

Caracterización de *Escherichia coli* de los grupos filogenéticos A y B1 causantes de infección extraintestinal

Eva Moreno, Guillem Prats, Irene Planells, Ana M. Planes, Teresa Pérez y Antonia Andreu

Servicio de Microbiología. Hospital Vall d'Hebron. Universidad Autónoma de Barcelona. España.

INTRODUCCIÓN. *Escherichia coli* de los grupos filogenéticos no patógenos A y B1 raramente causan infecciones extraintestinales. El objetivo de este estudio es el de caracterizar 37 *E. coli* de los grupos filogenéticos A y B1 y compararlos con 37 *E. coli* del grupo B2 y 31 del grupo D, productores de las mismas infecciones.

MÉTODOS. De estos 105 casos de *E. coli* aislados de orina de pacientes con cistitis y pielonefritis y de sangre de pacientes con sepsis urinaria y de otros orígenes, se estudió el grupo filogenético, 15 genes de virulencia, los antígenos O asociados a infección extraintestinal y la sensibilidad a fluoroquinolonas.

RESULTADOS. Los aislados de *E. coli* de los grupos A/B1 presentaron menos determinantes de virulencia (media de 3,5) que los del grupo B2 (8,6; $p < 0,001$) y D (5,3; $p < 0,001$); sin embargo un subgrupo formado por 3 aislados del grupo A y 5 del B1 poseían 5 o más factores. *E. coli* de los grupos A/B1 se asociaron con frecuencia significativa a resistencia a fluoroquinolonas (74%; $p < 0,001$), mientras que los del grupo B2 se asociaron a sensibilidad (76%; $p = 0,003$). *E. coli* de los grupos A/B1 se aislaron de forma significativa en pacientes con pielonefritis y sepsis y factores favorecedores de infección, asociación que no se observó en pacientes con cistitis.

CONCLUSIÓN. *E. coli* de los grupos filogenéticos A y B1, a pesar de que en general presentan un bajo potencial patógeno, se han mostrado capaces de producir infecciones extraintestinales, especialmente en pacientes con factores favorecedores de infección.

Palabras clave: *Escherichia coli*. Factores de virulencia. Grupo filogenético A y B1. Infección extraintestinal.

Characterization of *Escherichia coli* isolates derived from phylogenetic groups A and B1 causing extraintestinal infection

INTRODUCTION. *Escherichia coli* isolates from the non-pathogenic phylogenetic groups A and B1 rarely cause

extraintestinal infections. The aim of this study was to analyze 37 *E. coli* isolates pertaining to phylogenetic groups A and B1 and compare them with 37 *E. coli* isolates from group B2 and 31 from group D, which caused the same infections.

METHODS. Among 105 *E. coli* isolated from the urine of patients with cystitis and pyelonephritis and from the blood of patients with urinary-source and other-source bacteremia, the *E. coli* phylogenetic groups, 15 virulence-associated genes, 7 O-antigens and fluoroquinolone resistance were analyzed.

RESULTS. *E. coli* from groups A and B1 showed fewer virulence determinants (median 3.5) than *E. coli* from group B2 (8.6, $P < .001$) or D (5.3, $P < .001$); however, a subgroup containing 3 isolates from group A and 5 from B1 harbored 5 or more factors. *E. coli* from groups A/B1 were associated with resistance to fluoroquinolones (74%, $P < .001$), whereas *E. coli* from group B2 were associated with susceptibility to this antibiotic (76%, $P = .003$). *E. coli* from groups A/B1 were isolated significantly more frequently in patients with pyelonephritis or sepsis and local or general factors favoring infection, association not observed in patients with cystitis.

CONCLUSIONS. Even though most of the *E. coli* isolates from phylogenetic groups A and B1 presented a low virulence potential, they were able to cause extraintestinal infections, particularly in compromised patients.

Key words: *Escherichia coli*. Virulence factors. Phylogenetic group A and B1. Extraintestinal infection.

Introducción

Según el informe EPINE 2002 la infección urinaria constituye la segunda causa de infección bacteriana tanto en la comunidad como en el hospital. *Escherichia coli* es el principal agente de infección del tracto urinario. Sin embargo, este microorganismo es también el principal componente aerobio integrante de la flora comensal del intestino humano y de otros animales¹. En función de las relaciones de similitud evaluadas mediante técnicas de electroforesis de diferentes enzimas (MLEE)²⁻⁴ y de secuenciación de sus genes (MLST), en *E. coli* se han identificado cuatro grandes grupos filogenéticos: A, B1, B2 y D. Las diferencias entre *E. coli* patógenas y comensales se correlacionan con sus antecedentes filogenéticos. Así, los causantes de infecciones extraintestinales (ExPEC)^{5,6}, incluyendo las infecciones urinarias y la sepsis, derivan

Correspondencia: Dra. A. Andreu.
Servicio de Microbiología. Hospital Vall d'Hebron.
Pº Vall d'Hebron, 119-129. 08035 Barcelona. España.
Correo electrónico: anandreu@vhebron.net

Manuscrito recibido el 9-11-2005; aceptado el 27-2-2006.

principalmente del grupo B2 y en menor proporción del grupo D^{3,7} y poseen gran número de determinantes de virulencia que promueven funciones patogénicas (adherencia, evasión a los mecanismos de defensa del huésped, adquisición de hierro, invasión celular, etc.), mientras que los comensales derivan de los grupos A y B1 y poseen pocos determinantes de virulencia^{3,8,9}.

Aunque las cepas de *E. coli* de los grupos filogenéticos A o B1 conforman la flora comensal, y se consideran no patógenas, ocasionalmente han sido responsables de infecciones extraintestinales. El objetivo de este trabajo es caracterizar 16 determinantes de virulencia en 37 *E. coli* de los grupos filogenéticos A y B1 aislados en pacientes con infecciones extraintestinales y compararlos con *E. coli* productores de las mismas infecciones de los grupos filogenéticos B2 y D.

Métodos

Pacientes y cepas de *E. coli*

A partir de una colección de 200 aislados de *E. coli*, 50 procedentes de mujeres con cistitis, 50 de pacientes con pielonefritis y hemocultivo negativo, 50 de pacientes con sepsis urinaria y 50 con sepsis de otros orígenes (18 de origen abdominal y gastrointestinal, 11 del aparato genital femenino, 4 respiratorio, 2 cutáneo, 1 catéter intravenoso, además de 12 cepas aisladas de pacientes con cáncer avanzado y 2 con enfermedad terminal, cuyo origen fue indeterminado), para el presente estudio se seleccionaron los 24 aislados pertenecientes al grupo filogenético A, los 13 pertenecientes al grupo B1, 37 seleccionados entre 132 pertenecientes al grupo B2, y los 31 pertenecientes al grupo D. La forma de selección de estos *E. coli* previamente ha sido descrita^{10,11}. Entre los factores predisponentes se evaluaron los factores locales favorecedores de infección del tracto urinario (anormalidades anatómicas o funcionales, instrumentación y cuerpos extraños) y los factores generales que provocan disminución de las defensas antiinfecciosas (sida, diabetes, enfermedades oncológicas o sistémicas terminales, gran inmadurez [prematurado < 33 semanas de gestación] y terapéutica inmunosupresora). La sintomatología, la inclusión en una de las cuatro categorías clínicas estudiadas y la existencia o no de factores favorecedores de la infección se determinaron mediante una detallada revisión de las historias clínicas.

El sedimento urinario, el urocultivo y el hemocultivo se realizaron mediante métodos convencionales. Las cepas de *E. coli* fueron congeladas a -80 °C en caldo tripticase con un 5% de glicerol, hasta su uso.

TABLA 1. Distribución de *E. coli* derivados de los grupos filogenéticos A, B1, B2 o D en función del síndrome clínico y la edad

	A n = 24	B1 n = 13	B2 n = 37	D n = 31
Síndrome clínico				
Cistitis ^a	6 (25)	5 (39)	11 (30)	1 (3)
Pielonefritis	4 (17)	3 (23)	10 (27)	10 (32)
Sepsis urinaria	5 (21)	2 (15)	11 (30)	8 (26)
Sepsis no urinaria	9 (37)	3 (23)	5 (13)	12 (39)
Edad (años)				
Media	58	35	49	51
Rango	15-95	0,05-73	0-87	0-97
Sexo				
Mujer	18 (75)	7 (54)	30 (81)	19 (61)
Varón	6 (25)	6 (46)	7 (19)	12 (39)

Datos núm. (%) casos.

^ap = 0,021.

Grupo filogenético

La determinación del grupo filogenético se realizó mediante una PCR triple descrita por Clermont et al¹². En función de la combinación existente de los tres marcadores de ADN (*chuA*, *yjaA*, y el fragmento de ADN TspE.4C2) los aislados de *E. coli* se clasificaron en uno de los cuatro grupos filogenéticos: A, B1, B2 y D.

Factores de virulencia

Se estudiaron 15 genes de virulencia, incluyendo adhesinas *papA* (subunidad estructural de las fimbrias P), *papG* alelos I, II y III (adhesinas de las fimbrias P), *fimH* (adhesina de la fimbria tipo 1), *afa* / *draBC* (adhesinas Dr-binding), y *sfa* / *focDE* (región consenso de la fimbria S y F1C); toxinas: *hly* (hemolisina) y *cnf1* (factor citotóxico necrosante); sideróforos: *iutA* (aerobactina) y *fyuA* (yersiniabactina); cápsula polisacárida específica del grupo II, *KpsMII*; resistencia asociada al suero, *traT*; invasión del endotelio cerebral, *ibeA* y *malX*, una región codificante cerca del extremo terminal de la PAI I de la cepa de *E. coli* CFT073. La detección de estos genes de virulencia se realizó mediante 5 PCR múltiples según una técnica previamente descrita^{7,10}.

Determinación de los antígenos O

Se investigaron los antígenos O1, O2, O4, O6, O7, O18 y O83 por ser los más prevalentes en *E. coli* productores de infección urinaria en nuestra área^{13,14}. Su determinación se realizó mediante la técnica de microaglutinación, utilizando anticuerpos policlonales producidos en el Laboratorio de Referencia de *E. coli* español (LREC)¹⁴.

Media de factores de virulencia

La media de factores de virulencia se calculó sumando el número de factores de virulencia de cada uno de los aislados (*pap* se tomó como una unidad, independientemente del número de elementos *pap* identificados) y dividiéndolo por el total de aislados.

Estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos

La sensibilidad a las fluoroquinolonas se determinó mediante la técnica de disco difusión, según las recomendaciones del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)¹⁵, utilizando discos Neo-Sensitabs (Rosco, Taastrup, Dinamarca). A los *E. coli* aislados en sangre se les determinó la sensibilidad a ciprofloxacino (10 µg) y en los aislados en orina a norfloxacino (10 µg).

Métodos estadísticos

Con la finalidad de obtener un tamaño muestral similar con respecto al número de cepas de *E. coli* pertenecientes a cada grupo filogenético se seleccionaron al azar 37 cepas de *E. coli* del grupo filogenético B2 a partir de una muestra inicial de 132, mediante el programa informático *Research Randomizer*.

Los contrastes para las variables cualitativas se realizaron utilizando la prueba binomial, la prueba de chi cuadrado o la prueba exacta de Fisher, según fueran los criterios de aplicabilidad. En las variables cuantitativas se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) para un factor o la U de Mann Whitney en función de la normalidad de las variables. El grado de significación fue $\alpha \leq 0,05$, excepto en las comparaciones múltiples en 3 grupos en los que se aplicó el criterio de corrección de Bonferroni, y en la que el grado de significación estadística fue de $\alpha \leq 0,025$.

Resultados

Relación entre el síndrome clínico, la edad y los grupos filogenéticos A, B1, B2 y D

Los aislados de *E. coli* de los grupos filogenéticos A, B1 y B2 produjeron indistintamente cistitis, pielonefritis o sepsis (tabla 1). Sin embargo, los del grupo D causaron cistitis en menor proporción (3% respecto al 32% en pielonefritis,

TABLA 2. Perfil de virulencia de 24 *E. coli* del grupo filogenético A y de 13 del grupo B1, aislados en pacientes con infección extraintestinal

<i>E. coli</i>	GF	SC	<i>malX</i>	<i>papA</i>	<i>papG</i> alelo I	<i>papG</i> alelo II	<i>papG</i> alelo III	<i>fimH</i>	<i>afa/dra</i> BC	<i>sfa/foc</i> DE	<i>kpsM</i> II	<i>hlyA</i>	<i>cnfI</i>	<i>traT</i>	<i>iutA</i>	<i>fyuA</i>	<i>ibeA</i>	Ag O	Núm. FV
IR45	A	P	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
C31	A	C	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	2
C39	A	C	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	2
C44	A	C	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	2
IR19	A	P	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	2
IR141	A	SnU	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	2
IR150	A	SnU	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	2
IR93	A	SU	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
C2	A	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	3
IR3	A	P	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	3
IR5	A	P	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	3
IR88	A	SU	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	3
IR113	A	SnU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	3
IR140	A	SnU	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	3
C5	A	C	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	4
IR69	A	SU	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	4
IR111	A	SnU	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	4
IR112	A	SnU	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	4
IR121	A	SnU	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	4
IR135	A	SnU	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	4
IR138	A	SnU	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	4
C4	A	C	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	5
IR65	A	SU	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	O4	6
IR75	A	SU	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	8
IR83	B1	SU	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
IR130	B1	SnU	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
C3	B1	C	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	3
C49	B1	C	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
IR42	B1	P	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	3
IR6	B1	P	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	4
IR110	B1	SnU	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	4
IR48	B1	P	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	4
C16	B1	C	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	5
C28	B1	C	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	5
IR61	B1	SU	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	5
IR147	B1	SnU	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	6
C37	B1	C	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	7

“+” o “-” presencia o ausencia del factor de virulencia, respectivamente; *malX*, marcador asociado a la isla de patogenidad de la cepa de *E. coli* CFT073; *papA*, subunidad estructural de la fimbria P; *papG*, molécula de adhesina de la fimbria P (*papGI* no detectado); *fimH*, fimbria tipo 1; *afa/draBC*, adhesinas de la familia Dr; *sfa/focDE*, fimbria S i F1C; *kpsM* II, síntesis de la cápsula del grupo II; *hlyA*, hemolisina; *cnfI*, factor citotóxico necrosante 1; *traT*, resistencia al suero asociada a una proteína de la membrana externa; *iutA*, aerobactina; *fyuA*, receptor yersiniabactina; *ibeA*, invasor del endotelio cerebral; GF, grupo filogenético; SC, síndrome clínico; C, cistitis; P, pielonefritis; SU, sepsis urinaria; SnU, sepsis no urinaria; Ag O, antígenos O1, O2, O4, O6, O7, O18, O83.

26% en sepsis urinaria y 39% en sepsis no urinaria, $p = 0,021$).

No se observaron diferencias significativas entre los aislamientos de *E. coli* derivados de los 4 grupos filogenéticos y la edad y el sexo de los pacientes.

Comparación del perfil de virulencia de *E. coli* A y B1 respecto al de *E. coli* B2 y D

En la tabla 2 se detalla el perfil de virulencia de los 24 aislados de *E. coli* del grupo filogenético A y los 13 del grupo B1. El rango de factores de virulencia en los aislados del grupo A fue de 1 a 8 y en los del grupo B1 de 1 a 7,

con una media de 3,3 y 4, respectivamente. Entre los aislados del grupo filogenético A, 4 con 2 factores de virulencia, 2 con 3 factores, y 3 con 4, presentaron el mismo perfil, hecho que también se observó en 2 aislados del grupo filogenético B1 con 1 factor de virulencia y 2 con 4 factores.

El rango de factores de virulencia de los *E. coli* del grupo B2 fue de 3 a 11. Cabe destacar que únicamente un aislado presentó 3 factores de virulencia (*fimH*, *traT* y *iutA*), mientras que los 36 restantes (97%) presentaron 6 o más, de los cuales 11 (30%) acumularon 8 factores, 9 (24%) 9 factores y 4 (11%) 11. De los 11 aislados con 8 factores de virulencia, un grupo formado por 4 y otro por 2 compartían

TABLA 3. Distribución de los determinantes de virulencia en *E. coli* de los grupos filogenéticos A/B1, B2 y D

	A/B1 n = 37	B2 n = 37	D n = 31	<i>p</i> A/B1 frente a B2	<i>p</i> A/B1 frente a D	<i>p</i> B2 frente a D
Determinantes de virulencia						
<i>malX</i>	2 (5)	36 (97)	10 (32)	< 0,001	0,004	< 0,001
<i>papA</i>	9 (24)	27 (73)	17 (55)	< 0,001	0,010	
<i>papG</i> alelo II	2 (5)	16 (43)	17 (55)	< 0,001	< 0,001	
<i>papG</i> alelo III	3 (8)	13 (35)	0	0,005		< 0,001
<i>fimH</i>	32 (86)	37 (100)	29 (94)			
<i>afa/draBC</i>	0	1 (3)	1 (3)			
<i>sfa/focDE</i>	6 (16)	21 (57)	2 (6)	< 0,001		< 0,001
<i>kpsM II</i>	7 (19)	31 (84)	26 (84)	< 0,001	< 0,001	
<i>hlyA</i>	4 (11)	23 (62)	0	< 0,001		< 0,001
<i>cnf1</i>	3 (8)	19 (51)	0	< 0,001		< 0,001
<i>traT</i>	21 (57)	31 (84)	19 (61)	0,011		
<i>iutA</i>	22 (59)	21 (57)	24 (77)			
<i>fyuA</i>	19 (51)	36 (97)	23 (74)	< 0,001		0,015
<i>ibeA</i>	3 (8)	12 (32)	2 (6)	0,009		0,008
Ag O	1 (3)	23 (64)	9 (29)	< 0,001	0,007	0,008
Media de determinantes de virulencia por cepa	3,5	8,6	5,3	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Datos núm. (%) aislados. *malX*, marcador asociado a la isla de patogenicidad de la cepa de *E. coli* CFT073; *papA*, subunidad estructural de la fimbria P; *papG*, molécula de adhesina de la fimbria P (G alelo I no detectado); *fimH*, fimbria tipo 1; *afa/draBC*, adhesinas de la familia Dr; *sfa/focDE*, fimbria S y F1C; *kpsM II*, síntesis de la cápsula del grupo II; *hlyA*, hemolisina; *cnf1*, factor citotóxico necrosante 1; *traT*, resistencia al suero asociada a una proteína de la membrana externa; *iutA*, aerobactina; *fyuA*, receptor de yersiniabactina; *ibeA*, factor de invasión del endotelio cerebral; Ag O, antígenos O1, O2, O4, O6, O7, O18, O83. Únicamente se muestran los valores de *p* estadísticamente significativos ($p \leq 0,025$).

TABLA 4. Relación entre la sensibilidad o resistencia a fluoroquinolonas y los grupos filogenéticos de *E. coli*

	Fluoroquinolona sensible n = 82	Fluoroquinolona resistente n = 23	<i>p</i>
<i>E. coli</i> A/B1	20	17	< 0,001
<i>E. coli</i> B2	35	2	0,003
<i>E. coli</i> D	27	4	
Media de determinantes de virulencia	6,3	4	< 0,001

Datos de núm. aislamientos.

el mismo perfil, hecho que también ocurrió en 2 de los 9 *E. coli* con 9 factores de virulencia y en 2 con 11 factores.

El rango de factores de virulencia de los 31 *E. coli* del grupo filogenético D fue de 2 a 8 factores, de éstos 17 (55%) contenían 5 o 6 factores. Un total de 2 aislados con 2 factores presentaron el mismo perfil, como también ocurrió en 2 de las 4 con 3 factores de virulencia, en 4 de las 9 con 5 y en 3 de las 8 con 6.

Distribución de los determinantes de virulencia en *E. coli* A/B1 y su comparación con la distribución en *E. coli* B2 y D

El gen *fimH* se encontró en el 79% de los aislados del grupo filogenético A y en el 100% de los del grupo B1. El segundo gen más prevalente fue *iutA*, ya que se encontró en el 54 y 63%, respectivamente; seguido de *traT* en el 54 y 58% y de *fyuA* en el 54 y 50%. El gen *papA* se encontró aproximadamente en el 25% de *E. coli* de ambos grupos filogenéticos; *papG* alelo III, *sfa/focDE*, *kpsMII* y *hlyA* fueron más frecuentes en *E. coli* del grupo filogenético A (15, 39, 31 y 15%, respectivamente) que del grupo B1 (4, 4, 13 y 8%), aunque sin diferencias significativas. Los genes *malX*, *papG* alelo II, *cnf1*, *ibeA* y los antígenos O asociados a infección se encontraron en menos del 10% de aislados de ambos grupos, mientras que *papG* alelo I y

afa/draBC no fueron detectados. Al no observarse ninguna diferencia significativa entre *E. coli* de los grupos filogenéticos A y B1 con respecto a la producción de los síndromes clínicos estudiados, la distribución de los factores de virulencia y antígenos O y la media de factores de virulencia, en adelante se considerarán como un único grupo, para ser comparados con *E. coli* de los grupos filogenéticos B2 y D.

Exceptuando los genes *fimH* y *iutA*, presentes en la mayoría de *E. coli* estudiados y el gen *afa/draBC*, prácticamente ausente, el resto de genes se asociaron al grupo filogenético B2 y en menor frecuencia al grupo D (tabla 3). Existió un gradiente estadísticamente significativo en la media de determinantes de virulencia entre *E. coli* pertenecientes a los distintos grupos, desde los del grupo B2 con una media de 8,6 hasta los del grupo A/B1 con 3,5 ($p < 0,001$).

Entre los aislados de los grupos filogenéticos “no patógenos” A/B1, 8 poseían 5 o más determinantes de virulencia (3 del grupo A y 5 del grupo B1). Si se consideran “con elevado perfil de virulencia”, y se comparan con los 29 *E. coli* restantes considerados “con bajo perfil de virulencia”; resultó que *papG* alelo III, *sfa/focDE*, *KpsMII*, y *hlyA* fueron los determinantes significativamente más prevalentes en *E. coli* A/B1 “con elevado perfil de virulencia”. Además, cuando este subgrupo se comparó con el grupo filogenético B2, únicamente se encontraron diferencias significativas en la presencia de *malX* (13 frente a 97%, respectivamente; $p < 0,001$).

Resistencia a las fluoroquinolonas de *E. coli* A/B1 y su comparación con la de *E. coli* B2 y D

Del total de 105 *E. coli* estudiados, 23 (22%) fueron resistentes a las fluoroquinolonas (tabla 4). De éstos, el 74% pertenecían a los grupos filogenéticos A/B1 ($p < 0,001$), mientras que de los 82 sensibles, el 76% pertenecían a los grupos B2 y D ($p < 0,001$). Los aislados de *E. coli* sensibles a fluoroquinolonas poseían más determinantes de virulencia que los resistentes (media de 6,3 y 4, respectivamente; $p < 0,05$).

TABLA 5. Distribución de los *E. coli* de los diferentes grupos filogenéticos entre los síndromes clínicos estudiados en función de la ausencia o presencia de factores predisponentes de infección

	Cistitis ^a	Pielonefritis ^a	Sepsis urinaria ^a	Sepsis no urinaria ^b
<i>E. coli</i> grupo A/B1				
Con factor predisponente	2 (18)	7 (100)	5 [3] (71)	11 [1] (92)
Sin factor predisponente	9 [4] (82) ^{c,d}	0 ^c	2 (29)	1 (8) ^d
Total	11 [4]	7	7 [3]	12 [1]
<i>E. coli</i> grupo B2				
Con factor predisponente	2 (18)	7 (70)	7 (64)	1 (20)
Sin factor predisponente	9 (82)	3 (30)	4 (36)	4 (80)
Total	11	10	11	5
<i>E. coli</i> grupo D				
Con factor predisponente	0	5 (50)	8 (100)	7 (58)
Sin factor predisponente	1 (100)	5 (50)	0	5 (42)
Total	1	10	8	12

Datos del núm. total de *E. coli* aislados. Núm. *E. coli* grupos filogenéticos A/B1 con elevado perfil de virulencia (% *E. coli* aislados).

^aComo factor predisponente se considera tanto la presencia de factores locales favorecedores de infección urinaria como los factores generales de infección.

^bComo factor predisponente se consideran únicamente los factores generales de infección.

^c $p = 0,004$ (cistitis frente a pielonefritis).

^d $p = 0,002$ (sepsis no urinaria frente a cistitis).

Relación entre los factores predisponentes de infección, el grupo filogenético y determinantes de virulencia

El 56% de los 76 pacientes con cistitis, pielonefritis o sepsis urinaria presentaban factores predisponentes locales de infección del tracto urinario y/o factores generales, mientras que el 66% de los 29 pacientes con sepsis no urinaria presentaban factores generales favorecedores de infección. Los *E. coli* A/B1 con “bajo perfil de virulencia” infectaron mayoritariamente a los pacientes con factores predisponentes respecto a los que no presentaban dichos factores (72% frente al 28%, respectivamente; $p = 0,026$). En cambio, los *E. coli* A/B1 “con elevado perfil de virulencia”, así como los *E. coli* de los grupos B2 y D se aislaron de forma similar en pacientes con o sin factores favorecedores de infección (50% frente al 50%, 46% frente al 54% y 65% frente al 35%, respectivamente). Al analizarlo por síndromes clínicos se observó (tabla 5) que los *E. coli* de los grupos filogenéticos A/B1 causantes de pielonefritis y sepsis se aislaron más frecuentemente en pacientes con factores favorecedores de infección, haciéndose esta asociación significativa en pielonefritis y sepsis no urinaria con respecto a cistitis (100, 92 frente al 18%; $p = 0,004$ y $p = 0,002$, respectivamente). También se observó que los *E. coli* A/B1 “con elevado perfil de virulencia” o bien causaron cistitis en pacientes sin factores predisponentes o bien sepsis en pacientes con estos factores, y que los *E. coli* del grupo B2 se distribuyeron de forma similar entre los pacientes con y sin factores predisponentes afectados de pielonefritis y sepsis, mientras que en cistitis, al igual que los *E. coli* A/B1, se aislaron con más frecuencia en pacientes sin factores de riesgo.

Discusión

Los aislados de *E. coli* del grupo filogenético B2 y en menor proporción los del grupo D albergan numerosos factores de virulencia^{3,5}, la mayoría englobados dentro de islas

de patogenicidad y producen la mayoría de infecciones extraintestinales causadas por esta especie. Las cepas de *E. coli* uropatógena, sobre todo las productoras de infecciones sistémicas como pielonefritis y sepsis urinaria, incluyen a las fimbrias P como factores de virulencia. Se ha sugerido^{16,17} que mediante la transferencia horizontal, las cepas del grupo filogenético B2 pueden aportar islas de patogenicidad o plásmidos con factores de virulencia a cepas de los grupos filogenéticos A y B1, convirtiendo estos *E. coli* no virulentos en patógenos.

En la literatura médica, los aislados de *E. coli* de los grupos B2 y D han sido muy caracterizados, sin embargo existen pocos estudios que describan las características de los *E. coli* A y B1 productores de infecciones extraintestinales. Johnson et al¹⁸ publicaron sobre un paciente con peritonitis secundaria debida a una perforación intestinal en la que entre otros microorganismos se aislaron dos cepas de *E. coli*, una del grupo filogenético A y otra del D. La cepa del grupo A poseía únicamente dos genes de virulencia, *fimH* (que codifica la fimbria tipo 1) y *ompT* (que codifica la resistencia al suero). En este estudio, los aislados de *E. coli* de los grupos filogenéticos A y B1 se han mostrado capaces de producir tanto cistitis como pielonefritis, sepsis urinaria y sepsis de otros orígenes, lo que concuerda con lo observado por Johnson et al¹⁹, que no encontraron diferencias significativas en la distribución de los grupos filogenéticos entre los *E. coli* causantes de cistitis, pielonefritis y prostatitis.

A partir de trabajos previos^{3,20}, en éste se asume que el perfil de virulencia detectado genotípicamente en un aislado de *E. coli* se asocia a la virulencia *in vivo* que presenta dicho aislado de forma independiente del grupo filogenético. Por ello y como diversos autores han realizado previamente^{6,10,19}, se ha calculado la media de genes de virulencia para inferir el potencial virulento de dicho *E. coli*. Como cabría esperar de resultados publicados previamente por estos¹⁰ y otros autores²¹, la media de los factores de virulencia de los 37 *E. coli* de los grupos A/B1 se ha mantenido significativamente más baja (3,5) que la del grupo B2 (8,6). Además, la

mayoría de factores de virulencia y de antígenos O no se han encontrado asociados a los grupos A/B1, y se han asociado exclusivamente el gen codificador de las fimbrias tipo 1 y el de la aerobactina. De forma paradójica, algunos factores de virulencia, como *papG* alelo III, *sfa/focDE*, *hlyA*, *cnf1*, y *ibeA* muy poco prevalentes entre los aislados de los grupos filogenéticos A/B1 lo son todavía menos entre los del grupo D, aunque la media de factores de este grupo es mayor que la del grupo A/B1. En otros estudios^{21,22}, *papG* alelo III y *cnf1* no fueron detectados en ninguna cepa de los grupos filogenéticos A, B1 o D, mientras que *sfa/focDE*, *hlyA* y *ibeA* se detectaron en menos del 8%, resultados bastante similares a los obtenidos en este estudio.

Llama la atención el amplio abanico de perfiles de virulencia observados en *E. coli* de los grupos A/B1, desde aislados con un solo factor de virulencia a aislados con 8. Cuando estos *E. coli* se dividieron en función de la cantidad de factores de virulencia que contenían, se observó que entre los aislados A/B1 "con elevado perfil de virulencia" los factores *papG* alelo III, *sfa/focDE*, *kpsMII*, y *hlyA* estaban sobrerrepresentados, factores que probablemente habrían sido adquiridos por transferencia horizontal desde cepas de los grupos B2 o D, que curiosamente no transferían el gen *malX*. A excepción de la hemolisina, dichos factores son considerados marcadores de *E. coli* patógeno extraintestinal (ExPEC)^{5,23} y, a su vez, en diferentes colecciones, se asocian a *E. coli* del grupo B2^{10,22}. Por lo tanto, estos *E. coli* A/B1 con elevado perfil de virulencia se asemejan mucho a los del grupo filogenético B2, lo que sugiere que no sólo podría ser importante la presencia acumulativa de factores de virulencia, sino la presencia de determinados factores, debido al papel que los mismos desempeñan en la infección.

Se ha observado que la resistencia a los antimicrobianos se asocia a la ausencia de algunos factores de virulencia como las fimbrias tipo 1, fimbrias P, fimbrias S y F1C, hemolisina, factor citotóxico necrosante y aerobactina^{24,25}. Algunos autores^{26,27} sugieren que este fenómeno podría deberse a que la adquisición de resistencia tendría como consecuencia una pérdida de islas de patogenicidad que contienen los factores de virulencia, como lo corrobora el hallazgo de que los aislados de *E. coli* del grupo filogenético B2 resistentes a quinolonas presentan menos factores de virulencia que sus respectivos B2 sensibles²⁸. Sin embargo, otros autores^{11,23} postulan que las cepas resistentes aparecen por un cambio en la flora, consistente en que los *E. coli* del grupo filogenético B2, virulentos y en general sensibles a estos antimicrobianos serían sustituidos por *E. coli* de los grupos A o B1 que sometidos a presión selectiva por los antibióticos en hábitats animales o telúricos, alcanzan al hombre tras haber adquirido la resistencia. En este estudio, los *E. coli* resistentes a fluoroquinolonas derivan de forma significativa de los grupos filogenéticos A/B1 y poseen menos factores de virulencia que los *E. coli* sensibles derivados del grupo B2.

En la literatura médica existe controversia en la relación entre el potencial virulento de las cepas de *E. coli* y los factores locales y generales favorecedores de infección. En diversos estudios se observó que los *E. coli* de los grupos filogenéticos no pertenecientes al grupo B2 se aislaban mayoritariamente en pacientes con infección urinaria o bacteriemia y que presentaban factores locales²⁹⁻³² y/o generales de infección^{29,31,32}, lo que sugiere que estos *E. coli* con escaso

potencial virulento pueden invadir y producir infección debido a la disminución de las defensas del huésped. Nuestro estudio confirma parcialmente estos hallazgos, ya que los *E. coli* de los grupos filogenéticos A/B1, incluidos los aislados "con elevado perfil de virulencia", causan pielonefritis y sepsis en pacientes con las defensas disminuidas. Una hipótesis de por qué este hecho no se observa en los *E. coli* A/B1 causantes de cistitis podría ser que estos pacientes tuvieran el nicho intestinal colonizado exclusiva o mayoritariamente por *E. coli* A/B1³³. En estas condiciones, a estos *E. coli* A/B1 les sería relativamente fácil alcanzar la vejiga y producir cistitis. Sin embargo, al carecer de ciertos factores de virulencia, especialmente de *malX*, *papA* y *papG* alelo II (los aislados "con elevado perfil de virulencia" también carecen de ellos) tendrían dificultades para ascender por los uréteres e infectar el tracto urinario superior.

En conclusión, los aislados de *E. coli* de los grupos filogenéticos "no patógenos" A y B1 pueden producir tanto infecciones del tracto urinario como otras infecciones extraintestinales en personas sanas, pero principalmente en pacientes con factores favorecedores de infección. Estos *E. coli* poseen, por lo general, una media de factores de virulencia significativamente menor que los *E. coli* de los grupos B2 y D, aunque alguno acumula gran número de factores de virulencia, probablemente adquiridos por transferencia horizontal, lo que les hace semejantes a los *E. coli* de los grupos patógenos B2 y D. Los *E. coli* de los grupos filogenéticos A y B1 son significativamente más resistentes a las fluoroquinolonas que los de los grupos filogenéticos B2 y D.

Agradecimientos

Este estudio ha sido financiado por el Fondo de Investigación Sanitaria, becas FIS 01/1353 y FIS 02/1887.

Bibliografía

- Bettelheim KA. *Escherichia coli* in the normal flora of humans and animals. En: Sussman M, editor. *Escherichia coli: mechanisms of virulence*. 1st ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1997. p. 85-109.
- Herzer PJ, Inouye S, Inouye M, Whittam TS. Phylogenetic distribution of branched RNS-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1990;172:6175-81.
- Picard B, Sevali J, Gouriou S, Duriez P, Brahimi N, Bingen E, et al. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect Immun*. 1999;67:546-53.
- Selander RK, Korhonen TK, Väisänen-Rhen V, Williams PH, Pattison PE, Causant DA. Genetic relationships and clonal structure of strains of *Escherichia coli* causing neonatal septicemia and meningitis. *Infect Immun*. 1986;52:213-22.
- Russo TA, Johnson JR. Proposal of a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis*. 2000;181:1753-4.
- Johnson JR, Kuskowski MA, O'Bryan TT, Maslow JN. Epidemiological correlates of virulence genotype and phylogenetic background among *Escherichia coli* blood isolates from adults with diverse-source bacteremia. *J Clin Infect*. 2002;185:1439-47.
- Johnson JR, Stell AL. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis*. 2000;181:261-72.
- Lecointre G, Rachdi L, Dariu P, Denamur E. *Escherichia coli* molecular phylogeny using the incongruence length difference test. *Mol Biol Evol*. 1998;15:1685-95.
- Duriez P, Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E, Chaventré A, Elion J, et al. Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiol*. 2001;174:1671-6.
- Moreno E, Planells I, Prats G, Planes AM, Moreno G, Andreu A. Comparative study of *Escherichia coli* virulence determinants in strains causing uri-

- nary tract bacteremia vs. strains causing pyelonephritis and other sources of bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005;53:93-9.
11. Moreno E, Prats G, Sabaté M, Pérez T, Johnson JR, 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.
12. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *App Envir Microbiol.* 2000;66:4555-8.
13. Andreu A, Stapleton AE, Fenell C, Xercavins M, Lockman HA, Stamm WE. Urovirulence determinants in *Escherichia coli* strains causing prostatitis. *J Infect Dis.* 1997;176:464-9.
14. Blanco M, Blanco J, Blanco JE, Alonso MP, Abalia I, Rodriguez E, et al. Factores de virulencia y serogrupos O de *Escherichia coli* causantes de infecciones urinarias comunitarias. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 1995;13:236-41.
15. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Fourteenth Informational Supplement M100-S12. NCCLS, Wayne, PA, USA, 2004.
16. Johnson JR, O'Bryan TT, Kuskowski M, Maslow JN. Ongoing horizontal and vertical transmission of virulence genes and *papA* alleles among *Escherichia coli* blood isolates from patients with diverse-source bacteremia. *Infect Immun.* 2001;69:5363-74.
17. Bingen E, Picard B, Brahimi N, Mathy S, Desjardins P, Elion J, et al. 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.* 1998;177:642-50.
18. Johnson JR, Gajewski A, Lesse AJ, Russo TA. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as a cause of invasive nonurinary infection. *J Clin Microb.* 2003;41:5798-802.
19. Johnson J, Kuskowski MA, Gajewski A, Soto S, Horcajada JP, Jiménez de Anta M, et al. Extended virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from patients with cystitis, pyelonephritis, or prostatitis. *J Infect Dis.* 2005;191:46-50.
20. Johnson JR, Kuskowski M, Denamur E, Elion J, Picard B. Clonal origin, virulence factors, and virulence. *Infect Immun.* 2000;68:424-5.
21. Johnson JR, Kuskowski MA, O'Bryan TT, 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 Chem.* 2005;49:26-31.
22. Sannes MR, Kuskowski MA, Owens K, Gajewski A, Johnson JR. Virulence factor profile and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from veterans with bacteremia and uninfected control subjects. *J Clin Dis.* 2004;190:2121-8.
23. Johnson JR, Kuskowski MA, Gajewski A, Sahm DF, Karlowsky JA. Virulence characteristics and phylogenetic background of multidrug-resistant and antimicrobial-susceptible clinical isolates of *Escherichia coli* from across the United States, 2000-2001. *J Infect Dis.* 2004;190:1739-44.
24. Begel S, Heisig P, Wiedemann B. Fluoroquinolone resistance of *Escherichia coli* frequently is associated with decreased expression of type 1 fimbriae. *Proceedings of the 37th Interscience Conference on Antimicrobial and Chemotherapy*; 1997 Toronto, Canada. American Society for Microbiology. Washington, DC. 1997. p. 52.
25. Martínez-Martínez L, Fernández F, Perea EJ. Relationship between haemolysis production and resistance to fluoroquinolones among clinical isolates of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chem.* 1999;43:277-9.
26. Vila J, Simon K, Ruiz J, Horcajada JP, Velasco M, Barranco M, et al. Are quinolone-resistant uropathogenic *Escherichia coli* less virulent? *J Infect Dis.* 2002;186:1039-4.
27. Soto SM, Jiménez de Anta MT, Vila J. Quinolones induce partial or total loss of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* by SOS-dependent or independent pathways, respectively. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:649-53.
28. Horcajada JP, Soto S, Gajewski A, Smithson A, Jiménez de Anta MT, Mensa J, et al. Quinolone-resistant uropathogenic *Escherichia coli* strains from phylogenetic group B2 have fewer virulence factors than their susceptible counterparts. *J Clin Microbiol.* 2005;43:2962-4.
29. Johnson JR, Moseley S, Roberts P, Stamm WE. Aerobactina and other virulence factor genes among strains of *Escherichia coli* causing urosepsis: association with patient characteristics. *Infect Immun.* 1988;56:405-12.
30. Johnson JR, Goulet P, Picard B, Moseley SL, Roberts PL, Stamm WE. Association of carboxylesterase B electrophoretic pattern with presence and expression of urovirulence factor determinants and antimicrobial resistance among strains of *Escherichia coli* that cause urosepsis. *Infect Immun.* 1991;59:2311-5.
31. Johnson JR, Orskov I, Orskov F, Goulet P, Picard B, Moseley SL, et al. O, K, and H antigens predict virulence factors, carboxylesterase B pattern, antimicrobial resistance, and host compromise among *Escherichia coli* causing urosepsis. *J Infect Dis.* 1994;169:119-29.
32. Johnson JR, Roberts PL, Stamm WE. P fimbriae and other virulence factors in *Escherichia coli* urosepsis: association with patient's characteristics. *J Infect Dis.* 1987;156:225-9.
33. Moreno E, Andreu A, Pérez T, Sabaté M, Johnson JR, Prats G. Relationships between *Escherichia coli* strains causing urinary tract infection in women and the dominant faecal flora of the same hosts. *Epidemiol Infect.* 2006;26:1-9.