. coli* a les BMEC intervenen diferents estructures⁸:

- Càpsula K1. La majoria de casos de meningitis per *E. coli* són causats per aquells bacteris que presenten càpsules K1. La càpsula K1 no és necessària per a la invasió de les cèl·lules encefàliques, però és un factor de virulència important que permet al bacteri protegir-se en front de les defenses de l'hoste, i d'aquesta manera ser capaç de creuar la barrera hematoencefàlica i donar viabilitat al bacteri un cop a envaït les cèl·lules encefàliques. A més, la càpsula K1 també contribueix a alts nivells de bacterièmia ⁸⁹.
- OmpA és una proteïna de la membrana externa d'*E. coli*, que incrementa la invasió a les BMEC mitjançant la seva unió amb l'epítot GlcNAc1-4GlcNAc, present en els oligosacàrids de les glicoproteïnes superficials de BMEC. Tot i així, OmpA és present tant en les soques d'*E. coli* de mostres clíniques com de mostres no clíniques, per tant no és una estructura específica d'*E. coli* causant de meningitis ⁹⁰.
- IbeA, una proteïna transmembranal, ajuda a la interacció entre el bacteri invasiu i les cèl·lules endotelials encefàliques, s'ha aïllat en la soca d'*E. coli* RS218 causant de meningitis neonatal, i es troba relacionada amb soques d'*E. coli* aïllades en líquid cefaloraquidi, i no es troba present en *E. coli* K-12 i altres soques d'*E. coli* no invasives. Per tant, podria ser una estructura específica en *E. coli* causant de meningitis ⁹¹⁻⁹³.

Els gens *ibeB* ²³, *yjyP*⁹⁴, *asIA* i *OmpA* tenen homologies amb els gens presents en *E. coli* K-12, soca no patògena, mentre que *ibeA* és únic en *E. coli* K1, causant de meningitis.

1.8. Illes de patogenicitat

Com s'ha vist fins ara, en molts bacteris, la patogenicitat és deguda a la presència de gens que codifiquen factors de virulència (adhesines, toxines, sistemes de secreció, invasines...). Aquests gens sovint es troben en transposons, plasmidis o bacteriòfags i faciliten la seva difusió. A finals dels anys 80, Hacker *et al.*^{95,96} descriu un nou element genètic, anomenat illes de patogenicitat (PAI). Les PAIs són elements genètics mòbils que juguen un paper important en la virulència dels bacteris patògens. Són blocs d'ADN que contenen, entre d'altres, gens de virulència en llargues regions cromosòmiques que no són presents en el cromosoma de les soques no patògenes, com *E. coli* K-12. Després de la primera descripció de les PAIs en el genoma d'*E. coli* uropatògen, s'han identificat estructures similars en altres enterobacteris.

Les PAIs⁵⁴ es defineixen com:

- llargues regions genòmiques d'una longitud de 20 a > 200 kb,
- codifiquen un o més factors de virulència,
- molts d'ells amb un contingut de GC o un patró de codi genètic atípic per a l'espècie bacteriana hoste, el que fa pensar que tenen un origen exogen
- sovint es troben flanquejades per repeticions directes (DR),
- freqüentment inserides en l'extrem 3' dels *loci* de tARN,
- sovint porten gens funcionals o críptics que codifiquen factors de mobilitat, com integrases, transposases o seqüències d'inserció,
- fent d'aquesta manera que siguin regions d'ADN inestables.

El mecanisme de mobilitat de les PAIs es força desconegut, es postula que es comporten com a transposons conjugatius, el que permet una major difusió dels gens de virulència que contenen, en condicions de pressió selectiva.

Les PAIs generalment no representen peces homogènies d'ADN, sinó que representen estructures en forma de mosaic, suggerint que han estat generades en un procés seqüencial. Aquestes peces genètiques amb el temps experimentarien mutacions que homogeneïtzarien el seu codi genètic amb el del bacteri (incrementant l'eficàcia en la seva traducció), perdrien fragments no favorables i es confondrien amb el genoma propi del bacteri en un procés anomenat de maduració genètica.

Les soques patògenes sovint contenen diferents PAIs de diferents tamany inserides en el genoma. S'han descrit nou PAIs; PAI I fins V en la soca d'*E. coli* 536, PAI I i II en *E. coli* CFT073, i finalment PAI I i II en *E. coli* J96, que es detallen en la Taula 8.

Taula 8. Illes de patogenicitat en *E. coli* uropatògena

Soca d' <i>E. coli</i>	PAI	Determinants de virulència que codifica	Contingut GC (%)	Tamany (Kb)	tARN associat
536	PAI I	α -hemolisina, fímbria, adhesina	46	76,8	<i>selC</i>
	PAI II	adhesina Hek, fímbria P-relacionada, <i>a-hly</i> ,	46	102,2	<i>leuX</i>
	PAI III	fímbria S, sistema sideròfor <i>iro</i> , adhesina Sap	47	68,1	<i>thrW</i>
	PAI IV	sistema sideròfor Yersinbactina	57	30,2	<i>asnT</i>
	PAI V	càpsula polisacàrida	47,7	67	<i>pheV</i>
CFT 073	PAI I	α -hemolisina, fímbria-P, aerobactina	42,9	58	<i>pheV</i>
	PAI II	fímbria P, gens reguladors de ferro	48,8	>72	<i>pheU</i>
J96	PAI I	α -hemolisina, pilus P	41	>170	<i>pheV</i>
	PAI II	α -hemolisina, Prs, <i>cnf1</i> , hemaglutinina calor-resistent	41	>110	<i>pheU</i>

1.8.1. PAI I_{CFT073}

La soca uropatògena d'*E. coli* CFT073 aïllada en l'orina i sang d'una dona amb pielonefritis, conté dues PAIs, una de les quals, anomenada PAI I_{CFT073} s'estudia en aquest treball ⁹⁷.

La PAI I_{CFT073} conté l'operó *hly* que codifica per a l'*alpha*-hemolisina, l'operó *pap* que codifica per la fímbria P, i gens relacionats amb el sistema de transport de ferro i transport de carbohidrats. Aquesta PAI té un tamany de 58 kb, un contingut GC de 42.9%, i compren 44 ORF (*open reading frames*) i fragments d'*E. coli* K-12 enmig de la PAI.

1.9. Derives poblacionals d' *E. coli*

Escherichia coli inclou variants no patògenes, és a dir, soques amb poca capacitat de produir malalties, i variants patògenes, soques amb capacitat de produir malalties entèriques i infeccions extraintestinals en humans i animals. Per conèixer l'origen evolutiu de les variants patogèniques s'han caracteritzat molecular i fisiològicament ⁹⁸. La generació de la diversitat dins d'*E. coli* i l'emergència de variants és el resultat de dos processos evolutius: la mutació i la transferència horitzontal.

Les soques d'*E. coli* patògenes extraintestinals responsables de moltes infeccions en hostes sense cap factor de risc són diferents de les soques d'*E. coli* comensals i de les soques d'*E. coli* patògenes intestinals. *E. coli* comensal deriva dels grups filogenètics A o B1, i no posseeix factors de virulència. En canvi, els diferents tipus d'*E. coli* patogènics intestinals, que rarament causen malalties extraintestinals, deriven dels grups A, B1, D o E, i presenten factors de virulència característics. A diferència de les soques comensals i patogèniques intestinals, ExPEC (*E. coli* patogènic extraintestinal) ⁵ deriva principalment del grup filogenètic B2, i amb menys freqüència del grup D.

Les soques ExPEC presenten un gran ventall de factors de virulència, que com hem vist fins ara, capaciten a la soca per colonitzar les superfícies mucoses de l'hoste, evadir o sobreviure als sistemes de defensa de l'hoste, aconseguir nutrients essencials com el ferro, envair l'hoste i estimular una resposta inflamatòria. A diferència de les soques d'*E. coli* intestinals, les soques ExPEC són incapaces de produir malalties gastrointestinals en humans; però, si que són capaces de colonitzar asimptomàticament el tracte intestinal de l'hoste, i sota certes circumstàncies, poden ser més efectives colonitzant l'intestí que les pròpies soques fecals.

1.10. Infecció urinària ^{103,104}

Les infeccions causades per *E. coli* es poden classificar en dos tipus:

- Infeccions específiques, aquelles on la colonització de les mucoses és un pas essencial i preliminar, i on els principals símptomes i senyals de la infecció es relacionen amb el lloc de la colonització, com per exemple les infeccions intestinals i les infeccions urinàries. S'ha de tenir en compte que la colonització per si sola no és suficient per a causar la malaltia, sinó que en la seva producció intervenen el potencial patògen del bacteri i els mecanismes defensius de l'hoste.
- Infeccions inespecífiques, els principals símptomes i senyals no es relacionen amb el lloc de la colonització de la mucosa, no essent aquesta un pas preliminar. Aquestes infeccions no específiques són el resultat d'una infecció directa d'una ferida o del peritoneu durant una intervenció quirúrgica, encara que també poden ser el resultat de la propagació d'una infecció específica, com la septicèmia d'origen urinari.

1.10.1. Infecció urinària

L'aparell urinari és estèril, excepte el terç distal uretral, on habitualment hi ha presents diferents bacteris de la flora normal de la pell, la vagina i el recte com: *E. coli*, estreptococs, estafilococs, corinebacteris, lactobacils, etc. La infecció del tracte urinari (ITU) és una de les malalties infeccioses més freqüents.

L'ITU es divideix en infecció de vies baixes (cistitis i bacteriúria asimptomàtica) i de vies altes (pielonefritis).

Cistitis

La cistitis es caracteritza per la presència de síndrome miccional (disúria, poliúria i micció urgent), sovint acompanyat de dolor suprapúbic, i de vegades d'hematúria. L'incontinència urinària és freqüent en dones i vells. La presència de febre, dolor lumbar o una puny percussió positiva indiquen infecció del parènquima renal (pielonefritis).

La infecció urinària de vies baixes és monomicrobiana en un 95% dels casos. El 90% de les cistitis no complicades en la comunitat són causades per *E. coli*, i amb menys freqüència per *Staphylococcus saprophyticus* i altres enterobacteris (*Klebsiella*

spp., *Proteus spp.*, etc). En pacients hospitalitzats, amb infecció urinària complicada, sonda urinària i/o tractament antibiòtic prèvi, tot i que *E. coli* s'aïlla en un 40% dels casos, augmenta la incidència d'infecció per altres enterobacteris, enterococs, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida spp*, *Acinetobacter spp*, i altres microorganismes multiresistents.

El tractament de la cistitis no complicada en el nostre medi es mostra en la següent taula:

Taula 10. Tractament de la cistitis no complicada en el nostre medi

Fosfomicina trometanol	
Nitrofurantoina	
Cefalosporines de primera generació:	cefalexina, cefadroxil. Desaconsellable si les taxes de resistència són superiors al 20%
Betalactàmics amb inhibidors de les betactamases:	amoxicilina-clavulànic, ampicilina-sulbactam.
Fluoroquinolones	

Bacteriúria asimptomàtica¹⁰⁵⁻¹¹⁰

La bacteriúria asimptomàtica es defineix com un creixement de més de 100.000 UFC/mL d'uropatògens en un cultiu d'orina d'un pacient sense símptomes d'infecció urinària. En general, per establir el diagnòstic, es demana l'existència de dos urinocultius consecutius amb el mateix microorganisme. L'existència de bacteriària asimptomàtica augmenta la probabilitat de patir una infecció urinària simptomàtica (0,2-0,9 per 1.000 pacients i dia): en general en forma de cistitis, molt poques vegades en forma de pielonefritis aguda i de manera excepcional amb bacterièmia. La bacteriúria asimptomàtica és més freqüent en la dona (1%-5%) i en certs col·lectius com ara pacients amb sonda vesical (100% en sonda permanent) i persones ingressades a centres socio-sanitaris (10%-50%), i augmenta amb l'edat (15% en majors de 75 anys). El seu tractament amb antibiòtics pot disminuir la incidència d'infecció simptomàtica durant els primers mesos, però a la llarga l'augmenta. Hi ha evidència provinent d'estudis amb un seguiment dels pacients de més de deu anys que demostra que la bacteriúria asimptomàtica mantinguda no és causa de deteriorament de la funció renal. A més, la bacteriúria asimptomàtica es resol moltes vegades de forma espontània.

Pielonefritis aguda

La pielonefritis afecta la pelvis i el parènquima renal. Es tradueix per manifestacions locals com dolor lumbar i, sistèmiques com febre. Aquesta última és la dada clínica que diferencia més la cistitis de la pielonefritis aguda.

La pielonefritis es divideix en complicada o no complicada en funció de si existeixen o no trastorns anatòmics o funcionals de les vies urinàries que poden influir en la distribució del microorganisme, en la resposta al tractament i en la resolució de la malaltia.

Els uropatògens de la flora intestinal solen ascendir pels urèters des de la bufeta fins a la pelvis renal. Aquesta capacitat depèn de l'adherència dels microorganismes a l'epiteli uretral i de l'existència de reflux vesico-uretral. La capacitat d'adhesió permet la persistència del microorganisme en un sistema on el flux urinari té la tendència a emportar-se als bacteris. Un cop arriben al ronyó, els microorganismes produeixen infecció de la medul·la i de les papil·les renals, les quals són especialment sensibles degut al seu pH àcid, elevada osmolaritat i amonièmia, i l'escassa perfusió sanguínia. Aquestes condicions interfereixen amb els mecanismes de defensa de l'hoste com la migració leucocitària, la fagocitosi i el sistema del complement, i afavoreixen la invasió tissular dels uropatògens.

La pielonefritis aguda té un quadre clínic que oscil·la entre una sèpsia greu i un síndrome cistític amb lleuger dolor lumbar. Les manifestacions clíniques més freqüents són la febre amb calfreds, el dolor en la fossa lumbar i el síndrome miccional. Es produeix bacterièmia en el 20-30% dels casos.

Davant d'una pielonefritis aguda s'ha de valorar si el pacient compleix o no criteris d'ingrés hospitalari. El tractament antibiòtic empíric es prescriu d'acord a la sensibilitat als antimicrobians en cada àrea geogràfica.

Infecció urinària recurrent

Les infeccions urinàries recurrents es classifiquen segons la patogènia:

- Recidiva, representen un 20% de les recurrències, i es presenten generalment en les primeres setmanes després de la curació de la infecció urinària, són degudes a la persistència de la soca original en el focus de la infecció, o bé a un tractament antibiòtic inadequat o massa curt.
- Reinfecions, són noves infeccions urinàries originades per una soca diferent. Aproximadament un 20% de les dones joves amb activitat sexual

que presenten un primer episodi de cistitis pateixen reinfeccions sense tenir una anomalia en les vies urinàries. Aquestes dones tenen amb més freqüència el serotip Lewis no secretor i expressen en les cèl·lules un parell de globòsids que actuen com a receptors per a les soques uropatògenes d'*E. coli*.^{111,112}

1.10.2. Factors de risc associats a la infecció urinària

Una proporció important de la infecció urinària té lloc en persones sense anomalies al tracte urinari, són les anomenades infeccions no complicades; a diferència de les infeccions complicades que impliquen alteracions anatòmiques o funcionals del tracte urinari o presència de cossos estranys, constituent-se com a factors afavoridors de la infecció.

Els factors afavoridors / de risc associats a la infecció no complicada del tracte urinari canvien i depenen fonamentalment de l'edat, els hàbits de conducta, les condicions fisiològiques i anatòmiques del tracte urinari i de certs factors genètics¹¹³.

Els principals factors de risc associats a la infecció urinària en dones, són els següents:

- Factors biològics, de comportament / ambientals
 - Coit
 - Diafragma / Epermaticida
 - Epermaticida
 - Antibioteràpia prèvia
 - Pèrdua d'estrògens
 - Incontinència
 - Cistocele
 - Residu postmiccional
 - Estat mental alterat
- Factors genètics
 - Estatus no secretor
 - Grup sanguini P⁻ i Lewis
 - Expressió de CXCR⁻
 - Polimorfismes dels TLRs

- Alteracions immunològiques
 - Deficiències immunològiques
 - Diabetis
- Alteracions anatòmiques / funcionals del tracte urinari
 - Cirurgia urogenital
 - Cateterisme vaginal
 - Sonda vesical permanent
 - Litiasi
 - Obstrucció
 - Embaràs
- Alteracions de la flora vaginal

Estudis de casos-control han demostrat que no existeix associació significativa entre la infecció del tracte urinari i el buidat vesical pre o postcoital, augment de la ingesta líquida diària, micció freqüent, retenció de la micció, hàbits de neteja dels genitals, ús de tamps vaginals, pràctica de rentats vaginals, utilització de banyeres o tipus de roba interior.

En l'interval d'edat comprès entre els 15 i 50 anys, els principals factors són el coit, nova parella sexual en l'any previ, infeccions urinàries prèvies, antecedents d'infecció urinària en la família e història d'infecció urinària en dones familiars de primer grau¹¹⁴. Alguns autors han suggerit que en dones joves, les diferències anatòmiques en la distància entre la uretra i l'anus podria ser un factor de risc d'infecció urinària i, en canvi, no ho serien ni la longitud de l'uretra ni el volum del residu postmiccional. El coit, en aquestes edats és el principal factor de risc d'infecció urinària, ja que facilita tant la colonització periuretral per *E. coli*, com l'ascens de la mateixa desde la periuretra fins a la bufeta. Moltes dones mai experimenten una infecció urinària fins que comencen la seva activitat sexual. L'inici de l'activitat sexual incrementa el risc de patir una infecció urinària en 3,5 vegades. Posteriorment, segons la freqüència de la seva pràctica es dispara desde 0 (cap coit en 7 dies) a 2,6 (3 coits en 7 dies) i a 9 vegades (7 coits en 7 dies). L'ús d'espermaticides¹¹³ (freqüentment es tracta dels espermaticides que recobreixen els preservatius masculins i els diafragmes femenins) i l'antibioteràpia alteren l'hàbitat vaginal, disminuint els lactobacils i augmentant la colonització vaginal i periuretral per *E. coli*, afavorint la infecció

urinària. Hi ha evidències epidemiològiques que suggereixen que *E. coli* productors d' infecció urinària poden ser transmesos entre parelles sexuals i que aquesta transmissió es dues vegades més freqüent si *E. coli* posseix fímbríes P o si la parella manté sexe oral¹¹⁵.

L'estreta relació observada en algunes pacients, entre història d'infecció urinària en un o més dels seus familiars femenins en primer grau i el risc augmentat de patir cistitis o pielonefritis aguda entre els parents de nenes que pateixen pielonefritis¹¹⁶ suggereix una predisposició genètica a la infecció urinària. El risc d'infecció urinària en una dona que combina una història familiar d'infecció urinària i factors de risc de comportament com coïts freqüents, es considerablement més alta que si estigués exposada exclusivament a una sola categoria de factors de risc. Les cèl·lules dels epitelis vaginal i bucal de les dones amb infecció urinària recurrent demostren *in vitro* més adherència bacteriana que les cèl·lules de les dones que mai han experimentat infeccions urinàries. Això suggereix, que la composició de les superfícies cel·lulars d'aquestes dues poblacions és diferent i que aquestes diferències probablement estan determinades genèticament.

Hi ha la controvèrsia sobre si el fenotip no secretor dels grups sanguinis ABH és o no és factor de risc per a les infeccions urinàries. Stapleton, *et al.*¹¹² varen posar de manifest que les cèl·lules epitelials de les dones no secretores (aquelles que posseixen antígens H, A o B en els seus hematies, però no els sintetitzen en les seves cèl·lules ni els excreten) expressen dos únics globòsids: sialosil-glaglobòsid (SGG) i disialosil-galglobòsid (DSGG), que no són expressats per les dones secretores i que actuen com a receptors d' *E. coli* uropatogen. El gen secretor, *Se*, codifica una glicosiltransferasa que transfereix un residu de fucosa, resultant antígens de grups sanguínis detectables en les cèl·lules epitelials, incloses les de l'uroepiteli i en les secrecions inclosa la vaginal, de la població amb fenotip secretor. Per tant, el fenotip no secretor, genèticament determina que la mucosa urinària sigui més susceptible a l'adherència de les enterobacteriàcies. Diversos estudis desmostren que les dones amb fenotip no secretor pateixen infecció urinària recurrent amb una freqüència significativament superior que la de les dones secretores. En canvi, posteriorment, Schoeles *et al.*¹¹⁴ va observar que el fenotip no secretor no constitueix un factor de risc en la població jove (en la qual les pràctiques sexuals i contraceptives continuen sent els factors de risc més importants), en canvi en dones majors podria emergir com a un factor relativament més importants. Els grups sanguinis P1 i Lewis, també estan implicats com factors de risc per les infeccions urinàries. L'expressió de CXCR1, receptor de la IL-8, és significativament menor en infants amb pielonefritis de repetició i en els seus familiars que en els infants de la mateixa edat sense aquesta patologia; s'han

identificat dos polimorfismes del gen que codifica CXCR1 que poden predisposar a la pielonefritis ja que desmantellen als neutròfils.

Entre els anys 50 i 70, en dones postmenopàusiques sanes no portadores de catèters urinàris, els factors predisponents corresponen a la depleció estrogènica, la cirurgia urogenital, la incontinença urinària, el cistocele, el residu postmiccional, l'estatus no secretor i la història d'infecció urinària en el període premenopàusic ¹¹³. En aquest grup d'edat, la disminució o absència d'estrògens juga un paper clarament important en la seva predisposició a l'adquisició de la infecció urinària¹¹³, ja que incrementa el pH vaginal i altera el seu ecosistema disminuint la població de *Lactobacillus* i augmentant la d' *Escherichia coli*. El mecanisme mitjançant el qual els estrògens i el pH afecten l'adherència i colonització de la mucosa vaginal és bastant desconegut. La receptivitat de les cèl·lules de l'epiteli vaginal als uropatògens varia significativament al llarg del cicle menstrual, sent més intensa en els primers dies del cicle i disminuint en la fase d'ovulació, suggerint que les fluctuacions estrogèniques hormonals poden modificar la receptivitat de les cèl·lules vaginals i la patogènia de la infecció urinària. Raz *et al.*¹¹⁷, en un estudi realitzat en dones postmenopàusiques propenses a la infecció urinària recurrent, demostraven que l'administració d'estradiol disminuïa de manera significativa el nombre d'episodis d'infecció i, la població vaginal d'enterobacteràcies; alhora que augmentava la població vaginal de *Lactobacillus*, concloent que l'estrogenització de la mucosa vaginal promou el restabliment de la flora vaginal normal.

A partir dels anys 70, la incontinença urinària, la sonda permanent, la cirurgia urogenital, el deteriorament de l'estat mental i el tractament d'antimicrobians consitueixen els principals factors predisponents d'infecció urinària. En dones velles ingressades en institucions sanitàries el principal factor de risc és l'aplicació d'una sonda vesical i l'estat funcional del seu aparell urinari¹¹³. A mesura que aquest últim es deteriora, el risc de patir una infecció urinària augmenta, amb independència de la presència o absència de sonda vesical.

La susceptibilitat a la infecció del tracte urinari depèn en gran mesura de l'equilibri entre la virulència del bacteri infectant i la magnitud de les deficiències en les defenses de l'hoste. Les infeccions complicades s'associen a anormalitats anatòmiques, funcionals o metabòliques del tracte urinari que incapaciten les defenses naturals i poden conduir a una destrucció important del teixit renal. Les infeccions no complicades s'associen a alteracions més subtils, governades per factors genètics, biològics, de conducta o ambientals, els quals promouen l'accés dels uropatògens al tracte urinari i la colonització / infecció del mateix.

1.10.3. Interaccions *Escherichia coli* – hoste en l'establiment de la infecció urinària

Resposta innata precoç desencadenada per l'entrada i unió dels uropatògens a l'uroepiteli

La resposta de l'hoste a la infecció inclou una primer línia defensiva que implica la producció de citoquines i de pèptids antimicrobians anomenats defensines, com l'alpha y betadefensines i la catelicidina. A més de l'afluència de polimorfonucleats, apoptosi i exfoliació de les cèl·lules de l'hoste. L'uroepiteli contribueix a l'esterilitat dels tracte urinari extretant proteïnes com la Tamm-Horsfall que bloqueja l'adhesió bacteriana i la lipocalina i la lactoferrina que limiten la presència de ferro lliure al tracte urinari.

Tot i així, alguns uropatògens són capaços d'evadir aquesta primera línia defensiva i colonitzar l'uroepiteli. Aquesta colonització es produeix mitjançant l'adhesió de les diferent fimbries que posseeix l'uropatogen amb els seus receptors específics localitzats en la membrana de les cèl·lules de l'epiteli urinari. Simultàniament, l'uropatogen és reconegut per els receptors *Toll-like* (TLRs). Els TLRs són proteïnes situades en la mebrana de les cèl·lules eucariotes de l'hoste, que actuen com receptors que reconeixen patògens associats a patrons moleculars (PAMPs). Aquest reconeixement desencadena la cascada de resposta immunitària innata. La fixació de les PAMPs en els TLR implica l'activació de factors de transcripció (NF-kappa B, AP-1, IRF3 i IRF7, entre d'altres) els quals regulen múltiples gens, entre aquests alguns que codifiquen importants citoquines proinflamatories, activant la producció del factor de necrosi tumoral (TNF, *Tumor Necrosi Factor*), IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-12 i interferó tipus 1 (alpha i beta).

Cada teixit corporal pot expressar un o més TLRs, sent el TLR4 el més important en les cèl·lules eptelials del tracte urinari. El lipopolisacàrid (LPS) de la membrana externa de la paret dels bacils Gram negatiu uropatògens es fixen al TLR4 desencadenant la resposta immunològica. En aquest inici de respota el LPS actuaria en conjunció amb les fimbries tipus 1¹³ i les fimbries P després d'adherir-se als seus receptors de l'uroepiteli. Altres TLRs, com el TLR5 que reconeix la flagelina i el TLR 11 també estan involucrats en la defensa de l'hoste contra els uropatògens. Certs polimorfismes dels TLRs poden modificar la susceptibilitat a la infecció urinària. Així, s'han associat certs polimorfismes dels TLR4 i TLR2 amb un augment de susceptibilitat a les infeccions urinàries en nens¹¹⁸, els polimorfismes TLR1-G180ST i TLR4-a896G amb la protecció enfront a la pielonefritis i a les infeccions urinàries recurrents en

adults, respectivament; i el polimorfisme TLR5-C1174T amb la susceptibilitat augmentada a les infeccions urinàries recurrents en adults¹¹⁹.

1.10.4. Diagnòstic microbiològic de la infecció urinària

Examen microscòpic de l'orina

La detecció de piúria és fonamental en l'avaluació inicial del qualsevol pacient amb infecció de les vies urinàries. La presència de piúria es defineix com la detecció de més de 10 leucòcits per mm³ d'orina no centrifugada o més de 5 leucòcits per camp d'orina centrifugada (sediment). L'examen es realitza amb el microscopi a 40 augments. Aquesta tècnica té una sensibilitat superior al 95% en els pacients amb cistitis, per tant la seva absència obliga a considerar un altre diagnòstic.

Es pot determinar també mitjançant l'estudi de l'esterasa leucocitària i els nitrits en una tira reactiva, encara que aquesta tècnica aporta menys informació que l'examen microscòpic.

Cultiu

Un urocultiu es considera positiu quan s'aïllen més de 10³ unitats formadores de colònies per mil·lilitre (UFC/ml) d'un sol microorganisme en presència de piúria. En dones amb cistitis no complicada d'origen extrahospitalari no és necessari realitzar l'urocultiu abans d'iniciar la teràpia ni després de la finalització del tractament, excepte en les recidives precoces.

L'urocultiu es realitza a partir d'una mostra d'orina recollida a primera hora del matí, o si no és possible d'una mostra d'orina que hagi estat en la bufeta com a mínim 4 hores. En pacients amb pielonefritis aguda es realitza també un antibiograma

En el cas que l'urocultiu sigui negatiu cal tenir en compte els següents punts: tractament antibiòtic previ, micció recent, obstrucció ureteral, o infecció per un microorganisme "exigent" o de creixement lent.

Aproximadament un 20-30% dels pacients amb pielonefritis pateixen bacterièmia, per aquesta raó també es realitza un hemocultiu.

S'ha de realitzar un antibiograma del microorganisme aïllat.

1.10.5. Sensibilitat antimicrobiana

Els antimicrobians són substàncies químiques naturals o sintètiques que tenen la capacitat d'inhibir el creixement i/o destruir els microorganismes. La seva acció es desenvolupa a baixes concentracions que no provoquen toxicitat en l'ésser humà. Sovint ens referim a ells com a antibiòtics.

Quinolones ⁹⁹⁻¹⁰²

Les quinolones i fluoroquinolones (Taula 9) tenen com a dianes dos enzims essencials per a la replicació de l'ADN: la DNAgirasa i la topoisomerasa IV, respectivament.

La DNAgirasa és un tetràmer compost per dues subunitats GyrA i dues subunitats GyrB. És l'únic enzim bacterià que introdueix super-enrotllament negatiu en l'ADN, important per a l'inici de la replicació.

La topoisomerasa IV és estructuralment similar i es compon de dues subunitats de ParC i dues de ParE. ParC és homòloga a GyrA, i ParE a GyrB. La topoisomerasa IV actua en els estadis finals de la replicació, permetent la separació de les dues cadenes germanes.

Les quinolones i fluoroquinolones inhibeixen aquests enzims estabilitzant el complex ADN-DNAgirasa o el complex ADN-topoisomerasa IV, respectivament. En el primer cas es bloqueja el moviment de la forca de replicació de forma irreversible. En *E. coli*, la DNAgirasa és la primera diana de l'activitat de la quinolona, i la topoisomerasa IV és la segona diana de l'activitat de les fluoroquinolones.

Taula 9. Classificació de les quinolones i fluoroquinolones

Quinolones	Àcid Nalidíxic Àcid Pipemídric
Fluoroquinolones	Norfloxacina Ciprofloxacina Ofloxacina Levofloxacina Moxifloxacina

Mecanismes de resistència

a) Mutacions cromosomals

En soques d'*E. coli* aïllades de mostres clíniques les dues primeres mutacions tenen lloc, en la majoria dels casos, en la subunitat Gyr A de l'ADNgirasa. Les mutacions més freqüents en GyrA (Taula 10) són a prop del lloc actiu Tyr122 on l'ADN s'uneix a la DNA girasa, entre l'aminoàcid 67 fins 106, i s'anomena regió determinant

de la resistència a quinolones (QRDR, *quinolone resistance-determining region*). La tercera i quarta mutació tenen lloc en la subunitat ParC de la topoisomerasa IV.

Taula 10. Mutacions més freqüents en la subunitat GyrA de l'ADNgirasa d'*E. coli*

Posició	Mutació
Serina posició 83	Triptofan
Serina posició 83	Leucina
Àcid aspàrtic 87	Valina
Àcid aspàrtic 87	Gly

b) Alteració de la quantitat o tipus de porines en la membrana externa

c) Resistència plasmídica (poc important)

Trimetoprim-sulfametoxazole

Trimetoprim (TMP) i sulfonamides (SULs) són agents antibacterians sintètics. Administrats conjuntament tenen un ampli espectre antibacterià, incloent: *E. coli* i altres membres de la família *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*), entre d'altres.

Resistència al trimetoprim

TMP és un inhibidor competitiu de l'enzim dihidrofolat reductasa (DHFR), essencial per a la cèl·lula.

La resistència a TMP pot ser deguda a tres mecanismes:

- transposó Tn7 de localització cromosòmica
- mutacions puntuals en el gen DHFR, donen lloc baixos nivells de resistència es relacionen amb la incapacitat de metilar l'àcid deoxiuridilic a àcid timidílic per part del bacteri; i fent que calgui un aport extern de timina.
- mutacions cromosòmiques en el gen de DHFR, que incrementen la K_i de l'antimicrobià. Això es pot combinar amb mutacions dels reguladors de l'enzim, donant lloc a alts nivells de resistència a TMP.

Resistència a les sulfonamides

L'enzim dihidropterat sintasa (DHPS) catalitza la formació de l'àcid dihidropteròic en el bacteri. Les sulfonamides actuen com a inhibidors competitius de la DHPS bloquejant la biosíntesi del folat.

La resistència a sulfonamides pot ser deguda a dos mecanismes:

- mutacions cromosòmiques en el gen *dhps*, concretament la substitució del residu fenilalanina a la posició 28 per un residu de isoleucina.
- recombinació en el punt de mutació, inserint 6 nucleòtids.

2. Objectiu

L'objectiu global del projecte és el de caracteritzar el potencial virulent de les soques d' *E. coli*, interrelacionant el grup filogenètic del qual provenen, els factors de virulència que contenen, la resistència als antibiòtics i les seves dinàmiques poblacionals. Amb aquest objectiu s'han dissenyat i realitzat els següents estudis, cadascun d'ells amb els seus objectius concrets:

ESTUDI 1: Caracteritzar els factors de virulència i el grup filogenètic de soques d'*E. coli* procedents de mostres clíniques de pacients amb diferents patologies.

ESTUDI 2: Avaluar la relació entre la resistència a quinolones, fluoroquinolones i trimetoprim/sulfametoxazole, el potencial virulent i el grup filogenètic de soques d'*Escherichia coli*, provinents de mostres clíniques.

ESTUDI 3: Conèixer l'estructura de les poblacions intestinals d' *E. coli* en dones sanes, per posteriorment poder-la comparar amb la de les dones amb infeccions urinàries causades per aquest mateix bacteri.

ESTUDI 3: Conèixer l' estructura de les poblacions fecals d' *E. coli* en dones amb infecció urinària, analitzant la seva relació amb la soca causant de la infecció. Analitzar les diferències entre les poblacions fecals d' *E. coli* en dones sanes i en dones amb infecció urinària.

2.1. ESTUDI 1

La determinació dels factors de virulència i la filogènia de les soques d'*Escherichia coli* causants d'infeccions extraintestinals, com per exemple infecció urinària, colangitis, meningitis i bacterièmia ha estat objecte d'estudi per a molts autors i durant molts temps ^{20,43,120-125}. La majoria de soques d'*E. coli* causants d'aquestes infeccions en pacients sense factor locals o generals afavoridors d'infecció pertanyen al grup filogenètic B2 ³, i acumulen un bon nombre de factors de virulència ^{10,20,122,123,126}. Per tant, aquestes soques d'*E. coli* tenen un elevat perfil virulent i s'han anomenat *Escherichia coli* patògena extra-intestinal (ExPEC, *extra intestinal pathogenic E. coli*) ^{10,122}. Tot i així, encara hi ha molts dubtes al voltant del paper que

cada factor de virulència juga en les diferents patologies o la capacitat patogènica de soques d'*E. coli* no derivades del grup filogenètic B2 en un context clínic específic.

Objectius:

- 1.1. Determinar el grup filogenètic i factors de virulència d'*Escherichia coli* aïllada en pacients amb pielonefritis, bacterièmia urinària i bacterièmia d'origen no urinari en el nostre àmbit geogràfic.**
- 1.2. Conèixer si existeix cap factor de virulència que sigui determinant per causar una d'aquestes patologies.**

2.2. ESTUDI 2

Entre les soques d'*Escherichia coli* aïllades en mostres clíniques, els nivells de resistència als antimicrobians s'ha incrementat substancialment durant les darreres dècades, especialment en algunes àrees geogràfiques. En l'Hospital Vall d'Hebron de Barcelona, el 1987, el 57% de les soques d'*E. coli* aïllades en pacients amb infecció urinària eren resistents a l'ampicil·lina, el 31% al trimetoprim/sulfametoxazole, el 7% a la quinolona àcid pipemídric i cap a la fluoroquinolona norfloxacina. Però l'any 1995, l'aïllament de soques resistents va incrementar fins 63, 37, 20 i 15 % respectivament, l'any 2002 a 67, 36, 24 i 19 %, i l'any 2014 a 76, 39, 50 i 33 %, respectivament.

En un estudi nacional espanyol multi cèntric de l'any 2002 entre soques d'*E. coli* causants d'infecció urinària comunitària, la resistència a fluoroquinolones era del 20%, però variava significativament segons el sexe (28.9 % en homes vs. 19% dones), l'edat (7.1 % en pacients d'edat inferior als 40 anys, 15% en pacients d'edat compresa entre 41-60 anys, 29.2 % entre 61-80 anys i 33.7 % majors de 81 anys), tipus d'infecció urinària (24.8 % en infeccions complicades vs. 13.7% no complicades) i la regió geogràfica (9.2% a Galícia i Astúries vs. 33.3% a Aragó).

Alguns estudis suggereixen que les soques resistents són menys virulentes que les soques sensibles d'*E. coli*. Segons Johnson *et al.*¹²⁷, *E. coli* causant d'urosepsis en pacients sans amb un tracte urinari normal normalment són soques P fimbriades i sensibles als antimicrobians, mentre que aquelles soques d'*E. coli* causants d'urosepsis en pacients amb factors predisponents sovint són no P-fimbriades i resistents als antimicrobians. Aquest fet també es confirma en l'estudi realitzat per Picard *et al.*¹²⁸,

on les soques d'*E. coli* del grup filogenètic B2 són més sensibles als antimicrobians que les soques dels grups filogenètics A, B1 i D.

La relació entre resistència i virulència en *E. coli* és complexa. Per exemple, Manges *et al.* ¹²⁹ descriu un nou grup clonal d'*E. coli*, anomenat grup clonal A (CGA), que està molt associat a la resistència a trimetoprim/sulfametoxazole presentant un robust i característic perfil de virulència. Aquest grup clonal A es troba distribuït globalment de forma molt heterogènia, afecta diferents hostes de la població, ha estat aïllat en diferents llocs anatòmics, i sembla que ha sorgit d'un clon epidèmic disseminat.

Objectius:

2.1. Aprofundir en el paper de la resistència en relació al grup filogenètic i factors de virulència

2.2. Conèixer la prevalença del grup clonal A entre les soques d'*E. coli* resistents a trimetoprim/sulfametoxazole

2.3. ESTUDI 3

E. coli és el microorganisme predominant de la flora intestinal, i alhora l'agent més freqüent causant d'infecció extraintestinal. Les soques d'*E. coli* que causen la majoria d'infeccions extraintestinals deriven principalment del grup filogenètic B2 i en menys mesura del grup D. Les soques ExPEC presenten diferents factors de virulència com adhesines, toxines, sideròfors i polisacàrids recobrint la superfície del microorganisme, que poden estar codificats en elements genètics mòbils, com plasmidis, bacteriòfags i illes de patogenicitat. En canvi, les soques comensal d'*E. coli* deriven principalment dels grups filogenètics A i B1, i normalment manquen de factors de virulència.

La composició de la població fecal d'*E. coli* se suposa important en la patogènesi de les infeccions extraintestinals. Malgrat això, la població d'*E. coli* en l'intestí tant en dones sanes com en dones amb infecció urinària, ha estat poc estudiada ^{45,46,130,131}. Pocs estudis han avaluat la prevalença de cada grup filogenètic d'*E. coli* o han determinat si els clons de diferents grups filogenètics representen la població dominant o minoritària de la flora intestinal.

Objectius:

3.1. Conèixer els factors de virulència i el grup filogenètic de les diferents soques d'*E. coli* aïllades en mostres fecals de persones sanes.

2.4. ESTUDI 4

La infecció urinària és un problema comú de les dones i costós per a la seva salut. Usualment és causada per *Escherichia coli* ¹³². La soca d'*E. coli* causant d'aquesta infecció sovint formar part de la flora fecal de les dones en el mateix moment de l'episodi ^{133,134}. Aquest fet ha suggerit la hipòtesi fecal-perianal-uretral en la patogènesi de la infecció urinària, que postula que la mateixa flora fecal de l'hoste serveix com a reservori extern de les soques d'*E. coli* que emergiran per causar infecció urinària ^{134,135}.

Aquest fenomen, i el coneixement de que els antígens O més comuns entre les soques d'*E. coli* causants d'infecció urinària són també els més prevalents entre les soques fecals d'*E. coli* en persones sanes, ha suggerit la teoria de la prevalença, la qual postula que la infecció urinària té lloc quan una soca d'*E. coli* fecal es troba en el lloc correcte, en el moment adequat i, en suficient nombre per entrar al tracte urinari i ser el causant de la infecció ¹³⁶. En canvi, l'elevada prevalença, estadísticament significativa, del grup filogenètic B2, certs antígens O, i factors de virulència com adhesines, sideròfors, toxines i recobriment polisacàrid entre les soques d'*E. coli* causants d'infecció urinària, comparada amb la de les soques fecals d'*E. coli* de les persones sanes, ha suggerit la teoria de l'especial patogenicitat ¹³⁷. Aquesta hipòtesi postula que la patogènesi de la infecció urinària és conduïda per l'increment de la capacitat de virulència de la soca causant de la infecció, més que no pas una acció deguda a la quantitat de soques presents. El terme "*E. coli* uropatògena" sovint s'utilitza per descriure les soques que presumiblement tenen major capacitat de causar infecció urinària ¹³⁸. Com que aquestes soques poden causar infecció també en altres llocs extraintestinals no-urinàris, també s'han anomenat *E. coli* patogènica extra-intestinal (ExPEC) ⁵.

De tota manera, la majoria de dades epidemiològiques que recolzen la hipòtesi de l'especial patogenicitat sorgeixen de la comparació entre soques d'*E. coli* aïllades en pacients amb infecció urinària i soques d'origen intestinal d'hostes no relacionats ^{7,139}. Aquest fet, deixa oberta la possibilitat que existeixin més diferències ambientals i entre hostes, que no pas diferències relatives a la virulència *per se*, que expliquessin realment les diferències bacterianes observades. A més a més, molts estudis experimentals avaluen la importància dels putatius factors de virulència (per exemple,

fímbria P, factor citotòxic necrotitzant, càpsula o liposacàrid) en relació a la capacitat de la soca de causar infecció urinària ^{29,30}, o altres tipus d'infecció extraintestinal. Altres estudis han documentat que un simple tret bacterià no necessàriament juga un paper decisiu en la virulència ¹⁴¹⁻¹⁴⁴.

Objectius:

4.1. Aïllar en un mateix hoste la soca d'*E. coli* causant d'infecció urinària i els diferents clons d'*E. coli* presents en la mostra fecal en el mateix moment de la infecció i previ a l'administració d'antimicrobians.

4.2. Conèixer els factors de virulència i el grup filogenètic de les diferents soques d'*E. coli* aïllades en un mateix hoste.

4.3. Comparar el perfil de virulència de la soca d'*E. coli* causant d'infecció urinària amb la població fecal del mateix hoste.

4.4. Comparar els perfils de virulència de les poblacions fecals d' *E. coli* de persones sanes amb les poblacions fecals (en el mateix moment de la infecció i previ a l'administració d'antimicrobians) de pacients amb cistitis.

3. Material i mètodes

Totes les soques d' *Escherichia coli* van ser aïllades i seleccionades en el Servei de Microbiologia de l'Hospital Universitari Vall d' Hebron de Barcelona. La simptomatologia, la inclusió en les categories clíniques estudiades i l'existència o no de factors locals o generals afavoridors de la infecció van ser determinats mitjançant una acurada revisió de les històries clíniques.

3.1. Pacients i soques d' *Escherichia coli* corresponents a l' ESTUDI 1.

Caracteritzar els factors de virulència i el grup filogenètic de soques d'*E. coli* procedents de mostres clíniques de pacients amb diferents patologies.

S'han analitzat un total de 150 soques d' *E. coli* procedents de 50 pacients amb pielonefritis, 50 pacients amb bacterièmia d'origen urinari i 50 pacients amb bacterièmia d'origen no urinari.

Dels 50 pacients amb pielonefritis i hemocultiu negatiu, 11 eren homes i 39 dones, amb una mitja d'edat de 31 anys. Vint-i-nou (58%) presentaven factors locals o generals afavoridors d'infecció urinària i tres (6%) presentaven immunodeficiència.

Dels 50 pacients amb bacterièmia d'origen urinari 17 eren homes i 33 dones amb una mitja d'edat de 65 anys. D'aquests pacients, 26 (52%) presentaven factors locals o generals afavoridors d'infecció urinària i 13 (26%) presentaven immunodeficiència.

Dels 50 pacients amb bacterièmia d'origen no urinari 29 eren homes i 21 dones amb una edat mitja total de 47 anys. En 18 pacients l'origen de la bacterièmia va ser el tracte gastrointestinal o abdominal, en 11 el tracte genital femení, en 4 de l'aparell respiratori, en 2 la pell, i en un pacient un catèter intravenós. En els altres pacients, tot i que l'origen no corresponia a l'urinari va ser difícil de definir, 12 patien un càncer avançat i 2 malalties terminals. Un total de vint-i-nou pacients (58%) presentaven immunodeficiència.

Les 50 soques d' *E. coli* procedents de pacients amb pielonefritis van ser aïllades de l'orina, i les 100 les soques dels pacients amb bacterièmia van ser aïllades de la sang.

El sediment urinari, l'urocultiu i l'hemocultiu es van realitzar pels mètodes convencionals, descrits a la introducció. Les soques d'*E. coli* es van congelar a -80°C en brou Trypticase Soy amb un 5% de glicerol, fins a la pràctica dels diferents mètodes d'estudi.

En les 150 soques d'*Escherichia coli* es van estudiar els factors de virulència i el grup filogenètic mitjançant mètodes moleculars. També es va determinar la presència dels antígens O més comuns en la nostra àrea. La metodologia emprada es detalla en l'apartat "Mètodes moleculars" de *Material i mètodes*.

3.2. Pacients i soques d' *Escherichia coli* corresponents a l' ESTUDI 2

Avaluar la relació entre la resistència a quinolones, fluoroquinolones i trimetoprim/sulfametoxazol, el potencial virulent i el grup filogenètic de soques d'*Escherichia coli* procedents de mostres clíniques.

S'han analitzat un total de 150 soques d' *E. coli* procedents de 50 pacients amb cistitis, 50 pacients amb pielonefritis i 50 pacients amb bacterièmia d'origen urinari.

Les característiques dels pacients es detallen en la Taula 11.

Les 50 soques d' *E. coli* procedents de pacients amb cistitis i les 50 procedents de pacients amb pielonefritis van ser aïllades de l'orina, i les 50 soques procedents de pacients amb bacterièmia d'origen urinari van ser aïllades de la sang.

El sediment urinari, l'urocultiu i l'hemocultiu es van realitzar pels mètodes convencionals, descrits a la introducció. Les soques d'*E. coli* es van congelar a -80°C en brou Trypticase Soy amb un 5% de glicerol, fins a la pràctica dels diferents mètodes d'estudi.

Taula 11. Característiques clíniques dels pacients corresponents a l'ESTUDI 2.

		Cistitis	Pielonefritis	Bacterièmia d'origen urinari
Número total de pacients		50	50	50
Home		0	11	17
Dona		50	39	33
Mitja edat del grup (anys)		39	31	65

En les 150 soques d' *Escherichia coli* es van estudiar els factors de virulència i el grup filogenètic mitjançant mètodes moleculars, i es va determinar la presència dels antígens O més comuns en la nostra àrea. La sensibilitat antimicrobiana a quinolones, fluoroquinolones i trimetoprim-sulfametoxazole es va determinar per el mètode de disc difusió.

3.2.1. Estudi del grup clonal A entre les soques d'*E. coli* resistents a trimetoprim-sulfametoxazol

Del total de les 150 soques d'*E. coli* estudiades, 44 mostraven resistència a trimetoprim-sulfametoxazol. En aquestes 44 soques es va analitzar si pertanyien al grup clonal A (CGA, *clonal group A*) descrit per Johnson J.R. *et al.* ¹⁴⁵, mitjançant la determinació per PCR d'un polimorfisme específic d'un únic nucleòtid (SNP, *single nucleotide polymorphism*). Breument, els encebadors utilitzats CGAr (50-CGTGCATCGCCGTTGGAAAG-30) i CGAf (50-GCTATCTGGCAGACT-30) detecten el polimorfisme de *C288T CGA-specific fumC SNP*. L'amplificació del producte és de 175 parells de bases. Les soques d'*E. coli* de referència 46 i 47 (ECOR, *E. coli reference strains*) s'utilitzaren com a controls negatiu i positiu, respectivament.

La relació clonal entre les 46 soques d'*E. coli* (44 corresponents a l'estudi i les dues soques controls (ECOR47 i J722) s'ha realitzat mitjançant el mètode molecular d'ERIC-PCR (enterobacterial repetitive intragenic consensus) descrita en l'apartat "Anàlisi clonal" de *Material i mètodes*.

3.3. Pacients i soques d' *Escherichia coli* corresponents a l' ESTUDI 3:

Conèixer l'estructura de les poblacions intestinals d' *E. coli* en dones sanes, per posteriorment poder-la comparar amb la de les dones amb infeccions urinàries causades per aquest mateix bacteri.

Un total de 39 dones de l'àrea metropolitana de Barcelona van ser convidades a participar en l'estudi, amb una mitja d'edat de 29,7 anys (rang, 17 - 50), segons els següents criteris:

- a) edats compreses entre 17 a 50 anys

- b) no haver pres antibiòtics durant els 21 dies anteriors a la recolecció de la mostra fecal.
- c) no haver patit un episodi d'infecció urinària en els darrers dos mesos.

3.3.1. Mostra fecal

La mostra fecal va ser recollida mitjançant la introducció al recte d'un escovilló (Amies Transport Medium -Venturi Transystem, Brescia, Italy). Al laboratori l'escovilló es va inocular en solució salina estèril, es va agitar i posteriorment es va diluir i sembrar en una placa d'agar MacConkey mitjançant un sembrador automàtic en espiral (Figura 13). Després de la incubació a 35-37C durant 24-48h, es van seleccionar a l'atzar un total de 30 colònies sospitoses de ser *E. coli*, que posteriorment es van identificar mitjançant mètodes convencionals¹⁴⁶, per a confirmar que eren *E. coli*. Les soques d'*E. coli* es congelaren a -80°C en brou Trypticase Soy amb un 5% de glicerol fins a la pràctica dels diferents mètodes d'estudi.

3.4. Pacients i soques d' *Escherichia coli* corresponents a l' ESTUDI 4

Conèixer l' estructura de les poblacions fecals d' *E. coli* en dones amb infecció urinària, analitzant la seva relació amb la soca causant de la infecció. Analitzar les diferències entre les poblacions fecals d' *E. coli* en dones sanes i en dones amb infecció urinària.

Les dones ateses al Servei d'Urgències de l'Hospital Vall d'Hebron que presentaven cistitis no complicada van ser convidades a participar en l'estudi. En total es van incloure 42 dones, que complien els següents criteris:

- a) edats compreses entre 15 i 65 anys
- b) evidència clínica i evidència microbiològica de cistitis no complicada
- c) no haver estat en tractament d'antibiòtic durant els 21 dies anteriors
- d) urocultiu amb un únic microorganisme
- e) presència d' *E. coli* en la mostra fecal recollida prèviament a l'administració de l'antibiòtic.

3.4.1. Mostra fecal

L'aïllament de soques d' *E. coli* procedents de la femta es va realitzar mitjançant la mateixa metodologia que en l'ESTUDI 3. Breument, sempre que ha estat possible, es varen seleccionar un total de 30 colònies a partir de la sembra d'una dilució de la mostra de l'escovilló rectal (Figura 13).

En cada subjecte, es va estudiar la clonalitat de les 30 soques d' *E. coli* mitjançant ERIC-PCR. Un representat de cada clon aïllat es va seleccionar per a determinar el grup filogenètic i els factors de virulència. En el cas, que en les mostres d'un mateix subjecte hi haguessin soques amb diferent perfil d' ERIC-PCR però amb el mateix perfil de virulència i pertanyents al mateix grup filogenètic es va reavaluar la seva clonalitat mitjançant PFGE.

Figura 13. Placa d'agar MacConkey sembrada amb la mostra mitjançant un sembrador automàtic en espiral



3.4.2. Relacions clonals entre la soca urinària i les soques fecals d' *E. coli*

Mitjançant ERIC-PCR es va estudiar la relació clonal entre la soca d' *E. coli* causant de cistitis (aïllada a l'orina) i les 30 colònies aïllades de cada mostra fecal

Únicament el clon urinari i els diferents clons fecals observats en a cada pacient es varen seleccionar per realitzar els posteriors estudis moleculars (factors de virulència i grup filogenètic).

A les soques d' *E. coli* amb un mateix perfil de factors de virulència, el mateix grup filogenètic però que presentaven una similaritat < 93% en el perfil d'ERIC-PCR, i per

tant inicialment es van considerar com a clons diferents, es va tornar a realitzar l'anàlisi de la clonalitat amb una altra tècnica, PFGE (veure apartat "Anàlisi clonal" de *Material i mètodes*). Després de l'anàlisi dels perfils de PFGE, aquelles soques d' *E. coli* que presentaven perfils indistingibles (coeficient de similaritat de Dice 100%) van ser considerades com pertanyents al mateix clon.

3.4.3. Definicions

a) Clon

En epidemiologia, el terme "clon" fa referència al grup d'aïllaments relacionats per el fet de pertànyer a un ancestre comú.

b) Clon dominant i mostres pauciclonsals o multiclonsals

El clon més abundant en cada mostra fecal s'ha definit com a clon dominant, independentment de la seva absoluta prevalença, i assumint que la prevalença clonal de les soques pot variar diàriament ¹⁴⁷. Basant-nos en el nombre de soques d'*E. coli* identificades en les mostres fecals per a simplificar la presentació i l'anàlisi amb els dos treballs que estudien la població fecal en el moment de l' infecció urinària, les mostres han estat classificades arbitràriament com a pauciclonsal (presència d'almenys 4 clons d' *E. coli* per mostra) o multiclonsal (presència de més de 5 clons d' *E. coli* per mostra).

c) Grups ecològics

S'han diferenciat tres grups ecològics d'hostes, en funció de la relació entre del clon urinari i els clons fecals ¹⁴⁸. En el grup I, en la mostra fecal només s'ha aïllat el clon urinari (anomenat clon urino - fecal); en el grup II en la mostra fecal s'ha aïllat tant el clon urinari (clon urino - fecal) com altres clons (clons només - fecals); i en el Grup III la mostra fecal presentava un o més clons (clons només - fecals) diferents del clon aïllat a l'orina (clon només - urinari), i l'absència del clon urinari en la mostra fecal.

3.5. Estudi de la sensibilitat als antimicrobians

La sensibilitat a les fluoroquinolones i trimetoprim-sulfametoxazole es va determinar mitjançant la tècnica de disc difusió, segons les recomanacions de la CLSI ¹⁴⁹ utilitzant discs Neo-Sensitabs (Rosco, Taastrup, Denmark). Totes les soques estudiades es varen enfrontar a trimetoprim-sulfametoxazole, les aïllades en sang a ciprofloxacina, i les aïllades en orina àcid pipemídic i norfloxacina. Breument, les soques d'*E. coli* es varen sembrar en agar Muller-Hinton a partir d'una concentració

McFarland 0.5 en sèrum fisiològic i es varen incubar a 37°C durant 18 h. La interpretació antimicrobiana es va realitzar segons els valors de la Taula 12.

Taula 12. Interpretació de la sensibilitat antimicrobiana segons el diàmetre d'inhibició del creixement, valors recomanats per la CLSI.

Neo-Sensitabs	Potència (µg)	Diàmetre (mm)		
		Sensible	Intermig	Resistent
Quinolonas:				
Àcid pipemídic	30	≥ 20	19-17	≤ 16
Fluoroquinolonas:				
Ciprofloxacina	10	≥ 20	19-17	≤ 16
Norfloxacina	10	≥ 16	15-14	≤ 13
Trimetropim-sulfametoxazole	5,2+240	≥ 28	27-24	≤ 23

3.6. Mètodes moleculars

3.6.1. Factors de virulència:

Es varen estudiar 15 gens de virulència, incloent: adhesines *papA* (subunitat estructural de les fímbrics P), *papG* al·lel I, II, i III (adhesines de les fímbrics P), *fim H* (adhesina de la fímbrica tipus 1), *afa/draBC* (adhesines Dr-binding), i *sfa/focDE* (regió consens de la fímbrica S i F1C); toxines: *hly* (hemolisina) i *cnf1* (factor citotòxic necrotitzant); sideròfors *iut A* (aerobactina) i *fyuA* (yersinbactina); càpsula específica del grup II *KpsMT* (K1, K5, K12, etc.); resistència associada al sèrum *traT*; invasió de l'endoteli cerebral *ibeA*; i *malX*, una regió codificant a prop de l'extrem terminal d'una illa de patogenicitat de la soca d'*E. coli* CFT073. Les seqüències dels encebadors i els corresponents tamanyos del producte amplificat es mostren en la Taula 13.

La detecció dels gens de virulència es va realitzar mitjançant cinc PCRs múltiples segons la següent distribució ²⁰:

- Pool 1: *malX*, *papA*, *fimH* i *ibeA*.
- Pool 2: *sfa/focDE*, *iutA*, *papG* al·lel III i *fyuA*
- Pool 3: *hlyA*, *papG* al·lel I* i *kpsMII**
- Pool 4: *traT* i *papG* al·lel II
- Pool 5: *afa/draBC** i *cnf1**

En cada *pool* es van incloure controls positius i negatius.

Les concentracions dels reactius en un volum final de 25µL eren les següents; 1x tampó de reacció, 2 Mm MgCl₂, 200 mM dNTPs, 2.5 U Taq Polimerasa (BIOLINE), i 0.8 mM dels encebadors corresponents, excepte els marcats amb un * que s'utilitzaren a una concentració de 0,3 µM. I 2 µL d'ADN lisat mitjançant ebullició a partir d'una colònia de la soca corresponent. La PCR es va realitzar amb un Termociclador GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystem). Les condicions de la PCR eren les següents: desnaturalització inicial: 95°C 12 min; 25 cicles: 94°C 30 seg, 63°C 30 seg, 68°C 3 min; i una extensió final a 72°C 10 min. La lectura es va realitzar en un gel d'agarosa al 2% en 1xTBE, tenyit amb bromur d'etidi a una concentració de 0.5µg/µL. El marcador de pesos moleculars correspon a 100 (pb).

Taula 13. Descripció dels encebadors utilitzats en la PCR per a detectar els determinants de virulència, i el grup filogenètic

Determinant de virulència	Gen	Seqüència dels encebador (5'-3')	Nom de l'encebador	Tamany del producte (pb)	Número accés al GenBank		
Adhesines	<i>Fimbria P</i>	<i>papA</i>	ATG GCA GTG GTG TCT TTT GGT G CGT CCC ACC ATAC GT GCT CTT C	PapA f PapA r	720	X61239	
		<i>papC</i>	GTG GCA GTA TGA GTA ATG ACC GTT A ATA TCC TTT CTG CAG GGA TGC AAT A	PapC f Pap C r	200		
		<i>pap G</i>					
		al-lel I	TCG TGC TCA GGT CCG GAA TTT TGG CAT CCC CCA ACA TTA TCG	Al-lel I f Al-lel I r	461	X61239	
		al-lel II	GGG ATG AGC GGG CCT TTG AT CGG CGG CCC AAG TAA CTC G	Al-lel II f Al-lel II r	190	M20181	
		al-lel III	GGC CTG CAA TGG ATT TAC CTG G CCA CCA ATT GAC CAT GCC AGA C	Al-lel III f Al-lel III r	258	X61238	
	<i>Fimbria tipus 1</i>	<i>fimH</i>	TGC AGA ACG GAT AAG CCG TGG GCA GTC ACC TGC CCT CCG GTA	FimH f FimH r	508	AJ225176	
	<i>Adhesina Dr</i>	<i>afa/draBC</i>	GGC AGA GGG CCG GCA ACA GGC CCC GTA ACG CGC CAG CAT CTC	Afa f Afa r	559	X76688	
	<i>Fimbria S i F1C</i>	<i>sfa/focDE</i>	CTC CGG AGA ACT GGG TGC ATC TTA C CGG AGG AGT AAT TAC AAA CCT GGC A	sfa 1 sfa 2	410		
	Toxines	<i>Hemolisina</i>	<i>hlyA</i>	AAC AAG GAT AAG CAC TGT TCT GGC T AAC ATA TAA GCG GTC ATT CCC GTC A	hly f hly r	1177	M10133
<i>Factor citotòxic necrotitzant</i>		<i>cnf</i>	AAG ATG GAG TTT CCT ATG CAG GAG CAT TCA GAG TCC TGC CCT CAT TAT T	cnf1 cnf2	498	X70607	
Sideròfors	<i>Aerobactina</i>	<i>iutA</i>	GGC TGG ACA TCA TGG GAA CTG G CGT CGG GAA CGG GTA GAA TCG	AerJ f AerJ r	300	X05874	
	<i>Yersinbactina</i>	<i>fyuA</i>	TGA TTA ACC CCG CGA CGG GAA CGC AGT AGG CAC GAT GTT GTA	FyuA f FyuA r	880	Z38064	
<i>Càpsula polisacàrida del grup II</i>	<i>kspMII</i>	GCG CAT TTG CTG ATA CTG TTG CAT CCA GAC GAT AAG CAT GAG CA	kps II f kps II r	272	X53819		
<i>Resistència al sèrum</i>	<i>traT</i>	GGT GTC GTG CGA TGA GCA CAG CAC GGT TCA GCC ATC CCT GAG	TraT f TraT r	290	J01769		
<i>Invasor de l'endoteli cerebral</i>	<i>ibeA</i>	AAG CAG GTG TGC GCC GCG TAC TGG TGC TCC GGC AAA CCA TGC	Ibe10 f Ibe10 r	170	AF289032		
<i>Marcador de l'illa de patogenicitat (PAI) I d'E. coli CFT073</i>	<i>malX, PAI</i>	GGA CAT CCT GTT ACA GCG CGC A TCG CCA CCA ATC ACA GCC GAA C	RPAi f RPAi r	930	AF003742		
Grup filogenètic	<i>ChuA</i>	GAC GAA CCA ACG GTC AGG AT TGC CGC CAG TAC CAA AGA CA	ChuA.1 ChuA.2	279	U67920		
	<i>YjaA</i>	TGA AGT GTC AGG AGA CGC TG ATG GAG AAT GCG TTC CTC AAC	YjaA.1 YjaA.2	211	U00096		
	<i>TspE4C2</i>	GAG TAA TGT CCG GGC ATT CA CGC GCC AAC AAA GTA TTA CG	TspE4C2.1 TspE4C2.2	152	AF222188		

3.6.2. Definicions

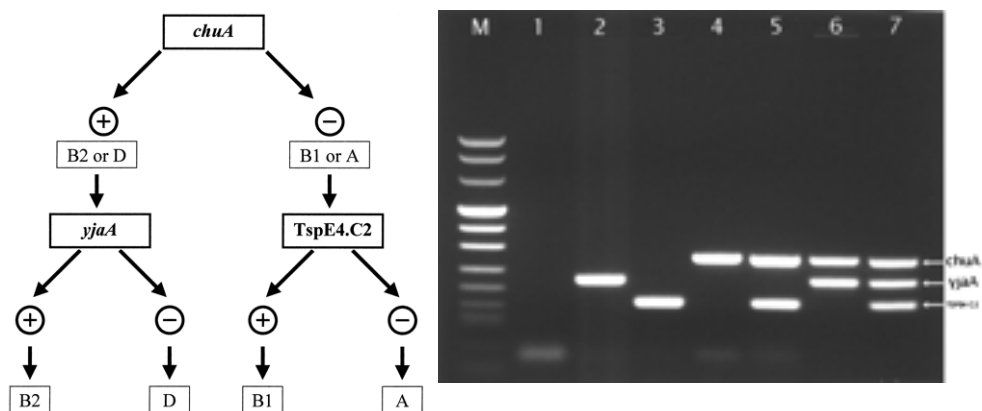
El grau de virulència és el nombre de gens de virulència detectats, amb els element *pap* comptabilitzats com a un únic tret.

3.6.3. Grup filogenètic

La determinació dels quatre grups filogenètics A, B1, B2 i D d'*E. coli* es va realitzar mitjançant una triple-PCR, descrita per Clermont et al. ¹⁵⁰ a partir de tres marcadors: *chuA*, gen necessari pel transport d'hemo en *E. coli* enterohemorràgic O157:H7; *yjaA*, gen identificat en *E. coli* K-12, de funció desconeguda; i un fragment d'ADN anònim anomenat TSPE4.C2 (Figura 13). La seqüència dels encebadors es mostra a la Taula 13.

Les concentracions dels reactius en un volum final de 20 µL van ser les següents: 1x tampó de reacció, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 2.5 U Taq Polimerasa (BIOLINE), i 1 µM dels encebadors corresponents. La PCR es va realitzar amb el Termociclador GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystem). Les condicions de la PCR van ser les següents, desnaturalització inicial a 94°C, 4 min; 30 cicles: 94°C 5s, 59°C 10s; i una extensió final a 72°C 7 min. La lectura es va realitzar en un gel d'agarosa al 3% en 1xTBE, tenyit amb 0.5 µg/µL Bromur d'Etidi. El marcador de pesos molecular correspon a 50 pb.

Figura 13 Arbre dicotòmic per a determinar el grup filogenètic d'*E. coli* segons el resultat de l'amplificació dels productes *chuA*, *yjaA* i el fragment TSPE4.C2.



3.7. Determinació dels antígens O

Els antígens O1, O2, O4, O6, O7, O18 i O83 es van seleccionar per ser els més prevalents en la infecció urinària en la nostra àrea¹⁵¹, i es van determinar mitjançant microaglutinació, utilitzant anticossos policlonals produïts al "Laboratorio de Referencia de *E. coli*" espanyol (LREC).

3.8. Anàlisi clonal

3.8.1. Anàlisi clonal mitjançant tècniques moleculars

E funció de l'estudi es van utilitzar diferents tècniques moleculars per a analitzar les propietats o polimorfismes genètics de les diferents soques d'*E. coli*.

La base d'aquestes tècniques són variables:

- a) l'anàlisi del nombre de còpies de determinades seqüències repetitives al llarg del cromosoma (ERIC-PCR - *Enterobacterial Repetitive Intragenic Consensus*-). En els genomes de tots els organismes existeixen seqüències d'ADN repetides que poden ser utilitzades per el disseny d'encebadors que amplifiquin la regió entre seqüències repetitives consecutives.
- b) l'estudi de restricció d'ADN cromosòmic (PFGE, - *Pulsed Field Gel Electrophoresis*-),

ERIC PCR

La relació clonal entre soques d'*E. coli* es va establir a partir del perfil d'ERIC generat utilitzant els encebadors ERIC1R and ERIC2¹⁵².(Taula 14) Les imatges del gel es varen capturar digitalment (Gel Compar II, version 3.0; Applied Maths). Les soques d' *E. coli* amb una similaritat de perfils d'ERIC $\leq 93\%$ es van considerar clons diferents.

Taula 14. Seqüència dels encebadors utilitzats per a la ERIC-PCR

ERIC 1R: 5' ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C 3' ; 30.7 nmols

ERIC 2R: 5' AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G 3' ; 47.7 nmols

PFGE

Les soques d' *E. coli* aïllades en un mateix pacient que presentaven el mateix perfil de factors de virulència i el mateix grup filogenètic però que presentaven una similaritat < 93% en el perfil d'ERIC-PCR, i per tant inicialment s'havien considerat com a clons diferents, es van re-analitzar mitjançant l'electroforesi de camp polsant després de la digestió de l'ADN total amb l'enzim de restricció *XbaI* ¹⁵³. En l'anàlisi dels perfils de PFGE, aquelles soques d' *E. coli* que presentaven perfils indistingibles (coeficient de similaritat de Dice 100%) van ser considerades com pertanyents al mateix clon.

3.9. Mètodes estadístics

En tots els casos el valor de $p < 0,05$ es considera estadísticament significatiu.

Test χ^2 Pearson

Per a la comparació de la freqüència o proporcions de variables dicotòmiques agrupades en dos o més grups s'ha utilitzat el Test χ^2 Pearson.

Test de Fisher

La comparació de les proporcions de dues variables dicotòmiques s'ha realitzat fent servir el test de Fisher en el cas que les mostres a estudiar siguin petites (al menys el 80% de les cel·les en una taula de contingència siguin majors de 5) i no es compleixen les condicions necessàries per aplicar el Test χ^2 Pearson.

U Mann-Whitney

Per a contrastar la distribució del grau de virulència entre dues poblacions diferents (per exemple entre soques d' *E. coli* del grup filogenètic A i del grup B1), o bé si el grau de virulència tendeix a ser superior en un dels dos grups s'utilitza la U de Mann-Whitney (proves de caràcter no - paramètric).

Model de regressió múltiple

S'ha utilitzat aquest model per a estudiar la possible relació entre les variables independents (predictores o explicatives) i una variable dependent (criteri o resposta). Les variables utilitzades com a independents o dependents varien en funció de l'estudi 3 o 4 del present treball.

Anàlisi de coordenades principals

Les relacions de similitud entre les diferents soques d' *E. coli* respecte al perfil de virulència s'ha estudiat mitjançant l'anàlisi de coordenades principals. L'anàlisi de coordenades principals s'ha aplicat al conjunt de factors de virulència per a simplificar els grups de comparacions. Els valors de cada clon dels tres primers eixos de l'anàlisi de coordenades principals, els quals representen la major variances entre el conjunt de les dades, s'ha utilitzat en un anàlisi de variances per a diferenciar entre clons urinàris i clons només-fecals.

Anàlisi de correspondència múltiple

És una tècnica descriptiva, l'objectiu de la qual és resumir una gran quantitat de dades en un nombre reduït de dimensions, amb la menor pèrdua d'informació possible.

S'analitza, des d'un punt de vista gràfic, les relacions de dependència i independència d'un conjunt de variables categòriques a partir de les dades d'una taula de contingència de variables qualitatives. En l'eix F1 s'inclouen tantes files com clons aïllats, i en l'eix F2 s'inclouen tantes columnes com factors de virulència o altres categories estudiades en cada clon.

4. Resultats i discussió

4.1. Estudi 1

Caracteritzar els factors de virulència i el grup filogenètic de soques d'*E. coli* procedents de mostres clíniques de pacients amb diferents patologies

En aquest estudi s'avaluen les característiques virulentes d'una nova col·lecció de soques d' *Escherichia coli* aïllades en pacients amb pielonefritis, bacterièmia d'origen urinari i d'altres orígens. Fins a la data, poques col·leccions de soques d'*E. coli* causant de bacterièmia havien estat caracteritzades ^{20,122,125,154-156}. Hi ha poques dades disponibles pel que fa referència a les característiques virulentes de les soques d'*Escherichia coli* aïllades en pacients amb bacterièmia d'origen urinari, o les associacions entre particulars determinants i la invasivitat en aquesta condició clínica. En concret, es desconeixia si certs determinants de virulència permeten als bacteris envair el torrent sanguini una vegada que han arribat al ronyó, i si ho fan, si aquests trets particulars són exclusius de les soques causants de bacterièmia urinària o són comuns a totes les soques productores de bacterièmia. Otto et al.⁴³ van comparar els genotips *pap* i la seva expressió fimbrial en *E. coli* causants de bacterièmia i d'infecció urinària febril no bacterièmica, i van concloure que *papG_{IA2}* era l'únic determinant significativament més freqüent entre els *E. coli* causants de bacterièmia. Wang et al.¹²⁵ van documentar que l'al·lel II de *papG*, *hlyA*, *cnf1* i *iutA* eren significativament més prevalents en soques d'*E. coli* causants de bacterièmia en pacients amb infecció del tracte urinari que en soques productores de bacterièmia en pacients amb colangitis aguda.

Distribució de les soques estudiades en els diferents grups filogenètics, perfils de virulència i presència d'antigen O associat a la infecció urinària

Del total de les 150 soques d' *Escherichia coli* estudiades, el grup filogenètic B2 va ser el més freqüent amb un total de 95 soques (63%), seguit del grup D amb 29 soques (19%) (Taula 14). La distribució del grup filogenètic entre els tres síndromes clínics és molt similar; tot i que les soques d' *E. coli* causants de bacterièmia d'origen no urinari es troben menys representades en els grups B2 i més en el grup D (52% i 24%, respectivament).

De la mateixa manera que han documentat altres autors, el grup filogenètic B2 és el més prevalent en els aïllats d'*E. coli* causants dels 3 síndromes clínics, sense diferències significatives. La prevalença del 62% entre les 100 soques causants de bacterièmia independentment de l'origen és gairebé igual al 65% documentat per Johnson et al.¹²²(2002) entre 182 *E. coli* aïllades de sang de diverses fonts de bacterièmia, mentre que el grup D va ser més prevalent en el nostre estudi (19% vs. 12%). En total, el 82% dels aïllaments derivaren dels grups filogenètics B2 i D, un fet que reforça el suggeriment^{8,157} que aquests grups representen llinatges patògens, no només per a la majoria de soques d'*E. coli* uropatògenes, sinó també per a la majoria de soques d'*Escherichia coli* extraintestinals (ExPEC). Les petites diferències observades en els diversos estudis sobre la distribució de ExPEC entre els grups no-B2 podria reflectir les divergències en l'evolució geogràfica entre regions i continents, o diferències en les característiques associades a l'hoste.

Taula 14. Distribució del grup filogenètic i dels gens de virulència entre les 50 soques d'*E. coli* aïllades en l'orina de pacients amb pielonefritis i les 100 soques d'*E. coli* aïllades en la sang de pacients amb bacterièmia (50 d'origen urinari i 50 d'altres orígens).

	Totes les soques (n = 150)	Bacterièmia urinària (n = 50)	Pielonefritis (n = 50)	Altres bacterièmies (n = 50)	<i>P</i> ^a
Grup filogenètic					
A	18 (12)	5 (10)	4 (8)	9 (18)	
B1	8 (5)	2 (4)	3 (6)	3 (6)	
B2	95 (63)	36 (72)	33 (66)	26 (52)	
D	29 (19)	7 (14)	10 (20)	12 (24)	
Factor de virulència					
<i>malX</i>	103 (69)	35 (70)	38 (76)	30 (60)	
<i>papA</i>	98 (65)	39 (78)	35 (70)	24 (48)	0,005 ^b
<i>papG</i>					
al·lel II	74 (49)	33 (66)	29 (58)	12 (24)	<0,001 ^b
al·lel III	35 (23)	14 (28)	7 (14)	14 (28)	
<i>fimH</i>	146 (97)	50 (100)	50 (100)	46 (92)	
<i>afa/draBC</i>	4 (3)	1 (2)	2 (4)	1 (2)	
<i>sfa/foc DE</i>	63 (42)	28 (56)	14 (28)	21 (42)	0,018 ^c
<i>kpsMII</i>	110 (73)	38 (76)	37 (74)	35 (70)	
<i>hlyA</i>	60 (40)	26 (52)	15 (30)	19 (38)	
<i>cnf1</i>	47 (31)	22 (44)	11 (20)	14 (28)	0,05 ^c
<i>traT</i>	103 (69)	31 (62)	40 (80)	32 (64)	
<i>iutA</i>	105 (70)	39 (78)	34 (68)	32 (64)	
<i>fuyA</i>	126 (84)	44 (88)	43 (86)	39 (78)	
<i>ibeA</i>	22 (15)	5 (10)	6 (12)	11 (22)	
Antígens O	77 (51)	28 (56)	25 (50)	24 (48)	

Nota: Les dades corresponen al nombre (%) d'aïllats. *malX* = marcador de l'illa de patogenicitat de la soca d'*E. coli* CFT073; *papA* = subunitat estructural de la fimbria P; *papG* = molècula d'adhesina de la fimbria P (l'al·lel G I no s'ha detectat); *fimH* = fimbria tipus 1; *afa/draBC* = adhesines Família DR; *sfa/focDE* = fimbria S i F1C; *kpsMII* = càpsula polisacàrida del grup II; *hlyA* = hemolisina; *cnf1* = factor citotòxic necrotitzant; *traT* = proteïna de membrana associada a la resistència al sèrum; *fuyA* = receptor yersinbactina; *iutA* = aerobactina; *ibeA* = invasor de l'endoteli cerebral; Antígens O = O1, O2, O4, O6, O7, O 18 I O83.

^a El test X² de Pearson s'ha utilitzat per a comparar la distribució entre els grups filogenètics i factors de virulència. Només es mostren els resultats estadísticament significatius.

^b Bacterièmia d'origen urinari i pielonefritis vs. Bacterièmies d'altres orígens

^c Bacterièmia d'origen urinari vs. pielonefritis

El factor de virulència més prevalent entre les 150 soques va ser *fimH*, present en el 97 % de soques d'*E. coli*. Les úniques 4 soques on no es detectà *fimH* van ser aïllades en pacients amb bacterièmia no urinària. Noranta-vuit (65%) soques d'*E. coli* presentaven almenys un al·lel *papG*. L'al·lel I no es va detectar en cap soca. En 63 (42%) soques d'*E. coli* es va detectar únicament l'al·lel II de la subunitat *papG* de les fimbries P, en 24 (16%) de les soques únicament es va detectar l'al·lel II, i en 11 soques (7,3%) es van detectar ambdós al·lells. Els factors de virulència *malX*, *kpsMII*, *traT*, *iutA*, and *fyuA* es trobaren presents en la majoria de soques d'*E. coli* estudiades (més del 68%). La prevalença dels altres factors de virulència varia en funció de la condició clínica. *malX*, *papA* i *papGII* eren significativament més prevalent en la bacterièmia d'origen urinari (70%, 78% i 66%) i pielonefritis (76%, 70% i 58%) que en les soques aïllades en pacients amb bacterièmia d'origen no urinari (60%, 48% i 24%). El gen de l'adhesina *sfa/focDE* i el gen de la toxina *cnf1* eren significativament més prevalents en la bacterièmia d'origen urinari que en pielonefritis (56% i 44% vs. 28% i 20%); *hlyA* també era més prevalent, tot i que sense significació estadística (52% vs. 30%). *E. coli* causant de bacterièmia, independentment de l'origen, presenta l'al·lel III de *papG* més freqüentment que les soques d'*E. coli* causants de pielonefritis amb hemocultiu negatiu (28% vs. 14%). Setanta-set (51%) de les 150 soques d'*E. coli* estudiades presentaven un dels 7 serogrups associats amb la infecció urinària. D'aquests, l'antigen O6 era el més prevalent (19 soques), seguit de O4 (15), O1 (13), O2 (11), O18 (9), O83 (7), i O7 (2). La prevalença d'aquests set antigens O entre els tres síndromes clínics no presenta diferències significatives (56%, 50%, and 48%).

Les soques causants de bacterièmia urinària i pielonefritis mostraren una elevada prevalença de factors de virulència amb valors similars en els trets *malX*, *papA*, *fimH*, i *kpsM II*; resultats similars a anteriors treballs^{20,43,156,158}. Per contra, *cnf1* i *sfa/foc DE* van ser més prevalents entre les soques d'*E. coli* causants de bacterièmia urinària, el que suggereix que encara que *E. coli* pot requerir fimbries P per arribar al ronyó, un cop allà, necessita toxines i/o fimbries F1C o S per envair i romandre en el torrent sanguini. Cal assenyalar que el requisit de fimbries P per aconseguir accedir al ronyó en *E. coli* es comptabilitza en gran part per l'al·lel II de *papG*, el qual en el nostre estudi va ser el millor marcador de la infecció renal.

Als efectes d'aquest estudi, es va assumir que cada factor de virulència amb l'excepció dels elements *pap* (presència de *papA*, al·lells II i II de *papG* considerats com a un únic factor) contribueixen de la mateixa manera en la virulència. També

assumim que la suma de tots els factors de virulència defineixen el potencial patogen final de les soques d' *Escherichia coli*, anomenat grau de virulència. Per tant, d'acord amb el grau de virulència, *E. coli* causant de bacterièmia urinària mostra un grau de virulència similar a *E. coli* causant de pielonefritis (puntuació mitjana del grau de virulència, 7,8 enfront de 7,0; diferència no significativa).

D'altra banda, el 51% dels aïllaments presenta un dels set O antígens associats amb la infecció del tracte urinari en la nostra àrea^{120,151}, sense diferències entre les tres condicions clíniques, el que reforça el concepte que *E. coli* causant d'infecció urinària i *E. coli* causant d'altres tipus d'infeccions extraintestinals deriven d'ancestres evolutius comuns^{10,122}.

Correlació entre el grup filogenètic i els factors de virulència

La distribució dels factors de virulència entre els grups filogenètics es descriu a la Taula 15. El grup B2 concentrà la gran majoria de factors de virulència, especialment *malX*, *papA*, *papG* II, *sfa/focDE*, *kpsMII*, *hlyA*, *cnf1*, *fyuA*, *ibeA* i els antígens O associats a la infecció urinària. En el grup D, l'al·lel III de *papG*, *hlyA* i *cnf1* eren absents. Es varen observar diferències importants entre el grau de virulència en cada grup filogenètic, el més elevat corresponia al grup B2 (8,7), el mitjà al grup D (5,3), i el més baix als grups B1 i A (3,5 i 3,4; respectivament). ($p < 0,001$, grup B2 versus grups A, B1, i D; $p = 0,016$, grup B1 vs. grup D; $p = .001$, grup A versus grup D).

Associacions entre factors de virulència

Els factors de virulència estudiats mostraren diferents associacions. *malX*, marcador d'una illa de patogenicitat, s'associà amb *papA* ($p < 0,001$), i amb els al·lells II i III de *papG* ($p = 0,005$ i $p < 0,001$, respectivament). *malX* i *papA* s'associaren amb *sfa/focDE*, *kpsMII*, *hlyA*, *cnf1* i *fyuA* ($p < 0,001$); mentre que l'al·lel III de *papG* ho feu amb *sfa/focDE*, *hlyA* i *cnf1* ($p < 0,001$). El sideròfor *fyuA* s'associà amb *sfa/focDE*, *kpsMII* i *hlyA* ($p < 0,001$), però el sideròfor *iutA* només s'associà amb *kpsMII* ($p < 0,001$). Finalment, les toxines *hlyA* i *cnf1* s'associaren entre elles i amb *sfa/focDE* ($p < 0,001$).

En aquest estudi i altres²⁰, els al·lells II i III de *papG* presenten algunes associacions amb diferents factors de virulència, que no es superposen entre si. Així,

papG al·lel III, sobre-representat entre les soques aïllades en pacients amb bacterièmia, es va associar significativament amb *sfa/focDE*, *hlyA* i *cnf1*, trets també freqüents en *E. coli* causants de bacterièmia urinària. Per contra, *papG* al·lel II es trobà rarament en les soques d'origen no-urinari i es va associar amb *iutA*, *fyuA* i *ibeA*. Aquests resultats recolzen la idea que els 2 al·lells de fímbries P podrien jugar diferents papers, amb *papG* al·lel II aparentment involucrat amb la infecció urinària de vies altes i *papG* al·lel III amb la bacterièmia. L'associació de *papGIII*, *hlyA*, i *cnf1* suggereix la presència de la illa de patogenicitat PAI IJ96- like domain, documentat per Blum et al.¹⁵⁹

Taula 15. Distribució dels factors de virulència entre els grups filogenètics

	Grup filogenètic				p
	A n = 18 (12)	B1 n = 8 (5)	B2 n = 95 (63)	D n = 29 (19)	
<i>malX</i>	1 (6)		92 (97)	10 (34)	<0,001 ^a
<i>papA</i>	4 (22)	2 (25)	77 (81)	15 (52)	<0,001 ^a
<i>papG</i>					
al·lel II	2 (11)		56 (59)	16 (55)	<0,001 ^b
al·lel III	2 (6)	2 (25)	32 (34)		<0,001 ^c
<i>fimH</i>	15 (83)	8 (100)	95 (100)	28 (97)	<0,001 ^d
<i>afa/draBC</i>			3 (3)	1 (3)	
<i>sfa/foc DE</i>	1 (6)	3 (38)	57 (60)	2 (7)	<0,001 ^c
<i>kpsMII</i>	3 (17)	1 (13)	82 (86)	24 (83)	<0,001 ^b
<i>hlyA</i>	2 (11)	1 (13)	57 (60)		<0,001 ^a
<i>cnf1</i>	2 (11)	1 (13)	44 (46)		<0,001 ^a
<i>traT</i>	10 (56)	4 (50)	71 (75)	18 (62)	
<i>iutA</i>	11 (61)	4 (50)	68 (72)	22 (76)	
<i>fyuA</i>	8 (44)	4 (50)	93 (98)	21 (72)	<0,001 ^a
<i>ibeA</i>	2 (11)		18 (19)	2 (7)	
<i>Antígens O</i>	1 (6)		66 (69)	9 (31)	<0,001 ^a

Nota: Les dades corresponen al nombre (%) d'aïllats. ^a El test X² de Pearson s'ha utilitzat per a comparar la distribució entre els grups filogenètics. Només es mostren els resultats estadísticament significatius.
^a grup B2 vs. grups A, B1 i D
^b grup B2 vs. grups A i B1
^c grup B2 vs. grups A i D
^d grup B2 vs. grup A

Factors locals o generals de l'hoste afavoridors de la infecció

La relació entre els factors de virulència i els factors generals o locals de l'hoste afavoridors de la infecció només s'ha analitzant entre les 100 soques uropatògenes d'*Escherichia coli* (Taula 16). Seixanta-tres d'aquestes soques van ser aïllades en pacients amb les condicions següents: 8 amb factors generals com SIDA, malaltia avançada, hepatopatia terminal o teràpia immunosupressora; 47 amb factors locals afavoridors d'infecció urinària, com anormalitats anatòmiques o fisiològiques del tracte urinari; i 8 pacients amb ambdues condicions. En malalts amb pielonefritis i bacterièmia d'origen urinari però sense factors afavoridors d'infecció, un elevat

percentatge de les soques deriven del grup filogenètic B2 (76 % i 88% en comparació amb el 59 % i 65 % de les soques d'aquests grups en malalts amb factors afavoridors). En canvi, les soques dels grups A i B1 van ser aïllades pràcticament de forma exclusiva en malalts amb factors generals o locals afavoridors de la infecció.

L'al·lel II de *papG* es l'únic tret significativament més prevalent en soques aïllades en pacients amb pielonefritis i sense factors afavoridors de la infecció que en soques aïllades en pacients amb pielonefritis i amb factors afavoridors. *malX*, *papA*, *kpsMII* i *fyuA* estan més presents (encara que de manera no significativa) en soques aïllades en pacients amb pielonefritis i bacterièmia d'origen urinari sense factors afavoridors de la infecció que en pacients amb les mateixes patologies però amb factors afavoridors. En canvi, la resta de factors de virulència presenten una distribució similar.

Taula 16. Relació entre els factors de virulència i els factors generals o locals de l'hoste afavoridors de la infecció urinària només s'ha analitzant entre les 100 soques uropatògenes d'*Escherichia coli*

	Pielonefritis		Bacterièmia d'origen urinari	
	Sense Factors n = 21	Amb Factors n = 29	Sense Factors n = 16	Amb Factors n = 34
Grup filogenètic				
A		4 (14)	2 (12)	3 (9)
B1		3 (10)		2 (6)
B2	16 (76)	17 (59)	14 (88)	22 (65)
D	5 (24)	5 (17)		7 (21)
Factor de virulència				
<i>malX</i>	19 (90)	19 (66)	14 (88)	21 (62)
<i>papA</i>	18 (86)	17 (59)	13 (81)	26 (76)
<i>papG</i>				
al·lel II	16 (76) *	13 (45)*	9 (56)	24 (71)
al·lel III	2 (10)	5 (17)	6 (38)	8 (24)
<i>fimH</i>	21 (100)	29 (100)	16 (100)	34 (100)
<i>afa/draBC</i>	1 (5)	1 (3)	1 (6)	
<i>sfa/foc DE</i>	6 (29)	8 (28)	9 (56)	19 (56)
<i>kpsMII</i>	17 (81)	20 (69)	13 (81)	25 (74)
<i>hlyA</i>	6 (29)	9 (31)	9 (56)	17 (50)
<i>cnf1</i>	4 (19)	7 (24)	9 (56)	13 (38)
<i>traT</i>	18 (86)	22 (76)	12 (75)	19 (56)
<i>iutA</i>	14 (67)	20 (69)	12 (75)	27 (79)
<i>fuyA</i>	20 (95)	23 (79)	15 (94)	29 (85)
<i>ibeA</i>	2 (10)	4 (14)	2 (13)	3 (9)
<i>Antígens O</i>	12 (57)	13 (45)	10 (63)	17 (50)

Nota: Les dades corresponen al nombre (%) d'aïllats. ^a El test X² de Pearson s'ha utilitzat per a comparar la distribució del grup filogenètic i els antígens O entre els diferents síndromes clínics. El test de la F de Fisher s'ha utilitzat per a comparar cada factor de virulència entre els diferents síndromes clínics.* $p < 0,05$ sense factors predisponents vs. factors predisponents.

Diversos autors^{43,126,160} han observat que pacients amb factors locals o generals afavoridors de la infecció redueixen els requisits de virulència del patogen. No obstant això, en aquest estudi com en un altre²⁰, la majoria de factors de virulència es distribueixen per igual en pacients amb o sense aquests factors, a excepció de certs trets, és a dir, l'al·lel II *papG* en aquest estudi, i el *sfaS* i *bmaE* en l'estudi de Johnson i Stell²⁰. Cal assenyalar que les soques d' *Escherichia coli* dels grups A i B1, que van mostrar pocs trets de virulència, es van aïllar gairebé exclusivament en pacients amb factors generals o locals afavoridors de la infecció. La prevalença substancial del grup B2 entre les soques amb molts trets virulents en els hostes amb immunodeficiència pot explicar la manca d'associació entre aquesta condició i la virulència reduïda. Malgrat això, es va observar una disminució no significativa, però continuada del gradient de virulència, començant per les soques d' *E. coli* causants de bacterièmia urinària (grau de virulència de 8,5) i pielonefritis (7,5) en pacients sense factors predisponents i seguint per les soques d' *E. coli* aïllades en pacients amb aquestes patologies però amb factors predisponents (7,4 i 6,6, respectivament).

4.2. Estudi 2

Relació entre la resistència a quinolones, fluoroquinolones i trimetoprim/sulfametoxazole i els factors de virulència i el grup filogenètic en soques d' *Escherichia coli* uropatògenes

Resistència a quinolones i fluoroquinolones

Del total de les 150 soques d' *E. coli* estudiades, 31 soques (21%) eren resistents a les quinolones i 18 (12%) resistents també a les fluoroquinolones. La prevalença de les soques resistents a quinolones entre les tres síndromes clíniques estudiades era del 14% en cistitis, 20 % en pielonefritis i 28% en bacterièmia urinària, mentre que la distribució de les resistents a fluoroquinolones era del 10% cistitis i pielonefritis i del 16 % en bacterièmia urinària.

Les soques sensibles a quinolones (Taula 17) s'associaven significativament al grup filogenètic B2 (81% vs. 32% de les soques resistents; $p < 0.001$); mentre que les soques resistents a quinolones al grup filogenètic A (36% vs. 3% de les soques sensibles, $p < 0.001$). En canvi, ambdós sensibles i resistents presentaven una distribució similar entre els grups B1 i D. Tots els factors de virulència estudiats, a excepció de *iutA* i *ibeA*, es trobaven més freqüentment entre les soques sensibles a quinolones que no pas entre les respectives resistents (Taula 17). Molts d'aquestes

factors de virulència incloent *malX*, *papA*, *papG* al.lel III, *sfa/foc* DE, *kpsM* II, *hlyA*, *cnf1*, *fyuA* i els Antígens O associats a IU eren significativament més freqüents entre les soques sensibles (Taula 17). Conseqüentment les soques sensibles a quinolones presentaven un grau de virulència superior al de les soques resistents (median score 8,6 vs. 5,2 ; $p < 0.001$).

Les soques sensibles a fluoroquinolones (Taula 17) s'associaven significativament al grup filogenètic B2 (79% vs. 11% en les resistents), $p < 0.001$, mentre que les soques resistents s'associaven al grup filogenètic A (56% vs. 4 % en les sensibles; $p < 0.001$). En canvi, ambdós sensibles i resistents presentaven una distribució similar entre els grups B1 i D. Tots els factors de virulència estudiats, a excepció de *iutA*, es trobaven més freqüentment en les soques sensibles que no pas en les soques resistents (Taula 17); algun d'ells, incloent *malX*, *papA*, *papG* al.lel II, *fimH*, *sfa/focDE*, *kpsM*, *hlyA*, *cnf1* i *fyuA*, amb diferències estadísticament significatives. Per tant, les soques sensibles a fluoroquinolones presenten una mitja de grau de virulència de 7,9 punts, inferior al que presenten les soques sensibles a quinolones (8,6), però significativament més alt que el que presenten les soques resistents a fluoroquinolones (3,9; $p < 0.001$). Cal remarcar que mentre el 53% de les soques sensibles a fluoroquinolones presenten algun antígen O relacionat amb infecció urinària, aquests antigens no es troben entre les soques resistents ($p < 0.001$).

La no aparició de soques d' *Escherichia coli* resistents a fluoroquinolones derivades del grup filogenètic B2 concorda amb els estudis de Johnson et al ¹⁶¹. En canvi, en el present estudi no s'ha trobat un increment en el grup filogenètic D com observen aquests autors (entre humans però no en soques aïllades de mostres animals) i altres autors¹⁶². Johnson et al.¹⁶¹ va descriure que el 36 % de les soques resistents a fluoroquinolones pertanyien als grups A i B1 (27 i 9 % respectivament), comparades amb el 73 % del nostre estudi (56 i 17%). En canvi, en un altre estudi¹⁶³ que analitza soques d'*E. coli* en dones amb cistitis, la majoria (67%) de resistents a fluoroquinolones pertanyien del grup filogenètic A. La baixa prevalença del factors de virulència i d'antígens O associats a infecció urinària que s'observa aquí entre les soques resistents també s'ha observat en altres estudis^{161,162,164}, el que demostra que aquestes característiques són comuns en soques d'origen humà resistents a fluoroquinolones.

Taula 17. Distribució dels grups filogenètics i els factors de virulència en relació a la sensibilitat de les soques d'*E. coli* a les quinolones, fluoroquinolones i trimetoprim/sulfametoxazol.

Grup filogenètic	Quinolona		<i>p</i> ^a	Fluoroquinolona		<i>p</i> ^a	Trimetoprim-sulfametoxazol		<i>p</i> ^a
	Sensible n = 119	Resistent n = 31		Sensible n = 132	Resistent n = 18		Sensible n = 106	Resistent n = 44	
A	4 (3)	11 (36)	<0,001	5 (4)	10 (56)	<0,001	7 (7)	8 (18)	
B1	6 (5)	4 (13)		7 (5)	3 (17)		4 (4)	6 (14)	
B2	96 (81)	10 (32)	<0,001	104 (79)	2 (11)	<0,001	87 (82)	19 (43)	<0,001
D	13 (11)	6 (19)		16 (12)	3 (17)		8 (8)	11 (25)	0,003
Factor de virulència									
<i>malX</i>	102 (86)	10 (32)	<0,001	110 (83)	2 (11)	<0,001	92 (87)	20 (45)	<0,001
<i>papA</i>	87 (73)	16 (52)	0,002	95 (72)	8 (44)	0,02	77 (73)	26 (59)	
<i>papG</i>									
al·lel I	1 (1)	0		1 (1)	0		1 (1)	0	
al·lel II	57 (48)	12 (39)		65 (49)	4 (22)	0,03	52 (49)	17 (39)	
al·lel III	33 (28)	3 (10)	0,004	34 (26)	2 (11)		26 (25)	10 (23)	
<i>fimH</i>	118 (99)	29 (94)		131 (99)	16 (89)	0,04	105 (99)	42 (95)	
<i>afa/draBC</i>	12 (10)	0		12 (9)	0		9 (8)	3 (7)	
<i>sfa/foc DE</i>	69 (58)	8 (26)	0,001	75 (57)	2 (11)	<0,001	60 (57)	17 (39)	0,04
<i>kpsMII</i>	101 (85)	15 (48)	<0,001	112 (85)	4 (22)	<0,001	86 (81)	30 (68)	
<i>hlyA</i>	66 (55)	4 (13)	<0,001	68 (52)	2 (11)	0,001	55 (52)	15 (34)	0,05
<i>cnf1</i>	50 (42)	3 (10)	0,01	51 (39)	2 (11)	0,02	42 (40)	11 (25)	
<i>traT</i>	87 (73)	18 (58)		94 (71)	11 (61)		71 (67)	34 (77)	
<i>iutA</i>	74 (62)	22 (71)		83 (63)	13 (72)		65 (61)	31 (70)	
<i>fuyA</i>	110 (92)	23 (74)		122 (92)	11 (61)	0,001	99 (93)	34 (77)	0,01
<i>ibeA</i>	12 (10)	5 (16)		16 (12)	1 (6)		11 (10)	6 (14)	
Antígens O	64 (54)	6 (20)	0,001	70 (53)	0	<0,001	59 (57)	11 (25)	<0,001
Virulence score, mitjana (rang)	8,6 (2-12)	5,2 (1-10)	<0,001	7,9 (2-12)	3,9 (1-10)	<0,001	7,9 (1-12)	6,4 (1-11)	0,005

Nota: Les dades corresponen al nombre (%) d'aïllats. *malX* = marcador de l'illa de patogenicitat de la soca d'*E. coli* CFT073; *papA* = subunitat estructural de la fimbria P; *papG* = molècula d'adhesina de la fimbria P; *fimH* = fimbria tipus 1; *afa/draBC* = adhesines Família DR; *sfa/focDE* = fimbria S i F1C; *kpsMII* = càpsula polisacàrida del grup II; *hlyA* = hemolisina; *cnf1* = factor citotòxic necrotitzant; *traT* = proteïna de membrana associada a la resistència al sèrum; *fuyA* = receptor yersinbactinia; *iutA* = aerobactina; *ibeA* = invasor de l'endoteli cerebral; Antígens O = O1, O2, O4, O6, O7, O18 i O83.

^a En les comparacions entre els grups filogenètics o els determinants de virulència en funció de la sensibilitat antimicrobiana s'ha utilitzat test de Pearson χ^2 quan totes les freqüències esperades eren ≥ 5 ; la correcció de Yates quan qualsevol cel·la de les freqüències esperades era 3 o 4; i el test de Fisher quan qualsevol cel·la de les freqüències esperades era < 3 ; i el test de la U de Mann-Whitney per a comparar entre els *virulence score*. Només es mostren les diferències estadísticament significatives ($p < 0,05$).

Resistència a trimetoprim/sulfametoxazole

De les 150 soques estudiades, 44 (29,3%) eren resistents al trimetoprim/sulfametoxazole (STX), amb una distribució entre les síndromes clíniques estudiades de 26 % en cistitis i pielonefritis i 36 % en bacterièmia urinària (Taula 17). Les soques sensibles i resistents a STX presenten una distribució diferent respecte als grups filogenètics, similar a l'observada entre els soques sensibles i resistents a quinolones i fluoroquinolones. Les soques sensibles a STX s'associaven al grup filogenètic B2 (82 % vs. 43% en soques resistents; $p < 0.001$), i les soques resistents al grup filogenètic D (25% vs. 8 % en sensibles; $p = 0.003$). Tot i que només quatre factors de virulència (*malX*, *sfa/foc DE*, *hlyA* i *fyuA*) eren significativament més prevalents entre les soques sensibles a STX que entre les soques resistents, el grau de virulència era superior en soques sensibles (7,9 vs. 6,4 en resistents; $p = 0.005$). També l'antigen O associat a infecció urinària era aproximadament dues vegades superior entre les soques sensibles a STX (57% vs. 25%; $p < 0.001$).

El que les soques resistents a trimetoprim/sulfametoxazole fossin principalment del grup D, ja havia estat observat en estudis prèvis¹⁶⁵. En canvi, la observació de que aquestes soques resistents també s'associen a una disminució significativa de la presència d'alguns factors de virulència, donant com a resultat una lleugera reducció (però estadísticament significativa) del seu grau de virulència, està en conflicte amb resultats d'altres estudis prèvis¹⁶⁶, on la resistència a trimetoprim/sulfametoxazole no s'associa a la disminució de la virulència.

Fenotip de sensibilitat combinat

Si s'agrupen les soques d'*E. coli* en funció del fenotip de sensibilitat als tres antimicrobians estudiats (quinolones, fluoroquinolones i trimetoprim/sulfametoxazole) també s'observen diferències en la distribució del grup filogenètic i els factors de virulència (Taula 18).

En els extrems, les soques sensibles als tres antimicrobians estudiats (Q S, FQ S i STX S) són les més virulentes (grau de virulència 8.1) i pertanyen al grup filogenètic B2, mentre que les soques resistents a quinolones, fluoroquinolones i sensibles a trimetoprim/sulfametoxazole són les menys virulentes (grau de virulència 2.8) i pertanyen al grup A. Entre aquests dos extrems, hi ha una aparent disminució del grau de virulència entre les soques resistents només a quinolones o trimetoprim/sulfametoxazole que és molt similar (7.1 i 7.8, respectivament), i només

lleugerament superior al de les soques resistents als dos tipus d' antimicrobians (grau de virulència 6.2).

Taula 18. Distribució dels grup filogenètic i factors de virulència en funció del fenotip de sensibilitat als tres antimicrobians estudiats en <i>E. coli</i> (quinolones, fluoroquinolones i trimetoprim/sulfametoxazole)							
		Q-S	Q-R	Q-R	Q-S	Q-R	Q-R
		FQ-S	FQ-S	FQ-R	FQ-S	FQ-S	FQ-R
		SXT-S	SXT-S	SXT-S	SXT-R	SXT-R	SXT-R
		n = 94	n = 8	n = 4	n = 25	n = 5	n = 14
Grup filogenètic	A	3 (3)	0	4 (100) ^b	1 (4)	1 (20)	6 (43) ^b
	B1	4 (4)	0	0	2 (8)	1 (20)	3 (21) ^a
	B2	80 (85)	7 (88)	0 ^a	16 (64) ^a	1 (20) ^a	2 (14) ^b
	D	7 (7)	1 (13)	0	6 (24) ^a	2 (40)	3 (21)
Determinants de virulència	<i>malX</i>	85 (90)	7 (88)	^b	17 (68) ^a	1 (20) ^a	2 (14) ^b
	<i>papA</i>	68 (72)	6 (75)	3 (75)	19 (76)	2 (40)	5 (36) ^a
	<i>papG</i> al·lel I	1 (1)	0	0	0	0	0
	<i>papG</i> al·lel II	46 (49)	6 (75)	0	11 (44)	2 (40)	4 (29)
	<i>papG</i> al·lel III	26 (28)	0	0	7 (28)	1 (20)	2 (14)
	<i>fimH</i>	94 (100)	8 (100)	3 (75) ^a	24 (96)	5 (100)	13 (93)
	<i>afa/draBC</i>	9 (10)	0	0	3 (12)	0	0
	<i>sfa/focDE</i>	56 (60)	4 (50)	0 ^a	13 (52)	2 (40)	2 (14) ^a
	<i>kspM II</i>	79 (84)	7 (88)	0 ^a	22 (88)	4 (80)	4 (29) ^b
	<i>hlyA</i>	55 (59)	0 ^a	0 ^a	11 (44)	2 (40)	2 (14) ^a
	<i>cnf1</i>	42 (45)	0 ^a	0	8 (32)	1 (20)	2 (14) ^a
	<i>traT</i>	65 (69)	4 (50)	2 (50)	22 (88)	3 (60)	9 (64)
	<i>iutA</i>	57 (61)	6 (75)	2 (50)	17 (68)	3 (60)	11 (79)
	<i>fyuA</i>	88 (94)	8 (100)	3 (75)	22 (88)	4 (80)	8 (57) ^a
	<i>ibeA</i>	9 (10)	2 (25)	0	3 (12)	2 (40)	1 (7)
	O Antigen	54 (58)	5 (63)	0	10 (40)	1 (20)	0 ^b
Virulence score, median (range)	8.1 (2,12)	7.1 (5,8)	2.8 ^a (1,4)	7.8 (2,11)	6.2 (2,10)	4.2 ^b (1,10)	
<p>Nota: Q, quinolona; FQ, fluoroquinolona; SXT, trimetoprim-sulfametoxazole. <i>malX</i> = marcador de l'illa de patogenicitat de la soca d'<i>E. coli</i> CFT073; <i>papA</i> = subunitat estructural de la fímbria P; <i>papG</i> = molècula d'adhesina de la fímbria P; <i>fimH</i> = fímbria tipus 1; <i>afa/draBC</i> = adhesines Família DR; <i>sfa/fo cDE</i> = fímbria S i F1C; <i>kpsMII</i> = càpsula polisacàrida del grup II; <i>hlyA</i> = hemolisina; <i>cnf1</i> = factor citotòxic necrotitzant; <i>traT</i> = proteïna de membrana associada a la resistència al sèrum; <i>fyuA</i> = receptor yersinbactina; <i>iutA</i> = aerobactina; <i>ibeA</i> = invasor de l'endoteli cerebral; Antígens O = O1, O2, O4, O6, O7, O 18 I O83.</p> <p>En les comparacions entre els grups filogenètics o els determinants de virulència en funció de la sensibilitat antimicrobiana s'ha utilitzat test de Pearson X^2 quan totes les freqüències esperades eren ≥ 5; la correcció de Yates quan qualsevol cel·la de les freqüències esperades era 3 o 4; i el test de Fisher quan qualsevol cel·la de les freqüències esperades era < 3; i el test de la U de Mann-Whitney per a comparar entre els <i>virulence score</i>. Només es mostren les diferències estadísticament significatives ^a $p < 0.05$ resistant vs. sensible a tot. ^b $p < 0.001$ resistant vs. sensible a tot.</p>							

Els subgrups (QS-FQS-SXTS; QS-FQS-SXTR i QR-FQR-SXTS) pertanyen principalment al grup filogenètic B2. En el subgrup QR FQS-SXTR, aquesta pertinença és menys extensiva. En canvi, amb l'addició de la resistència a fluoroquinolones el grau de virulència disminueix dràsticament (per exemple, el grau de virulència de les

soques resistents als 3 antimicrobians és de 4.2), i el grup filogenètic predominant passa a ser l'A. Aquest canvi en la virulència i el grup filogenètic amb l'addició de la resistència a FQ es més acusat en les soques sensibles a trimetoprim/sulfametoxazole.

Aquest estudi suggereix que, entre les soques d'*E. coli* aïllades en pacients amb infecció urinària, la resistència a quinolones, fluoroquinolones i trimetoprim/sulfametoxazol s'associa a un baix nivell de virulència i no es relaciona amb el grup filogenètic B2, sinó que es relaciona als filogrups A, B1 i/o D. La magnitud del canvi en el grup filogenètic depèn d'un patró específic de resistència antimicrobiana, sent superior en la resistència a fluoroquinolones que en la resistència a quinolones, o a trimetoprim/sulfametoxazole, i variat en les soques fluoroquinolones resistents, segons el fenotip de sensibilitat a trimetoprim/sulfametoxazole.

Analitzant amb més detall la relació entre els perfils de virulència i el fenotip combinat als tres antimicrobians s'observen quatre trets diferencials. El primer, es que entre les soques sensibles a trimetoprim/sulfametoxazole, les 4 soques resistents a fluoroquinolones (i per tant també a quinolones) deriven exclusivament del grup A, mentre que les 7 de les 8 soques resistents a quinolones (però sensibles a fluoroquinolones) deriven del grup filogenètic B2. El segon, correspon a les diferències entre grups filogenètics, el 63 % de les soques resistents a quinolones (però sensibles a fluoroquinolones i trimetoprim/sulfametoxazole), es relacionen amb l'antigen O associat a infecció urinària, cosa que no s'observa a les corresponents resistents a fluoroquinolones. El tercer, tot i que el grup filogenètic B2 és predominant entre les soques resistents exclusivament a quinolones, aquestes no presenten els gens *hlyA* i *cnf1*, que també es troben en menys quantitat en les soques del grup B2 resistents a àcid nalidíxic segons l'estudi de *Horcajada et al.*¹⁶⁷ D'altra banda, les soques del grup B2 resistents a fluoroquinolones no presenten *sfa/focDE* i *hlyA*, dades coincideix amb altres estudis prèvis¹⁶². Quart, la resistència a fluoroquinolones sembla ser el principal marcador associat amb un baix potencial de virulència. Les soques resistents a quinolones i fluoroquinolones però sensibles a trimetoprim/sulfametoxazole són menys virulentes que la resta (grau de virulència de 2,8 punts, inferior al grau de virulència de 3,2 entre les 15 soques aïllades del grup A i 4,0 entre les 10 del grup B1). A més a més, entre les soques resistents a quinolones, ja siguin resistents o sensibles a trimetoprim/sulfametoxazole, l'addició de la presència de resistència a fluoroquinolones s'associa amb una disminució significant de les característiques virulentes.

Grup clonal A

Entre les soques resistents a trimetoprim/sulfametoxazole, 3 (7%) pertanyien al grup clonal A. La primera d'aquestes soques va ser aïllada l'any 1999 en una dona de 75 anys, la segona al febrer del 2002 en un nadó d'onze mesos i la tercera al novembre del 2002 en una dona de 26 anys, a tots tres pacients se'ls va diagnosticar pielonefritis. Les tres soques eren també resistents a ampicil·lina però sensibles a les cefalosporines d'ampli espectre, als carbapenems i als antimicrobians combinats amb inhibidors de β -lactamases; mentre que les dues primeres eren sensibles i la tercera resistent a quinolones i fluoroquinolones. Les tres soques pertanyien al grup filogenètic D i presentaven un perfil de virulència molt uniforme que incloïa en totes elles: *pap A*, *papG allele II*, *finH*, *kpmII*, *iut A I* *fyuA*, a més a més de *traT* en les dues primeres.

Encara que CGA és el grup clonal més prevalent entre les soques resistents a trimetoprim/sulfametoxazole, en el present estudi només s'han aïllat tres (7%) soques. Les tres essencialment idèntiques a les soques CGA americanes (ref. 11 i 25) respecte al grup filogenètic, factors de virulència, patró d'ERIC i perfil de resistència als antimicrobians, excepte que una soca també era fluoroquinolona resistent. Aquesta darrera soca representa la segona coneguda resistent a fluoroquinolones en membres CGA, la primera va ser aïllada en Calgary¹⁶⁸.

La primera soca descrita com CGA va ser aïllada l'any 1999, mentre que la segona i la tercera l'any 2001, i no se'n va documentar cap més fins al 2004, el que suggereix que les soques del CGA no proliferen com a clon epidèmic. En recents estudis en USA, s'han trobat que el 15% de totes les soques resistents a trimetoprim/sulfametoxazole pertanyien al grup clonal A¹⁶⁵, i més del 50% de les soques resistents a trimetoprim/sulfametoxazole eren causants de cistitis no complicada i pielonefritis en dones¹⁶⁹, mentre que a Europa l'*E. coli* CGA representa el 7% de les soques resistents a trimetoprim/sulfametoxazole. D'acord amb el present estudi, les soques d'*E. coli* CGA presenten un grau d'especificitat de síndrome, ja que les tres causaven pielonefritis, el que representa que el 23% de les soques resistents a trimetoprim/sulfametoxazole aïllades en pacients amb pielonefritis pertanyia al grup clonal A ($p=0.02$) i en canvi no s'ha aïllat cap soca del grup clonal A resistent a trimetoprim/sulfametoxazole en pacients amb cistitis i bacterièmia urinària. Això suggereix que el grup clonal A és, almenys en el nostre àmbit, principalment pielonefrigènic, com s'ha vist també amb el grup clonal O15:K52:H1¹⁷⁰. Les dades indiquen que el CGA té una distribució geogràfica global però heterogènia, encara que probablement aquesta disseminació i emergència ha estat més difícil en àrees com

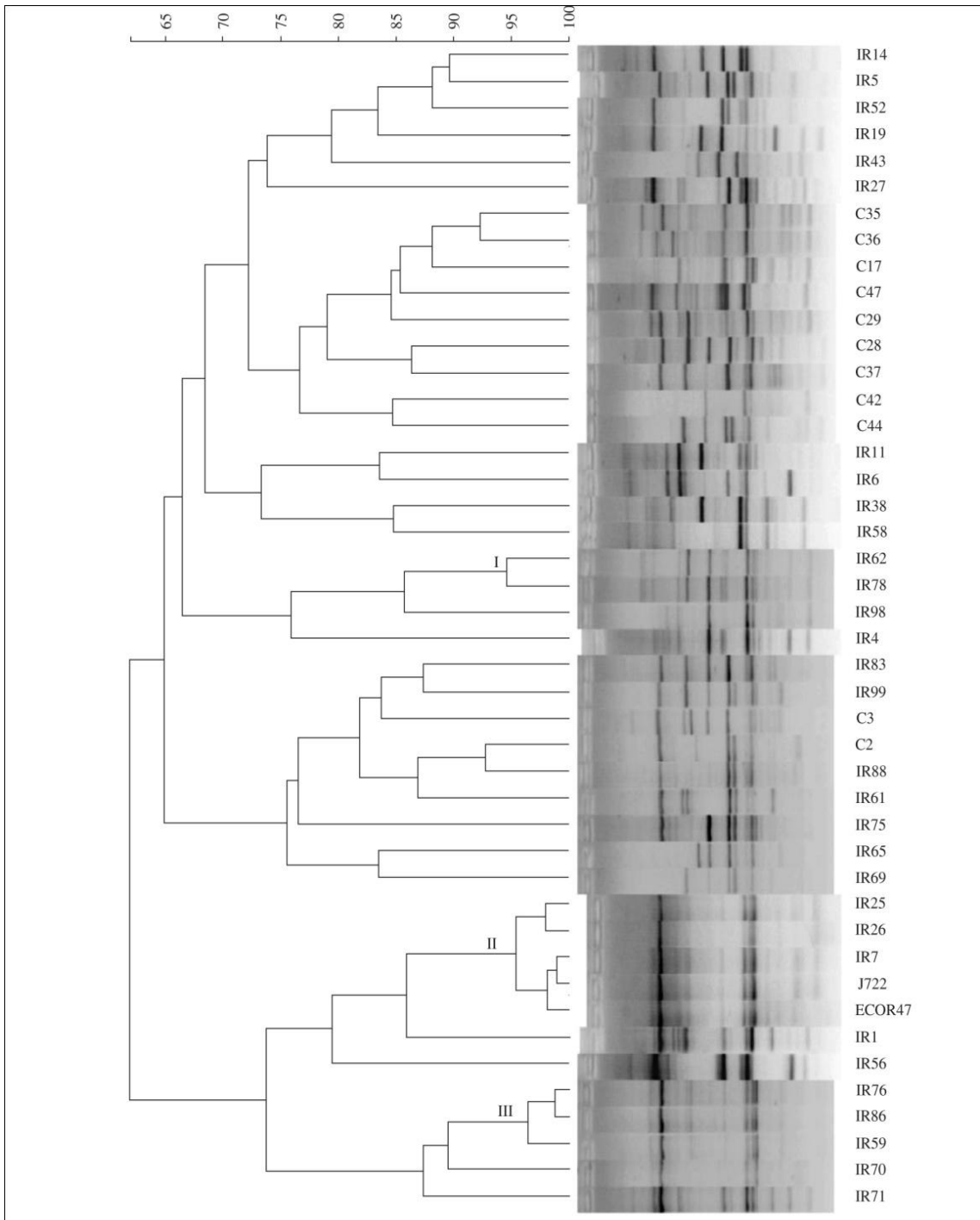
Espanya on, des de mitjans de 1980, més d'una tercera part dels aïllaments clínics d' *E. coli* eren resistents a trimetoprim/sulfametoxazole ^{171,172}, pel que el nínxol ecològic de soques resistents ja estava ocupat.

ERIC PCR

Amb un nivell de delineació del 93 % de similaritat, s'han diferenciat 35 perfils d'ERIC entre les 44 soques resistents a trimetoprim/sulfametoxazole (Figura 14). Les tres soques del grup clonal A (IR7, IR25 i IR26) i dues soques CGA de referència (ECOR47 i J722) compartien el mateix patró d'ERIC (similaritat 95,4%), que difereix dels altres perfils d' *E. coli* resistents a trimetoprim/sulfametoxazole (86% similaritat amb el patró veí). Aquestes cinc soques componen el clúster II.

Considerant el 93% de similaritat entre els diferents perfils dels patrons d'ERIC-PCR com a punt de tall en la diferenciació de diferents clons, a part del clúster II, format per les soques del grup clonal A, es varen observar dos clústers més. El clúster I format per dues soques (IR62 i IR78), ambdues del filogrup B2 i amb el mateix perfil de virulència, que inclou la presència de *malX*, *papA*, *papG allele II*, *fimH*, *sfa/focDE*, *kpsM*, *traT*, *iutA* i *fyuA*. Aquestes dues soques d' *E. coli* es van aïllar en dues dones de 59 i 75 anys respectivament, amb bacterièmia urinària. El clúster III format per tres soques (IR76, IR86 i IR59), totes elles del filogrup D, i amb un mateix perfil de virulència que compta amb la presència de *papA*, *papG allele II*, *fimH*, *kpsM*, *iutA* i *fyuA*. Les soques d'aquest clúster II van ser aïllades de tres homes de 93 anys, 69 anys i 77 anys respectivament, amb bacterièmia d'origen urinari. Cap d'aquestes 8 soques (3 CGA i 5 noCGA) varen tipar amb els 7 antígens O associats a la infecció urinària.

Figura 14. Representació dels perfils d'ERIC-PCR de les 42 soques d' *Escherichia coli* resistents a trimetoprim-sulfametoxazole i les dues soques de referència (J722 i ECOR47) mitjançant el mètode UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic). (Continua pàgina següent)



4.3. Estudi 3

Conèixer l'estructura de les poblacions intestinals d' *E. coli* en dones sanes, per posteriorment poder-la comparar amb la de les dones amb infeccions urinàries causades per aquest mateix bacteri

La flora fecal de l'hoste (i en les dones, també la flora vaginal) és l'origen més comú de les soques d'*E. coli* causant de la infecció^{134,135}. Per tant l'estructura de la flora fecal, condiona en gran part la etiologia i les característiques de la infecció urinària. En el nínxol intestinal humà coexisteixen diferent clons d'*E. coli*. Alguns d'aquests clons són intrínsecament més virulents que d'altres, doncs deriven de grup filogenètic patogènics i presenten més factors de virulència. Igualment, alguns d'aquests clons són més abundants o predominants que d'altres, els quals podrien incrementar la seva probabilitat per a causar infeccions independentment del grau de virulència que presentin. Per tant, probablement, a més a més dels factors afavoridors de la infecció de l'hoste, l'estructura de la població intestinal també juga un paper molt important en que una determinada soca d'*E. coli* produeixi l'episodi d'infecció i una determinada etiologia.

En aquest estudi s'analitza amb detall l'estructura de les poblacions d'*Escherichia coli* en el reservori fecal de 39 dones sanes, mitjançant l'anàlisi de 1060 colònies d'*E. coli*, amb un màxim 30 per mostra fecal; això proporciona una estimació del 90% de probabilitats per detectar els clons minoritaris¹³⁰. L'acurada elecció de la mostra seleccionada, fa possible detectar les poblacions minoritàries i determinar la relativa abundància dels diferents clons en cada mostra, permetent observar les variacions en la diversitat de les poblacions fecals d'*E. coli* entre les dones estudiades. Fins a la data, aquest va ser el primer estudi que avalua un nombre tant elevat de colònies d'*E. coli* fecals en dones sanes amb edat reproductiva, i la seva relació amb el risc de patir una infecció urinària no complicada.

***E. coli* fecals**

Es van recollir 39 mostres fecals procedents de 39 dones sanes, d'edats compreses entre els 17 i els 50 anys, que no havien pres tractament ni profilaxis

antibiòtica els 21 dies previs a la presa de la mostra i no havien sofert infeccions urinàries els dos mesos prèvis. En 38 de les 39 mostres fecals analitzades, es van poder estudiar 30 putatives colònies d'*E. coli*, mentre que en una única mostra només se'n van estudiar 9. Per tant, un total de 1.149 presumptes colònies d'*E. coli* van ser estudiades. D'aquestes, 1060 (92%) es va confirmar que eren *E. coli*, i són les que es van procedir a analitzar molecularment.

Clons d'*E. coli* i el seu perfil filogenètic

A partir de l'anàlisi dels perfils d'ERIC-PCR de les 1060 colònies d' *E. coli*, es van diferenciar 120 clons, amb una mitja de 3 clons per mostra fecal i un rang de 1 a 9). La metodologia emprada de selecció de colònies ens permeté detectar les poblacions minoritàries i determinar la relativa abundància dels diferents clons en cada mostra, fent possible l' observació de la diversitat de la població fecal d'*E. coli* entre les dones estudiades. El 23% d'aquestes poblacions fecals alberguen únicament un clon d'*E. coli*, mentre que altres poblacions presenten de dos fins a nou clons diferents. Aquest rang tant ampli de diversitat permet realitzar una classificació dicotòmica arbitrària de les mostres segons si presenten almenys fins a 4 clons (mostres pauciclons) o si presenten 5 o més clons (mostres multiclons). Trentadues dones presenten almenys 4 clons en les seves mostres fecals (mostres pauciclons), amb un total de 75 clons. Les altres 7 dones presenten 5 o més clons d'*E. coli* (mostres multiclons), amb un total de 45 clons (Figura 15).

Globalment, els 120 clons d'*E. coli* estudiats es distribueixen entre els quatre grups filogenètics de la següent manera: en el grup A (33%), grup D (31%), grup B1 (19%) i grup B2 (17%). En canvi, si s'analitza per subjecte, el grup filogenètic D és el més prevalent (el 67% de les dones presenten almenys una soca d' *E. coli* del grup filogenètic D), seguit del grup A (49%), grup B2 (36%) i del grup B1 (33%).

Figura 15 Distribució dels 120 clons d'*Escherichia coli* fecals entre 39 dones sanes.

(continua pàgina següent)

Subjecte Clon fecal d'*Escherichia coli*

1	#1 100% B2 (6)								
2	#2 100% B2 (9)								
3	#3 100% B2 (8)								
4	#4 100% D (7)								
5	#5 100% D (6)								
6	#6 100% D (6)								
7	#7 100% D (3)								
8	#8 100% B1 (3)								
9	#9 100% B1 (1)								
10	#10 50% B2 (8)	#11 50% B1 (3)							
11	#12 97% D (7)	#13 3% D (6)							
12	#14 93% D (7)	#15 7% B2 (9)							
13	#16 59% D (5)	#17 41% D (5)							
14	#18 97% B1 (6)	#19 3% B1 (6)							
15	#20 97% B1 (1)	#21 3% D (2)							
16	#22 60% A (3)	#23 40% B2 (8)							
17	#24 70% A (3)	#25 30% B2 (6)							
18	#26 70% B2 (7)	#27 27% D (7)	#28 3% A (1)						
19	#29 85% B2 (7)	#30 10% B2 (7)	#31 5% A (3)						
20	#32 53% B2 (8)	#33 43% D (4)	#34 3% B2 (10)						
21	#35 87% D (3)	#36 7% B2 (7)	#37 7% D (2)						
22	#38 50% D (2)	#39 40% A (4)	#40 10% A (1)						
23	#41 73% D (6)	#42 17% A (0)	#43 10% A (0)						
24	#44 44% B1 (2)	#45 40% B1 (5)	#46 16% B1 (2)						
25	#47 53% A (3)	#48 40% A (3)	#49 7% D (6)						
26	#50 87% A (2)	#51 10% A (2)	#52 3% D (3)						
27	#53 63% A (0)	#54 30% A (1)	#55 7% B1 (3)						
28	#56 82% B2 (8)	#57 11% B1 (2)	#58 4% B2 (5)	#59 4% B1 (1)					
29	#60 75% B2 (6)	#61 8% B2 (6)	#62 8% B2 (4)	#63 8% D (3)					
30	#64 53% D (6)	#65 23% A (2)	#66 20% A (4)	#67 3% D (8)					
31	#68 50% D (4)	#69 23% D (1)	#70 20% D (4)	#71 7% A (3)					
32	#72 69% A (2)	#73 24% D (7)	#74 4% D (4)	#75 4% A (0)					
33	#76 46% D (4)	#77 29% A (1)	#78 18% A (3)	#79 4% B1 (3)	#80 4% B1 (2)				
34	#81 33% D (1)	#82 30% B1 (6)	#83 30% A (2)	#84 3% B1 (4)	#85 3% B1 (3)				
35	#86 50% D (6)	#87 33% B1 (2)	#88 7% A (3)	#89 7% B1 (3)	#90 3% A (1)				
36	#91 41% A (0)	#92 22% D (1)	#93 15% D (1)	#94 15% B1 (1)	#95 4% D (2)	#96 4% D (2)			
37	#97 43% A (4)	#98 30% A (4)	#99 7% D (3)	#100 4% A (3)	#101 4% A (3)	#102 4% A (1)	#103 4% A (2)		
38	#104 29% A (1)	#105 18% B2 (5)	#106 12% D (1)	#107 12% A (2)	#108 12% B1 (1)	#109 6% B2 (4)	#110 6% B1 (1)	#111 6% B1 (1)	
39	#112 27% A (0)	#113 20% A (0)	#114 13% A (4)	#115 13% A (1)	#116 10% D (6)	#117 7% D (5)	#118 3% A (0)	#119 3% A (0)	#120 3% A (0)

(veure pàgina anterior). Cada subjecte (números de l'1 al 39) es troba representat per a una fila de quadrats (clons). En cada clon trobem identificat el número de clon (extrem superior esquerra), la proporció fecal d'aquest clon (extrem superior dret), el grup filogenètic (extrem inferior esquerra), i el grau de virulència (extrem inferior dret). La tonalitat gris dels quadrats representa els grups B2 (gris més fort), D, A i B1 (el més clar). Els subjectes s'han classificat segons el nombre de clons d'*E. coli* identificats. Per a cada subjecte, els clons s'han classificat d'esquerra a dreta en ordre descendent en funció de la seva prevalença relativa en la mostra fecal.

Clons dominants

En les 39 dones es van diferenciar un total de 40 clons dominants, aquest fet es produeix perquè en una dona (cas 10) s'han aïllat dos clons en les mateixes proporcions (50% de cadascun, per tant els dos s'han classificat com a dominants).

La distribució dels diferents grups filogenètics entre els 40 clons dominants i els 80 clons no-dominants es descriu en la Taula 19.

Taula 19. Distribució dels diferents grups filogenètics entre els 40 clons dominants i els 80 clons no-dominants d'*Escherichia coli* fecal entre 39 dones sanes

Grup filogenètic	Clons dominants n = 40 (33)	Clons no dominants n = 80 (67)	p
A	10 (25)	30 (38)	
B1	6 (15)	17 (21)	
B2	9 (23)	11 (14)	
D	15 (38)	22 (27)	
B2 + D	21 (60)	33 (40)	0,053 ^a

Nota: Les dades corresponen al nombre (%) d'aïllats.
^a En els límits d'un valor estadísticament significatiu, els clons dominants pertanyen als grups filogenètics B2 i D.

A diferència de la població dominant, la població intestinal d'*E. coli* no-dominant es troba representada per clons dels grups A i B1, a més a més amb una freqüent repetició d'aquests grups entre la mateixa mostra (ex. en els subjectes 37 i 39 s'han diferenciat 6 i 7 clons diferents, respectivament, tots ells del grup A). Per tant, aquestes dades mostren una clara tendència en algunes dones a presentar múltiples clons, principalment dels grups A i B1, mentre que en altres la tendència és presentar pocs clons, principalment dels grups B2 i D. Les bases de l'estructura de la població fecal no és clara, però és important determinar si presenten els grups patogènics B2 i D.

En els diferents estudis sobre la població fecal d'individus sans existeix una gran divergència de resultats en relació a la proporció de la presència de soques d'*E. coli* de cada grup filogenètic, que pot ser atribuïda tant a diferències a nivell de localització geogràfica, com a nivell de comportament de colonització del tracte intestinal. Per exemple, Duriez *et al.* documenten que el grup filogenètic B2 globalment és el menys prevalent (11%), però amb diferències ben marcades entre residents a Mali, Croàcia i França (2%, 11% i 19%, respectivament) ¹⁷³. En el mateix sentit, Escobar-Paramo *et al.* ¹⁷⁴ evidencien un gran rang de varietat en la prevalença del grup B2, des del 3,3% (residents a la Guyana francesa, Amerindians) fins al 44 % (residents a Tokyo) ¹⁷⁴. Zhang *et al.* descriuen una elevada prevalença del grup B2 en dones sanes de Michigan ⁷⁷. De la mateixa manera, la prevalença del grup B2 en un estudi realitzat per Nowrouzian *et al.* ⁴⁵ entre escolars de Suècia era del 18 %, però amb diferències significatives si les soques eren considerades residents o transitòries (38% vs. 5%, respectivament, $p=.0004$).

En molts d'aquests estudis, només s'analitzen entre una i tres colònies per mostra, per tant presumiblement s'estudia el clon dominant. Això permet comparar aquests resultats amb les dades del present estudi relatives als clons dominants, en el que s'ha estimat un 23% de prevalença d'*E. coli* B2 entre la població dominant fecal de dones sanes, resultat que es troba en consonància amb els anteriors. Aquest fet confirma en una nova població estudiada, com són les dones sanes en edat reproductiva de l'Europa Mediterrània, on l'intestí constitueix un substancial reservori de soques del grup filogenètic B2, presumiblement amb virulència per causar tant infeccions urinàries com altres infeccions estraintestinals.

Mostres pauciclons

La distribució dels diferents grups filogenètics entre les mostres fecals pauciclons i les multiclons es descriu en la taula 20.

Al comparar els grups filogenètic de les mostres pauciclons amb els de les multiclons, s'observen notables diferències. Així, els clons d'*E. coli* del grup filogenètic B2, i en menys mesura els del grup D, s'associen significativament a mostres pauciclons i tenen la tendència a trobar-se en abundància i comportar-se com a clons dominants. A més, també es constata que el grau de virulència és significativament superior entre clons dominants de la població fecal al comparar-los amb clons no-dominants, i també es superior entre els clons de les mostres

pauciclons al comparar-los amb els clons de les mostres multiclonals; reflexant que els clons dominants i /o les mostres pauciclons estan representats principalment pel grup filogenètic B2, i/o el grup D, els quals posseeixen més factors de virulència que els grups A i B1. Aquests resultats coincideixen amb estudis prèvis on les adhesines P són més comuns entre els clons dominants^{45,46,131} i on els clons dominants tendeixen a persistir en l'intestí de l'hoste^{45,45,130}. A més, la relació entre múltiples factors de virulència i els grups filogenètics B2 i D, constatada en aquest estudi, també coincideix amb un estudi de l'evolució ecològica¹⁷⁵.

Taula 20. Distribució dels diferents grups filogenètics entre els 120 clons fecals d'*Escherichia coli* en funció si pertanyen a una mostra pauciclona o multiclona en 39 dones sanes.

Grup filogenètic	Mostra pauciclona	Clons no dominants	p
	≤4 clons / mostra fecal n = 75 (62)	≥ 5 clons / mostra fecal n = 45 (38)	
A	19 (25)	21 (47)	0,016
B1	12 (16)	11 (24)	>0,10
B2	18 (24)	2 (4)	0,005 ^a
D	26 (35)	11 (24)	

Nota: Les dades corresponen al nombre (%) d'aïllats. ^a En una única mostra es va aïllar com a únic clon.

Determinants de virulència

La majoria de factors de virulència estudiats (*papC*, *papA*, *papG II*, *hlyA*, *cnf1*, *fuyA*, *kpsMII*, *ibeA* i *malX*) s'associen significativament al grup filogenètic B2, en comparació amb els altres filogrupos (Taula 21). També hi ha una acumulació de factors de virulència en soques derivades del grup D, tot i que no és estadísticament significatiu. S'observa un ordre descendent de la mitja del grau de virulència, des de la més alta del grup B2 (6,9), grup D (4,2), grup B1 (2,7) a la més baixa del grup A (1,7). Per a tots els grups vs. el grup B2 la diferència es significativa ($p < .001$).

Comparat amb els 80 clons no-dominants, els 40 clons dominants presenten significativament una major prevalença de *iutA* (58% vs. 34%; $p=0,01$), *kpsMII* (50% vs. 30 %, $p=0,03$), i *malX* (40% vs. 21 %, $p=0,03$), i una major prevalença dels altres factors de virulència (Taula 21). Conseqüentment el grau de virulència és

Taula 21. Distribució dels factors de virulència entre els 120 clons d'*Escherichia coli* fecals en funció de la dominància i pauciclonalitat

Determinants de virulència		Clons Dominants	Clons no dominants	p^a	Mostra Pauciclonal	Mostra Multiclonal	p^a
		(n = 40)	(n = 80)		(≤ 4 clons) (n = 75)	(≥ 5 clons) (n = 45)	
Adhesines	<i>papC</i>	12 (30)	13 (16)		21 (28)	4 (9)	.01
	<i>papA</i>	12 (30)	13 (16)		21 (28)	4 (9)	.01
	<i>papG</i> al·lel II	9 (23)	10 (13)		15 (20)	4 (9)	
	<i>papG</i> al·lel III	1 (3)	3 (4)		3 (4)	1 (2)	
	<i>fimH</i>	37 (93)	66 (83)		66 (88)	37 (82)	
	<i>afa/draBC</i>	0 (0)	4 (5)		3 (4)	1 (2)	
	<i>sfa/focDE</i>	7 (18)	7 (9)		13 (17)	1 (2)	.01
Toxines	<i>hlyA</i>	4 (10)	5 (6)		7 (9)	2 (4)	
	<i>cnf1</i>	4 (10)	2 (3)		6 (8)	0 (0)	
Sideròfors	<i>fyuA</i>	20 (50)	34 (43)		44 (59)	10 (22)	< .001
	<i>iutA</i>	23 (58)	27 (34)	.01	39 (52)	11 (24)	.003
Protectines	<i>kpsM</i> II	20 (50)	24 (30)	.03	35 (47)	9 (20)	.003
	<i>traT</i>	27 (68)	43 (54)		49 (65)	21 (47)	.045
Invasines	<i>ibeA</i>	5 (13)	7 (9)		10 (13)	2 (4)	
Marcador de l'illa de patogenicitat	<i>malX</i>	16 (40)	17 (21)	.03	31 (41)	2 (4)	< .001

Nota: Les dades corresponen al nombre (%) d'aïllats. *malX* = marcadore de l'illa de patogenicitat de la soca d'E. coli CFT073; *papA* = subunitat estructural de la fímbria P; *papG* = molécula d'adhesina de la fímbria P; *fimH* = fímbria tipus 1; *afa/draBC* = adhesines Família DR; *sfa/focDE* = fímbria S i F1C; *kpsMII* = càpsula polisacàrida del grup II; *hlyA* = hemolisina; *cnf1* = factor citotòxic necrotitzant; *traT* = proteïna de membrana associada a la resistència al sèrum; *fyuA* = receptor yersinbactinia; *iutA* = aerobactina; *ibeA* =invasor de l'endoteli cerebral.

^aNomés es mostres les diferències estadísticament significatives, $p < 0.05$

significativament superior entre clons dominants vs. clons no-dominants (mitja 4,4 vs. 3,1, $p=0,015$).

Igualment, comparant amb els clons de mostres multiclonals, els clons de mostres pauciclonals (en les quals predominen les soques dels grups filogenètics B2 i D) presenten un major grau de factors de virulència, específicament, *papC*, *papA*, *sfa/focDE*, *fyuA*, *iutaA*, *kspMII*, *malX* i *traT* (Taula 21). Per tant, el grau de virulència és significativament superior entre els clons de les mostres pauciclonals vs. els de les mostres multiclonals (mitja 4,3 vs. 2,2; $p<0,001$).

Model de regressió múltiple

Per a considerar la no-independència de múltiples aïllats d'*E. coli* del mateix hoste, s'ha realitzat un model de regressió mixte. El model d'anàlisi univariable mixte identifica múltiples associacions entre els factors de virulència, els grups filogenètics, les característiques d'aquestes bactèries per a colonitzar, com poden ser l'estatus dominant, la prevalença, i provenir d'una mostra fecal pauciclonal. Segons això, diferents models multivariables s'han construït per a predir un potencial de virulència segons l'anàlisi del poder predictiu independent de la mostra pauciclonal, grup B2, i l'estatus dominant i la prevalença clonal (com una alternativa a la variable abundància). En aquest model, pauciclonalitat, grup B2, prevalença, qualsevol combinació d'elles, eren significativament multivariables per a predir el potencial de virulència (Taula 22).

Taula 22. Model d'anàlisi multivariable per a predir el grau de virulència dels 120 clons fecals d'*Escherichia coli* segons el grup filogenètic i el tipus de colonització.

Model	Valors de p per a les variable predictores incloses en el model			-2 Log Likelihood
	Mostra pauciclonal	Grup B2	Prevalença	
1	0.055	< .001	0.03	486
2	x	< .001	0.004	491
3	0.009	x	0.033	533
4	0.01	< .001	x	492

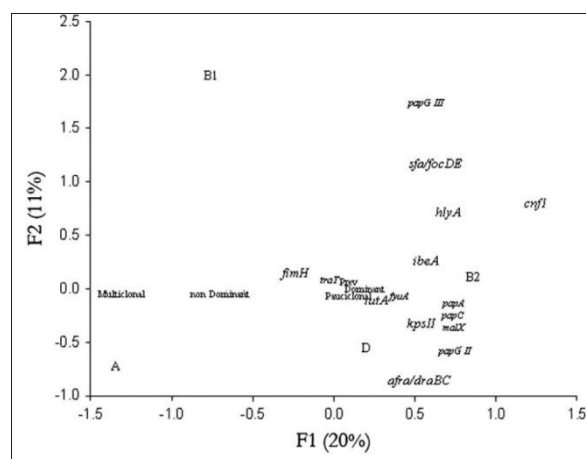
Nota. X, variable no utilitzada en el model. El valor de -2 Log likelihood mostren el millor model (valors baixos = millor model). Els models s'han construït utilitzant, com a variables predictores, totes les combinacions de mostra pauciclonals (si /no), grup B2 (si / no), i prevalença clonal (0 - 1)

Anàlisi de correspondència múltiple

Per avaluar les relacions globals entre l'estudi de variables s'ha fet servir una anàlisi de correspondència. L'eix F1 i F2 presenten un 20% i 11 % de variances, respectivament. En les projeccions de les variables en el pla F1/F2 es distingeixen dues associacions (Figura 16). Les mostres pauciclons es caracteritzen per la prevalença, clons dominants, grup B2 i D, i molts factors de virulència. En canvi, les mostres multiclons estan més relacionades amb clons no-dominants i grup A. El grup B1 es troba en la línia intermèdia, eliminat per altres variables i la variable colonització.

D'aquests anàlisi es conclou, que la pauciclonalitat i la dominància del clon en una mateixa mostra, estan estadísticament associades als grups B2 i D i als factors de virulència, el que reflexa una convergència de virulència i abundància. Aquesta relació suggereix la presència de factors bacterians específics, com poden ser adhesines o altres trets propis dels *E. coli* del grup B2 que contribueixen a la seva supervivència en el nínxol intestinal, o potser també suggereix la producció de bacteriolisines amb capacitat de matar els clons no-B2 un cop els clons B2 s'estableixen a l'intestí. Alternativament, en algunes dones cabria la presència de determinants factors

Figura 16. Anàlisi de correspondència entre els trets bacterians i l'estatus de colonització entre els 120 clons d'*Escherichia coli* aïllats en 39 dones sanes.



En els eixos F1/F2 es representa: les posicions dels 16 factors de virulència caracteritzats en les 120 soques, els quatre grups filogenètics (A, B1, B2 i D), la mostra fecal pauciclons o multiclons, l'estatus clonal dominant o no-dominants, i la prevalença del clon en la femta. L'eix F1 representa el 20 % del total de la variances i l'eix F2 l'11%.

específics com poden ser receptors que atrauen o retenen preferentment els clons dels grups B2 i D en detriment dels clons d'altres grups filogenètics, mentre que altres dones presentarien un ambient intestinal menys selectiu que acceptaria un equilibri entre els clons comensals i els clons introduïts "de novo" com per exemple mitjançant l'alimentació ¹⁷⁶.

4.4. Estudi 4

Conèixer l' estructura de les poblacions fecals d' *E. coli* en dones amb infecció urinària, analitzant la seva relació amb la soca causant de la infecció.

Analitzar les diferències entre les poblacions fecals d' *E. coli* en dones sanes i en dones amb infecció urinària

La flora fecal de l'hoste (i en les dones, també la flora vaginal) és l'origen més comú de les soques d'*E. coli* causant de la infecció^{134,135}. Encara continuen les incerteses respecte a si la quantitat en la que es troba representada la soca causant de la infecció en la població fecal / vaginal de l'hoste és l'element més important per a causar la infecció (teoria de la prevalença¹³⁶), o bé, si una població seleccionada de la flora fecal / vaginal d'*E. coli* amb un potencial virulent molt elevat és el que facilita la infecció (teoria de l'especial patogenicitat¹³⁷).

A favor de la teoria la prevalença, existeix el fet que la soca urinària tendeix a ser la soca predominant en la flora fecal de l'hoste^{133,134,137}. A favor de la teoria de l'especial patogenicitat, existeix el fet que les soques d'*E. coli* aïllades en pacients amb infecció urinària normalment presenten més factors de virulència que les soques fecals aïllades en dones sanes, i deriven principalment dels grups filogenètics B2 i D (vs. els grups A i B1 de les soques fecals)^{77,177}, com també coincideixen els resultats del present Estudi 1. Aquestes comparacions poden confondre, degut a les diferències entre les poblacions hostes, doncs les dones que pateixen infecció urinària tendeixen a tenir una predisposició genètica o a presentar diferent comportament que les dones sense infecció urinària^{110,131,178} i , possiblement tenen poblacions fecals diferents. Conseqüentment, el grup ideal per a comparar les soques causants d'infecció urinària aguda seria la població fecal del mateix hoste.

En el present estudi s'avalua la importància relativa de l'abundància fecal respecte el potencial de virulència en els clons d'*E. coli* fecals de cada hoste, en 42 dones amb cistitis causada per *E. coli* (edat mitjana 30,4 anys; rang 15-65 anys). També s'ha dut a terme una valoració de les relacions entre la complexitat de la població fecal d'*E. coli* i les seves característiques associades a la virulència de cada clon. Per a cada hoste, s'ha estudiat la soca causant de cistitis i 30 colònies d'una mostra fecal prèvia a la teràpia, d'aquesta manera s'han pogut detectar poblacions minoritàries fecals d'*E. coli*¹³¹.

Distribució dels clons d'*E. coli* en funció de l'origen i de l'hoste

En conjunt, de les 42 mostres fecals estudiades, un total de 1241 presumptes colònies d'*E. coli* han estat analitzades (30 colònies en 38 mostres; 29, 28, 27 i 17 colònies en les 4 mostres restants, respectivament). De totes aquestes, 1117 colònies (90%) es van confirmar com a *E. coli*. Segons el perfil molecular, les 1159 colònies d'*E. coli* (1117 fecal, 42 urinàries) representen 109 únics clons. Dels 109 clons, 4 (4%) es van aïllar només en la mostra urinària (clons només-urinaris), 38 (35%) en la mostra urinària i fecal (clons urino-fecals), i 67 (61%) només en la femta (clons només-fecals), amb un total de 42 clons urinaris i 105 clons fecals (Figura 17).

Cada dona presentava un únic clon urinari, en canvi el rang de clons fecals era d'1 a 11 (mitja 2,5). En la comparació del clon urinari en relació amb els clons fecals es distingeixen tres grups ecològics (Taula 23):

- Grup I, 14 dones (33%) – el clon urinari és l'únic clon trobat a la població fecal
- Grup II, 24 dones (54%) el clon urinari es troba present en la població fecal juntament amb altres clons fecals.
- Grup III, 4 dones (10%) el clon urinari és absent en la població fecal.

Per tant, en el 90 % de les dones estudiades (grup I i grup II) el clon urinari es troba present entre els clons de la població fecal, amb o sense altres clons fecals addicionals.

Taula 23. Distribució filogenètica dels 109 clons d'*Escherichia coli* en dones amb infecció urinària en relació al grup ecològic i l'origen de la mostra.

Categoria	Grup I <i>clon urinari = únic clon trobat a la mostra fecal</i>		Grup II <i>(clon urinari present a la mostra fecal amb altres clons)</i>		Grup III <i>(clon urinari diferent dels clons fecals)</i>	
	Clon urino-fecal ^a n = 14	Clon urino-fecal ^b n = 24	Clon només fecal n = 55	Clon només urinari ^c n = 4	Clon només fecal ^d n = 12	
A	1 (7)	3 (12)	29 (53)	1 (25)	8 (66)	
B1	0	2 (8)	12 (22)	0	0	
B2	11 (79)	15 (62)	5 (9)	3 (75)	2 (17)	
D	2 (14)	4 (17)	9 (16)	0	2 (17)	

Nota: Les dades corresponen al nombre (%) d'aïllats.
 En l'estudi estadístic, s'ha utilitzat el text de χ^2 test or el test Fischer (two-tailed).
^a Grup I, $p = .006$ (grup B2 vs. grup A) i $p = .001$ (grup B2 vs. grup B1); ^b Grup II, $p = .008$ (grup B2 vs. grup A), $p = .002$ (grup B2 vs. grup B1); ^c Grup III (només urinari), $p = .012$ (grup A vs. grup B1), $p < .001$ (grup A vs. grup B2), $p = .002$ (grup A vs. D); ^d Grup III (només fecal), $p = .008$ (grup A vs. grup B1).

El 44% (46 de 105) del total de clons eren els més abundants en la població fecal. En 30 dones de les 42 estudiades, el clon urinari es comportava com el clon dominant en la població fecal.

El 86 % (36 de 42 mostres fecals) de les mostres fecals albergaven 4 o menys clons cadascuna (mostres pauciclons), col·lectivament representaven el 63% (66) del total dels 105 clons fecals. Les altres sis mostres fecals (14%) albergaven 5 o més clons cadascuna (mostres multiclons), col·lectivament representaven el 37% (39) del total dels 105 clons fecals.

Grup filogenètic

A la Taula 24 es presenta la distribució dels grups filogenètics entre els 109 clons estudiats, amb una distribució decreixent de l'abundància dels mateixos des del grup A, passant pel B2, D i fins al B1. Com que moltes de les dones estudiades presenten múltiples clons, un anàlisi concret per dona proporciona valors més elevats en relació a aquestes proporcions. Així, de les 42 dones, el grup A es troba en el 42% de les mateixes, el grup B1 en un 21 %; el grup B2 en un 71% i el grup D en un 31 %. El grup B2 mostra doncs una prevalença més elevada (tant absoluta com proporcional) en l'anàlisi per subjecte, sobrepassant el grup A el qual és el grup filogenètic més prevalent quan s'avaluen tots els clons.

Factors de virulència

Dels 16 factors de virulència estudiats, tots excepte *papG* al·lel I es detecten en almenys 1 clon. El factor menys prevalent és *afa/draBC* (1%) i el més *fimH* (96%) (Taula 24). La majoria de factors de virulència s'associen estadísticament de forma significativa al grup B2 i al grup D. Per tant, el grau de virulència és superior en el grup B2 (mitja 7, rang 4 - 10), mig en el grup D (mitja 5, rang 2-7), i inferior en els grups A i B1 (mitja 2, rang 0 a 4) ($p < 0.001$ B2 vs. altres grups; $p < 0.001$ grup D vs. grup A i B1).

Figura 17. Distribució dels 109 clons d' *E. coli* entre les 42 dones amb cistitis no complicada

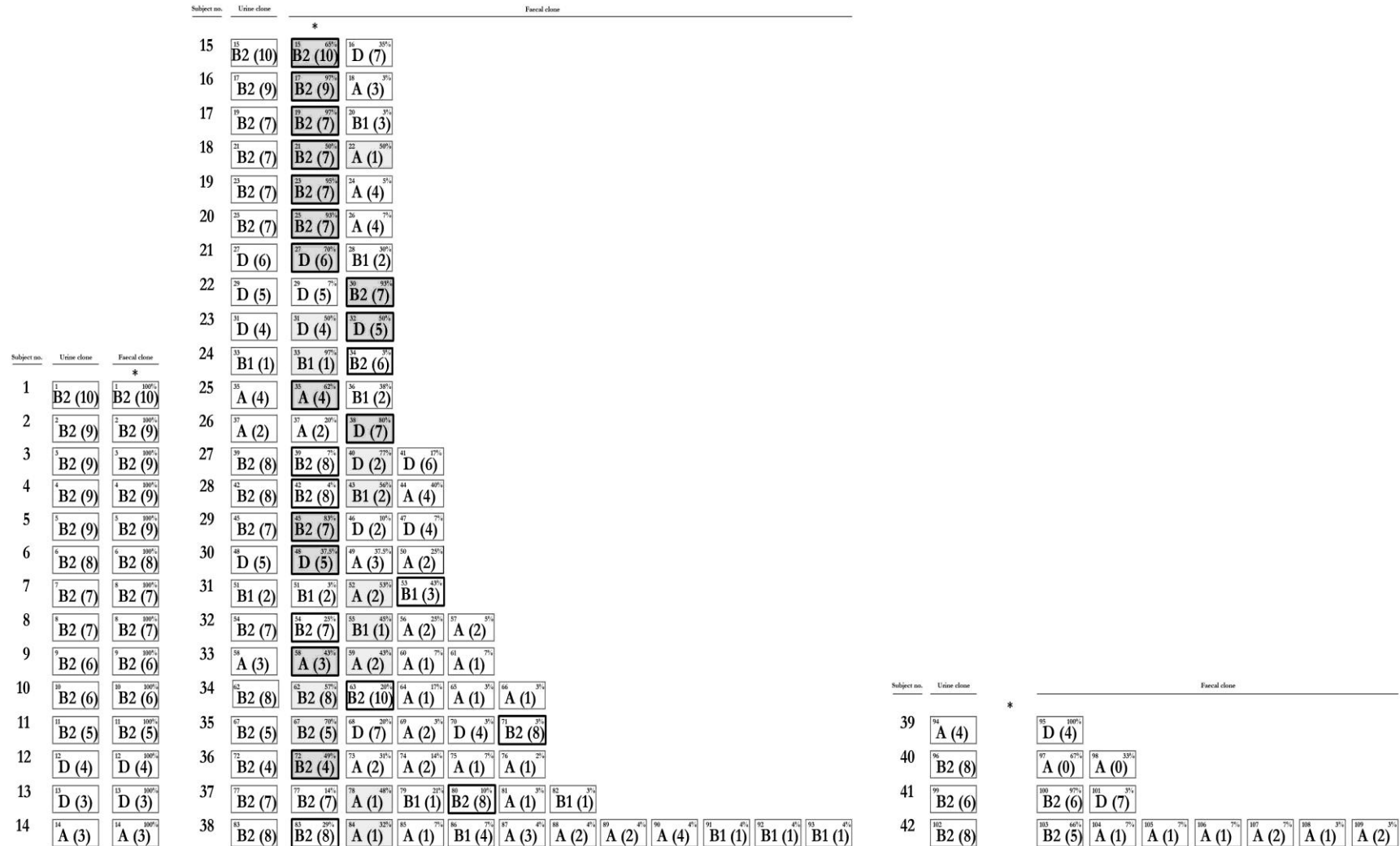
Els clons d' *E. coli* de cada dona es representen com un rectangle en una mateixa línia (de l'1 al 42). En cada clon s'identifica el número de clon (extrem superior esquerre), proporció del clon en la mostra fecal (extrem superior dret); grup filogenètic (inferior esquerra); i grau de virulència (inferior dret).

Ecological groups

Group I
urine clone = sole fecal clone

Group II
urine clone present among fecal clones

Group III
urine clone distinct from fecal clone



Taula 24. Distribució del grup filogenètic i factors de virulència segons l'origen i la diversitat dels clons en les mostres dels 109 clons d'*Escherichia coli* aïllats en dones amb cistitis.

	Total n = 109	Clons urinaris n = 42	Clons només fecals n = 67	<i>p</i> ^a	Mostra pauciclona (≤ 4 clons) n = 66	Mostra multiclona (≥ 5 clons) n = 39	<i>p</i> ^a
Grup filogenètic							
A	42 (38)	5 (12)	37 (55)	< .001	19 (29)	22 (56)	.005
B1	14 (13)	2 (5)	12 (18)	.046	8 (12)	6 (15)	
B2	36 (33)	29 (69)	7 (10)	< .001	24 (36)	9 (23)	
D	17 (16)	6 (14)	11 (16)		15 (23)	2 (5)	.018
Determinant de virulència							
<i>Adhesines</i>							
<i>papC</i>	27 (25)	17 (41)	10 (15)	.003	23 (35)	4 (10)	.005
<i>papA</i>	25 (23)	17 (41)	8 (12)	.001	20 (30)	4 (10)	.018
<i>papG</i> II	19 (17)	12 (29)	7 (10)	.015	18 (27)	1 (3)	.001
<i>papG</i> III	4 (4)	4 (10)	0	.020	3 (5)	0	
<i>fimH</i>	105 (96)	41 (98)	64 (96)		63 (95)	39 (100)	
<i>afa/dra</i> BC	1 (1)	1 (2)	0		0	0	
<i>sfa/foc</i> DE	23 (21)	17 (41)	6 (9)	< .001	17 (26)	5 (13)	
<i>Toxines</i>							
<i>hly</i>	21 (19)	15 (36)	6 (9)	.001	16 (24)	3 (8)	.033
<i>cnf1</i>	17 (16)	14 (33)	3 (5)	< .001	15 (23)	1 (3)	.005
<i>Sideròfors</i>							
<i>fyuA</i>	60 (55)	37 (88)	23 (34)	< .001	41 (62)	15 (38)	.019
<i>iutA</i>	46 (42)	26 (62)	20 (30)	.001	34 (52)	10 (26)	.009
<i>Protectines</i>							
<i>kpsM</i> II	50 (46)	34 (81)	16 (24)	< .001	37 (56)	9 (23)	.001
<i>traT</i>	52 (48)	24 (57)	28 (42)		34 (52)	15 (38)	
<i>Invasines</i>							
<i>ibeA</i>	12 (11)	8 (19)	4 (6)		4 (6)	7 (18)	
<i>Marcador PAI</i>							
<i>malX</i>	42 (39)	29 (69)	13 (19)	< .001	29 (44)	10 (26)	

Nota: Les dades corresponen al nombre (%) d'aïllats. malX = marcador de l'illa de patogenicitat de la soca d'E. coli CFT073; papA = subunitat estructural de la fímbria P; pap G = molècula d'adhesina de la fímbria P; fimH = fímbria tipus 1; afa/draBC = adhesines Família DR; sfa/focDE = fímbria S i F1C; kpsMII = càpsula polisacàrida del grup II; hlyA = hemolisina; cnf1 = factor citotòxic necrotitzant; traT = proteïna de membrana associada a la resistència al sèrum; fyuA = receptor yersinbactina; iutA = aerobactina; ibeA = invasor de l'endoteli cerebral.

^aNomés es mostren les diferències estadísticament significatives, *p* < 0.05

Característiques bacterianes en relació a l'origen del clons i el tipus de colonització

Els clons urinàris dels grups ecològics I, II i III pertanyen majoritàriament al grup filogenètic B2, posseïxen un elevat nombre de factors de virulència, i un grau de virulència similar (Taula 23). En canvi, els clons només-fecals del grup II i del grup III presenten una baixa prevalença del grup B2 (Taula 23), posseïxen pocs factors de virulència, i per tant un baix grau de virulència. A la Taula 24, tots els clons urinàris s'han agrupat per a comparar-los amb els clons només-fecals i s'observa que els clons urinàris presenten una elevada prevalença, estadísticament significativa, del grup B2 i dels múltiples gens de virulència individuals, i una baixa prevalença, estadísticament significativa, dels grups A i B1 en relació als clons només-fecals. Per tant, la mitja del grau de virulència dels clons urinàris era significativament superior (mitja 6,2 (rang 1-10) vs. 2,9 (rang 0-10); $p < 0,001$).

Comparat amb els clons fecals no-dominants, els clons fecals dominants representen el 79% dels clons urino-fecals (vs. 24% fecals no-dominants, $p < 0,001$) i deriven del grup B2 (52 % vs. 15%, $p < 0,001$). També presenten un elevat grau de virulència (5,2 vs. 3,2; $p < 0,001$). D'altra banda, comparat amb els clons de mostres fecals multiclonals, els clons de mostres pauciclonals pertanyen amb més proporció als grups B2 i D (en aquest últim de manera significativa), posseïxen més gens de virulència (Taula 24), una baixa prevalença del grup A, i un elevat grau de virulència (mitja 4,7, vs. 3 en les mostres fecals multiclonals, $p < 0,001$).

Model de regressió múltiple

Degut a la no-independència entre les múltiples soques obtingudes de cada mostra s'utilitza el model de regressió mixta. S'utilitza primer el model univariable per a predir l'estatus del clon urinari entre els 109 clons totals estudiats. Específicament, el grup filogenètic A és un predictor negatiu significatiu (i el grup B1 un borderline significatiu) de l'estatus clon urinari, mentre que el grup B2 és un predictor positiu significatiu de l'estatus clon urinari (odds ratio, 20.75; 95%CI, 7.08 – 60.74) i és el predictor més important en tot el conjunt. Altres predictors significatius positius inclouen 10 factors individuals de virulència, el grau de virulència (predictor molt més potent que un únic gen de virulència (odds ratio, 1,62; 95%CI, 1,34 - 1,97)), dominància fecal (odds ratio, 11,53; 95%CI, 4,52 to 29,46), abundància relativa fecal (odds ratio, 18,37; 95%CI, 5,03 - 67,11), i mostres fecals pauciclonals (odds ratio, 5,03; 95%CI, 1,84 to 13,73).

Posteriorment, es realitza un model mixte multivariable per a predir l'estatus de clon urinari utilitzant totes les possibles combinacions de grup B2 (com a grup filogenètic variable), grau de virulència (com a variable dels gens de virulència), mostres pauciclons, i clons dominants o clons fecals amb una prevalença absoluta (com a alternativa a la variable abundància-fecal). En aquest model totes les variables predictores es mostren estadísticament significatives (Taula 25). Quan el grup B2 s'inclou en el model, el grau de virulència no és estadísticament significatiu, però cadascuna de les tres variables individuals de colonització romanen significatives i incrementen el poder predictiu del model. Sense el grup B2 en el model, el grau de virulència passa a ser estadísticament significatiu i també ho és en presència de cada variable de colonització, individualment o en combinació.

Taula 25. Anàlisi multivariable dels determinants de virulència i el tipus de colonització com a predictors de clons d'origen urinari segon el model multivariable entre els 109 clons d'*Escherichia coli* aïllats en dones amb cistitis.

Model	Variables en el model i valors de <i>p</i>					-2 LL ^b
	Grup B2	Grau de virulència	Mostra pauciclons	Clon dominant	Prevalença del clon en la mostra fecal	
1	< .001	(ns) ^c	.01	-	-	93
2	< .001	(ns) ^c	(ns) ^c	.001	-	92
3	< .001	(ns) ^c	(ns) ^c	-	.005	92
4	-	< .001	.02	-	-	99
5	-	< .001	-	.003	-	94
6	-	< .001	-	-	.01	97
7	-	< .001	.02	< .001	-	91
8	-	< .001	.03	-	.01	91

^a Els models s'han construït utilitzant totes les combinacions del grup filogenètic B2, grau de virulència, mostra fecal pauciclons, i clon dominant o prevalença en la femta. Només s'inclouen en la taula els 8 models on en els quals $p < 0,05$. Les variables no incloses en un model concret corresponen a les marcades amb un guionet (-).

^b -2 LL (log likelihood) indica el nivell d'aproximació del model, valors baixos indiquen un millor model.

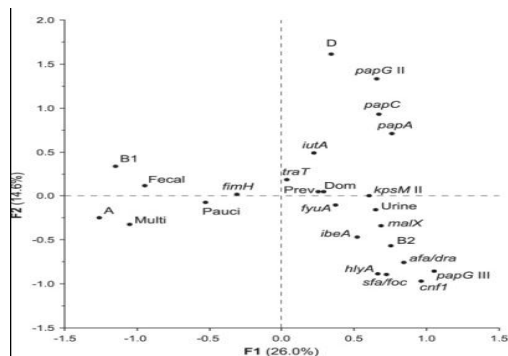
^c Les variables incloses en un model que no són estadísticament significatives i tampoc alteren el nivell de significació estadística d'altres variables incloses en el mateix model es mostren com (ns).

Anàlisi de correspondència múltiple

Per avaluar les relacions de totes les variables estudiades s'ha realitzat un estudi de l'anàlisi de correspondència.

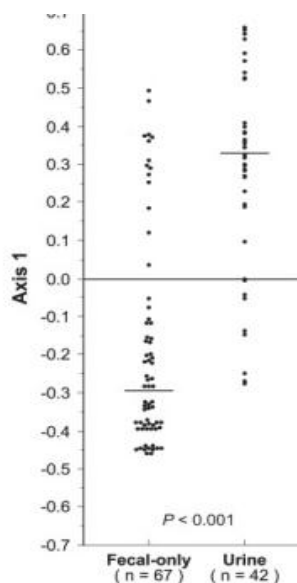
Els eixos F1 i F2 presenten el 26% i 14,6% del total de la variances, respectivament. En el pla F1- F2, molts factors de virulència s'agrupen formant un clúster al voltant de l'estatus clon urinari, així com del grup B2, estatus clon dominant i prevalença (Figura 18). L'estatus de mostra fecal pauciclons esta més relacionat amb l'estatus clon urinari que no pas el de mostra fecal multiclons, en canvi l'estatus mostra fecal multiclons esta relacionat amb l'estatus clon només-fecal. Els grups A i B1, estan molt relacionats amb l'estatus clon només-fecal, i molt allunyats de la variable clon urinari

Figura 18. Anàlisi de correspondència múltiple per als determinants de virulència i l'estatus de colonització entre les 109 soques d'*E. coli*.



Els 16 factors de virulència estudiats, els quatre grups filogenètics (A, B1, B2 I D), l'origen del clon (urinari o fecal), la mostra fecal pauciclona (Pauci) o multiclona (Multi), l'estatus dominant del clon (Dom), i la prevalença en la femta (Prev) s'han projectat en els eixos F1-F2. L'eix F1 conté el 26% de la variances total i l'eix F2 el 14,6%.

Figura 19. Distribució dels 109 clons d'*Escherichia coli* en relació al seu origen (urinari o només-fecal) segons el seu valor en el primer eix de l'anàlisi de coordenades principals



Anàlisi de coordenades principals

L'anàlisi de coordenades principals s'utilitza per a simplificar les dades multidimensionals entre els grups comparats (Figura 19). En l'estudi d'anàlisi de coordenades principals s'incorporen els factors de virulència de forma individual, el

grup filogenètic, la prevalença fecal, clon dominant i estatus de mostra pauciclinal. Els tres primers eixos mostren una variances total de 46,6%, 17,6% i 11,1%. L'eix 1 separa significativament els clons urinaris dels només-fecals ($p < 0,001$), el 42% d'urinaris vs. la variances de l'estatus només-fecal (Figura 20). En canvi, l'eix 2 només agrupa el 0,7% de clons urinaris vs. variances només-fecal ($p > 0,30$). L'eix 3 presenta una significació *borderline* dels clons urinaris i fecals tenint només un 3% de variances entre el clon urinari vs. estatus només-fecal ($p = 0,006$).

Comparació de les poblacions fecal en dones sanes vs. en dones amb infecció urinària (Estudi 3 vs. Estudi 4)

Les dues cohorts de dones (sanes vs. amb IU) eren de la mateixa àrea geogràfica, i la distribució de l'edat també era similar (mitja d'edat de 29,7 anys en dones sanes vs. De 30,4 anys en dones amb infecció urinària, $p = 0,7$).

Observacions de la comparació dels dos estudis:

- 1- Les dues poblacions de dones presentaven una proporció elevada de poblacions fecals amb un únic clon (23% en dones sanes vs. 36% en dones amb IU, $p > 0,05$).
- 2- Els clons d'*E. coli* del grup filogenètic B2 es varen aïllar en un 71% de dones amb infecció urinària i en canvi només en un 36% de dones sanes ($p = 0,001$). Mentre que el grup D estava relacionat inversament (31 % en dones amb IU vs. 67% en dones sanes, $p = 0,001$). En canvi, dones amb IU i dones sanes presenten unes proporcions similars dels grups A (41% i 49%, respectivament) i B1 (21 % i 33%, respectivament).
- 3- Els clons del grup B2 presenten més factors de virulència que els clons dels grups A, B1 o D
- 4- Tant en dones sanes com en dones amb IU, els clons fecals del grup B2, i en menys mesura del grup D, es trobaren significativament associats a mostres pauciclonals i tendrien a ser els clons dominants.

Aquestes observacions permeten hipotetitzar que abans de tenir lloc un episodi d'infecció urinària, l'intestí de la dona s'experimenta un important increment de la colonització per soques d'*E. coli* del grup filogenètic B2, i que aquestes soques tendeixen a predominar sobre la població fecal. Per tant, l'èxit de la predominança, o

de l'elevada abundància, d'un clon dintre de la flora fecal de l'hoste podria constituir un primer pas, important en la patogènesi de la infecció urinària. Aquests resultats coincideixen amb l'estudi de LeGall *et al.* que es basa en l'anàlisi de l'evolució i l'ecologia d'una àmplia col·lecció de soques d'*E. coli* fecals i clíniques¹⁷⁵.

En un previ estudi, comparant la soca urinària i la soca fecal de dones amb cistitis¹⁴⁸, es suggeria que la soca causant d'infecció urinària era tant la més virulenta com la més abundant entre les soques d'*E. coli* aïllades a la femta. Però el petit nombre estudiat de dones (n=11) i de colònies fecals per mostra (3 per dona) era un estudi molt limitat per a donar força a aquestes conclusions. A més a més, a part de la limitació del nombre de soques estudiades en la femta de l'hoste tant en aquest estudi¹⁴⁸, com en estudis prèvis amb noies^{45,137}, dones¹⁷⁹, homes¹⁸⁰, i gossos¹⁸¹ amb infecció urinària exclou una avaluació de la diversitat clonal de la població fecal de l'hoste, que suposen que varia en funció de la naturalesa dels clons colonitzats i de la influència dels risc de patir infecció urinària. Per tant, en aquest estudi s'avalua l'abundància relativa, la virulència molecular, i el grup filogenètic de cada clon fecal en comparació amb el clon causants d'infecció urinària del mateix hoste en relació a la complexitat clonal de la mostra fecal.

Aquest estudi, fins al nostre coneixement, és el primer que avalua la prevalença quantitativa dels clons fecals, o la naturalesa de les mostres fecals pauciclonsals vs. multiclonsals, en relació al grup filogenètic, el perfil de factors de virulència i l'estatus d'infecció urinària, i compara els clons urinàris i fecals del mateix hoste segons característiques moleculars amb mètodes estadístics com el model multivariable, l'anàlisi de correspondència i l'anàlisi de coordenades principals. Per tant, es validen els estudis prèviament fets per nosaltres¹⁴⁸ en una població més elevada i amb un superior rigor metodològic.

5. Conclusions

5.1. ESTUDI 1

Caracteritzar els factors de virulència i el grup filogenètic de soques d'*E. coli* procedents de mostres clíniques de pacients amb diferents patologies.

1. L'al·lel II de *papG* sembla ser un tret fonamental perquè les soques d' *E. coli* puguin accedir al ronyó, mentre que *cnf1* i *sfa/focDE* són importants perquè la soca d' *E. coli* pugui ser capaç de causar bacterièmia d'origen urinari.
2. Les soques d' *E. coli* causants de bacterièmia d'origen urinari poden ser considerades un grup diferenciat. En trets generals, aquestes soques comparteixen avantpassats evolutius amb els restants membres ExPEC, com indica el predomini del grup filogenètic B2 i diversos trets de virulència. No obstant això, alguns factors semblen ser crítics perquè pugui tenir lloc la bacterièmia, com ara la presència de fimbries P (especialment l'al·lel II de *papG*) que permeten que les soques d'*E. coli* puguin accedir al ronyó, i la presència de toxines (*cnf1*) i de fimbries S i/o F1C (*sfa/focDE*) que produïrien urosepsis. Aquestes dades impliquen que, per una determinada patologia, trets específics d' *E. coli* poden ser igualment importants o més importants per a la capacitat patogènica, que el nombre total de factors de virulència presents en una soca.

5.2. ESTUDI 2

Avaluar la relació entre la resistència a quinolones, fluoroquinolones i trimetoprim/sulfametoxazole, el potencial virulent i el grup filogenètic de soques d' *Escherichia coli*, provinents de mostres clíniques.

1. Les soques només resistents a quinolones (per tant sensibles a fluoroquinolones i trimetoprim/sulfametoxazole) deriven principalment del grup B2.
2. Les soques resistents a quinolones i fluoroquinolones (però sensibles a trimetoprim/sulfametoxazole) deriven del grup A.

3. Aquests dos subgrups (*E. coli* resistent només a quinolones i *E. coli* resistent a fluoroquinolones) representen dues poblacions diferents. Les soques quinolones resistents podrien derivar predominantment de les soques sensibles del grup B2 (possiblement dins de l'hoste), mentre que les soques resistents a fluoroquinolones derivarien de soques sensibles del grup A (possiblement dins de l'hoste), per adquisició de resistència mitjançant mutacions a *gyrA* i *parC* en el context de l'exposició a quinolones o fluoroquinolones.
4. Les soques d'*E. coli* resistents a fluoroquinolones aïllades en pacient amb infecció urinària s'associen a la disminució de la prevalença de factors de virulència i a grups filogenètics no B2.
5. S'accepta que les soques d'*E. coli* extraintestinals més virulentes pertanyen al grup filogenètic B2, i en menys mesura al grup D, mentre que les soques comensals pertanyen al grup A. Aquest fet ens permet hipotetitzar que l'ús de les fluoroquinolones pot eliminar *E. coli* sensibles de l'intestí, i que degut a l'elevat nombre d'*E. coli* comensals existents en aquest nínxol, probablement algun d'ells podria emergir com a fluoroquinolona resistent. Això permetria a les soques resistents però menys virulentes del grup A causar malaltia, principalment en hostes amb factors predisponents (que són els que també estan més exposats als antimicrobians).
6. Les soques d'*E. coli* pertanyents al grup clonal A (CGA) representen el 7% de soques resistents a trimetoprim/sulfometoxazole, i totes han estat aïllades en pacients amb pielonefritis, suggerint que en la nostra àrea CGA és particularment pielonefrigènica.

5.3. ESTUDI 3

Conèixer l'estructura de les poblacions intestinals d' *E. coli* en dones sanes, per posteriorment poder-la comparar amb les poblacions intestinals de les dones amb infeccions urinàries causades per aquest mateix bacteri.

1. En el nínxol intestinal humà coexisteixen diferents clons d' *E. coli*. Alguns d'aquests clons són intrínsecament més virulents que d'altres, doncs deriven de grups filogenètics patogènics i presenten més factors de virulència. Igualment, alguns d'aquests clons són més abundants o predominants que d'altres, fet que prodria incrementar la seva probabilitat

per a causar infeccions, independentment del grau de virulència que presentin.

2. Per tant, amb tota probabilitat, a més a més dels factors afavoridors locals o generals d' infecció de l' hoste, l'estructura de la població intestinal també juga un paper molt important en la patogènia de la infecció urinària.
3. Aquest estudi és dels poquíssims existents a la lliteratura que analitza amb detall les diferents poblacions d' *E. coli* existents a la femta de les persones sanes. Com a fortaleses podriem anomenar les següents: que inclou una mostra relativament àmplia; que la minuciosa metodologia per a seleccionar un total de 30 colònies d' *E. coli* per mostra, permet diferenciar entre clons dominants i no-dominants, i conèixer la diversitat de la població d' *E. coli* intestinal; la caracterització extensiva molecular dels clons, i un anàlisi estadístic complementari.

5.4. ESTUDI 4

Conèixer l' estructura de les poblacions fecals d' *E. coli* en dones amb infecció urinària, analitzant la seva relació amb la soca causant de la infecció. Analitzar les diferències entre les poblacions fecals d' *E. coli* en dones sanes i en dones amb infecció urinària.

1. Els nostres resultats indiquen que entre dones amb cistitis no complicada la població fecal d' *E. coli* varia considerablement de l'una a l'altre respecte a la diversitat clonal i a la distribució filogenètica. Els clons d' *E. coli* dels grup filogenètics B2 i D són més comuns en mostres pauciclonsals i tendeixen a ser clons dominants.
2. Els clons urinaris, almenys aquells detectats en la flora fecal en el moment de la majoritàriament enriqueixen la flora intestinal amb soques proveïdes de factors de virulència i derivades del grup B2, donant suport a la teoria de l'especial patogenicitat.
3. Per altra banda, el clon urinari tendeix a ser el clon fecal més abundant en l'hoste, o clon dominant, donant suport a la teoria de la prevalença.
4. Això suggereix que la teoria de la prevalença i la de l'especial patogenicitat no són alternatives, o exclusives, per a explicar l'origen de la soca d'infecció urinària. Ans al contrari, ambdues teories semblen ser complementàries. Els factors de virulència i altres característiques associades al grup B2 possiblement promouen la dominància intestinal i conseqüentment

incrementen la probabilitat que tinguin lloc pasos posterior de la patogènesi.

5. Les dones amb infecció urinària que estan colonitzades per molts clons d' *E. coli* tendeixen a tenir poca virulència, i a no ser clons B2. Mentre que aquelles dones amb colonitzades amb pocs clons, aquests tendeixen a ser clons amb una elevada virulència i del grup B2.

Podria ser que certes dones fossin particularment receptives a la colonització intestinal per clons virulents, els quals competirien amb els altres clons desproveïts de factors de virulència, desplaçant-los i establint una nova poca-diversitat de clons B2 dominants en la flora fecal. Mentre que altres dones podrien presentar una colonització intestinal amb qualsevol tipus de clon que adquireixin.

Alternativament, aquest fenomen podria no ser en funció de les característiques de l'hoste, sino ser una funció de les pròpies soques, on les soques del grup B2 tendeixen a desplaçar altres grups filogenètics mitjançant una millor adaptació al nínxol i/o inhibir els altres clons.

Taules i figures

- Taula 1. Classificació d' *Escherichia coli* segons la patologia
- Taula 2. Identificació bioquímica d'*Escherichia coli*
- Taula 3. Resum d'una selecció de factors de virulència d'*Escherichia coli* uropatògena
- Taula 4. Adhesines d'*Escherichia coli* uropatògena
- Taula 5. Antígens P del grup sanguini i fenotips
- Taula 6. Estructures i nomenclatures dels oligosacàrids que contenen Gal(α 1-4)Gal
- Taula 7. Classificació de les càpsules polisacàrides d'*Escherichia coli*
- Taula 8. Illes de patogenicitat en *E. coli* uropatògena
- Taula 9. Classificació de les quinolones i fluoroquinolones
- Taula 10 Tractament de la cistitis no complicada en el nostre medi
- Taula 11. Característiques clíniques dels pacients corresponents a l'ESTUDI 2.
- Taula 12. Interpretació de la sensibilitat antimicrobiana segons el diàmetre d'inhibició del creixement, valors recomanats per la CLSI.
- Taula 13. Descripció dels encebador utilitzats
- Taula 14. Distribució del grup filogenètic i dels gens de virulència entre les 50 soques d'*E. coli* aïllades en l'orina de pacients amb pielonefritis i les 100 soques d'*E. coli* aïllades en la sang de pacients amb bacterièmia (50 d'origen urinari i 50 d'altres orígens).
- Taula 15. La distribució dels factors de virulència entre els grups filogenètics
- Taula 16. Relació entre els factors de virulència i els factors generals o locals de l'hoste afavoridors de la infecció només s'ha analitzant entre les 100 soques uropatògenes d'*Escherichia coli* (Taula 16)
- Taula 17. Distribució dels grups filogenètics i els factors de virulència en relació a la sensibilitat de les soques d'*E. coli* a les quinolones, fluoroquinolones i trimetoprim/sulfametoxazol.
- Taula 18. Distribució dels grup filogenètic i factors de virulència en funció del fenotip de sensibilitat als tres antimicrobians estudiats en *E. coli* (quinolones, fluoroquinolones i trimetoprim/sulfametoxazole
- Taula 19. Distribució dels diferents grups filogenètics entre els 40 clons dominants i els 80 clons no-dominants
- Taula 20. Distribució dels diferents grups filogenètics entre les mostres fecals pauciclonsals i les multiclonsals
- Taula 21. Taula 21. Distribució dels factors de virulència entre les 120 clons d'*E. coli*
- Taula 22. Model d'anàlisi multivariable per a predir el grau de virulència dels 120 clons fecals d'*Escherichia coli* segons el grup filogenètic i el tipus de colonització Taula 23. Distribució filogenètica dels 109 clons d'*Escherichia coli* en dones amb IU en relació al grup ecològic i l'origen de la mostra.

- Taula 24. Distribució del grup filogenètic i factors de virulència segons l'origen i la diversitat dels clons en les mostres dels 109 clons d'*Escherichia coli* aïllats en dones amb cistitis.
- Taula 25. Anàlisi multivariable dels determinants de virulència i el tipus de colonització com a predictors de clons d'origen urinari segons el model multivariable entre els 109 clons d' *Escherichia coli* aïllats en dones amb cistitis
- Figura 1. Principals factors de virulència de les soques uropatògenes d' *Escherichia coli*
- Figura 2. Organització genètica de l'operó que codifica per a la fimbria tipus 1 d'*Escherichia coli*.
- Figura 3. Variació de fase en l'expressió de la fimbria tipus 1 d'*Escherichia coli*.
- Figura 4. Organització genètica de l'operó *pap* d'*Escherichia coli*
- Figura 5 Model d'estructura i assemblatge de la fimbria P
- Figura 6. Organització genètica dels operons *Afa/Dra afa1, afa7* i *afa8,i dra*
- Figura 7. Organització genètica dels operons *sfa* i *foc*.
- Figura 8. Toxines associades a *Escherichia coli* uropatógena: α -hemolisina (HlyA) i factor citotòxic necrotitzant 1 (CNF1).
- Figura 9. Estructura del determinant de l'alpha-hemolisina en *E. coli*
- Figura 10. Funcions de la càpsula polisacàrida d'*Escherichia coli* uropatògena
- Figura 11. Diagrama comparant l'organització general del cluster del gens que codifiquen per a la càpsula polisacàrida d'*E. coli* K5, *H. influenzae*, i *N. meningitidis*
- Figura 12. Seqüència del determinant d'aerobactina d'*Escherichia coli*
- Figura 13 Arbre dicotòmic per determinar el grup filogenètic d'*E. coli* segons el resultat de l'amplificació dels productes *chuA*, *yjaA* i el fragment TSPE4.C2.
- Figura 14. Representació dels perfils d'ERIC-PCR de les 42 soques d'*Escherichia coli* resistents a trimetoprim-sulfametoxazole i les dues soques de referència (J722 i ECOR47) mitjançant el mètode UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic*).
- Figura 15. Distribució dels 120 clones d'*Escherichia coli* fecals entre 39 dones sanes.
- Figura 16. Anàlisi de correspondència entre els trets bacterians i l'estatus de colonització entre els 120 clons d'*Escherichia coli* aïllats en 39 dones sanes
- Figura 17. Distribució dels 109 clons entre les 42 dones amb cistitis
- Anàlisi de correspondència múltiple per als determinants de virulència i l'estatus de colonització entre les 109 soques d'*E. coli*
- Figura 19. Distribució dels 109 clons d'*Escherichia coli* en relació al seu origen (urinari o només-fecal) segons el seu valor en el primer eix de l'anàlisi de coordenades principals

Bibliografia

1. Bettelheim K.A. *Escherichia coli* in the normal flora of humans and animals. (Cambridge University Press, 1997).
2. Herzer, P. J., Inouye, S., Inouye, M. & Whittam, T. S. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**, 6175–6181 (1990).
3. Picard, B. et al. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect. Immun.* **67**, 546–553 (1999).
4. Selander, R. K. et al. Genetic relationships and clonal structure of strains of *Escherichia coli* causing neonatal septicemia and meningitis. *Infect. Immun.* **52**, 213–222 (1986).
5. Russo, T. A. & Johnson, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J. Infect. Dis.* **181**, 1753–1754 (2000).
6. Lecointre, G., Rachdi, L., Darlu, P. & Denamur, E. *Escherichia coli* molecular phylogeny using the incongruence length difference test. *Mol. Biol. Evol.* **15**, 1685–1695 (1998).
7. Johnson, J. R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **4**, 80–128 (1991).
8. Johnson, J. R. Microbial virulence determinants and the pathogenesis of urinary tract infection. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **17**, 261–278, viii (2003).
9. Lane, M. C. & Mobley, H. L. T. Role of P-fimbrial-mediated adherence in pyelonephritis and persistence of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in the mammalian kidney. *Kidney Int.* **72**, (2007).
10. Mulvey, M. A. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell. Microbiol.* **4**, 257–271 (2002).
11. Marre, R., Hacker, J., Henkel, W. & Goebel, W. Contribution of cloned virulence factors from uropathogenic *Escherichia coli* strains to nephropathogenicity in an experimental rat pyelonephritis model. *Infect. Immun.* **54**, 761–767 (1986).
12. Anderson, G. G. et al. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science* **301**, 105–107 (2003).
13. Mulvey, M. A. et al. Induction and evasion of host defenses by type 1-

- piliated uropathogenic *Escherichia coli*. Science **282**, 1494–1497 (1998).
14. Wright, K. J., Seed, P. C. & Hultgren, S. J. Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* depends on type 1 pili. Cell. Microbiol. **9**, 2230–2241 (2007).
 15. Wiles, T. J., Dhakal, B. K., Eto, D. S. & Mulvey, M. A. Inactivation of host Akt/protein kinase B signaling by bacterial pore-forming toxins. Mol. Biol. Cell **19**, 1427–1438 (2008).
 16. Smith, Y. C., Rasmussen, S. B., Grande, K. K., Conran, R. M. & O'Brien, A. D. Hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli* evokes extensive shedding of the uroepithelium and hemorrhage in bladder tissue within the first 24 hours after intraurethral inoculation of mice. Infect. Immun. **76**, 2978–2990 (2008).
 17. Lemonnier, M., Landraud, L. & Lemichez, E. Rho GTPase-activating bacterial toxins: from bacterial virulence regulation to eukaryotic cell biology. FEMS Microbiol. Rev. **31**, 515–534 (2007).
 18. Rippere-Lampe, K. E., O'Brien, A. D., Conran, R. & Lockman, H. A. Mutation of the gene encoding cytotoxic necrotizing factor type 1 (cnf(1)) attenuates the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. **69**, 3954–3964 (2001).
 19. Rama, G., Chhina, D. K., Chhina, R. S. & Sharma, S. Urinary tract infections-microbial virulence determinants and reactive oxygen species. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. **28**, 339–349 (2005).
 20. Johnson, J. R. & Stell, A. L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. J. Infect. Dis. **181**, 261–272 (2000).
 21. Holden, N. J. & Gally, D. L. Switches, cross-talk and memory in *Escherichia coli* adherence. J. Med. Microbiol. **53**, 585–593 (2004).
 22. Torres, A. G., Redford, P., Welch, R. A. & Payne, S. M. TonB-dependent systems of uropathogenic *Escherichia coli*: aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse. Infect. Immun. **69**, 6179–6185 (2001).
 23. Huang, S. H. et al. Identification and characterization of an *Escherichia coli* invasion gene locus, *ibeB*, required for penetration of brain microvascular

- endothelial cells. *Infect. Immun.* **67**, 2103–2109 (1999).
24. Pak, J., Pu, Y., Zhang, Z. T., Hasty, D. L. & Wu, X. R. Tamm-Horsfall protein binds to type 1 fimbriated *Escherichia coli* and prevents *E. coli* from binding to uroplakin Ia and Ib receptors. *J. Biol. Chem.* **276**, 9924–9930 (2001).
 25. Gunther, N. W. 4th, Lockatell, V., Johnson, D. E. & Mobley, H. L. In vivo dynamics of type 1 fimbria regulation in uropathogenic *Escherichia coli* during experimental urinary tract infection. *Infect. Immun.* **69**, 2838–2846 (2001).
 26. Holden, N. J. et al. Demonstration of regulatory cross-talk between P fimbriae and type 1 fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol. Read. Engl.* **152**, 1143–1153 (2006).
 27. Xia, Y., Gally, D., Forsman-Semb, K. & Uhlin, B. E. Regulatory cross-talk between adhesin operons in *Escherichia coli*: inhibition of type 1 fimbriae expression by the PapB protein. *EMBO J.* **19**, 1450–1457 (2000).
 28. Sokurenko, E. V., Courtney, H. S., Maslow, J., Siitonen, A. & Hasty, D. L. Quantitative differences in adhesiveness of type 1 fimbriated *Escherichia coli* due to structural differences in fimH genes. *J. Bacteriol.* **177**, 3680–3686 (1995).
 29. Ronald, L. S. et al. Adaptive mutations in the signal peptide of the type 1 fimbrial adhesin of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 10937–10942 (2008).
 30. Wold, A. E., Caugant, D. A., Lidin-Janson, G., de Man, P. & Svanborg, C. Resident colonic *Escherichia coli* strains frequently display uropathogenic characteristics. *J. Infect. Dis.* **165**, (1992).
 31. Snyder, J. A. et al. Coordinate expression of fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **73**, 7588–7596 (2005).
 32. Tullus, K., Kuhn, I., Orskov, I., Orskov, F. & Mollby, R. The importance of P and type 1 fimbriae for the persistence of *Escherichia coli* in the human gut. *Epidemiol. Infect.* **108**, 415–421 (1992).
 33. Hamrick, T. S. et al. Genetic characterization of *Escherichia coli* type 1 pilus adhesin mutants and identification of a novel binding phenotype. *J. Bacteriol.* **182**, 4012–4021 (2000).
 34. Goetz, M. B., Kuriyama, S. M. & Silverblatt, F. J. Phagolysosome

- formation by polymorphonuclear neutrophilic leukocytes after ingestion of *Escherichia coli* that express type 1 pili. *J. Infect. Dis.* **156**, 229–233 (1987).
35. Ishikawa, K., Sundelin, B., Möllby, R., Normark, S. & Winberg, J. Receptors for *Escherichia coli* adhesins in the genitourinary tract in a non-human primate. *Scand. J. Urol. Nephrol.* **38**, 3–14 (2004).
 36. Antonia Andreu. Factores de virulencia de *E. coli* en la patogenia de la infección urinaria. (Universitat Autònoma de Barcelona, 1990).
 37. Fischer, H. et al. Ceramide as a TLR4 agonist; a putative signalling intermediate between sphingolipid receptors for microbial ligands and TLR4. *Cell. Microbiol.* **9**, 1239–1251 (2007).
 38. Bergsten, G., Wullt, B. & Svanborg, C. *Escherichia coli*, fimbriae, bacterial persistence and host response induction in the human urinary tract. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* **295**, (2005).
 39. Hull, R. A. et al. Virulence properties of *Escherichia coli* 83972, a prototype strain associated with asymptomatic bacteriuria. *Infect. Immun.* **67**, 429–432 (1999).
 40. Bjornham, O., Nilsson, H., Andersson, M. & Schedin, S. Physical properties of the specific PapG-galabiose binding in *E. coli* P pili-mediated adhesion. *Eur. Biophys. J. EBJ* **38**, 245–254 (2009).
 41. Tseng, C. C. et al. PapG II adhesin in the establishment and persistence of *Escherichia coli* infection in mouse kidneys. *Kidney Int.* **71**, 764–770 (2007).
 42. Zhao, L. et al. Prevalence of virulence factors and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli* in Jiangsu province (China). *Urology* **74**, 702–707 (2009).
 43. Otto, G., Magnusson, M., Svensson, M., Braconier, J. & Svanborg, C. pap genotype and P fimbrial expression in *Escherichia coli* causing bacteremic and nonbacteremic febrile urinary tract infection. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **32**, 1523–1531 (2001).
 44. Nowrouzian, F., Adlerberth, I. & Wold, A. E. P fimbriae, capsule and aerobactin characterize colonic resident *Escherichia coli*. *Epidemiol. Infect.* **126**, 11–18 (2001).
 45. Nowrouzian, F. L., Adlerberth, I. & Wold, A. E. Enhanced persistence in the colonic microbiota of *Escherichia coli*

- strains belonging to phylogenetic group B2: role of virulence factors and adherence to colonic cells. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* **8**, 834–840 (2006).
46. Nowrouzian, F. L., Wold, A. E. & Adlerberth, I. *Escherichia coli* strains belonging to phylogenetic group B2 have superior capacity to persist in the intestinal microflora of infants. *J. Infect. Dis.* **191**, 1078–1083 (2005).
 47. Bagger-Skjot, L. et al. Association between antimicrobial resistance and virulence genes in *Escherichia coli* obtained from blood and faeces. *Scand. J. Infect. Dis.* **39**, 724–727 (2007).
 48. Wold, A. E., Thorssen, M., Hull, S. & Edén, C. S. Attachment of *Escherichia coli* via mannose- or Gal alpha 1----4Gal beta-containing receptors to human colonic epithelial cells. *Infect. Immun.* **56**, 2531–2537 (1988).
 49. Servin, A. L. Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 264–292 (2005).
 50. Nowicki, B., Moulds, J., Hull, R. & Hull, S. A hemagglutinin of uropathogenic *Escherichia coli* recognizes the Dr blood group antigen. *Infect. Immun.* **56**, 1057–1060 (1988).
 51. Nowicki, B., Hart, A., Coyne, K. E., Lublin, D. M. & Nowicki, S. Short consensus repeat-3 domain of recombinant decay-accelerating factor is recognized by *Escherichia coli* recombinant Dr adhesin in a model of a cell-cell interaction. *J. Exp. Med.* **178**, 2115–2121 (1993).
 52. Westerlund, B. et al. The O75X adhesin of uropathogenic *Escherichia coli* is a type IV collagen-binding protein. *Mol. Microbiol.* **3**, 329–337 (1989).
 53. Nowicki, B., Svanborg-Edén, C., Hull, R. & Hull, S. Molecular analysis and epidemiology of the Dr hemagglutinin of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **57**, 446–451 (1989).
 54. Labigne-Roussel, A., Schmidt, M. A., Walz, W. & Falkow, S. Genetic organization of the afimbrial adhesin operon and nucleotide sequence from a uropathogenic *Escherichia coli* gene encoding an afimbrial adhesin. *J. Bacteriol.* **162**, 1285–1292 (1985).
 55. Van Loy, C. P., Sokurenko, E. V. & Moseley, S. L. The major structural subunits of Dr and F1845 fimbriae are adhesins. *Infect. Immun.* **70**, 1694–1702 (2002).
 56. Moch, T., Hoschützky, H., Hacker, J., Kröncke, K. D. & Jann, K. Isolation and

- characterization of the alpha-sialyl-beta-2,3-galactosyl-specific adhesin from fimbriated *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **84**, 3462–3466 (1987).
57. Huovinen, P., Sundström, L., Swedberg, G. & Sköld, O. Trimethoprim and sulfonamide resistance. Antimicrob. Agents Chemother. **39**, 279–289 (1995).
58. Ott, M., Hoschützky, H., Jann, K., Van Die, I. & Hacker, J. Gene clusters for S fimbrial adhesin (sfa) and F1C fimbriae (foc) of *Escherichia coli*: comparative aspects of structure and function. J. Bacteriol. **170**, 3983–3990 (1988).
59. Parkkinen, J., Korhonen, T. K., Pere, A., Hacker, J. & Soinila, S. Binding sites in the rat brain for *Escherichia coli* S fimbriae associated with neonatal meningitis. J. Clin. Invest. **81**, 860–865 (1988).
60. Backhed, F. et al. Identification of target tissue glycosphingolipid receptors for uropathogenic, J. Biol. Chem. **277**, 18198–18205 (2002).
61. Cavalieri, S. J., Bohach, G. A. & Snyder, I. S. *Escherichia coli* alpha-hemolysin: characteristics and probable role in pathogenicity. Microbiol. Rev. **48**, 326 (1984).
62. Johnson, J. R. & Russo, T. A. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: 'the other bad E coli'. J. Lab. Clin. Med. **139**, 155–162 (2002).
63. Walton, J. R. & Smith, D. H. New hemolysin (gamma) produced by *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **98**, 304–305 (1969).
64. Cavalieri, S. J. & Snyder, I. S. Effect of *Escherichia coli* alpha-hemolysin on human peripheral leukocyte viability in vitro. Infect. Immun. **36**, 455–461 (1982).
65. Gadeberg, O. V., Orskov, I. & Rhodes, J. M. Cytotoxic effect of an alpha-hemolytic *Escherichia coli* strain on human blood monocytes and granulocytes in vitro. Infect. Immun. **41**, 358–364 (1983).
66. Gadeberg, O. V. & Orskov, I. In vitro cytotoxic effect of alpha-hemolytic *Escherichia coli* on human blood granulocytes. Infect. Immun. **45**, 255–260 (1984).
67. Dhakal, B. K. & Mulvey, M. A. The UPEC pore-forming toxin alpha-hemolysin triggers proteolysis of host proteins to disrupt cell adhesion, inflammatory, and survival pathways. Cell Host Microbe **11**, (2012).

68. Nagamatsu, K. et al. Dysregulation of *Escherichia coli* alpha-hemolysin expression alters the course of acute and persistent urinary tract infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E871–880 (2015).
69. Justice, S. S. & Hunstad, D. A. UPEC hemolysin: more than just for making holes. *Cell Host Microbe* **11**, (2012).
70. Goebel, W. & Hedgpeth, J. Cloning and functional characterization of the plasmid-encoded hemolysin determinant of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **151**, 1290–1298 (1982).
71. Lebek, G. & Gruenig, H. M. Relation between the hemolytic property and iron metabolism in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **50**, 682–686 (1985).
72. Siitonen, A. *Escherichia coli* in fecal flora of healthy adults: serotypes, P and type 1C fimbriae, non-P mannose-resistant adhesins, and hemolytic activity. *J. Infect. Dis.* **166**, 1058–1065 (1992).
73. Fiorentini, C. et al. *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1: evidence for induction of actin assembly by constitutive activation of the p21 Rho GTPase. *Infect. Immun.* **63**, 3936–3944 (1995).
74. Mills, M., Meysick, K. C. & O'Brien, A. D. Cytotoxic necrotizing factor type 1 of uropathogenic *Escherichia coli* kills cultured human uroepithelial 5637 cells by an apoptotic mechanism. *Infect. Immun.* **68**, 5869–5880 (2000).
75. Caprioli, A. et al. Cytotoxic necrotizing factor production by hemolytic strains of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *J. Clin. Microbiol.* **25**, 146–149 (1987).
76. Caprioli, A. et al. Relationship between cytotoxic necrotizing factor production and serotype in hemolytic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 758 (1989).
77. Zhang, L., Foxman, B. & Marrs, C. Both urinary and rectal *Escherichia coli* isolates are dominated by strains of phylogenetic group B2. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 3951–3955 (2002).
78. Siqueira, A. K. et al. Virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infection and pyometra cases and from feces of healthy dogs. *Res. Vet. Sci.* **86**, 206–210 (2009).
79. Brauner, A., Katouli, M., Tullus, K. & Jacobson, S. H. Production of cytotoxic necrotizing factor, verocytotoxin and haemolysin by pyelonephritogenic *Escherichia coli*. *Eur. J. Clin. Microbiol.*

- Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. **9**, 762–767 (1990).
80. Salyers, A. A. & Whitt, D.D. Bacterial pathogenesis: a molecular approach. (ASM Press, 2002).
 81. Kumar, S. & Bandyopadhyay, U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. Toxicol. Lett. **157**, 175–188 (2005).
 82. Bingen E., Picard B., Brahimi N., Mathy S., Desjardins P., Elion J., and Denamur E. Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggest horizontal transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. J Infect Dis **177**, 642–50 (1998).
 83. Koczura, R. & Kaznowski, A. The Yersinia high-pathogenicity island and iron-uptake systems in clinical isolates of *Escherichia coli*. J. Med. Microbiol. **52**, 637–642 (2003).
 84. Schubert, S., Cuenca, S., Fischer, D. & Heesemann, J. High-pathogenicity island of *Yersinia pestis* in enterobacteriaceae isolated from blood cultures and urine samples: prevalence and functional expression. J. Infect. Dis. **182**, 1268–1271 (2000).
 85. Schubert, S., Picard, B., Gouriou, S., Heesemann, J. & Denamur, E. Yersinia high-pathogenicity island contributes to virulence in *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. Infect. Immun. **70**, 5335–5337 (2002).
 86. Schubert, S., Rakin, A., Karch, H., Carniel, E. & Heesemann, J. Prevalence of the 'high-pathogenicity island' of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. Infect. Immun. **66**, 480–485 (1998).
 87. Xu, J. G., Cheng, B., Wen, X., Cui, S. & Ye, C. High-pathogenicity island of *Yersinia* spp. in *Escherichia coli* strains isolated from diarrhea patients in China. J. Clin. Microbiol. **38**, 4672–4675 (2000).
 88. Kim, K. S. Strategy of *Escherichia coli* for crossing the blood-brain barrier. J. Infect. Dis. **186 Suppl 2**, S220–224 (2002).
 89. Hoffman, J. A., Wass, C., Stins, M. F. & Kim, K. S. The capsule supports survival but not traversal of *Escherichia coli* K1 across the blood-brain barrier. Infect. Immun. **67**, 3566–3570 (1999).
 90. Prasadarao, N. V. et al. Outer membrane protein A of *Escherichia coli* contributes to invasion of brain microvascular endothelial cells. Infect. Immun. **64**, 146–153 (1996).

91. Huang, S. H., Wan, Z. S., Chen, Y. H., Jong, A. Y. & Kim, K. S. Further characterization of *Escherichia coli* brain microvascular endothelial cell invasion gene *ibeA* by deletion, complementation, and protein expression. *J. Infect. Dis.* **183**, 1071–1078 (2001).
92. Huang, S. H. et al. *Escherichia coli* invasion of brain microvascular endothelial cells in vitro and in vivo: molecular cloning and characterization of invasion gene *ibe10*. *Infect. Immun.* **63**, 4470–4475 (1995).
93. Prasadarao, N. V., Wass, C. A., Huang, S. H. & Kim, K. S. Identification and characterization of a novel *Ibe10* binding protein that contributes to *Escherichia coli* invasion of brain microvascular endothelial cells. *Infect. Immun.* **67**, 1131–1138 (1999).
94. Wang, Y., Huang, S. H., Wass, C. A., Stins, M. F. & Kim, K. S. The gene locus *yijP* contributes to *Escherichia coli* K1 invasion of brain microvascular endothelial cells. *Infect. Immun.* **67**, 4751–4756 (1999).
95. Hacker, J. et al. Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur in vitro and in vivo in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates. *Microb. Pathog.* **8**, 213–225 (1990).
96. Knapp, S., Hacker, J., Jarchau, T. & Goebel, W. Large, unstable inserts in the chromosome affect virulence properties of uropathogenic *Escherichia coli* O6 strain 536. *J. Bacteriol.* **168**, 22–30 (1986).
97. Kao, J. S., Stucker, D. M., Warren, J. W. & Mobley, H. L. Pathogenicity island sequences of pyelonephritogenic *Escherichia coli* CFT073 are associated with virulent uropathogenic strains. *Infect. Immun.* **65**, 2812–2820 (1997).
98. Johnson, J.R. *Escherichia coli*: virulence mechanism of a versatile pathogen. (Elsevier Science, 2002).
99. Pigrau, C., Horcajada, J.C., Cartón, J.A. & Pujol, M. in *Protocolos clínicos SEIMC* (Sociedad Española de Enfermedades infecciosas y microbiología Clínica).
100. Sussman, M. in *Escherichia coli* mechanisms of virulence (Cambridge University Press, 1997).
101. Cai, T. et al. The role of asymptomatic bacteriuria in young women with recurrent urinary tract infections: to treat or not to treat? *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **55**, 771–777 (2012).

102. Colgan, R., Nicolle, L. E., McGlone, A. & Hooton, T. M. Asymptomatic bacteriuria in adults. *Am. Fam. Physician* **74**, 985–990 (2006).
103. Gupta, K. et al. International clinical practice guidelines for the treatment of acute uncomplicated cystitis and pyelonephritis in women: A 2010 update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **52**, e103–120 (2011).
104. Meiland, R. et al. Association between *Escherichia coli* bacteriuria and renal function in women: long-term follow-up. *Arch. Intern. Med.* **167**, 253–257 (2007).
105. Nicolle, L. E., Zhanel, G. G. & Harding, G. K. M. Microbiological outcomes in women with diabetes and untreated asymptomatic bacteriuria. *World J. Urol.* **24**, 61–65 (2006).
106. Nicolle, L. E. et al. Infectious Diseases Society of America guidelines for the diagnosis and treatment of asymptomatic bacteriuria in adults. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **40**, 643–654 (2005).
107. Cordón-Cardo, C., Casals Marull, D. & Guix Perica, M. Determinantes antigénicos de los grupos sanguíneos: pasado, presente y futuro. *Med. Clínica* **93**, 64–7 (1989).
108. Stapleton, A. E., Stroud, M. R., Hakomori, S. I. & Stamm, W. E. The globoseries glycosphingolipid sialosyl galactosyl globoside is found in urinary tract tissues and is a preferred binding receptor *In vitro* for uropathogenic *Escherichia coli* expressing pap-encoded adhesins. *Infect. Immun.* **66**, 3856–3861 (1998).
109. Stamm, W. E. & Raz, R. Factors contributing to susceptibility of postmenopausal women to recurrent urinary tract infections. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **28**, 723–725 (1999).
110. Scholes, D. et al. Risk factors for recurrent urinary tract infection in young women. *J. Infect. Dis.* **182**, 1177–1182 (2000).
111. Foxman, B. et al. Transmission of uropathogens between sex partners. *J. Infect. Dis.* **175**, 989–992 (1997).
112. Scholes, D. et al. Family history and risk of recurrent cystitis and pyelonephritis in women. *J. Urol.* **184**, 564–569 (2010).

113. Raz, R. & Stamm, W. E. A controlled trial of intravaginal estriol in postmenopausal women with recurrent urinary tract infections. *N. Engl. J. Med.* **329**, 753–756 (1993).
114. Tabel, Y., Berdeli, A. & Mir, S. Association of TLR2 gene Arg753Gln polymorphism with urinary tract infection in children. *Int. J. Immunogenet.* **34**, (2007).
115. Hawn, T. R. et al. Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to urinary tract infections in adult women. *PloS One* **4**, (2009).
116. Alós J.I. Quinolonas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **21**, 261–8 (2003).
117. Drlica, K. & Zhao, X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 377–392 (1997).
118. Hawkey, P. M. Mechanisms of quinolone action and microbial response. *J. Antimicrob. Chemother.* **51 Suppl 1**, 29–35 (2003).
119. Hooper, D. C. Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **31 Suppl 2**, S24–28 (2000).
120. Andreu A., Stapleton A.E & Fenell C. Urovirulence determinants in *Escherichia coli* strains causing prostatitis. *J Infect Dis.* 1997 Aug;176(2):464-9. Erratum in: *J Infect Dis* 1997 Nov;176(5):1416. PubMed PMID: 9237713. *J Infect Dis* **176**, 464–9 (1997).
121. Cook, S. W., Hammill, H. A. & Hull, R. A. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from female reproductive tract infections and neonatal sepsis. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* **9**, 203–207 (2001).
122. Johnson, J. R., Kuskowski, M. A., O'Bryan, T. T. & Maslow, J. N. Epidemiological correlates of virulence genotype and phylogenetic background among *Escherichia coli* blood isolates from adults with diverse-source bacteremia. *J. Infect. Dis.* **185**, 1439–1447 (2002).
123. Maslow, J. N. et al. Clonal relationships among bloodstream isolates of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **63**, 2409–2417 (1995).
124. Ruiz, J. et al. Differences in virulence factors among clinical isolates of *Escherichia coli* causing cystitis and pyelonephritis in women and prostatitis in men. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 4445–4449 (2002).

125. Wang, M.-C., Tseng, C.-C., Chen, C.-Y., Wu, J.-J. & Huang, J.-J. The role of bacterial virulence and host factors in patients with *Escherichia coli* bacteremia who have acute cholangitis or upper urinary tract infection. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. **35**, 1161–1166 (2002).
126. Johnson, J. R. et al. O, K, and H antigens predict virulence factors, carboxylesterase B pattern, antimicrobial resistance, and host compromise among *Escherichia coli* strains causing urosepsis. J. Infect. Dis. **169**, 119–126 (1994).
127. Johnson, J. R., Roberts, P. L. & Stamm, W. E. P fimbriae and other virulence factors in *Escherichia coli* urosepsis: association with patients' characteristics. J. Infect. Dis. **156**, 225–229 (1987).
128. Picard, B. & Goulet, P. Correlation between electrophoretic types B1 and B2 of carboxylesterase B and host-dependent factors in *Escherichia coli* septicaemia. Epidemiol. Infect. **100**, (1988).
129. Manges, A. R. et al. Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal group. N. Engl. J. Med. **345**, 1007–1013 (2001).
130. Schlager, T. A., Hendley, J. O., Bell, A. L. & Whittam, T. S. Clonal diversity of *Escherichia coli* colonizing stools and urinary tracts of young girls. Infect. Immun. **70**, 1225–1229 (2002).
131. Schlager, T. A. et al. Variation in frequency of the virulence-factor gene in *Escherichia coli* clones colonizing the stools and urinary tracts of healthy prepubertal girls. J. Infect. Dis. **188**, 1059–1064 (2003).
132. Russo, T. A. & Johnson, J. R. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. Microbes Infect. Inst. Pasteur **5**, 449–456 (2003).
133. Gruneberg, R. N. Relationship of infecting urinary organism to the faecal flora in patients with symptomatic urinary infection. Lancet Lond. Engl. **2**, 766–768 (1969).
134. Yamamoto, S. et al. Genetic evidence supporting the fecal-perineal-urethral hypothesis in cystitis caused by *Escherichia coli*. J. Urol. **157**, 1127–1129 (1997).

135. Stamm, W. E. et al. Urinary tract infections: from pathogenesis to treatment. *J. Infect. Dis.* **159**, 400–406 (1989).
136. TURCK, M. & PETERSDORF, R. G. The epidemiology of nonenteric *Escherichia coli* infections: prevalence of serological groups. *J. Clin. Invest.* **41**, 1760–1765 (1962).
137. Plos, K. et al. Intestinal carriage of P fimbriated *Escherichia coli* and the susceptibility to urinary tract infection in young children. *J. Infect. Dis.* **171**, 625–631 (1995).
138. Korhonen, T. K., Vaisanen, V., Saxen, H., Hultberg, H. & Svenson, S. B. P-antigen-recognizing fimbriae from human uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Infect. Immun.* **37**, 286–291 (1982).
139. Johanson, I. M., Plos, K., Marklund, B. I. & Svanborg, C. Pap, papG and prsG DNA sequences in *Escherichia coli* from the fecal flora and the urinary tract. *Microb. Pathog.* **15**, 121–129 (1993).
140. Donnenberg, M.S. & Welch, R.A. in *Urinary tract infection* 135–174 (ASM Press, 1996).
141. Johnson, D. E. et al. The role of cytotoxic necrotizing factor-1 in colonization and tissue injury in a murine model of urinary tract infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **28**, (2000).
142. Mobley, H. L. et al. Isogenic P-fimbrial deletion mutants of pyelonephritogenic *Escherichia coli*: the role of alpha Gal(1-4) beta Gal binding in virulence of a wild-type strain. *Mol. Microbiol.* **10**, 143–155 (1993).
143. Russo, T., Brown, J. J., Jodush, S. T. & Johnson, J. R. The O4 specific antigen moiety of lipopolysaccharide but not the K54 group 2 capsule is important for urovirulence of an extraintestinal isolate of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **64**, 2343–2348 (1996).
144. Russo, T. A., Sharma, G., Brown, C. R. & Campagnari, A. A. Loss of the O4 antigen moiety from the lipopolysaccharide of an extraintestinal isolate of *Escherichia coli* has only minor effects on serum sensitivity and virulence in vivo. *Infect. Immun.* **63**, 1263–1269 (1995).
145. Johnson, J. R., Owens, K., Manges, A. R. & Riley, L. W. Rapid and specific detection of *Escherichia coli* clonal group A by gene-specific PCR. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 2618–2622 (2004).

146. Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Tenover, M.A. & Tenover, R.H. Manual of clinical microbiology. (ASM Press, 2003).
147. Whittam, T. S. Clonal dynamics of *Escherichia coli* in its natural habitat. *Antonie Van Leeuwenhoek* **55**, (1989).
148. Moreno, E. et al. Relationship between *Escherichia coli* strains causing urinary tract infection in women and the dominant faecal flora of the same hosts. *Epidemiol. Infect.* **134**, 1015–1023 (2006).
149. National Committee of Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Fourteenth Informational Suppl. M100-S12 NCCLS; Wayne, PA, USA. (2004).
150. Clermont, O., Bonacorsi, S. & Bingen, E. Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4555–4558 (2000).
151. Blanco M., Blanco J., Blanco J.E., et al. Factores de virulencia y serogrupos O de *Escherichia coli* causantes de infecciones urinarias comunitarias. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **13**, 236–41 (1995).
152. Versalovic, J., Koeuth, T. & Lupski, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* **19**, 6823–6831 (1991).
153. Gautam, R. K. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 2977–2980 (1997).
154. Hilali, F. et al. Prevalence of virulence genes and clonality in *Escherichia coli* strains that cause bacteremia in cancer patients. *Infect. Immun.* **68**, 3983–3989 (2000).
155. Olesen, B., Kolmos, H. J., Orskov, F. & Orskov, I. *Escherichia coli* bacteraemia in patients with and without haematological malignancies: a study of strain characters and recurrent episodes. *J. Infect.* **36**, (1998).
156. Otto, G., Sandberg, T., Marklund, B. I., Ulleryd, P. & Svanborg, C. Virulence factors and pap genotype in *Escherichia coli* isolates from women with acute pyelonephritis, with or without bacteremia. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **17**, 448–456 (1993).

157. Goulet, P. & Picard, B. Electrophoretic type B2 of carboxylesterase B for characterisation of highly pathogenic *Escherichia coli* strains from extra-intestinal infections. *J. Med. Microbiol.* **33**, 11–16 (1990).
158. Ikaheimo, R. et al. Community-acquired pyelonephritis in adults: characteristics of *E. coli* isolates in bacteremic and non-bacteremic patients. *Scand. J. Infect. Dis.* **26**, 289–296 (1994).
159. Blum, G., Falbo, V., Caprioli, A. & Hacker, J. Gene clusters encoding the cytotoxic necrotizing factor type 1, Prs-fimbriae and alpha-hemolysin form the pathogenicity island II of the uropathogenic *Escherichia coli* strain J96. *FEMS Microbiol. Lett.* **126**, 189–195 (1995).
160. Maslow, J. N., Mulligan, M. E., Adams, K. S., Justis, J. C. & Arbeit, R. D. Bacterial adhesins and host factors: role in the development and outcome of *Escherichia coli* bacteremia. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **17**, 89–97 (1993).
161. Johnson, J. R., Kuskowski, M. A., Owens, K., Gajewski, A. & Winokur, P. L. Phylogenetic origin and virulence genotype in relation to resistance to fluoroquinolones and/or extended-spectrum cephalosporins and cephamycins among *Escherichia coli* isolates from animals and humans. *J. Infect. Dis.* **188**, 759–768 (2003).
162. Branger, C. et al. Genetic background of *Escherichia coli* and extended-spectrum beta-lactamase type. *Emerg. Infect. Dis.* **11**, (2005).
163. Johnson, J. R., Kuskowski, M. A., O'bryan, T. T., Colodner, R. & Raz, R. Virulence genotype and phylogenetic origin in relation to antibiotic resistance profile among *Escherichia coli* urine sample isolates from Israeli women with acute uncomplicated cystitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, (2005).
164. Johnson, J. R., van der Schee, C., Kuskowski, M. A., Goessens, W. & van Belkum, A. Phylogenetic background and virulence profiles of fluoroquinolone-resistant clinical *Escherichia coli* isolates from the Netherlands. *J. Infect. Dis.* **186**, 1852–1856 (2002).
165. Johnson, J. R. et al. Distribution and characteristics of *Escherichia coli* clonal group A. *Emerg. Infect. Dis.* **11**, 141–145 (2005).

166. Vila, J. et al. Are quinolone-resistant uropathogenic *Escherichia coli* less virulent? *J. Infect. Dis.* **186**, 1039–1042 (2002).
167. Horcajada, J. P. et al. Quinolone-resistant uropathogenic *Escherichia coli* strains from phylogenetic group B2 have fewer virulence factors than their susceptible counterparts. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 2962–2964 (2005).
168. Pitout, J. D. D., Laupland, K. B., Church, D. L., Menard, M. L. & Johnson, J. R. Virulence factors of *Escherichia coli* isolates that produce CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 4667–4670 (2005).
169. Manges, A. R., Dietrich, P. S. & Riley, L. W. Multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal groups causing community-acquired pyelonephritis. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **38**, 329–334 (2004).
170. Johnson, J. R. et al. Global molecular epidemiology of the O15:K52:H1 extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* clonal group: evidence of distribution beyond Europe. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 1913–1923 (2002).
171. Cercenado, E., Aguilar, J.M. & Gonzalez-Palacios, A. Situación actual de la resistencia a los antibióticos de las bacterias aisladas en bacteriurias intra y extrahospitalarias. *Med. Clínica* **88**, 93–6 (1987).
172. Gomez, J., Hernandez Cardona, J.L. & San Miguel, T. Evolución de los patrones de resistencia de *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* y *Klebsiella pneumoniae*. Estudio prospectivo en la región de Murcia (1986-1995). *Rev Esp Quimioterapia* **9**, 181–4 (1996).
173. Duriez, P. et al. Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiol. Read. Engl.* **147**, 1671–1676 (2001).
174. Escobar-Paramo, P. et al. Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 5698–5700 (2004).
175. Le Gall, T. et al. Extraintestinal virulence is a coincidental by-product of commensalism in B2 phylogenetic group *Escherichia coli* strains. *Mol. Biol. Evol.* **24**, 2373–2384 (2007).
176. Johnson, J. R., Kuskowski, M. A., Smith, K., O'Bryan, T. T. & Tatini, S. Antimicrobial-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia*

- coli* in retail foods. J. Infect. Dis. **191**, 1040–1049 (2005).
177. Johnson, J. R., Owens, K., Gajewski, A. & Kuskowski, M. A. Bacterial characteristics in relation to clinical source of *Escherichia coli* isolates from women with acute cystitis or pyelonephritis and uninfected women. J. Clin. Microbiol. **43**, 6064–6072 (2005).
178. Stapleton, A., Hooton, T. M., Fennell, C., Roberts, P. L. & Stamm, W. E. Effect of secretor status on vaginal and rectal colonization with fimbriated *Escherichia coli* in women with and without recurrent urinary tract infection. J. Infect. Dis. **171**, 717–720 (1995).
179. Manges, A. R., Johnson, J. R. & Riley, L. W. Intestinal population dynamics of UTI-causing *Escherichia coli* within heterosexual couples. Curr. Issues Intest. Microbiol. **5**, (2004).
180. Johnson, J. R. et al. Phylogenetic and pathotypic comparison of concurrent urine and rectal *Escherichia coli* isolates from men with febrile urinary tract infection. J. Clin. Microbiol. **43**, 3895–3900 (2005).
181. Johnson, J. R. et al. Evidence of commonality between canine and human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains that express papG allele III. Infect. Immun. **68**, 3327–3336 (2000).

Annex I

Producció científica derivada de la tesi

Publicacions en revistes científiques indexades

Moreno E, Planells I, Prats P, Planes AM, Moreno G, Andreu A. **Comparative study of *Escherichia coli* virulence determinants in strains causing urinary tract bacteremia vs. strains causing pyelonephritis and other sources of bacteremia.** *Diag microbiol Infec Dis* 2005; 53: 93-9.

Moreno E, Prats G, Sabaté M, Pérez T, R. Johnson J, Andreu A. **Quinolone, fluoroquinolone, and trimethoprim-sulfamethoxazole resistance in relation to virulence determinants and phylogenetic background among uropathogenic *Escherichia coli*.** *J Antimicrob Chemoth* 2006; 57: 204-11.

Moreno E, Andreu A, Perez T, Sabate M, Johnson JR, Prats G. **Relationship between *Escherichia coli* strains causing urinary tract infection in women and the dominant faecal flora of the same hosts.** *Epidemiol Infect.* 2006; 16: 1-9.

Moreno E, Prats G, Planells I, Planes AM, Pérez T, Andreu A. **Caracterización de 37 aislamientos de *Escherichia coli* de los grupos filogenéticos a y b1, causantes de infección extraintestinal.** *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24; 483-9

Sabaté M, Moreno E, Pérez T, Andreu A, Prats G. **Detection of pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates.** *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 880-6.

Sabaté M, Prats G, Moreno E, Ballesté E, Blanch AR, Andreu A. **Virulence and antimicrobial resistance profiles among *Escherichia coli* strains isolated from human and animal wastewater.** *Res Microbiol* 2008; 159 (4): 288-93.

Moreno E, Andreu A, Pigrau C, Kuskowski MA, Johnson JR, Prats G. **Relationship between *Escherichia coli* Strains Causing Acute Cystitis in Women and the Host's Fecal *E. coli* Population.** J Clin Microbiol 2008; 46(8): 2529-34.

Cereto F, Herranz X, Moreno E, Andreu A, Vergara M, Fontanals D, Roget M, Simó M, González A, Prats G, Genescà J. **Role of host and bacterial virulence factors in *Escherichia coli* spontaneous bacterial peritonitis.** Eur J Gastroenterol Hepatol. 2008; 20(9): 924-9.

Moreno E, Johnson JR, Pérez T, Prats G, Kuskowski MA, Andreu A. **Structure and urovirulence characteristics of the fecal *Escherichia coli* population among healthy women.** Microbes Infect. 2009;11(2): 274-80.

Garcia-Aljaro C, Moreno E, Andreu A, Prats G, Blanch AR. **Phylogroups, virulence determinants and antimicrobial resistance in stx(2) gene-carrying *Escherichia coli* isolated from aquatic environments.** Res Microbiol 2009; 160(8): 585-91.

Comunicacions en congressos

A. Andreu, E. Moreno, M. Tenedor, A.M. Planes, S. Molinos, E. Ruiz de Gopegui, J. Bosch. **"Phylogenetic background and virulence profile of *Escherichia coli* causing neonatal disease".** 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Barcelona.

E. Moreno, G. Prats, M. Sabaté, A. Andreu. **«Virulence profile among urinary and fecal *Escherichia coli* belonging to the same phylogenetic group".** American Society for Microbiology, General 107th meeting. Toronto. 2007

M. Sabaté, A.R. Blanch, A. Andreu, E. Moreno, E. Ballesté, G. Prats. **«Comparision between human and animal sewages *Escherichia coli* isolates in relation to antimicrobial status and virulence markers».** American Society for Microbiology, General 107th meeting. Toronto. 2007

A. Andreu, G. Prats, M. Sabaté, E. Moreno. **« Structure of fecal *Escherichia coli* poulation in healthy women ».** American Society for Microbiology, General 107th meeting. Toronto. 2007

E. Moreno, G. Prats, T. Pérez, A. Andreu. **"Comparación del potencial patógeno entre *Escherichia coli* uropatógenos y comensales de los grupos filogenéticos A, B1, B2 y D".**

XII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2006.

E. Moreno, X. Herranz, D. Fontanals, M. Villa, F. Cereto, A. Andreu, J. Genescà, G. Prats. "***Escherichia coli* causantes de peritonitis bacteriana espontánea. Caracterización de su potencial virulento y sensibilidad a fluoroquinolonas**". XII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2006.

E. Moreno, X. Herranz, G. Prats, F. Cereto, T. Pérez, J. Genescà, A. Andreu. "**Dinámica de las poblaciones fecales de *Escherichia coli* en pacientes cirróticos sometidos a profilaxis con norfloxacin**". XII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2006.

D. Rodríguez, C. Pigrau, A. Andreu, C. Batlle, A. Imaz, B. Almirante, I. Planells, B. Moure, E. Moreno, A. Pahissa. "**Evaluación de la sensibilidad de las enterobacterias a las fluorquinolonas en diferentes grupos de pacientes con infección del tracto urinario (ITU)**". XII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2006.

E. Moreno, A. Andreu, T. Pérez, M. Sabaté, G. Prats. "**Relationship between uropathogenicity of *Escherichia coli* and host compromise status**". 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Abril 2005. Copenhagen.

E. Moreno, M. Sabaté, AM. Planes, I. Planells, G. Prats, A. Andreu. "**Phylogenetic origin of the uropathogenic *Escherichia coli* resistant and susceptible to fluoroquinolone and trimethoprim-sulfamethoxazole**". 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Abril 2005. Copenhagen.

M. Sabaté, A. Andreu, E. Moreno, T. Pérez, G. Prats. "**Commensal and uropathogenic *Escherichia coli* strains: do they have differences in the presence of pathogenicity islands?**". 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Abril 2005. Copenhagen.

Moreno E, Pérez T, Sabaté M, Planells I, Planes AM, Andreu A. "**Caracterización de 16 cepas uropatógenas de *E. coli* pertenecientes a los grupos filogenéticos A y B1**". XI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Maig 2004. Bilbao.

Moreno E, Sabaté M, Planes AM, Prats G, Andreu A. "**Relación entre virulencia de *Escherichia coli* extraintestinal y resistencia a fluoroquinolonas**". XI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Maig 2004. Bilbao.

Sabaté M, Prats G, Moreno E, Pérez T, Andreu A. "**Detección de marcadores de islas de patogenicidad (PAIs) en cepas de *Escherichia coli* uropatógena y comensales**". XI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Maig 2004. Bilbao.

Sabaté M, Andreu A, Moreno E, Prats G. "***Escherichia coli* relación entre el grupo filogenético y la presencia de islas de patogenicidad (PAIs)**". XI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Maig 2004. Bilbao.

Planells I, Moreno E, Andreu A, Planes AM, Prats G. "**Virulence factors, phylogenetic group and quinolone resistance among *E. coli* isolates from pyelonephritis, urosepsis and other sepsis**". Esdeveniment: 43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). Setembre, 2003. Chicago, IL.