



Desenvolupament de models experimentals murins per a l'avaluació de la virulència i patogenicitat de soques d'*Escherichia coli*

**Tesi Doctoral presentada per Julieth Nàtalia Quintero Zarate
per a optar al Grau de Doctor en Microbiologia
per la Universitat Autònoma de Barcelona**

Realitzada en el Grup de Microbiologia de l'Institut de Recerca Vall d'Hebron, dins del Servei de Microbiologia de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron de Barcelona.

Amb el vistiplau dels directors de Tesi Doctoral:

Dr. Guillem Prats Pastor

Dra. Antònia Andreu Domingo

Barcelona, juliol de 2013

INFORME DELS DIRECTORS DE TESI

Barcelona, 15 de juliol de 2013

El Dr. Guillem Prats Pastor, professor emèrit del Departament de Genètica i Microbiologia de l'Universitat Autònoma de Barcelona i la Dra. Antònia Andreu Domingo professora titular del Departament de Genètica i Microbiologia de l'Universitat Autònoma de Barcelona.

CERTIFIQUEN:

Que la tesi doctoral "Desenvolupament de models experimentals murins per a l'avaluació de la virulència i patogenicitat de soques d'*Escherichia coli*", presentada per Julieth Natalia Quintero Zarate per a optar al Grau de Doctor en Microbiologia per la Universitat Autònoma de Barcelona, ha sigut realitzada sota la nostra direcció i compleix tots el requeriments establerts per a ser defensada davant el tribunal d'avaluació corresponent.

Dra. Julieth Natàlia Quintero Zarate

Doctorand

Dr. Guillem Prats Pastor

Director de la tesi doctoral

Dra. Antònia Andreu Domingo

Codirectora de la tesi doctoral

*A mis dos madres y a mi hermana
por enseñarme la importancia de la familia.*

*A tu Andres, pel teu amor incondicional,
infinita paciència i per creure en mi.*

*I tu Ander, pel meravellós plaer de tenir-te
dins meu durant aquest mesos d'escritura...*

"L'educació és l'arma més poderosa que pots utilitzar per canviar el món, és el motor del desenvolupament personal. És a través de l'educació que **la néta d'una costurera pot arribar a ser doctora** o que el fill d'un miner arriba a ser el cap de la mina. No és el que ens ve donat, sinó la capacitat de valorar el millor que tenim, el que distingeix una persona d'una altra".

"Un bon cap i un bon cor són sempre una combinació formidable. Hem de fer servir el temps sàviament i adonar-nos que sempre és el moment oportú per fer les coses bé. Després d'escalar una gran turó, te n'adones que hi ha molts més per a escalar. Tot sembla impossible fins que ho fas "

Nelson Mandela

Índexs

ÍNDIX DE CONTINGUT

AGRAÏMENTS	xv
ABREVIACIONS	xxi
RESUMS	xxv
I. INTRODUCCIÓ	1
1. <i>Escherichia coli</i> . Visió de conjunt	3
1.1 Característiques generals del bacteri <i>Escherichia coli</i>	3
1.1.1 Aspectes bacteriològics	4
1.1.2 Classificació infraespecífica	4
1.1.3 <i>E. coli</i> com a bacteri comensal	7
1.2 Infeccions causades per <i>Escherichia coli</i>	7
1.2.1 Infeccions urinàries	8
1.2.1.1 Concepte i generalitats	8
1.2.1.2 Topografia i clínica de la infecció urinària	9
1.2.1.3 Etiologia	10
1.2.1.4 Diagnòstic	12
1.2.1.5 Epidemiologia	14
1.2.1.6 Mecanismes de defensa de l'hoste	15
1.2.1.7 Factors predisponents de l'hoste	20
1.2.2 Altres infeccions extraintestinals causades per <i>E. coli</i>	24
1.2.2.1 Infecció abdominal i pèlvica	25
1.2.2.2 Infeccions del sistema nerviós central	27
1.2.2.3 Bacterièmia i sèpsia en infeccions extraintestinals	29
2. <i>Escherichia coli</i> com agent infeccions	32
2.1 <i>E. coli</i> patògena intestinal	33
2.2 <i>E. coli</i> patògen extraintestinal	36
2.2.1 Patotipus de soques ExPEC	37
2.2.1.1 <i>E. coli</i> uropatogen	38
2.2.1.2 <i>E. coli</i> causant de meningitis i sèpsia	41
2.2.1.3 <i>E. coli</i> adherent i invasiu	42
2.2.1.4 <i>E. coli</i> patògen aviari	43
2.2.1.5 Altres patotipus	44
2.2.2 Factors moleculars de patogenicitat	44
2.2.2.1 Factors de virulència associats a infeccions ExPEC	45

ÍNDIX DE CONTINGUT

2.2.2.2	Illes de patogenicitat_____	68
2.2.2.3	Correlació patogenicitat <i>versus</i> filogrup i MLST_	70
2.2.3	Resistència antimicrobiana en soques ExPEC_____	73
3.	Relació dels factors de virulència amb el filogrup i amb les infeccions extraintestinals. Justificació d'un model experimental_____	74
3.1	Models experimentals per a l'avaluació de la virulència de soques d' <i>E. coli</i> causants d'infeccions extraintestinals_____	76
3.1.1	Infecció urinària ascendent (IUA)_____	77
3.1.2	Septicèmia_____	82
3.1.3	Altres models experimentals utilitzats per a valorar soques d' <i>E. coli</i> _____	82
II.	OBJECTIUS_____	85
III.	MATERIALS I MÈTODES_____	89
1.	Selecció de soques bacterianes_____	91
2.	Mètodes microbiològics_____	91
2.1	Medis i condicions de cultiu_____	91
2.2	Serotipificació_____	93
2.2.1	Determinació de l'antigen O_____	93
2.2.1.1	Preparació de les suspensions bacterianes_____	93
2.2.1.2	Determinació presumptiva del serogrup O_____	93
2.2.1.3	Confirmació del serogrup O_____	94
2.2.2	Determinació de l'antigen H_____	94
2.2.2.1	Procediment per a la detecció_____	95
2.3	Determinació fenotípica de resistència_____	95
2.4	Recompte de bacteris viables en placa_____	96
2.5	Cinètiques de creixement en medi líquid_____	97
2.6	Preparació dels inòculs d'experimentació animal_____	98
2.6.1	Inoculació subcutània_____	98
2.6.2	Inoculació transuretral_____	99
3.	Mètodes de caracterització molecular_____	99
3.1	Electroforesi en gel de camp polsant_____	99
3.2	Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)_____	100
3.2.1	Extracció de DNA cromosòmic des de cultiu pur_____	100

ÍNDIX DE CONTINGUT

3.2.2	Oligonucleòtids utilitzats en l'estudi	101
3.2.3	ERIC PCR	103
3.2.4	Multiplex PCR	104
3.2.4.1	Determinació del grup filogenètic	104
3.2.4.2	Detecció de gens de virulència	105
3.2.4.3	Determinació de la presència d'illes patogenicitat	108
3.3	Electroforesi de DNA en gels d'agarosa	110
3.3.1	Electroforesi convencional	110
3.3.2	Electroforesi per capil·lar	112
4.	Mètodes alternatius a l'experimentació animal	112
5.	Models d'experimentació animal	113
5.1	Model animal	114
5.1.1	Nombre d'animals	115
5.1.2	Estabulació i dieta	115
5.2	Inoculació	116
5.2.1	Protocols d'inoculació	116
5.2.1.1	Inoculació via subcutània	116
5.2.1.2	Inoculació via transuretral	117
5.2.2	Estandardització de l'inòcul bacterià	121
5.2.3	Estudis de virulència	122
5.2.4	Controls d'inoculació	123
5.3	Supervisió i seguiment	124
5.3.1	Criteris de punt final	125
5.4	Eutanàsia i necròpsia	127
5.5	Processament de mostres	128
5.5.1	Anàlisi microbiològic	128
5.5.1.1	Sang	128
5.5.1.2	Orina	128
5.5.1.3	Òrgans	129
5.5.2	Anàlisi histològic	129
6.	Mètodes d'anàlisi estadístics	131
IV.	RESULTATS	133

ÍNDIX DE CONTINGUT

1.	Determinació de la virulència intrínseca <i>in vitro</i> d'una col·lecció de soques d' <i>E. coli</i> aïllades simultàniament del tracte intestinal i de l'orina de dones amb infecció urinària no complicada_____	135
1.1	Determinació de les illes de patogenicitat en soques d' <i>E. coli</i> aïllades de femta i d'orina de dones durant el curs d'una cistitis no complicada_____	135
1.1.1	Prevalença de PAI i distribució segons l'origen dels aïllats	135
1.1.2	Determinació de la distribució de les PAI en les soques d' <i>E. coli</i> _____	137
1.2	Histories clíniques de les dones amb cistitis de les quals es van aïllar les soques per a experimentació <i>in vivo</i> _____	141
1.3	Confirmació del grup filogenètic_____	142
1.4	Serotipificació dels antígens O i H de les soques d' <i>E. coli</i> _____	142
1.5	Avaluació de la clonalitat de les soques seleccionades_____	143
1.6	Determinació de resistència_____	144
1.7	Detecció de factors de virulència_____	144
2.	Estandardització de models murins per a l'avaluació de soques d' <i>E. coli</i> extraintestinals_____	148
2.1	Normalització d'un model murí d'experimentació animal per a l'avaluació d'infeccions extraintestinals a part de la infecció urinària causada per <i>E. coli</i> _____	149
2.2	Estandardització d'un model murí d'experimentació animal per a l'avaluació de la infecció urinària causada per <i>E. coli</i> _____	152
3.	Avaluació del potencial virulent i patogen en dos models murins de soques d' <i>E. coli</i> aïllades de femta i d'orina de dones durant el curs d'una cistitis no complicada_____	156
3.1	Model d'infecció sistèmica via subcutània_____	156
3.2	Model d'infecció urinària ascendent via transuretral_____	163
V.	DISCUSSIÓ _____	173
VI.	CONCLUSIONS _____	187
VII.	BIBLIOGRAFIA _____	191
VIII.	ANNEXOS _____	201

Taula 1. Característiques bioquímiques d' <i>E. coli</i> i altres membres de la família <i>Enterobacteriaceae</i> _____	5
Taula 2. Principals microorganismes aïllats de cistitis adquirides en la comunitat, en diferents estudis nacionals i multinacionals_____	11
Taula 3. Interpretació microbiològica del urocultiu i conducta recomanada_____	13
Taula 4. Factors de virulència específics en soques d' <i>E. coli</i> causants de meningitis_____	28
Taula 5. Comportaments patogènics dels tres principals tipus d' <i>E. coli</i> _____	33
Taula 6. Patotipus d' <i>E. coli</i> patògena intrainestinal_____	35
Taula 7. Interaccions <i>E. coli</i> patògena extraintestinal amb l'hoste humà_____	45
Taula 8. Trets associats amb la virulència de soques d' <i>E. coli</i> per categoria funcional_____	48
Taula 9. Tipus d'adhesines en soques ExPEC_____	50
Taula 10. Classificació de càpsules present en <i>E. coli</i> _____	64
Taula 11. Prevalença expressada en percentatges dels diferents factors de virulència aïllats en soques ExPEC_____	67
Taula 12. Principals PAI descrites en soques UPEC_____	69
Taula 13. Prevalença de grups filogenètics d' <i>E. coli</i> en diferents poblacions d'estudi_____	71
Taula 14. Complexos clonals predominats entre les soques ExPEC de la base de dades del MLST per a <i>E. coli</i> _____	73
Taula 15. Diferents models d'experimentació animals descrites a la literatura per a valorar infecció urinària_____	81
Taula 16. Diferents models d'experimentació animals descrites a la literatura per a valorar bacterièmia o septicèmia_____	83
Taula 17. Diferents models d'experimentals utilitzats per a avaluar la virulència de soques d' <i>E. coli</i> _____	83
Taula 18. Gens amplificats i primers utilitzats en les diferents reaccions de PCR_____	101
Taula 19. Preparació de la mescla de reacció per a l'ERIC PCR_____	104
Taula 20. Programa de termociclador per a l'ERIC PCR_____	104
Taula 21. Preparació de la mescla de reacció per a la Multiplex PCR de grups filogenètics_____	104

ÍNDIX DE TAULES

Taula 22. Programa de termociclador per a PCR de grups filogenètics_____	105
Taula 23. Correspondència de l'amplificació dels productes de PCR per a cadascun dels quatre grups filogenètics_____	105
Taula 24. Detecció de 55 gens de virulència en soques d' <i>E. coli</i> per Multiplex PCR_____	106
Taula 25. Preparació dels sis pools d'oligonucleòtids per a la detecció dels gens de virulència_____	107
Taula 26. Preparació de la mescla per a la reacció de Multiplex PCR de factors de virulència_____	108
Taula 27. Programa de termociclador per a PCR de factors de virulència__	108
Taula 28. Control positius de l'amplificació per a la PCR de factors de virulència_____	108
Taula 29. Preparació del dos <i>pools</i> d'oligonucleòtids per a la detecció de d'illes de patogenicitat_____	109
Taula 30. Preparació de la mescla per a la reacció de Multiplex PCR de detecció d'illes de patogenicitat_____	109
Taula 31. Programa de termociclador per a PCR d'illes de patogenicitat__	109
Taula 32. Nombre total d'animals per als procediments d'experimentació animal_____	115
Taula 33. Rang de concentracions dels estudis d'estandardització de l'inòcul_____	122
Taula 34. Representació dels grups controls del procediment d'experimentació animal_____	124
Taula 35. Quadre de supervisió individual per a cada animal d'experimentació_____	126
Taula 36. Escala de classificació histopatològica per al grau d'inflamació__	130
Taula 37. Prevalença de PAI segons origen_____	136
Taula 38. Nombre acumulat de PAI segons grup filogenètic i origen_____	137
Taula 39. Determinació específica de vuit PAI en les soques escollides_____	140
Taula 40. Soques escollides després de fer l'anàlisi dels resultats de l'estudi de PAI_____	140
Taula 41. Història clínica de les pacients incloses a l'estudi_____	141
Taula 42. Resultats de les dades de laboratori de les mostres processades_	142
Taula 43. Resultats de la Multiplex PCR de determinació dels grups	

filogenètics_-----	143
Taula 44. Resultats de serotipificació dels antígens O i H_-----	143
Taula 45. Resistència fenotípica i genotípica_-----	144
Taula 46. Detecció específica de FV en les mostres d' <i>E. coli</i> per a experimentació animal_-----	145
Taula 47. Comparació de les dues caracteritzacions de FV en soques d' <i>E. coli</i> _-----	146
Taula 48. Factors de virulència determinats a les 20 soques clíniques_--	147
Taula 49. Caracterització de les soques d' <i>E. coli</i> per a inoculació dels assajos de virulència en els dos models murins_-----	148
Taula 50. Resultats de la inoculació via subcutània de les soques control negatiu i positiu de procediment_-----	150
Taula 51. Resultats de la inoculació via transuretral de les soques control negatiu i positiu de procediment_-----	154
Taula 52. Distribució segons grup filogenètic de les soques per a inoculació a cadascuna de les dos vies en els models <i>in vivo</i> _-----	156
Taula 53. Perfil virulent de les soques i relació amb mortalitat_-----	159
Taula 54. Anàlisi de les mostres d'orina processades amb tira reactiva per a la determinació de característiques fisico-químiques_-----	167
Taula 55. Anàlisi microbiològic de les mostres d'orina, bufeta i ronyons, i comparació amb l'anàlisi histològic de bufeta i ronyons_-----	170
Taula 56. Proporció de ratolins amb canvis histològics després dels assajos de virulència_-----	172
Taula 57. Comparació dels paràmetres tècnics dels dos models animals estandarditzats_-----	178
Taula 58. Comparació del potencial patògen de les soques d' <i>E. coli</i> en els dos models experimentals murins_-----	185

Figura 1. Arbore de decisió dicotòmica per a la determinació del grup filogenètic en soques d' <i>E. coli</i> mitjançant l'ús dels resultats de l'amplificació per PCR_____	6
Figura 2. Microscòpia electrònica de rastreig del procés d'exfoliació i regeneració de l'epiteli de la bufeta al model murí d'infecció urinària_____	17
Figura 3. Representació esquemàtica de l'activació de TLR i l'atracció de PMN_____	18
Figura 4. Factors de virulència de soques uropatògenes i la seva resposta innata_____	19
Figura 5. Resposta inflamatòria en septicèmia_____	30
Figura 6. Llocs de colonització d' <i>E. coli</i> _____	33
Figura 7. Patogènesi de les infeccions urinàries ascendents produïdes per <i>E. coli</i> _____	39
Figura 8. Mecanisme patogènic de les soques UPEC_____	40
Figura 9. Atlas genòmic comparatiu entre soques AIEC i altres patotipus d' <i>E. coli</i> _____	43
Figura 10. Representació esquemàtica dels operons <i>fim</i> i <i>pap</i> _____	51
Figura 11. Diferents models per a l'adquisició de ferro en soques ExPEC_ _	57
Figura 12. Toxines associades a soques UPEC_____	59
Figura 13. Estructura general de les PAI_____	69
Figura 14. Distribució filogenètica de factors de virulència associats a soques d' <i>E. coli</i> _____	71
Figura 15. Representació de l'anàlisi filogenètic dels resultats de la base de dades del MLST per a <i>E. coli</i> _____	72
Figura 16. Adaptació metabòlica i fisiològica d' <i>E. coli</i> a microambients_____	78
Figura 17. Formació i maduració del <i>intracel·lular bacterial communities</i> _ _	79
Figura 18. Participació de les diferents adhesines durant el procés d'infecció per soques UPEC al ronyó_____	80
Figura 19. Reacció d'aglutinació per als antígens H_____	95
Figura 20. Resistència fenotípica d'una de les soques d' <i>E. coli</i> (14334) del present estudi_____	96
Figura 21. Preparació dels inòculs per a les vies d'inoculació subcutània i transuretral_____	98

Figura 22. Gel d'electroforesis en camp polsant al 1%_-----	100
Figura 23. Marcadors de pes molecular_-----	110
Figura 24. Detecció d'amplificats d'ERIC PCR en gels d'agarosa al 2%_-----	111
Figura 25. Detecció d'amplificats de gens de virulència en gels d'agarosa al 2%_-----	111
Figura 26. Detecció d'amplificació d'illes de patogenicitat en gels d'agarosa al 1%_-----	111
Figura 27. Detecció d'amplificats de grups filogenètics utilitzant el sistema MultiNa_-----	112
Figura 28. Control de correcta inoculació_-----	124
Figura 29. Mostres per a l'anàlisi histològic_-----	130
Figura 30. Nombre acumulat de PAI segons origen i grup filogenètic_-----	136
Figura 31. Soques amb diferent clonalitat, mateix nombre i mateixa combinació de PAI_-----	137
Figura 32. Distribució de PAI en tots els aïllats segons nombre acumulat_-----	138
Figura 33. Dendograma de les soques majoritàries que albergaven el mateix nombre i la mateixa combinació de PAI_-----	139
Figura 34. Dendograma de les mostres utilitzades per als assajos de virulència_-----	143
Figura 35. Recuperació bacteriana dels diferents líquids i òrgans processats del model de septicèmia_-----	150
Figura 36. Monitorització en orina de la IUA durant els 7 dies d'experiment, i recuperació bacteriana de sang i òrgans del 7è dia_-----	153
Figura 37. Recuperació bacteriana dels diferents líquids i òrgans processats del model d'IUA_-----	155
Figura 38. Recuperació bacteriana del 7è dia d'experiment en orina, bufeta i ronyons_-----	155
Figura 39. Mortalitat causada per les soques d' <i>E. coli</i> als grups de 10 ratolins inoculats via subcutània_-----	158
Figura 40. Recuperació bacteriana agrupada per grup filogenètic de totes les mostres processades de cadascun dels grups d'inoculació_-----	160
Figura 41. Comparació individualitzada dels recomptes bacterians de les mostres processades dels òrgans_-----	162

Figura 42. Seguiment de la infecció urinària ascendent mitjançant cultiu d'orina durant els set dies de l'experiment, agrupades per grups filogenètics_-----	164
Figura 43. Representació dels paràmetres estadístics de mitjana i mediana per als marcadors de leucocitúria, proteïnúria i hematúria en les mostres d'orina durant l'experiment de 7 dies_-----	167
Figura 44. Recomptes bacterians del 7è dia d'experiment de mostres d'orina, de bufeta, de ronyons i de sang; i comparativa amb els resultats histopatològics de bufeta i de ronyons agrupats per grup filogenètic_-----	168
Figura 45. Recomptes bacterians d'orina, de bufeta i de ronyons de cadascun del grups de 10 ratolins inoculats per a cada soca_-----	170
Figura 46. Tinció de hematoxilina-eosina de mostres positives i negatives per a cistitis i pielonefritis_-----	171

Agraïments

Després d'escriure tota la tesi ara tinc un grapat de fulls en blanc, l'últim pas per a poder donar-la per finalitzada. Que siguin les últimes pàgines no vol dir que siguin les menys importants ni molt menys, però després d'estar mesos escrivint aquest document; també somnies amb aquest moment. Que no només reflexa la finalització de la tesi, sinó que em fa recordar com han sigut els meus últims cinc anys de vida.

Des de la primera vegada que vaig llegir els agraïments d'una altra tesi doctoral, la d'en Jesús, com oblidar-lo, vaig pensar: com ho faré el dia que ho hagi de fer jo. Són d'aquestes coses que segurament et planifiques i vas rumiant, però que el final termina sortint el que vol dir el cor en aquell moment. Per tant, aquí comencen els agraïments a totes aquelles persones que han fet possible que aquest somni pugui fer-se realitat.

I com no començar amb el mentor de tot això, el Dr. Prats, el meu cap i director d'aquesta tesi. Dr. Prats, no tinc paraules per a agrair-li la immensa possibilitat que m'ha donat formant part del seu equip de treball. Mai oblidaré la primera entrevista al seu despatx. Durant aquests quasi quatre anys al seu costat, compartint més enllà de l'activitat professional, la vida dia a dia, les reunions científiques, els "tips" per a fer relacions professionals. I és clar, el seu sentit del humor (aprofitant que els seus fills no li deixen utilitzar-lo el cap de setmana!) Gràcies a vostre, *E. coli* ha passat de ser el millor bacteri estudiat del món científic; per a convertir-se en el meu company fidel de cada dia. Sort que és bo i s'ha comportat a pesar de totes les que ha tingut de passar al meu costat. Ja sé que aquestes línies no poden reflectir tot el que vull agrair-li, però se que sense vostre aquest projecte i en particular aquest document no seria el que és avui en dia: una realitat.

També vull donar les gràcies a la meva codirectora de tesi la Dr. Antònia Andreu, sense el seu FIS aquesta tesi no hagués sigut possible. I amés Antònia, vull agrair-te la disposició que has tingut durant aquest anys. Cada vegada que he necessitat ajuda pel que fos, estaves disponible per a mi amb una simple trucada, un correu o una reunió al teu despatx. Gràcies per la teva ajuda, consells, franquesa i complicitat.

Aprofito per a continuar amb el resta de l'equip del servei de Microbiologia del Hospital, en general a tots. Moltes gràcies, perquè sempre he tingut el vostre recolzament. Agrair a cada una de les persones de totes les seccions per ajudar-me

quan necessitava alguna cosa. En particular als d'orina, òbviament, als que més vaig emprenyar, i també a les noies de la cuina, Núria i Marisa per ajudar-me en tot moment amb el material, tant important pel desenvolupament d'aquesta tesi. A tots els estudiants de pràctiques de Màster o llicenciatura: Eva, Marta, Alba, i molts més, als quals he tingut l'oportunitat d'ensenyar una mica de la feina en el laboratori, a la vegada que jo aprenia cada dia al vostre costat. Per recordar-me que la docència per a mi es una passió i no una obligació. I com no dir-ho, però també gràcies per la vostra col·laboració amb la meva línia d'investigació i de descarregar-me una mica de la meva pròpia feina.

Com acabar de parlar de la gent del hospital sense nombrar a tres grans persones: Rosa, Nieves i Juanjo, a vosaltres gràcies per acompanyar-me durant tot aquest procés de formació professional. Cadascun de vosaltres en la seva àrea i amb les seves capacitats professionals i personals. M'han estimulat la passió i el rigor necessaris per a viure i conviure dins la microbiologia. Gràcies per les vostres recomanacions i consell, i com no, per tots els moments personals viscuts en aquest anys. No vull oblidar en aquest apartat a Mayli... no se com ho vam fer, no se si és per la proximitat dels nostres orígens, però ens hem convertit en psicòlogues particulars en horari de tarda. Per a resoldre mútuament als nostres problemes professionals i personals, gràcies per aquests moments i espero haver-te sigut d'ajuda...

També, no vull deixar de costat a la gent de l'estabulari del VHIR, Marta, Alex, Montse i a les cuidadores, gràcies a vosaltres m'he pogut endinsar al món veterinari i per tant de l'experimentació animal. Crec que sense voler, heu sigut claus per a la passió que ha significat per a mi treballar molt èticament amb els meves ratolinetes, mai m'havia imaginat que em pugés agradar tant aquesta àrea de la investigació.

A més, vull donar les gràcies a resta de professionals que m'han ajudat en la realització dels diferents experiments que composant aquesta tesi. Per exemple el grup d'estadístics: Xavi i Santi, i per suposat a tot el grup de persones del laboratori de referència de Lugo a càrrec del Dr. Jorge Blanco. I molt especialment a Ghizlane "Cris" per la seva professionalitat i incondicionalitat, *el mundo es un pañuelo*, qui ens anava a dir que ens retrobarien a Lugo després de la teva estada a l'UAB.

Ara, vull agrair a tota la meva família en Barcelona, per obrir els vostres cors a un colombiana. Començaré amb tu "Alisu", encara que ja no vius a Barcelona, sense tu

aquests anys a la Vall d'Hebron no haguessin sigut iguals, recordaré sempre les tardes solucionant el món... Gràcies a tu, avui puc dir que tinc una germana francesa, i quin honor poder-ho ser, perquè amb persones com tu; val la pena treballar i compartir una amistat. Ara més que mai, estic feliç perquè el nostres somnis en conjunt es fan realitat aquest 2013. Després tu "Su", como et dic jo "la veterana" que sense voler, estàs veient arribar i marxar la gent. T'anirem a visitar i veurem com continues fent la teva feina cada dia com el primer. Però, com no comptar amb tu per un equip de professionals; si ets la millor professional amb que es pot comptar! Que seria d'aquesta tesis sense tu, a les llargues e interminables hores d'estabulari!. Quantes coses compartides i gràcies a això una bella amistat. Gràcies per ser com ets i per poder contar amb tu per tot, mai millor dit. "Nu" els anys passen volant, com oblidar els primers mesos de les teves pràctiques i els teus fantàstics pentinats... Mica en mica hem vist com "Nu" es feia pas dins de la Núria Piedra. Gràcies per ser la madrina de palma, per estar amb mi durant aquest anys i per la teva amistat. "Tuanet", tu i els teus ulls blaus, el *ti-tiri-tiri*, *¡Soy Luis Mariano, fregona en mano...*, i la manera de portar la bata: fan que la família al Vall de *Bronx* estigui més feliç cada dia. Continua així, alegrant-nos la vida. Sembla que el calçots es continuen fermentat i força... "Oi", vas arribar a la meva vida quant més et necessitava, quant les coses dels ratolins començaven a ser més que les hores del dia. Quin fitxatge, *zaren bakarra eta errepikaezina*. Que bé que tenim una filla de basconia a la nostra família, i espero no m'odiïs per insistir-te en la Bioinfo "només de tant en tant". I finalment "Ju", encara que han sigut molt pocs mesos, no per no voler sinó per no poder, m'alegro d'haver pogut comptar amb tu, ja veuràs com tu passaràs pipa al lab mentre fas la tesi.

També vull guardar un espai per tota la gent del Microbiologia Molecular de la UAB, gràcies a aquella primera oportunitat vaig començar al món de la investigació, i també reorientar el meu camí. Sense saber res de biologia molecular, vaig arribar a un laboratori amb moltes persones amb ganes d'ajudar-me professionalment i a practicar el català, sense por. Gràcies: Susana C., Jordi, Montse, Pilar, Susana E., Jesús, Carlota, Denis, Gerard, Ana, Laura T., Laura M. i Andrea. Gràcies a tots.

Vull donar les gràcies a tu Sussy, que seria de mi en aquest país sense tu. Les coincidències de la vida: al compartir el primer nom amb la meva germana i de haver nascut el mateix any que ella; van fer que ens coneguéssim estudiant català. I des de fa molts anys cultivem la nostra amistat. Gràcies per prestar-me al Marcos i l'Adriana per a jugar i oblidar-me de tant en tant de la feina, i per anar entrenant-me. Espero poder tenir més temps ara per a fer mil coses més amb tu. També aprofito per mencionar a Hayat, Alejandro i David, més coincidències en la vida.

Per això dic que el destí és el destí, que bé que l'Ander ja té tants cosinets. I els meus sogres Gladys i Gilberto per recolzar sempre les nostres metes i estar disposats quan els necessitem.

I ara la meva família, el més important per a mi. Gràcies a vosaltres he fet tot el que m'he proposat a la vida. *A ti tita, gracias por tu incondicionalidad y corazón para todos en la familia, que sería de mi vida tan lejos de casa si mi mami y mi hermana no te tuvieran. Gracias por tus sacrificios y por tu paciencia. Y sobre todo gracias por ser mi segunda madre. Nunca me cansare de decírtelo. Liza, ni por todo el oro del mundo cambiaría la oportunidad de tenerte a ti como hermana, eres la mejor aunque a veces las travesuras te traicionen y nos enloquezcan a todos. Mami, que mejor ejemplo que tenerte a ti como espejo, con tu fuerza, tus ganas de superación, tus sacrificios para ser alguien en la vida i sobre todo por el transmitirme desde siempre el gusto por el saber. Espero poder mínimamente hacerte sentir orgullosa de mi, sabes que nuestra relación nunca ha sido de una madre e hija normal: somos amigas. Gracias por motivarme cada día y solo espero poderte darte todo y cuanto más pueda. Te amo. A vosotras tres gracias por ser mi fuerza en la distancia.*

I finalment, a tu. El meu amor, Andres i a la nostra llavor: l'Ander, que seria de mi sense tu en el camí diari des de fa molts anys. Tu, la raó que estigui tan lluny de casa. Però sóc conscient que gràcies això, he tingut la possibilitat d'aconseguir aquests fruits professionals. Són tantes coses que vull agrair-te a la meva vida que unes línies són molt poques. L'únic que realment sé, és que acaba un etapa a les nostres vides i donem pas a un altra; que amb tota seguretat serà la més meravellosa. Gràcies per permetre'm estar al teu costat cada dia de la meva vida. T'estimo.

Abreviaciones

ABREVIACIONS

<i>ad libitum</i>	a placer, a voluntat
AIEC	<i>Adherent invasive Escherichia coli</i>
APEC	<i>Avian pathogenic Escherichia coli</i>
BLEE	Betalactamases d'espectre estès
CEEA	Comitè de ètica i experimentació animal
CFA	<i>Colonization factor antigen</i>
CNF	<i>Cytotoxic necrotizing factor</i>
DAEC	<i>Diffusely adherent Escherichia coli</i>
DAF	<i>Decay-accelerating factor</i>
DL ₅₀	Dosis letal 50
DNA	Àcid desoxiribonucleic
DO	Densitat òptica
EAEC	<i>Enteroggregative Escherichia coli</i>
EHEC	<i>Enterohaemorrhagic Escherichia coli</i>
EIEC	<i>Enteroinvasive Escherichia coli</i>
EnPEC	<i>Endometrial pathogenic Escherichia coli</i>
EPEC	<i>Enteropathogenic Escherichia coli</i>
EPINE	<i>Estudio de prevalencia de las infecciones nosocomiales en España</i>
ETEC	<i>Enterotoxigenic Escherichia coli</i>
EUA	Estats Units d'Amèrica
ExPEC	<i>Extraintestinal pathogenic Escherichia coli</i>
FUR	<i>Ferric uptake regulator</i>
FV	Factors de virulència
GEI	<i>Genomic islands</i>
GF	Grup filogenètic
IBC	<i>Intracellular bacterial communities</i>
IPEC	<i>Intestinal pathogenic Escherichia coli</i>
IU	Infecció urinària
IUA	Infecció urinària ascendent
kDa	Kilodaltons
LB	Luria Bertani
LCR	Líquid cefaloraquidi
LPS	Lipopolisacàrid
mDa	Megadaltons

ABREVIACIONS

ml	Mil·lilitre
MLEE	<i>Multilocus enzyme electroforesis</i>
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
MPEC	<i>Mammary pathogenic Escherichia coli</i>
nm	Nanòmetres
NMEC	<i>Neonatal Meningitis associated Escherichia. coli</i>
NTEC	<i>Necrotoxigenic Escherichia. coli</i>
ON	<i>Over-night</i>
PAI	<i>Pathogenic-associated island</i>
PAP	<i>Pyelonephritis associated pili</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed field gel electrophoresis</i>
PMN	Polimorfonuclears neutròfils
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i>
RVU	Reflux vesicoureteral
SEPEC	<i>Sepsia-Causing Escherichia. coli</i>
SNC	Sistema nerviós central
SPATE	<i>Serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae</i>
STEAEC	<i>Shiga toxin (Stx) producing enteroaggregative Escherichia coli</i>
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
UFC	Unitats formadores de colònies
µl	Microlitre
µm	Micròmetre
UPEC	<i>Uropathogenic Escherichia coli</i>
UV	Ultraviolada

Resums

Les infeccions urinàries constitueixen una de les infeccions bacterianes més freqüents tant en la comunitat com en l'àmbit hospitalari, que afecten dones sanes i pacients amb factors predisponents. *Escherichia coli* és sens dubte l'agent causal més freqüent d'aquestes infeccions. El qual també, s'ha constatat com a causant d'altres infeccions extraintestinals com ara colecistitis, peritonitis, meningitis i sèpsia. Paradoxalment, *E. coli* és el principal component de la flora facultativa comensal de l'intestí humà i altres animals.

Basant-se en tècniques moleculars s'ha demostrat que aquesta espècie pot dividir-se principalment en quatre grups filogenètics principals: A, B1, B2 i D. S'ha pogut comprovar que les infeccions extraintestinals estan causades majoritàriament per soques del filogrup B2 i en menor proporció del D. D'altra banda s'ha pogut demostrar en diversos estudis experimentals i de correlació estadística, que les soques d'aquests filogrups associades a infecció porten amb més freqüència un conjunt de factors de virulència als que s'atribueixen les funcions patogèniques; com són les adhesines, els quelants de ferro, les toxines, les càpsules i d'altres.

No obstant això, hi ha observacions que posen en qüestió aquestes troballes, com és el fet que amb certa freqüència soques dels filogrups A i B1, portadores d'escassos factors de virulència, causin infeccions urinàries i sèpsia en persones sanes. Això, i estudis específics per a cadascun d'aquest factors han qüestionat el seu valor patogènic; considerats de forma aïllada o col·lectivament. La forta correlació entre el filogrup i l'acció patògena podria indicar la presència de factors de virulència desconeguts i la importància de la seva associació.

En aquest context, l'única manera de conèixer si una soca és capaç de fer infeccions extraintestinals i en particular infeccions urinàries, és avaluar-les en models experimentals, amb aquesta finalitat s'han descrit dos models *in vivo*. El primer d'ells, valora la capacitat de causar infecció generalitzada una vegada s'han sobrepassat les barreres naturals de l'hoste, i de permetre la disseminació del patogen al sistema circulatori i causant bacterièmia o septicèmia. Mentre que el segon model, d'infecció urinària ascendent, avalua el potencial virulent i patogen en el sistema urinari. I la capacitat del bacteri per ascendir des de la bufeta fins als ronyons quan no s'apliquen pautes terapèutiques per a contenir la infecció urinària de les vies baixes.

Per tant, els principals objectius d'aquesta tesi doctoral han estat: i) determinar el grup filogenètic, els factors de virulència i altres característiques biològiques d'un grup de soques d'*E. coli* d'origen urinari i intestinal; amb la finalitat de seleccionar les soques utilitzades per als estudis amb els models experimentals *in vivo*; ii) estandarditzar dos models murins d'experimentació animal per a l'avaluació d'infeccions extraintestinals causades per *E. coli* i iii) avaluar el potencial virulent i patogen en els dos models murins de les soques d'*E. coli* prèviament seleccionades.

El treball realitzat han permès incorporar en el grup de Microbiologia de l'Institut de Recerca Vall d'Hebron, dins del Servei de Microbiologia del Hospital Universitari Vall d'Hebron; dos models experimentals murins per a l'avaluació de la virulència i patogenicitat de soques d'*E. coli*. Així mateix, també ha permès la caracterització *in vitro* d'un grup de soques heterogènies, aportant les primeres proves de conceptes dels models.

Els dos models murins estandarditzats i les dades aportades per aquesta tesi obren futures vies de treball com són: i) estudis de virulència de microorganismes causants de sèpsies o infecció urinària, ii) monitorització d'infeccions extraintestinals per a la determinació de la implicació específica de determinants de virulència mitjançant tecnologies d'expressió *in vivo* o assajos de competició de mutants, iii) avaluació de la eficàcia, la farmacocinètica i la farmacodinàmica de nous antimicrobianes, entre altres.

Las infecciones urinarias constituyen una de las infecciones bacterianas más frecuentes tanto en la comunidad como en el ámbito hospitalario, que afectan mujeres sanas y pacientes con factores predisponentes. *Escherichia coli* es sin duda el agente causal más frecuente de estas infecciones, que también se ha constatado como causante de otras infecciones extraintestinales como colecistitis, peritonitis, meningitis y sepsis. Paradójicamente, *E. coli* es el principal componente de la flora facultativa comensal del intestino humano y otros animales.

Basándose en técnicas moleculares se ha demostrado que esta especie puede dividirse principalmente en cuatro grupos filogenéticos principales: A, B1, B2 y D. Se ha podido comprobar que las infecciones extraintestinales están causadas mayoritariamente por cepas del filogrupo B2 y en menor proporción del D. Por otra parte se ha podido demostrar en varios estudios experimentales y de correlación estadística, que las cepas de estos filogrupos asociadas a infección llevan con más frecuencia un conjunto de factores de virulencia en los que se atribuyen las funciones patogénicas como son las adhesinas, los quelantes de hierro, las toxinas, las cápsulas y otros.

Sin embargo, hay observaciones que ponen en cuestión estos hallazgos, como es el hecho de que con cierta frecuencia cepas de los filogrupos A y B1, portadoras de escasos factores de virulencia, causen infecciones urinarias y sepsis en personas sanas. Esto y estudios específicos para cada uno de estos factores han cuestionado su valor patogénico, considerados de forma aislada o colectivamente. La fuerte correlación entre el filogrupo y la acción patógena podría indicar la presencia de factores de virulencia desconocidos y la importancia de su asociación.

En este contexto, la única manera de conocer si una cepa es capaz de hacer infecciones extraintestinales y en particular infecciones urinarias, es evaluarlas en modelos experimentales, con esta finalidad se han descrito dos modelos *in vivo*. El primero de ellos valora la capacidad de causar infección generalizada, una vez se han sobrepasado las barreras naturales del huésped, permitiendo la diseminación del patógeno al sistema circulatorio causando bacteriemia o septicemia. Mientras que el modelo de infección urinaria ascendente, evalúa el potencial virulento y patógeno en el sistema urinario y la capacidad de la bacteria para ascender desde la vejiga hasta los riñones; cuando no se aplican pautas terapéuticas para contener la infección urinaria de las vías bajas.

Por tanto, los principales objetivos de esta tesis doctoral han sido: i) determinar el grupo filogenético, los factores de virulencia y otras características biológicas de un grupo de cepas de *E. coli* de origen urinario e intestinal; con el fin de seleccionar las cepas utilizadas para los estudios con modelos experimentales *in vivo*, ii) estandarizar dos modelos murinos de experimentación animal para la evaluación de infecciones extraintestinales causadas por *E. coli* y iii) evaluar el potencial virulento y patógeno en los dos modelos murinos de las cepas de *E. coli* previamente seleccionadas.

El trabajo realizado ha permitido incorporar en el grupo de Microbiología del *Institut de Recerca Vall d'Hebron*, dentro del Servicio de Microbiología del *Hospital Universitari Vall d'Hebron* dos modelos experimentales murinos para la evaluación de la virulencia y patogenicidad de cepas de *Escherichia coli*. Asimismo, también permitió la caracterización *in vitro* de un grupo de cepas heterogéneas, aportando las primeras pruebas de conceptos de los modelos.

Los dos modelos murinos estandarizados y los datos aportados por esta tesis abren varias futuras vías de trabajo como son: i) estudios de virulencia de microorganismos causantes de sepsis o infección urinaria, ii) monitorización de infecciones extraintestinales para la determinación de la implicación específica de determinados de virulencia, mediante tecnologías de expresión *in vivo* o ensayos de competición de mutantes, iii) evaluación de la eficacia, la farmacocinética y la farmacodinámica de nuevos antimicrobianos, entre otros.

Urinary tract infections are one of the most common bacterial infections in the community and in hospitals, affecting healthy women and patients with predisposing factors. *Escherichia coli* is certainly the most common casual agent of these infections, which also is the cause of other extraintestinal infections such as cholecystitis, peritonitis, meningitis and sepsis. Paradoxically, *E. coli* is the main component of facultative commensal flora of the human intestine and other animals.

Using molecular techniques it has been proven that this specie can be divided into four main phylogenetic groups, named A, B1, B2 and D. The majority of the extraintestinal infections are caused by strains from phylogenetic group B2 and in a less extent by group D strains. Moreover, several experimental studies and statistical correlations have demonstrated that the strains associated to infections, present more often a set of virulence factors attributed to features such as pathogenic adhesins, iron chelates, toxins, and capsules, among others.

However, some observations are calling into question these results; such as the fact that frequently strains from phylogenetic groups A and B1 (carriers of fewer virulence factors) cause urinary tract infections and sepsis in healthy people. Because of this result and other studies carried out for each of the virulence factors, the pathogenic value of the factors, singly and collectively, has been questioned. The strong correlation among the pathogenic action of phylogenetic groups may indicate the presence of unknown virulence factors and the importance of their relationship with extraintestinal infections.

Taking into account the background, the only way to know if a strain is capable of producing extraintestinal infection and particularly urinary tract infection, is evaluating them using experimental models. For this purpose, two *in vivo* models were described. The first one recognizes the worth of the ability to cause widespread infection once the natural barriers of the host have been exceeded, allowing the spread of the pathogen into the circulatory system causing bacteremia or septicemia. Meanwhile, the ascending urinary infection model assesses the pathogenicity and the virulent potential of the strains in the urinary system, besides the capability of the bacteria to ascend from the bladder to the kidneys without any treatment to contain the lower urinary tract infection

Therefore, the main objectives of this thesis were: i) to determine the phylogenetic group, virulence factors, and other biological characteristics of urinary and intestinal *E. coli* strains, in order to select the strains to be used for *in vivo* experimental studies ii) to standardize two murine models for the evaluation of extraintestinal infections caused by *E. coli*, and iii) to evaluate the pathogenicity and the virulent potential of previously selected *E. coli* strains in murins models.

The work has allowed the incorporation of two experimental murine models for the evaluation of the virulence and the pathogenicity of *Escherichia coli* strains into the Microbiology group of *Vall d'Hebron Institut de Recerca* in the Microbiology department of *Hospital Universitari Vall d'Hebron*. Likewise, it has allowed the *in vitro* characterization of a heterogeneous group of strains, providing the first evidence of concepts of those models.

The two standardized murine models and the data provided by this thesis open several lines for future work, such as: i) studying the virulence of microorganisms causing sepsis or urinary tract infection, ii) monitoring of extraintestinal infections to determine the specific involvement of certain virulence factors by means of *in vivo* expression technologies or mutants competition assays, and iii) evaluating the efficacy, pharmacokinetics and pharmacodynamics of new antimicrobials, among other studies.

I. Introducció

1. *Escherichia coli*. Visió de conjunt

Escherichia coli és un important membre de la microflora intestinal normal de l'home i dels animals de sang calenta. En el còlon humà és el bacteri aerobi i anaerobi facultatiu més abundant. Constitueix el paradigma dels bacteris comensals, ja que realitza diverses funcions beneficioses per al seu hoste, però pocs microorganismes són tan versàtils com l'*E. coli*; aquesta gran adaptabilitat ha permès que alguns clons adquireixin i estabilitzin gens exògens, que els permeten comportar-se com a patògens, en envair els teixits o produir toxines.

Les infeccions produïdes per l'*E. coli* es classifiquen en dos grans grups: les intestinals, causades per soques enteropatògenes i les extraintestinals. Les infeccions intestinals, les que el símptoma cardinal és la diarrea, estan causades per soques que ocasionen les lesions per diferents mecanismes: algunes envaeixen l'intestí gràcies a factors de virulència específics i altres produeixen diversos tipus d'enterotoxines.

Entre les infeccions extraintestinals destaquen les infeccions urinàries, la colecistitis, les infeccions de les incisions quirúrgiques, la peritonitis, la meningitis i la bacterièmia. Aquestes infeccions extraintestinals estan produïdes per soques d'*E. coli* que tenen diversos factors de virulència que els permeten adherir-se, penetrar en els teixits i resistir la fagocitosi. Actualment s'accepta que els factors de virulència que indueixen les infeccions urinàries són els mateixos que faciliten la resta d'infeccions extraintestinals i les soques que els posseeixen s'han denominat ExPEC (*Extraintestinal pathogenic Escherichia coli*).

1.1 Característiques generals del bacteri *Escherichia coli*

E. coli va ser descrita per primera vegada al segle XIX pel Dr. Theodor Escherich com a un microorganisme habitual en la microbiota del budell dels individus sans. No obstant això, tant el seu descobridor com posteriors investigadors van demostrar que *Bacterium coli commune*, com va ser denominat inicialment, podia trobar-se també associat a infeccions intestinals i extraintestinals.

1.1.1 Aspectes bacteriològics

Les característiques bioquímiques més importants d'aquesta espècie (taula 1) inclouen un coeficient de guanina-citosina al DNA entre el 49-52% i les següents característiques: fermenta la glucosa amb producció de gas i sense producció d'acetoïna determinada per la prova de Voges-Proskauer; no utilitza el citrat de Simmons; no produeix enzims extracel·lulars (lipasa, proteases ni Dnases); no produeix H₂S; no hidrolitza l'urea; no desamina el triptòfan ni la fenilalanina; fermenta l'arabinosa, manosa, mannitol i maltosa, però no l'inositol. *E. coli* és usualment distingida dels altres membres de la família per l'habilitat de moltes soques de fermentar la lactosa i altres sucres; i addicionalment per produir indol des de triptòfan, i presentar positivitat a les proves d'ONPG (β -galactosidasa) i de roig de metil¹.

1.1.2 Classificació infraespecífica

Al 1947, Kauffmann va proposar una manera per a diferenciar les soques d'*E. coli* en base a la determinació dels antígens superficials O (somàtics), K (capsulars) i H (flagel·lars). Aquest tipus de classificació serològica va resultar molt útil per als estudis epidemiològics, de resistència i de patogènesis en *E. coli*. Es coneixen més de 176 serogrupos O, 80 de la classe K i 56 de l'H. La combinació dels diferents serogrupos origina els serotipus (O:H:K). Si bé hi ha una àmplia varietat d'aquests serotipus entre les soques comensals, hi ha una predominança de certs antígens entre les soques responsables d'infeccions ExPEC. Addicionalment, als antígens convencionals, Orskov en 1983, va introduir una nova classificació basada en l'esquema serològic dels antígens fimbrials (antígens F), que va denominar des de F1 a F13, encara que aquella nova classificació no ha estat àmpliament utilitzada²⁻⁵.

Encara que *E. coli* aparegui com a una espècie molt homogènia metabòlicament i fisiològicament, pot subdividir-se d'acord a criteris genètics. Per exemple, Goulet i Picard al 1989 utilitzant les soques de referència d'Ochman i Selander (1984) i basant-se en el polimorfisme electroforètic de les esterases i altres enzims van trobar que aquestes soques de referència estaven formades per sis grups filogenètics als quals van anomenar A, B1, B2, C, D i E. Posteriorment, Herzer *et al.*, al 1990, van definir quatre grups filogenètics majors (A, B1, B2 i D).

Taula 1. Característiques bioquímiques d'*E. coli* i altres membres de la família *Enterobacteriaceae*. Adaptada de Farmer *et al.*, 2007⁶.

Prova bioquímica	Reaccions bioquímiques positives (%)				
	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>S. enterica</i>	<i>S. dysenteriae</i>
Producció de sulfur d'hidrogen (TSI*)	1	0	98	95	0
Producció d'Indol	98	0	2	1	45
Prova de citrat (Simmons)	1	98	65	95	0
Prova de roig de metil	99	10	97	100	99
Prova de Voges-Proskauer	0	98	50	0	0
Prova DNAsa (25°C)	0	0	50	2	0
Prova d'ONPG*	95	99	0	2	30
Prova d'oxidasa	0	0	0	0	0
Fermentació adonitol	5	90	0	0	0
Fermentació celobiosa	2	98	1	5	0
Fermentació D-arabitol	5	98	0	0	0
Fermentació de lactosa	95	98	2	1	0
Fermentació de sucrosa	50	99	15	1	0
Fermentació D-glucosa	100	100	100	100	100
Fermentació D-glucosa (gas)	95	97	96	96	0
Fermentació D-manitol	98	99	0	100	0
Fermentació D-manosa	98	99	0	100	100
Fermentació D-sorbitol	94	99	0	95	30
Fermentació ducitol	60	30	0	96	5
Fermentació D-xilosa	95	99	98	97	4
Fermentació eritritol	0	0	0	0	0
Fermentació glicerol	75	97	70	5	10
Fermentació L-arabinosa	99	99	0	92	45
Fermentació L-ramnosa	80	99	1	95	30
Fermentació maltosa	95	98	0	97	15
Fermentació melibiosa	75	99	0	95	0
Fermentació mucato	95	90	0	90	0
Fermentació rafinosa	50	99	1	2	0
Fermentació salicina	40	99	0	0	0
Fermentació trehalose	98	99	98	99	90
Fermentació α -Metil-D-glucòsid	0	90	0	2	0
Fermentació inositol	1	95	0	35	0
Hidrolisi de tirosina	0	0	99	0	0
Hidrolisi de gelatina (22°C)	0	0	90	0	0
Hidròlisi d'esculina	35	99	0	5	0
Hidròlisi d'urea	1	95	98	1	0
Arginina decarboxilasa	17	0	0	70	2
Lisina decarboxilasa	90	98	0	98	0
Fenilalanina deaminasa	0	0	98	0	0
Ornitina decarboxilasa	65	0	99	97	0
Creixement en KCN*	3	98	98	0	0
Lipasa	0	0	92	0	0
Movilitat (35°C)	95	0	95	95	0
Nitrat \rightarrow nitrit	100	99	95	100	99
Utilització acetat	90	75	20	90	0
Utilització de malonat	0	93	2	0	0

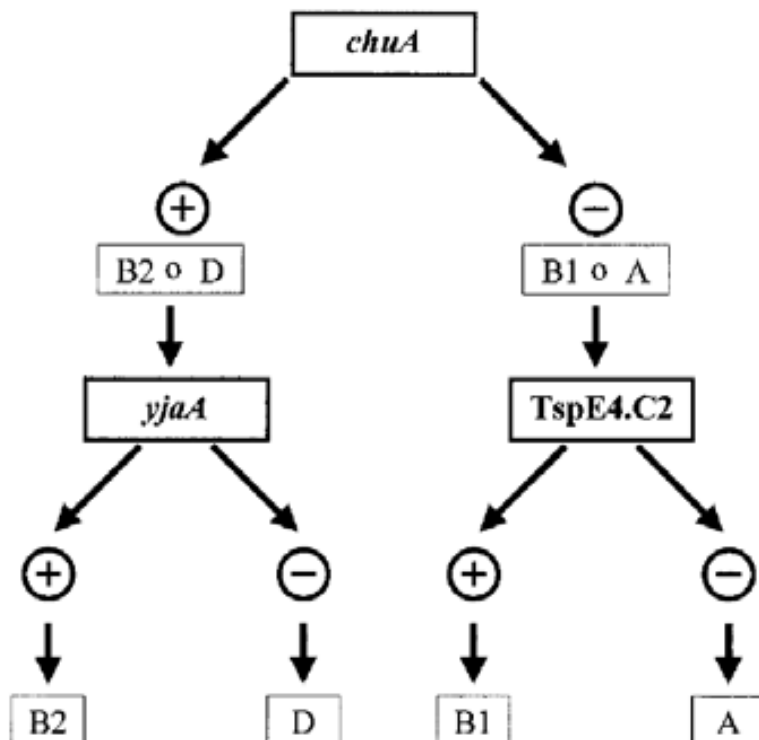
* Abreviacions: Agar ferro triple sucre (TSI, *triple sugar iron agar*), ONPG: o-Nitrofenil- β -D-galactopiranoside, KCN: cianur de potassi.

** Resultat de reaccions després de dos dies d'incubació a 36°C, a no ser que s'indiqui una altra T^º diferent. La gran majoria de les reaccions positives van ocórrer a les 24h.

Herzer *et al.*, van desenvolupar al 1990 un sistema de classificació mitjançant l'estudi dels diversos enzims determinats per electroforesi (MLEE, *Multilocus enzyme electroforesis*). És a dir, basat en l'anàlisi dels patrons de mobilitat electroforètica de 38 enzims metabòlics d'una col·lecció de 72 soques de referència d'*E. coli* de diversos orígens (Ochman i Selander, 1984). Les anàlisis per MLEE d'aquesta col·lecció van revelar quatre grups filogenètics (GF) principals, designats com A, B1, B2 i D.

Estudis de biblioteques genòmiques realitzats en soques pertanyents als diferents GF van posar en evidència gens o fragments de DNA específics de cada grup, suggerint així el seu ús com a marcadors moleculars de cada un dels GF existents. Utilitzant com a base aquests estudis, l'any 2000 Clermont *et al.*, van desenvolupar una tècnica senzilla de detecció subrogada dels grups filogenètics d'*E. coli*, triant com a marcadors filogenètics específics els gens: *chuA* (necessari per al transport del grup hemo en *E. coli* O157:H7 enterohemorràgica), *yjaA* (identificat en el genoma d'*E. coli* K-12, amb funció desconeguda) i un fragment de DNA amb funció desconeguda, anomenat TSPE4.C2. La figura 1 presenta la relació dicotòmica que s'utilitza per distingir els quatre grups filogenètics a partir de la identificació de les regions gèniques esmentades, mitjançant amplificació de DNA per reacció en cadena de la DNA polimerasa (PCR)⁷.

Figura 1. Arbre de decisió dicotòmica per a la determinació del grup filogenètic en soques d'*E. coli* mitjançant l'ús dels resultats de l'amplificació per PCR. Presa de Clermont *et al.*, 2000⁷.



La relació que tenen els factors de virulència amb el grup filogenètic es pot analitzar més detalladament a través d'estudis de diversitat genòmica, mitjançant la utilització de noves metodologies de genòmica com ho és la tipificació mitjançant seqüenciació múltiple de locus o MLST (*Multilocus sequence typing*) que donen un major suport en la discriminació dels diferents patotipus d'*E. coli*. Aquesta tècnica introduïda per Maide *et al.*, 1998, actualment és el sistema amb major acceptació per a l'anàlisi de soques, sent el patró d'or estàndard per la seva senzillesa i comparabilitat mundial.

1.1.3 *E. coli* com a bacteri comensal

Les soques d'*E. coli* comensals constitueixen gran part de la microbiota facultativa de l'intestí dels humans sans, mamífers i aus. Són soques perfectament adaptades a la coexistència amb el seu hoste, confereixen beneficis a l'hoste (p. ex., processar nutrients, generació de senyals per al creixement, regulació immune i protecció contra la colonització per microorganismes patògens). S'ha assenyalat que els grups filogenètics A i B1, són els predominants en la flora intestinal normal. Aquests grups es caracteritzen per no tenir molts dels determinants de virulència que estan presents en les soques patògenes que els permeten causar patologia intra o extraintestinal. No obstant això, fins i tot aquestes soques comensals poden causar infeccions extraintestinals en presència de factors facilitadors com cossos estranys (catèters urinaris), ruptures de la barreres físiques (pell o membranes corporals), immunodepressió d'hoste (anomalies anatòmiques i funcionals de les vies urinàries/biliars o immunodepressió sistèmica, per exemple) o un inòcul bacterià amb elevades concentracions^{2, 5, 8-14}.

D'altra banda diversos autors han proposat que molts dels factors considerats com responsables de les infeccions extraintestinals (adhesines, quelants, etc) són elements que faciliten la colonització i persistència al budell de les soques del filogrup B2.

1.2 Infeccions causades per *Escherichia coli*

Abans de descriure les característiques patogèniques de les soques d'*E. coli* capaces de produir processos infecciosos, fem una breu revisió dels aspectes clínics i conceptuals d'aquestes infeccions.

1.2.1 Infeccions urinàries

1.2.1.1 Concepte i generalitats

Les infeccions urinàries (IU) es defineixen com aquelles infeccions que afecten qualsevol lloc de l'aparell urinari (bufeta, urèters o ronyó) produïdes per via ascendent. Les IU es caracteritzen per la presència de bacteris en l'orina (bacteriúria) i de leucòcits (piúria) com a reflex de la resposta inflamatòria. Les infeccions renals adquirides per via hematògena o per contigüitat no entren en el concepte clàssic d'infecció urinària.

Les IU es consideren no complicades quan es donen en una persona sense alteracions fisiològiques o anatòmiques de l'aparell urinari. Per contra, quan apareixen en el context d'un pacient amb un factor predisposant ja sigui local o general, es consideren complicades.

Les IU poden reaparèixer després d'un primer episodi, anomenant-se IU recurrents que es diferencien en recidives i reinfeccions. Les recidives són degudes a la persistència de la soca original en el focus d'infecció, bé per un tractament antibiòtic inadequat, o bé per l'existència d'una anormalitat genitourinària o pel acantonament dels bacteris en un lloc inaccessible per a l'antibiòtic, com ara la pròstata. Solen presentar-se en les primeres setmanes després de l'aparent curació de la IU i representen el 20% de les recurrències. Per la seva banda, les reinfeccions són causades per una soca diferent de la que va produir la infecció prèvia. És així com aproximadament un 20% de les dones joves amb activitat sexual que presenten un primer episodi de cistitis pateixen reinfeccions sense tenir una anomalia de les vies urinàries¹⁵.

La bacteriúria asimptomàtica es defineix com la presència de bacteris en dues mostres d'orina amb absència de simptomatologia clínica; aquesta situació és freqüent en la gent gran i en els pacients sondats. En aquests pacients la seva presència no sol provocar complicacions (sèpsia urinària o altres). No obstant això, pot causar-les en nens amb reflux vesicoureteral, en embarassades, en malalts sotmesos a manipulació de la via urinària, en els trasplantats renals i també en alguns pacients diabètics o immunodeprimits¹.

1.2.1.2 Topografia i clínica de la infecció urinària

Les IU segons la seva localització es classifiquen en dues categories generals: i) infeccions baixes, que afecten la bufeta urinària (cistitis) i ii) infeccions altes, localitzades en els urèters i ronyó (pielonefritis).

i) Cistitis

Les infeccions baixes de l'aparell urinari que afecten la bufeta s'anomenen cistitis. Per regla general constitueixen una inflamació superficial de la paret vesical, caracteritzada per l'aparició d'un infiltrat inflamatori, edema i hiperèmia de la mucosa. Si la infecció progressa, poden aparèixer hemorràgies focals o difuses i exsudat purulent. Aquestes infeccions donen lloc a la síndrome miccional caracteritzada per micció dolorosa i freqüent (disúria i pol·laciúria) amb sensació contínua de necessitat d'orinar (tenesme). Algunes vegades acompanyada de dolor suprapúbic i normalment és un quadre afebril amb escassa repercussió general. L'orina és tèrbola i pudent, a causa de la piúria, bacteriúria i freqüentment microhematúria. Les IU baixes en general es resolen en un període mitjà de 3,46 dies (σ : 2.59)¹⁵⁻¹⁷.

ii) Pielonefritis

Les infeccions que afecten la part alta de l'aparell urinari, com ara urèters, pelvis o parènquima renal s'anomenen pielonefritis. En aquesta patologia s'observa un infiltrat inflamatori amb predomini de leucòcits polimorfonuclears neutròfils (PMN), generalment localitzat en un lòbul renal, d'aspecte triangular amb la base dirigida cap a fora. Si existeix obstrucció uretral, pot afectar tot el ronyó i en pocs dies, l'acció conjunta d'infecció i hidronefrosi pot originar una lesió irreversible del parènquima renal. Aquestes infeccions es produeixen per l'ascens dels microorganismes des de la bufeta fins a la pelvis renal a través dels urèters, des d'on arriben al ronyó, que causa la infecció de la medul·la i de les papil·les renals; les quals resulten particularment sensibles a aquestes infeccions a causa del seu pH àcid, elevada osmolaritat i escassa perfusió sanguínia. Aquest procés es produeix en un terç dels pacients amb cistitis^{15, 17, 18}.

Els pacients amb pielonefritis evidencien símptomes típics de cistitis als quals es suma febre superior a 38,3 °C, nàusees, vòmits, dolor a la palpació de la fossa lumbar o puny-percussió positiva. Aquestes infeccions solen cursar amb leucocitosi i desviació a

l'esquerra. En un 20 a 30% d'aquests pacients es produeixen bacterièmia i una tercera part d'ells evolucionen a xoc sèptic^{15, 18}.

1.2.1.3 Etiologia

La invasió de l'aparell urinari sense patologia predisposada està restringida a un grup de microorganismes anomenats uropatògens. Aquests són capaços, mitjançant l'expressió de factors de virulència, de sobrepassar les barreres i minimitzar els mecanismes de defensa de l'hoste.

Les IU no complicades són generalment infeccions monomicrobianes, causades en la seva majoria per bacteris gramnegatius uropatògens de la microbiota aeròbia i anaeròbia facultativa del tub digestiu. Ascendeixen per la uretra fins a aconseguir arribar a la bufeta urinària i en alguns casos poden afectar urèters i ronyons¹⁹.

En pacients ambulatoris *Escherichia coli* causa al voltant del 80% de les infeccions agudes de l'aparell urinari (tant cistitis com pielonefritis)¹⁸⁻²⁰. A la taula 2, es mostren els resultats de set estudis nacionals i multinacionals referents a l'etiologia de les infeccions urinàries baixes (cistitis) en el medi ambulatori (comunitari), en els quals hi ha petites variacions percentuals, que corresponen bàsicament a la població mostral. En aquestes infeccions, els bacils gramnegatius representen entre el 62,6 i el 91,8% del total de microorganismes aïllats en els diferents contextos mostrats. L'*E. coli* és el bacteri detectat amb major freqüència (53,3-79,2%) seguit per les espècies del gènere *Proteus* entre les quals destaca *Proteus mirabilis* (2,0-9,3%), del gènere *Klebsiella* (0,2-6,8%, principalment *K. pneumoniae*: 2,3-6,3%), *Pseudomonas aeruginosa* (0,8-5,1%), espècies d'*Enterobacter* (0,1-1,8%), *Morganella morganii* (0,7-1,3%) i finalment espècies de *Citrobacter* (0,1-1,1%)^{19, 21-26}.

De la mateixa manera, els cocs grampositius són menys freqüents en les IU comunitàries (2,5-13,6%). Però tot i així, destaca el gènere *Enterococcus* (0,5-5,5%, principalment *E. faecalis*: 2,5-7,3%), *Staphylococcus saprophyticus* (0,7-4,4%), *Streptococcus agalactiae* (0,5-2,8%), altres estafilococs plasmocoagulasa negativa (0,4-0,8%) o *Corynebacterium urealyticum* (0,4%)^{19, 21-26}.

L'espècie micòtica més destacada és *Candida albicans*, amb una prevalença del 2,2%, seguida de *C. glabrata* (0,4%), *C. parapsilosis* (0,3%) i *C. tropicalis* (0,1%). Tot i que en

aquests estudis només es disposen de percentatges del *Estudio de prevalencia de las infecciones nosocomiales en España* (EPINE 2011), que correspon a les dades de les IU comunitàries de pacients que finalment acaben ingressant a l'hospital i que segurament són compatibles amb històries clíniques de pacients portadors de sonda urinària o altres factors predisposants locals²¹.

Taula 2. Principals microorganismes aïllats de cistitis adquirides en la comunitat, en diferents estudis nacionals i multinacionals. Taula adaptada d'EPINE 2011²¹, Palou *et al.*, 2011²², Foxman 2010¹⁹, Andreu *et al.*, 2008²³ i 2005²⁵, Vallano *et al.*, 2006²⁴ i Kahlmeter 2003²⁶.

Microorganisme	Aïllaments microbiològics segons cada estudi (%)						
	EPINE (2011) ²¹	Palou (2011) ²²	Foxman (2010) ¹⁹	Andreu (2008) ²³	Vallano (2006) ²⁴	Andreu (2005) ²⁵	Kahlmeter (2003) ²⁶
Bacils gramnegatius	78,7	85,8	84,1	89,9	88,1	91,8	62,6
<i>Escherichia coli</i>	56,6	79,2	74,2	70,8	74,6	73	53,3
<i>Klebsiella</i> spp.	0,2	-	-	6,8	-	1,2	2,2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6,3	2,3	6,2	-	4,2	5,4	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0,8	-	0,9	-	-	-	-
<i>Proteus</i> spp.	0,3	-	-	0,2	-	0,2	-
<i>Proteus mirabilis</i>	4,4	4,3	2,0	6,4	9,3	7,2	4,4
<i>Proteus vulgaris</i>	0,2	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter</i> spp.	0,1	-	-	1,8	-	0,9	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	1,3	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5,1	-	0,8	1,4	-	1,3	-
<i>Morganella morganii</i>	1,3	-	-	0,8	-	0,7	-
<i>Providencia stuartii</i>	0,6	-	-	-	-	0,1	-
<i>Citrobacter</i> spp.	0,1	-	-	1,1	-	1,1	-
<i>Citrobacter freundii</i>	0,6	-	-	-	-	-	-
<i>Citrobacter koseri</i>	0,3	-	-	-	-	-	-
<i>Serratia</i> spp.	0,3	-	-	0,2	-	0,5	-
<i>Serratia marcescens</i>	0,2	-	-	0,2	-	-	-
Otras Enterobacteriaceae	-	-	-	-	-	-	2,7
Otros bacilos gramnegativos	-	-	-	0,2	-	0,2	-
Cocs grampositius	13,6	7,6	10,4	10,4	5	8,34	2,5
<i>Enterococcus</i> spp.	0,5	-	5,3	5,5	-	4,8	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	7,3	3,2	-	-	2,5	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	1,4	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,2	-	-	0,6	-	0,6	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,8	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	-	4,4	1,4	1,1	2,5	0,7	2,5
<i>Staphylococcus plasmocoagulasa negativa</i>	0,6	-	-	0,4	-	0,4	-
Otros Staphylococcus	0,4	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus</i> spp.	0,3	-	-	0,3	-	0,1	-
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0,5	-	2,8	2,5	-	1,7	-
<i>Streptococcus viridans</i>	0,1	-	0,9	-	-	-	-
<i>Corynebacterium</i> spp.	0,1	-	-	-	-	0,04	-
<i>Corynebacterium urealyticum</i>	0,4	-	-	-	-	-	-
Llevats	3,4	-	-	-	-	-	-
<i>Candida</i> spp.	0,4	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	2,2	-	-	-	-	-	-
<i>Candida glabrata</i>	0,4	-	-	-	-	-	-
<i>Candida parapsilosis</i>	0,3	-	-	-	-	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	0,1	-	-	-	-	-	-
Altres patògens	0,3	-	-	-	-	-	4,1

Addicionalment, hi ha alguns processos en què l'aïllament de microorganismes en l'orina reflecteix infecció renal metastàtica, producte d'una bacterièmia per *S. aureus*, per espècies de *Salmonella* o per *Mycobacterium tuberculosis*. Així mateix, cal destacar l'aïllament d'adenovirus (especialment del tipus 11) i el virus BK causants de cistitis hemorràgica epidèmica, especialment en nens i en pacients hematològics respectivament^{18, 19}.

1.2.1.4 Diagnòstic

Per al diagnòstic de la IU s'ha de tenir en compte la clínica del pacient, els elements formis de l'orina i el seu cultiu. El urocultiu confirma la infecció i permet identificar el microorganisme involucrat. La correcta recollida de l'orina, evitant contaminacions, és fonamental per obtenir resultats fiables.

Com que l'orina sempre arrossega una petita quantitat de microorganismes de la flora normal uretral, des dels anys 50 s'ha postulat que la quantificació dels bacteris en l'orina permetria diferenciar entre contaminació per la pròpia flora uretral (recomptes baixos) i infecció urinària (recomptes elevats). Per aquest motiu l'any 1956, Kass va definir el recompte de 10^5 unitats formadores de colònies (UFC) per ml d'orina; com a criteri de bacteriúria significativa (indicadora d'IU veritable). Aquest criteri va ser establert comparant el nombre de bacteris per ml d'orina en mostres obtingudes per punció suprapúbica i raig mitjà en dones amb pielonefritis simptomàtica^{20, 27}.

Els postulats de Kass, vigents durant gairebé quatre dècades, van ser revisats al 1992 per un comitè d'experts de la Societat Americana de Malalties Infeccioses, ja que en moltes ocasions els recomptes per sota dels indicats responien a una autèntica IU. D'aquesta manera, els valors de recomptes necessaris per considerar infecció van baixar a 10^2 UFC/ml en els casos de cistitis simple o recurrent, sempre i quan s'acompanyin de manifestacions clíniques, i a 10^3 UFC/ml quan hi hagi clínica de pielonefritis; mantenint la significació de 10^5 UFC/ml per les bacteriúries asimptomàtiques (taula 3).

En efecte, en certes circumstàncies com en la síndrome uretral aguda, així com en pacients portadors de sonda permanent pot existir una veritable IU amb recomptes bacterians inferiors a 10^5 UFC/ml. D'altra banda, la presència de bacteriúria de qualsevol grau en els aspirats suprapúbics o aïllaments de 10^2 UFC/ml en orina obtinguda mitjançant sondatge, són indicadors d'infecció.

Aquestes conclusions repercuteixen tant en els microbiòlegs, que han d'informar sempre el microorganisme aïllat i el nombre d'UFC/ml (per sota de 10^5), com en els clínics, obligats a considerar els recomptes en funció de la informació disponible restant, representada pels signes o símptomes i les exploracions complementàries, i en situacions més complexes ser capaços d'avaluar les infeccions per microorganismes especials o que habitualment cursen amb recomptes baixos^{17, 20}.

Taula 3. Interpretació microbiològica del urocultiu i conducta recomanada. Adaptada de Prats 2008²⁸, Andreu *et al.*, 2010¹⁷ i Sobel i Kaye 2010²⁹.

Mètode de recolecció	Urocultiu		Interpretació o conducta recomanable
	Recompte de colònies	Microorganisme(s) aïllat(s)	
Micció espontània			
Orina contaminada*	≥ 10.000 UFC/ml	≥ 1 microorganisme	No significatiu. Cultiu mixte. Sol·licitar nova mostra
Orina no contaminada			
Amb piúria	≥ 100 UFC/ml	≤ 2 microorganismes	Identificació i estudi de susceptibilitat
	≥ 1.000 UFC/ml	≥ 3 microorganismes	Cultiu mixte. Sol·licitar nova mostra o descartar factors predisponents (sonda, litiasi i altres)
Sense piúria	0 UFC/ml	-	Urocultiu negatiu
	≥ 10.000 UFC/ml	1 microorganisme	Possible bacteriúria asimptomàtica. Possible contaminació*. Sol·licitar nova mostra
		≥ 2 microorganismes	Possible contaminació*. Sol·licitar nova mostra o bé descartar factors predisponents
	≤ 1.000 UFC/ml	≥ 1 microorganisme	Possible contaminació*
Sonda permanent			
Amb piúria	Qualsevol resultat	≥ 1 microorganisme	Identificació i estudi de susceptibilitat
Sense piúria	Qualsevol resultat	≥ 1 microorganisme	Bacteriúria asimptomàtica
Punció suprapúbica**	Qualsevol resultat	Qualsevol microorganisme	Identificació i estudi de susceptibilitat

* La contaminació en la dona es detecta per la presència de cèl·lules d'origen vaginal en el sediment, que no s'observen en una mostra correctament recollida. En l'home aquesta valoració és més difícil. En un pacient sense infecció urinària, encara que l'orina estigui ben recollida, si es conserva a T° ambient durant més d'una hora es produeix multiplicació escassos bacteris contaminants detectant-se una falsa bacteriúria sense piúria.

** En les mostres recollides per punció suprapúbica i processades de manera immediata, el resultat ha de considerar-se definitiu i per tant constitueix el mètode de referència.

No obstant això, els símptomes urinaris i la bacteriúria freqüentment ocorren independentment l'un de l'altre. Així, al voltant del 20% de les dones amb símptomes d'IU clàssica presenten urocultius negatius. En altres casos es pot recuperar a l'orina un nombre no menyspreable de bacteris en pacients simptomàtics, els quals si no estan en un grup de risc (embaràs o sondatge) no requeriran tractament antibiòtic, amb l'objectiu d'evitar efectes adversos com alteracions de la microbiota o selecció de microorganismes resistents¹⁹.

A l'orina de pacients amb IU, a més dels bacteris causants de la infecció (bacteriúria), es troben leucòcits (leucocitúria) com a resposta a la infecció, fet pel qual, generalment el seu aspecte és tèrbol. Al laboratori es pot fer un recompte precís de leucòcits en una càmera de Neubauer o un recompte aproximat, en un examen del sediment d'orina. Amb la primera tècnica, el 95% de les pacients amb cistitis tenen més de 10 leucòcits/ml d'orina. Per la seva part, l'examen de sediment és una prova menys precisa, però més fàcil de

realitzar i permet constatar la IU, visualitzant la presència de bacteriúria i leucocitúria. Es consideren patològics els recomptes superiors a cinc leucòcits per camp en orina centrifugada i examinada amb microscopi de 40 augments. Així, la piúria constitueix un criteri addicional d'IU^{15, 17-19}.

Segons alguns algorismes per al diagnòstic de la IU, si es combina la simptomatologia amb el resultat de la tira reactiva d'uroanàlisi, es poden obtenir sensibilitats que oscil·len entre 65-82%, amb especificitat entre 53-95%. Per la seva banda, si s'addiciona a un cultiu d'orina de $\geq 10^2$ UFC/ml la simptomatologia i la determinació de leucòcits i nitrats en orina s'obté una sensibilitat de 80,3% i especificitat de 53,7%¹⁹.

1.2.1.5 Epidemiologia

La IU constitueix un dels processos més comuns en patologia infecciosa, el que la converteix en un seriós problema de salut pública que causa anualment als Estats Units més de 8 milions de visites mèdiques, 1,5 milions de consultes per urgència i 300.000 hospitalitzacions¹⁶. Les IU en qualsevol comunitat solen ocupar el segon lloc després de les respiratòries, amb un cost anual directe i indirecte als EUA durant 1995 d'1.6 mil milions de dòlars (equivalent a 2,3 mil milions de dòlars al 2010, ajustada per inflació). Addicionalment, l'any 2000 les IU nosocomials van incrementar una mitjana de 676 dòlars les factures hospitalàries (equivalent a 842 de dòlars al 2010) i la necessitat d'un dia extra d'hospitalització per pacient (prop d'1 milió d'hospitalitzacions diàries més cada any)^{19, 21}.

De la mateixa manera, la IU també és una de les entitats infeccioses més freqüents en el nostre medi. Així, segons EPINE 2011, les IU d'origen comunitari solen representar el 45,3%, mentre que el 20,6% el van ocupar les IU d'origen nosocomial. Aquestes últimes dins de les diferents àrees assistencials (medicina, cirurgia, atenció intensiva, ginecologia/obstetrícia, pediatria o altres serveis)²¹.

Hi ha un patró de prevalença característic i definit relacionat amb les diferents etapes de la vida dels éssers humans. Segons dades d'EPINE 2011, l'anàlisi de la distribució per edats va demostrar que és poc freqüent durant la infància (0-9 anys), amb una prevalença de 0,5% i que va en augment progressiu en cada dècada de la vida de la manera següent: 10-19 anys: 0,57%, 20-29 anys: 0,79%, 40-49 anys: 1,15%, 50-59 anys: 1,29%, 60-69 anys: 1,65%, 70-79 anys: 1,93% i majors de 80 anys: 1,87%. En aquests últims tres grups les IU són més freqüents per l'existència de diverses alteracions anatòmiques i funcionals.

L'única excepció a aquest augment significatiu es va observar en la dècada dels 30 anys, amb un petit descens de 0,54%, respecte a la dècada anterior²¹.

A més de l'edat, hi ha altres circumstàncies que influeixen en l'epidemiologia de la IU, com a determinades malalties, l'estada hospitalària, els cateterismes, o bé altres tipus d'instrumentació de l'aparell genitourinari¹⁵⁻¹⁷. Per exemple, segons dades comunicades per EPINE 2011, el fet de tenir una sonda representa un factor de risc del 3,84% i 15,51%, depenent si la sonda urinària és oberta o tancada respectivament²¹.

The National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) al 2009 va comunicar una incidència anual estimada d'IU a EUA per a les dones del 12,6%, un 20% d'aquestes eren en dones joves amb un rang d'edat entre 15-29 anys¹⁹. Sobretot, si és sexualment activa (amb una incidència entre 0,5-0,7 episodis per any), porta dispositius intrauterins o està embarassada. A Espanya, s'estima un mínim de 3.819.100 episodis anuals en dones d'edats compreses entre els 20 i 44 anys i entre 10-15% en dones entre els 65 i 70 anys. Encara que aquesta xifra augmenta fins al 15-20% en dones majors de 80 anys, al 30-40% en ancianes hospitalitzades o ingressades en institucions geriàtriques i pràcticament al 100% de portadores de sonda urinària permanent¹⁷.

A l'home adult les IU són menys freqüents, estimant-se una incidència anual de 5-8 episodis per cada 10.000 homes de menys de 65 anys. Encara que els nens i els homes poden presentar espontàniament una IU (sobretot en homosexuals, pacients infectats per VIH i en no circumcidats), gairebé sempre es relacionen amb una anomalia urològica o amb una prostatitis crònica subjacent. A partir dels 50 anys, la prevalença augmenta progressivament en relació amb les obstruccions de pròstata i la possible instrumentació urològica¹⁵⁻¹⁸.

1.2.1.6 Mecanismes de defensa de l'hoste

L'organisme humà posseeix un conjunt de defenses antiinfeccioses. Algunes dirigides de manera inespecífica i innata davant gran nombre de microorganismes que són detectats per posseir estructures pròpies del món microbià. I altres, dirigides específicament a microorganismes detectats a través dels seus antígens, que constitueixen la resposta immunitària. En aquest aspecte la immunitat innata proporciona una primera línia de defensa, en la qual les barreres mecàniques, el flux ininterromput d'orina, la presència de

substàncies bactericides o la fagocitosi tenen un paper important que contraresten l'acció patògena³⁰.

i) Barreres cutànies i mucoses de les vies urinàries

Perquè una soca d'*E. coli* produeixi IU, ha de guanyar prèviament la batalla als mecanismes defensius de l'hoste. És així com, en la dona el pH àcid (4,8 aproximadament) de la vagina, determinat per la microbiota normal, composta principalment per diverses espècies de *Lactobacillus*, protegeixen la vagina i el introit vaginal davant la colonització per uropatògens. A més, aquest *Lactobacillus* bloquegen els seus receptors i interfereixen en la seva adherència a l'epiteli, que sol ser la primera condició per a la colonització uretral i l'ascens posterior del bacteri. Aquesta ascensió en la dona, és facilitada per la curtedat de la uretra. Per la seva part, en els homes, la major longitud de la uretra impedeix el pas de potencials patògens a la bufeta urinària^{15, 17, 18, 20, 30, 31}.

En circumstàncies normals, els bacteris que han pogut ascendir a la bufeta s'eliminen amb rapidesa. En part pels efectes de dilució i d'arrossegament durant la micció que impedeix que gèrmens amb escassa afinitat per l'uroteli el colonitzin. Normalment, la vàlvula vesicoureteral prevé el reflux de l'orina de la bufeta cap a sectors més elevats. És per això que alteracions funcionals o anatòmiques d'aquesta vàlvula determinen un major risc, que s'observa especialment a la infància^{20, 30}.

En un altre sentit l'apoptosi a la mucosa vaginal i uretral generen l'exfoliació natural de les cèl·lules, gràcies als nivells de producció d'estrògens i progesterona. Aquesta exfoliació comporta l'eliminació de possibles microorganismes adherits a la seva paret. L'epiteli de la bufeta és normalment inactiu en les persones sanes, i aquestes cèl·lules són renovades cada pocs mesos. Al model murí per exemple, només unes hores després de la inoculació, aquest comportament típic es veu ràpidament alterat (figura 2). Així mateix, la mucosa intacta és també una barrera efectiva enfront de la colonització. Per això, alguns bacteris com *Staphylococcus saprophyticus* requereixen la presència de fibres de col·lagen que s'exposen a la superfície, després de microtraumatismes, cosa que explicaria la presència d'aquest agent a IU en dones amb vida sexual activa^{30, 32}.

Figura 2. Microscòpia electrònica de rastreig del procés d'exfoliació i regeneració de l'epiteli de la bufeta al model murí d'infecció urinària. Adaptada de Kau *et al.*, 2005³².



Per la seva part, els urèters impedeixen la colonització de bacteris gràcies al seu peristaltisme, que impulsa el flux d'orina des del ronyó a la bufeta. Així mateix, en el ronyó, l'escorça renal és molt més resistent a la infecció que la zona medul·lar, gràcies a les condicions d'osmolaritat, concentració d'amoni i flux sanguini. En canvi, la medul·la renal és més susceptible per l'alta concentració d'urea que inactiva el complement. Així mateix, hi ha una osmolaritat elevada, pH baix i manca de flux sanguini²⁹.

ii) Molècules amb activitat antimicrobiana

Si els processos defensius de les barreres cutànies i mucoses són incapaços de neutralitzar i eliminar el microorganisme, aquest aconsegueix mantenir-se i multiplicar-se en el teixit. Però l'hoste disposa d'altres opcions per a limitar la infecció mitjançant la generació i excreció de molècules amb activitat antimicrobiana, amb l'objectiu de contrarestar la invasió uropatògena.

La microbiota composta principalment per lactobacils, inhibeixen la multiplicació de potencials uropatògens en la vagina, gràcies a la producció i excreció de H₂O₂, àcid làctic i bacteriocines. És important precisar que aquesta producció pot variar a causa de la concentració i espècies de lactobacils pròpies de cada dona. Així mateix, en l'home, la presència d'una sal de zinc amb activitat antibacteriana, secretada per la pròstata, evita l'ascens espontani de microorganismes a través de la uretra^{15, 17, 18, 20, 31}.

Per la seva part, les propietats antibacterianes de l'orina: elevada osmolaritat, contingut d'urea, concentració d'àcids grassos, pH àcid o la presència de pèptids antimicrobians, que actuen de manera immediata davant dels microorganismes. Són fonamentals per a la inhibició del creixement bacterià^{18, 33}. Una altra característica de les mucoses urogenitals és la segregació d'una mucina que recobreix la bufeta i que hi prevé l'adherència dels

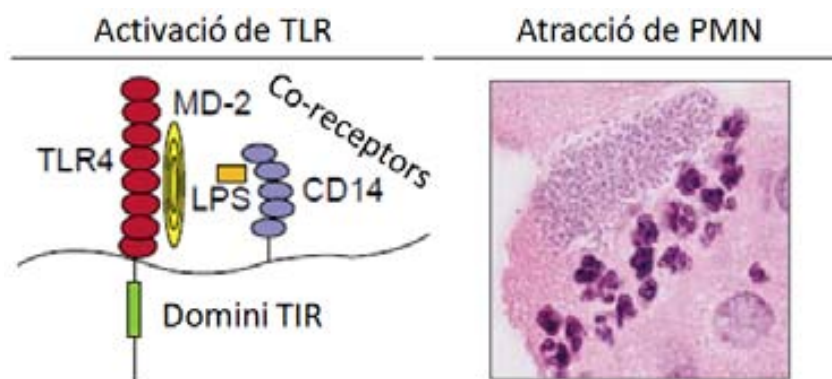
bacteris, i de la proteïna de *Tamm Horsfal*, present en l'orina, que és una glicoproteïna polimèrica produïda en la branca ascendent de la nansa de Henle en el teixit renal i que conté nombrosos residus de manosa, que s'uneixen i inhibeixen competitivament l'adherència per mitjà dels pilis manosa sensibles^{18, 20, 29, 30, 34}.

A més, en les mucoses i en l'orina, hi ha substàncies antimicrobianes com ara pèptids antibacterians, enzims, oligopèptids i lípids bioactius, molècules d'oxigen reactiu i nitrogen^{30, 33}.

Els macròfags i polinuclears interactuen amb el patogen invasor a través de molècules de reconeixement d'estructures bacterianes (*Pattern recognition receptors*, PRR), les quals s'uneixen als microbis per a facilitar el seu reconeixement. Aquestes PRR són de dos tipus:

i) Les PRR cel·lulars presents en els macròfags, neutròfils i cèl·lules endotelials. Es troben situades a la superfície de la membrana cel·lular, però també a l'interior de les membranes del reticle endoplàsmic i dels vacúols en el propi citoplasma. Pertanyen a aquest primer grup: receptors tipus toll (*Toll-like receptors*, TLR1-TLR9^a, especialment el TLR4 és essencial en la defensa enfront de la infecció per uropatògens gramnegatius amb l'ajuda de CD14 i MD2 per a reconèixer el LPS), lectines tipus C (receptors per a manosa), receptors *scavenger* (SR-A i CD36), receptors tipus NLR (NOD 1, NOD 2, i NALP), i receptors N-formil-met-leu-fenilalanina (FRP i FRPL1). Quan els microorganismes s'uneixen a aquestes PRR cel·lulars indueixen, entre altres accions efectores, la producció i alliberament de substàncies proinflamatòries amb caràcter vasodilatador (IL-6 i IL-8), augmentant la permeabilitat capil·lar, que permet concentrar gran quantitat de substàncies i promoure l'atracció de PMN i macròfags (figura 3)^{31, 32, 35}.

Figura 3. Representació esquemàtica de l'activació de TLR i l'atracció de PMN. Adaptada de Kau *et al.*, 2005³².

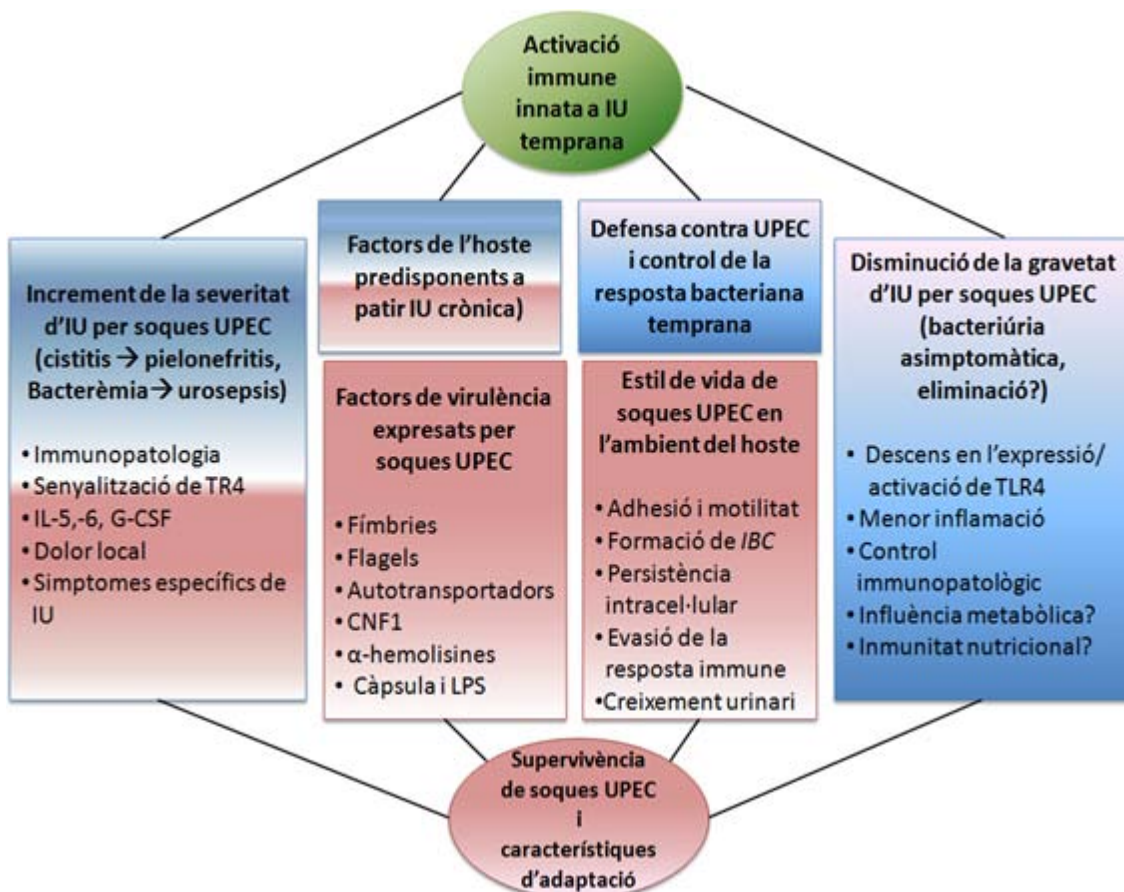


ii) En el segon grup es troben les PRR extracel·lulars les quals circulen en el plasma i l'espai intersticial dels teixits; entre aquestes destaquen les pentraxines (proteïna C reactiva, amiloide sèrica (SAP), pentraxina 3 (PTX3)), les colectines (lectines: proteïna fixadora de manosa, proteïnes surfactants pulmonars A i D o les ficolines), la proteïna fixadora de lipopolisacàrid (LPS), el sistema del complement i els anticossos naturals (IgM)^{16, 17, 30, 36}.

iii) Immunitat innata: fagocitosi i producció de citocines

Els macròfags dels teixits (histiòcits) formen una de les primeres línies de defensa en el sistema urinari i ofereixen resistència contra la infecció per producció de citocines. La producció de TNF- α i IL-1 produeixen vasodilatació local. La citoquina quimiotàctica CXCL8 (IL-8) i el C3a s'alliberen i generen reclutament dels PMN al lloc de la infecció des de la sang, i com a conseqüència es produeix piúria, i es contribueix així a l'eradicació de bacteriúria. L'elaboració d'IL-1 β i IL-6, per la seva acció sistèmica, condueixen a l'elevació de temperatura (febres) i l'activació de la resposta de fase aguda (figura 4)^{29, 31}.

Figura 4. Factors de virulència de soques uropatògenes i la seva resposta innata. Adaptada d'Ulett *et al.*, 2013³⁷.



Per tant, després dels macròfags que actuen com a desencadenants de la inflamació, els PMN proporcionen una defensa davant la IU actuant a través de la fagocitosi; sens dubte és el procés més important de la resposta defensiva innata. Aquestes cèl·lules, són essencials per a l'eliminació dels bacteris de l'aparell urinari.

La producció de citocines és conseqüència del reconeixement dels bacteris pels macròfags, mitjançant el lipopolisacàrid (LPS) i altres macromolècules bacterianes reconegudes per les PRR, però també per les cèl·lules de l'epiteli vascular i les cèl·lules urotelials que expressen TLR4. Les molècules microbianes reconegudes per les PRR s'anomenen col·lectivament PAMP (*Pathogen-associated molecular pattern*)^{16, 29-31, 36}.

iv) Immunitat adquirida: resposta cel·lular i humoral

El paper de la immunitat humoral en la defensa de l'hoste davant les IU, encara que està àmpliament estudiat, és poc conegut. La resposta serològica permet la producció d'immunoglobulines locals com IgA secretora o IgG contra el lípid A. La producció sistemàtica d'anticossos habitualment es correlaciona amb la gravetat de la infecció renal i la progressió cap a la destrucció del parènquima renal. Per exemple, en casos de pielonefritis aguda i prostatitis, es troben anticossos contra els antígens O i ocasionalment K, o en alguns casos també s'han descrit anticossos específics per a les fimbries tipus 1 o P. Tot i això, no s'ha demostrat que els anticossos protegeixin contra les IU, i per aquest motiu és aquesta una de les possibles explicacions dels casos de recurrència^{15, 29}.

1.2.1.7 Factors predisponents de l'hoste

Quan hi ha factors predisponents a l'hoste, les IU solen ser polimicrobianes i recidives. Estan causades per microorganismes resistents a tractaments d'episodis anteriors, i aquests estaran presents mentre persisteixi el factor predisposant. S'ha demostrat que quan hi ha factors predisponents d'IU, són necessaris menys factors de virulència en els microorganismes per produir la mateixa patogenicitat¹⁹.

i) Factors fisiològics

Les IU afecten sobretot les dones, encara que hi ha etapes de major incidència relacionades amb l'activitat sexual i l'edat. Un exemple d'això són els nens nous o joves

amb absència de circumcisió o dones amb depleció estrogènica. També està clarament demostrat que la freqüència d'IU en ambdós sexes augmenta amb l'edat^{15, 19, 21, 29}.

Les principals raons per les quals les IU es solen originar amb més freqüència en dones, és a causa de l'escassa longitud de la uretra (4-6 cm aproximadament), ja que desemboca en l'introït vaginal, colonitzat normalment per flora cutània (difteroides, estreptococs del grup viridans, lactobacils i estafilococs coagulasa negativa); però ocasionalment i de manera transitòria, poden trobar-s'hi un escàs nombre d'*E. coli* o d'altres enterobacteris de major potencial uropatogen^{15, 19, 30}.

Les raons de l'elevada susceptibilitat a les IU de repetició que determinades dones presenten, amb normalitat del sistema urinari, són desconegudes. Els següents caràcters han estat implicats com a factors de risc: major densitat, accessibilitat o distribució de receptors fimbrials a les cèl·lules uroepiteliales. També s'han relacionat amb baixos nivells vaginals d'estrògens, la qual cosa condicionaria una disminució en la concentració vaginal de lactobacils, i com a conseqüència un augment del pH vaginal, que al mateix temps afavoreix la presència d'enterobacteris³⁰.

A aquest fet s'afegeix que aquestes infeccions normalment estiguin relacionades amb el coït, ja que propicia la introducció de bacteris a la bufeta i s'associa de manera temporal al inici de cistitis, per tant, sembla essencial en la patogènia de les IU de les dones joves. Per aquest motiu, la micció després del coït disminueix el risc de cistitis, afavorint l'arrossegament per l'eliminació dels bacteris introduïts durant la relació sexual^{19, 30}.

Adicionalment a aquests fets, alguns autors hi condicionen la pertinença a determinats fenotips de grups sanguinis, com ara els: P1, B, AB i Lewis. Aquest últim en els fenotips no secretors (Le(a+b-)) i recessius (Le(a-b-)); ja que probablement expressen en les cèl·lules epiteliales dos globòsids que actuen com a receptors per a soques uropatògenes d'*E. coli*^{15, 16, 29, 30}.

Una altra condició seria l'híperosmolaritat de la medul·la renal, que implica inhibició de la mobilitat dels granulòcits i conseqüentment disminució de la fagocitosi.

Finalment, durant el període d'embaràs es detecten entre un 2-11% de bacteriúria asimptomàtica, especialment entre un 20-40% d'aquestes acaben patint pielonefritis, si no s'instaura tractament. Entre els canvis que provoca l'embaràs i que influeixen en l'aparició

d'estasi es troba: i) relaxació de la fibra muscular llisa ureteral i vesical, a causa de la gran quantitat de progesterona circulant (efecte hormonal) que comporta a un mal buidament; ii) compressió de les porcions distals dels urèters que provoquen hidronefrosi dreta en el 75% de les embarassades i esquerra en el 30%; iii) expansió de la pelvis i els calzes renals, iv) increment de la capacitat vesical, iv) augment del filtrat glomerular, el que fa que s'incrementi l'aportació d'orina al sistema excretor. Tot això, fa que s'augmenti la freqüència d'infeccions urinàries en gestants^{15, 20, 38, 39}.

ii) Factors patològics locals i generals

Entre els factors patològics generals predisponents es poden trobar: la diabetis mellitus (pacients amb descontrol metabòlic de la glucosúria, afavoreixen el desenvolupament de bacteris), les malalties neurològiques, la cirrosi, la immunodepressió i la neutropènia^{16, 19, 39}.

Els factors locals patològics que predisposen a la infecció són: la litiasi renal, les uropaties obstructives, l'hipertròfia de la pròstata, el cistocele, la bufeta neurògena, el reflux vesicoureteral, les lesions medul·lars, les alteracions congènites de les vies urinàries, la incontinença i les instrumentacions (ús de sondes per al drenatge de la bufeta o portadors de sonda permanent, que representen un 40% de les infeccions nosocomials)^{16, 17}. En resum, l'obstrucció del flux urinari de manera mecànica o funcional; és la condició predisposant més comú en pacients amb IU. La infecció per sonda es produeix a través de tres mecanismes durant la seva inserció, per la via intraluminal o bé per via extraluminal. Si es tracta de la via intraluminal (a través de la llum del catèter) es produeix a través de dos mecanismes: per la ruptura del circuit tancat de la sonda urinària a nivell de les connexions, o bé a través de la contaminació de la bossa de drenatge urinari a nivell de l'orifici de buidatge de l'orina^{15, 17}.

I per últim, si es produeix per via extraluminal (a través de la capa de moc que es diposita al voltant de la sonda al meat urinari) adquireix major importància a partir de la primera setmana de cateterització i és més freqüent en dones, al voltant del 70%, que en homes^{15, 17}.

iii) Altres factors predisponents d'infecció

Addicionalment als factors fisiològics o patològics de l'hoste, s'han de ressaltar altres elements afavoridors d'infecció que predisposen la colonització periuretral, com ara: l'alteració de la microflora vaginal normal pels antibiòtics (pèrdua de lactobacils), infeccions genitals concomitants i utilització d'anticonceptius (diafragma, espermicides o preservatius). D'altra banda, la resistència als antibiòtics d'alguns uropatògens els permeten una ràpida disseminació d'alguns clons epidèmics^{12, 16, 19, 33}.

Així mateix, alguns autors plantegen la possibilitat que les IU estiguin causades per bacteris transmesos mitjançant aigües, aliments, viatgers (gràcies al contacte persona amb persona) o transmissió zoonòtic, i que permeten la colonització entèrica amb posterior selecció antibiòtica davant pressió selectiva. Encara que no es coneix com s'inicia exactament el procés de colonització ni com, posteriorment, tenen la capacitat de transmetre les IU a la comunitat^{16, 5, 12, 40}.

iv) Aspectes específics de les infeccions urinàries en pacients amb factors predisponents d'infecció

Inicialment en aquest tipus d'hostes les IU estan causades per els mateixos bacteris que en les persones sense factors predisponents. Essent *E. coli* el patògen més freqüentment (36%) associat a les infeccions nosocomials segons EPINE 2011. Així com, *Klebsiella pneumoniae* (8,6%), *Proteus mirabilis* (3,7%), *Enterobacter cloacae* (1,5%), *Klebsiella oxytoca* (1,4%), *Enterobacter aerogenes* (1,2%), *Citrobacter freundii* (0,9%), *Morganella morganii* (0,8%), *Serratia marcescens* (0,6%), *Stenotrophomonas maltophilia* (0,6%), i altres enterobacteris multiresistents. També es troben, *Pseudomonas aeruginosa* (8,7%), *Acinetobacter baumannii* (1,3%). I bacteris grampositius com ara *Enterococcus fecalis* (9,1%), *E. faecium* (3,8%), *Staphylococcus epidermidis* (1,2%) o *S. aureus* (0,7%)^{15, 17, 18}.

D'altra banda les espècies de *Proteus*, gràcies a la producció d'ureases que desdoblen la urea present en l'orina en amoni i diòxid de carboni. Determinen l'elevació del pH urinari i per tant alcalinitzen el medi, que dóna com a resultat formació de càlculs per acumulació de sals de fosfat amònic-magnèsic (estruvita) o *Corynebacterium urealyticum* (CDC grup D2) i la formació de fosfat càlcic (apatita). Així mateix, també es pot incloure el cas de *Klebsiella pneumoniae* que s'aïlla amb freqüència en malalts amb litiasi, i persisteix mitjançant la formació de moc extracel·lular i polisacàrids^{15, 17, 18}.

Staphylococcus epidermidis és una causa freqüent d'infeccions de les vies urinàries originades per sondes. De la mateixa manera, els enterococs i *Staphylococcus aureus* causen infeccions en pacients amb nefrolitiasi, que s'han sotmès a instrumentació o cirurgia amb anterioritat. Segons EPINE 2011, és freqüent la colonització per *Candida albicans* (7,2%) i altres espècies micòtiques com *C. glabrata* (1,3%), *C. tropicalis* (1%), *C. parapsilosis* (0,9%) a l'orina de pacients diabètics o portadors de sonda^{39, 41}.

Així mateix a causa del tractament antibiòtic és probable que aquests pacients estiguin colonitzats per microbiota resistent a l'antibiòtic emprat, i per tant es seleccionen progressivament soques i espècies resistents¹⁶. Un reflex d'aquest fet serien les dades publicades en l'estudi ARESC (*Antimicrobial Resistance Epidemiological Survey on Cystitis*)⁴², a càrrec de tres organismes de vigilància internacional durant el període 2003-2006, en poblacions del Nord i Sud Amèrica i Europa; amb la finalitat de determinar la prevalença i susceptibilitat de patògens causants de cistitis. I un segon estudi espanyol publicat el 2011²², que utilitza les dades ARESC de nou hospitals estatals. On es descriuen nivells de resistència per a *E. coli* uropatògena entre 33-80% per ampicil·lina, 9-61% per trimetoprim (tractament de primera línia a IU no complicades), fins a un 72% per ciprofloxacina, 18% per àcid nalidíxic i 25% per amoxicil·lina/àcid clavulànic o cefuroxima.

1.2.2 Altres infeccions extraintestinals causades per *E. coli*

A més de les infeccions urinàries, la diversitat de síndromes extraintestinals causades per poblacions d'*E. coli* ha permès designar-les com: *E. coli* patògens extraintestinals i intrainestinals: (ExPEC, *Extraintestinal Pathogenic E. coli*) i (IPEC, *Intrainestinal Pathogenic E. coli*) respectivament. Aquesta classificació s'ha fet amb l'objectiu de diferenciar les soques causants purament de quadres gastrointestinals, les IPEC. Ja que generalment les IPEC no causen malaltia extraintestinal i a la vegada les soques ExPEC no produeixen diarrea^{8, 9, 14}.

Les IU, la sèpsia o la meningitis neonatal han estat els síndromes que han concentrat la majoria d'estudis científics amb el principal objectiu de caracteritzar epidemiològica i molecularment aquestes soques. No obstant això, les evidències acumulades durant els darrers anys suggereixen un considerable solapament entre aquests tres síndromes (IU, sèpsia i meningitis). A la vegada, la descripció de noves infeccions invasives causades per soques ExPEC com pneumònies, peritonitis, colangitis, artritis sèptiques, piomiositis

emfisematoses, osteomielitis vertebrals hematògenes, abscessos epidurals del *psaos* o ilíac, infeccions profundes de ferides quirúrgiques, etc^{43, 44}.

És important destacar, que la gravetat d'aquests quadres clínics depèn considerablement de l'estat immunològic del pacient. Com també de la presència o no en aquest de patologies de base; la quantitat d'inòcul bacterià infectant i la versatilitat (perfil virulent) d'aquests clons ExPEC o l'existència de coinfecció amb altres microorganismes patògens.

1.2.2.1 Infecció abdominal i pèlvica

L'abdomen i la pelvis constitueixen la segona localització més freqüent d'infecció extraintestinal per *E. coli*. Aquestes infeccions engloben una àmplia varietat de síndromes clínics, com les peritonitis agudes per contaminació fecal, les peritonitis bacterianes espontànies, les peritonitis relacionades amb diàlisi, diverticulitis, apendicitis, abscessos intraperitoneals o viscerals (hepàtic, pancreàtic, esplènic, etc.), pseudoquistes pancreàtics infectats i colangitis infecciosa amb o sense colescistitis. En les infeccions intraabdominals *E. coli* pot aïllar-se ja sigui sola, o com és més freqüent en combinació amb altres bacteris anaeròbis facultatius o bacteris intestinals^{11, 14}.

i) Peritonitis i abscessos intrabdominals⁴⁵

La peritonitis és una inflamació de la cavitat peritoneal deguda a una infecció, un traumatisme o l'acció irritant de substàncies químiques com la bilis, el suc pancreàtic o els sucs intestinals. En general es presenta de forma aguda i pot ser localitzada o difusa. Les peritonitis infeccioses depenent del seu origen, solen classificar-se com a primàries, secundàries o terciàries.

La peritonitis primària és poc freqüent (1-2%) i es dona en pacients amb ascites que presenten infecció peritoneal sense una causa evident. En els pacients cirròtics, el 70% d'aquestes infeccions estan causades per enterobacteris particularment *E. coli*.

Les peritonitis secundàries i terciàries solen estar causades per la flora endògena habitual del tub digestiu, per exemple *E. coli*. Apareixen després de la contaminació de la cavitat abdominal per matèria intestinal o del tracte genitourinari. A causa de perforació de mucoses (apendicitis, diverticulitis, ulcus pèptic, vesícula biliar gangrenosa, etc.), necrosi isquèmica de la paret, traumatismes o cirurgia.

La presència d'una síndrome febril després d'una laparotomia ha de fer sospitar la formació d'un abscess i obliga a un diagnòstic diferencial entre les infeccions nosocomials més freqüents en aquesta circumstàncies (pneumònia, bacterièmia per catèter, infecció urinària, infecció de ferida i infecció intraabdominal). Un interval lliure de febre en el postoperatori és suggestiu d'abscess intraabdominal.

ii) Infeccions de les vies biliars⁴⁵

Els microorganismes més comunament aïllats com a causants d'infecció de les vies biliars són els que constitueixen la flora intestinal normal. En primer lloc, hi ha els bacils gramnegatius entèrics i entre ells *E. coli*. La durada i gravetat dels símptomes, l'edat avançada i la icterícia, són factors que prediuen l'existència d'bacterobilia.

La colecistitis aguda és la inflamació aguda de la vesícula biliar. La forma clàssica de presentació sol estar associada a una litiasi biliar, manifestant-se com un còlic biliar amb dolor intens que persisteix durant més de quatre a sis hores, localitzat en hipocondri dret i irradiat a l'esquena i l'espatlla; acompanyat de febre, leucocitosi i signe de Murphy en l'exploració física.

Al seu torn, la colecistitis aguda no litiàsica passa en un 5-10% de casos de colecistitis. La colecistitis acalculosa es produeix habitualment en pacients crítics (xoc, cirurgia abdominal o traumatològica recent, grans cremats, etc.) I té una elevada mortalitat. Comparada amb la colecistitis aguda litiàsica, el quadre clínic està menys focalitzat en hipocondri dret i el curs clínic és més ràpid i fulminant.

S'entén per colangitis la inflamació del sistema biliar que es desenvolupa com a conseqüència de l'estasi i infecció habitualment bacteriana. La litiasi és la causa del 80-90% de casos de colangitis. A la resta es deuen a estenosi biliars benignes o malignes. Freqüentment, la colangitis es produeix després d'una manipulació percutània o endoscòpica que no aconsegueix un bon drenatge biliar. Les dades clíniques més típiques són el dolor en hipocondri dret, febre i icterícia (tríada de Charcot). Alguns pacients presenten un quadre lleu amb febre, orina fosca i dolor abdominal.

1.2.2.2 Infeccions del sistema nerviós central

La invasió por *E. coli* de la barrera hematoencefàlica és un prerrequisit per a la penetració dins del cervell. Perquè això es dugui a terme, es requereixen factors específics tant del microbi com de l'hoste. Les últimes dades científiques han permès avançar en el coneixement de la patogènesi i de l'emergència de resistència antimicrobiana en aquest tipus d'infeccions, determinant que el bloqueig d'aquests factors en el microorganisme o en l'hoste, contribueixen a la prevenció de la invasió d'*E. coli* dins del cervell.

i) Meningitis

La meningitis aguda bacteriana és una malaltia infecciosa que ocasiona la inflamació de les meninges i del líquid cefaloraquídi (LCR) que protegeix al sistema nerviós central i a la medulla espinal. Constitueix una important causa de morbiditat i mortalitat, d'aquí la importància de realitzar un diagnòstic ràpid per a iniciar un tractament immediat i donar mesures generals de suport al pacient.

L'etiologia de la meningitis aguda bacteriana està condicionada no només pel lloc i la forma d'adquisició de la infecció, sinó també per determinats factors com l'edat, la immunodepressió o l'existència de drenatges del LCR. Els microorganismes poden arribar a l'espai subaracnoïdal per via hematògena o bé a partir d'un focus de veïnatge, com en els casos secundaris a otitis, fístula pericranial, etc. Aquest últim grup habitualment té un focus d'infecció procedent des d'una ferida quirúrgica, traumàtica o per derivació del sistema nerviós central^{46, 47}.

Després dels estreptococs del grup B, *E. coli* és la segona causa de meningitis bacteriana neonatal als països desenvolupats. La incidència de meningitis neonatal causades per *E. coli* s'estima entre un 0,2 i 5 per cada 1.000 naixements. Així, aquestes soques d'*E. coli* responsables de les infeccions neonatals provenen de la flora intestinal, suggerint que la vagina de les dones embarassades i el líquid amniòtic són dues estructures que afavoreixen la selecció de poblacions d'*E. coli* que presenten una elevada virulència i per tant, un risc d'infecció en nounats^{14, 35, 48, 49}.

La barrera hematoencefàlica és una barrera estructural i funcional formada per la microvasculació cerebral de cèl·lules endotelials, astròcits i perícits, que protegeixen el cervell dels microbis que puguin circular per la sang, però les soques d'*E. coli* que

expressen polisacàrid capsular K1 (80% aproximadament) i lipopolisacàrid O (O-LPS), tenen l'habilitat de travessar la barrera hematoencefàlica per penetració transcel·lular sense causar alteració en la permeabilitat i per tant són capaços de causar inflamació del sistema nerviós central, com a conseqüència causar meningitis. Les investigacions han demostrat que l'èxit de les soques d'*E. coli* circulants, que traspassen la barrera hematoencefàlica és gràcies als elevats nivells de bacterièmia, la càrrega virulenta d'aquestes soques (taula 4) i els factors específics de l'hoste^{35, 50}.

Taula 4. Factors de virulència específics en soques d'*E. coli* causants de meningitis. Adaptada de Kim, 2012³⁵.

Mecanismes patògens	Factors de virulència**
Elevat grau de bacterièmia	K1, O-LPS, Nlpl
<i>E. coli</i> que només s'uneix a CEMCH*	Fímbria tipus 1, flagel, OmpA, AVF, Nlpl
<i>E. coli</i> que envaeixen CEMCH*	Proteïnes Ibe, AsIA, CNF1
Traspàs de la barrera hematoencefàlica K1	
*CEMCH: Cèl·lules Endotelials Microvasculars de Cervell Humà (CEMCH)	
**AsIA: arilsulfatasa, AVF: antígen 43-like virulence factor, CNF1: factor citotòxic necrosant 1, LPS: lipopolisacàrid, Nlpl: nova lipoproteïna L i OmpA: Proteïna A de membrana externa.	

La colonització neonatal succeeix com a resultat de la transmissió maternal durant el part. Així, la colonització vaginal s'observa entre el 3-20% de les dones embarassades, sent un pas important en la infecció neonatal. Gairebé la meitat de tots les soques vaginals expressen l'antigen K1, per tant la presència d'aquest s'ha associat a meningitis neonatal. No obstant, només algunes d'aquestes dones donen a llum nadons amb infecció aguda, amb baix pes en néixer o en parts prematurs. El que implica que només algunes soques d'*E. coli* amb un perfil virulent específic pot causar aquesta patologia complicant l'embaràs o causar infeccions neonatals.

La clínica consisteix en la clàssica tríada: febre, fotofòbia, rigidesa de nugal associada a rigidesa generalitzada, signe de Kerning i de Brudzinski, i alteració de l'estat de consciència^{46, 47}.

ii) Abscés cerebral⁵¹

L'abscés cerebral es defineix com una col·lecció purulenta localitzada en el parènquima cerebral. Els abscessos localitzats en la fossa posterior (cerebel i tronc) i els que excepcionalment afecten la medul·la espinal s'engloben també habitualment dins d'aquesta entitat.

Encara que en el 15-30% dels casos no es troba cap factor predisposant, els dos mecanismes principals pels quals apareix un abscess cerebral són l'extensió a partir d'un focus subjacent i el desenvolupament d'un abscess hematogen. El mecanisme que amb més freqüència explica l'aparició d'un abscess cerebral és l'existència d'un focus contigu d'infecció de l'oïda, sinus paranasals o arcada dentària. La via d'entrada dels microorganismes al teixit cerebral pot ser directa (característicament en les otomastoiditis a través del sostre de les cel·les mastoïdees o el tegmen timpànic), o bé a través del drenatge venós retrògrad, cap a les venes corticals i els sinus venosos intracranials. Les infeccions facials i del cuir cabellut, també poden ser responsables de trombosi del si cavernós i desenvolupament d'abscess cerebral, igual que el traumatisme cranial obert i els procediments neuroquirúrgics. Sovint, la infecció hematògena dona lloc a abscessos cerebrals múltiples que es localitzen en la unió cortico-subcortical del territori de l'artèria cerebral mitjana. S'associa especialment a infeccions pulmonars cròniques (bronquiectàsies i abscess pulmonar), cardiopaties congènites amb curtcircuit dreta-esquerra i malformacions arteriovenoses pulmonars. L'endocarditis bacteriana és responsable de menys del 5% dels abscessos cerebrals.

L'etiologia de l'abscess cerebral reflecteix les característiques de l'hoste i el focus d'origen responsable del desenvolupament de l'abscess. Els bacils gramnegatius aerobis i especialment *E. coli* s'associen especialment als abscessos cerebrals secundaris a otitis mitjana crònica, en la qual amb freqüència es demostra l'existència de colesteatoma.

El símptoma més freqüent és la cefalea, que apareix en el 70% dels casos mentre que la febre i els dèficits neurològics apareixen en menys de la meitat dels casos. Les crisis epilèptiques apareixen entre el 25-45% dels casos. L'evolució clínica pot ser aguda o subaguda, encara que en la majoria dels casos la durada dels símptomes és menor de dues setmanes. L'edema de papil·la i la rigidesa nucal s'observen en el 25% dels casos. En alguns casos els abscessos es presenten clínicament com una meningitis aguda, amb cefalea i signes meninges prominents d'instauració aguda, sent compatible amb ruptura de l'abscess al ventricle o a l'espai subaracnoïdal.

1.2.2.3 Bacterièmia i sèpsia en infeccions extraintestinals

La bacterièmia és la presència de microorganismes en el sistema circulatori. Els tres microorganismes més comuns causants d'aquest quadre són *E. coli*, *S. aureus* i *S. pneumoniae*, els quals apareixen en taxes aproximades de 35, 25 i 10 per cada 100.000

pacients, respectivament⁵². La bacterièmia per *E. coli* pot originar secundàriament d'una infecció primària en qualsevol localització extraintestinal. En termes generals, una proporció similar de casos de bacterièmia per *E. coli* s'origina fora i dins de l'hospital (17-37%). Així mateix, és el bacil gramnegatiu aïllat amb més freqüència de la sang en pacients ambulatoris, en persones internes en unitats de cures a llarg termini i hospitalitzats. L'aïllament d'*E. coli* de la sang gairebé sempre té importància clínica i en general s'acompanya de la síndrome sèptic, septicèmia greu (disfunció induïda per septicèmia en almenys un òrgan/aparell/sistema) o xoc sèptic (figura 5)^{14,32,40,52}.

Figura 5. Resposta inflamatòria en septicèmia. Presa de Reinhart *et al.*, 2.012⁵³.

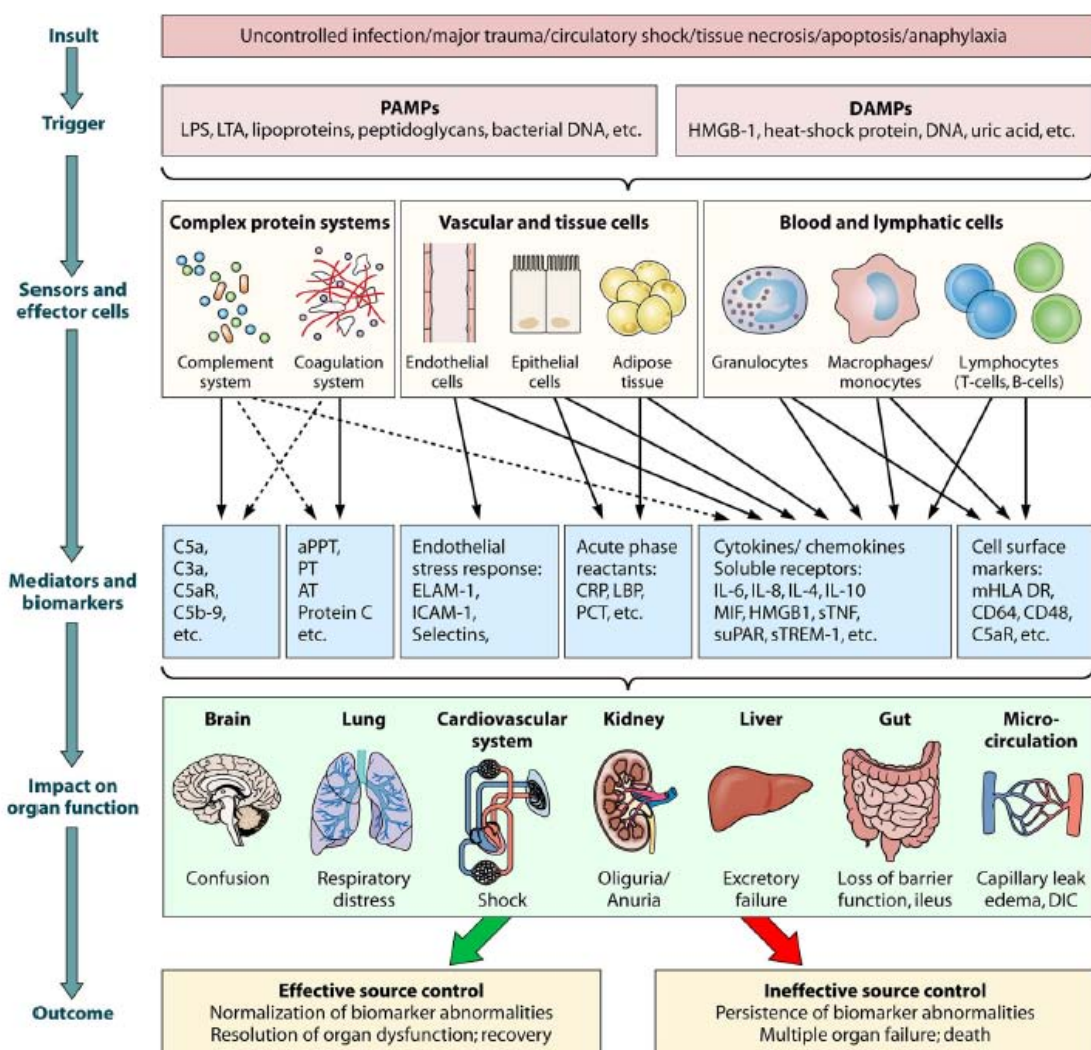


FIG 1 The inflammatory response. This simplified overview shows the course of the inflammatory response. An insult triggers the release of PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) and/or DAMPs (danger-associated molecular patterns), which are sensed by pattern recognition mechanisms such as receptors (pattern recognition receptors (PRRs)) on the cell surface or within the cytosol or nucleus of sensor cells as well as by pattern-recognizing complex systems such as the complement system and others. Therefore, sensors can be different types of cells, tissues/organs, or proteins/other molecules, which themselves may function as effectors to modulate the immune response through various different pro- or anti-inflammatory mediators or biomarkers. As a result, the underlying insult can be cleared or not, and organ function may be temporarily or permanently impaired. LPS, lipopolysaccharide (part of the membrane of Gram-negative bacteria); LTA, lipoteichoic acid (part of the cell wall of Gram-positive bacteria); HMGB1, high-mobility-group protein B1; C5a and C3a, complement components 5a and 3a; C5aR, C5a receptor protein; C5b-9, terminal complement complex; aPPT, activated partial thromboplastin time; PT, prothrombin time; AT, antithrombin; ELAM-1, endothelial leukocyte adhesion molecule 1; ICAM-1, intercellular adhesion molecule 1; CRP, C-reactive protein; LBP, LPS-binding protein; PCT, procakitonin; IL-6, interleukin-6; MIF, macrophage migration inhibitory factor; sTNF, soluble tumor necrosis factor; suPAR, soluble urokinase-type plasminogen activator receptor; sTREM-1, soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 1; mHLA-DR, monocytic human leukocyte antigen DR; CD64 and CD48, integral membrane glycoproteins; DIC, disseminated intravascular coagulation.

Si el microorganisme comença a multiplicar-se, la bacterièmia progressa a septicèmia. La sèpsia, també coneguda com a Síndrome de Resposta Inflamatòria Sistèmica (SRIS), és una condició mèdica greu induïda per una infecció massiva de la sang, amb una àmplia activació de les vies proinflamatòries i de coagulació amb disfunció del sistema circulatori generant xoc sèptic, com a resultat d'aquesta sèpsia greu es produeix fallida multiorgànica, pel descens en la perfusió sanguínia generant dany col·lateral en òrgans i teixits^{50, 53}.

La sèpsia pot estar causada per la infecció microbiana que s'origina des de diferents localitzacions corporals. Els càlculs basats en estimacions conservadores de la contribució proporcional d'*E. coli* a la septicèmia greu (és a dir 17% dels casos) es tradueix en gairebé 40.000 morts en els pacients afectats als EUA l'any 2001^{32, 40}.

El terme urosèpsia és comunament utilitzat per descriure la síndrome de sèpsia causada per les infeccions de l'aparell urinari, les vies urinàries són la font més comuna de bacterièmia per *E. coli* i representen entre 50-66% dels episodis. La bacterièmia que s'origina en les vies urinàries és generalment per pielonefritis, obstrucció de les vies urinàries o exploració instrumental de les mateixes en presència d'orina infectada. L'abdomen és el segon origen més comú i explica 25% dels episodis. L'obstrucció biliar (càlculs i tumors) i la perforació intestinal evident causen la major part dels casos, però hi ha algunes causes intraabdominals (p. ex., abscessos). Es caracteritza per un curs asimptomàtic i sol ser necessària la identificació per mitjà d'estudis d'imatge. Altres fonts de bacterièmia per *E. coli* inclouen infeccions en teixits tous, ossos, pulmons i catèters intravasculars^{11, 50}.

Als EUA les taxes d'hospitalitzacions per sèpsia o septicèmia incrementen un 70%, de 221 (al 2001) a 377 (al 2008) per cada 100.000 pacients i la incidència de sèpsia postoperatòries severes es van triplicar de 0.3% al 0.9%. Els individus en les edats extremes de la vida són els més susceptibles a les septicèmies induïdes o d'adquisició comunitària⁵³.

E. coli és el quart agent (després de les espècies d'estafilococs coagulasa negativa, *S. aureus* i *Candida*) que s'associen a septicèmia en infants (<1 any) i en persones majors de 65 anys, representant aproximadament el 20% de total d'aïllats. S'estima que *E. coli* causa el 17% de les sèpsies severes als EUA, calculant 127.500 casos i 40.000 morts cada any, amb una taxa de mortalitat d'aproximadament 30%³⁷. D'acord amb el CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) al 2008 es va estimar una despesa de 14,6 mil milions de dòlars a

l'any en hospitalitzacions per sèpsia entre 1997 i 2008. Segons els paràmetres d'inflació el tractament de pacients hospitalitzats per aquesta condició incrementa anualment un 11,9%^{50, 53}.

Els nounats són particularment susceptibles a les sèpsia bacterianes originades per infeccions de vies ascendents (tracte genital sota de la mare o bacterièmia transplacentària), del canal vaginal (part) o des d'ambients hospitalaris o comunitaris. A nivell mundial entre 4 i 5 milions d'infants moren durant les primeres quatre setmanes de vida; 98% d'aquestes morts ocorre en països en vies de desenvolupament, de la mateixa manera que en països desenvolupats, a causa de sèpsia neonatals. Els nounats amb sèpsia per *E. coli* tenen un baix pes al néixer i requereixen estades més llargues en cures intensives, habitualment requereixen ventilació mecànica i els hi generen seqüeles cròniques físiques i cognitives que inclouen pèrdua auditiva i defectes en el desenvolupament neuronal. Al seu torn, aquests nounats tenen tres vegades més gran el risc de mortalitat quan es comparen contra episodis de septicèmies causades per estreptococs del grup B. A més, tenint en compte que els casos de sèpsia per *E. coli* s'han duplicat. Responent a un comportament inversament proporcional per la disminució en dos terços dels causats per estreptococs del grup B, a causa de la implementació de la teràpia profilàctica d'aquests últims^{50, 53}.

D'altra banda, el nombre anual de sèpsia en adults als EUA s'incrementa des de 164.072 al 1979 a 659.935 al 2000. Ho mateix passa pel que fa a l'edat, al seu torn els canvis en els nivells de vida de les poblacions ha generat un continu increment en la morbiditat i mortalitat per sèpsia. És així, com la diabetis i la patologia urinària subjacent són els majors factors de risc que contribueixen a la bacterièmia⁵⁰.

2. *Escherichia coli* com agent infecció

Tenint en compte els criteris clínics, les soques d'*E. coli* es poden classificar dins de tres grups: soques comensals, soques patògenes intestinals (entèriques o productores de diarrea) i soques patògenes extraintestinals.

Taula 5. Comportaments patògens dels tres principals tipus d'*E. coli*. Presa de Johnson i Russo 2004¹³.

Grup patotípic d' <i>E. coli</i>	Manifestació clínica*		
	Colonització asimptomàtica intestinal	Diarrea	Infecció extraintestinal
Comensal	+++	-	+
Patògen intestinal	-	+++	-
Extraintestinal	+	-	+++

* Escala semiquantitativa: - (absent) o bé +++ (màxima expressió)

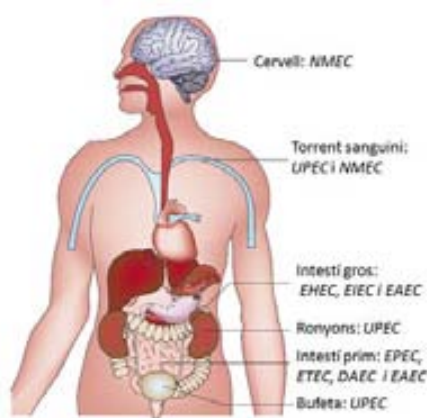


Figura 6. Llocs de colonització d'*E. coli*. Presa de Croxen i Finlay 2010⁵⁴. *Enteropathogenic E. coli* (EPEC), *enterotoxigenic E. coli* (ETEC) i *diffusely adherent E. coli* (DAEC) colonitzen l'intestí prim i causant diarrea, mentre que *enterohaemorrhagic E. coli* (EHEC) i *enteroinvasive E. coli* (EIEC) causant malaltia en l'intestí gros. Per la seva part *Enterogaeggrative E. coli* (EAEC) pot colonitzar tant els intestí prim com el gros. *Uropathogenic E. coli* (UPEC) entra al tracte urinari i viatja a la bufeta per causar cistitis, i si es deixa sense tractament, pot pujar encara més fins els ronyons per causar pielonefritis. La septicèmia pot

ocórrer tant en soques UPEC com en soques de *Neonatal Meningitis E. coli* (NMEC), a més NMEC pot crear la barrera hematoencefàlica en el sistema nerviós central (SNC) i causar meningitis.

Els atributs de virulència d'aquestes soques estan freqüentment codificats en elements mòbils, que poden transferir entre diferents soques per crear nous perfils de virulència o nous elements mòbils susceptibles de ser mobilitzats o fixats genòmicament a nivell cromosòmic.

Tot i l'elevada importància de les infeccions extraintestinals causades per *E. coli*, aquestes no han arribat a cridar l'atenció dels organismes de salut pública; fet que si han aconseguit les infeccions intestinals produïdes per *E. coli* i les seves síndromes associades, bàsicament per el caràcter epidèmic d'aquestes soques.

2.1 *E. coli* patògena intestinal

Certes soques d'*E. coli* han evolucionat a patògens intestinals estrictes i causen gastroenteritis per diversos mecanismes patògens singulars. Les soques IPEC (*Intestinal pathogenic E. coli*) molt poques vegades es troben a la microbiota fecal d'individus sans i rarament causen malaltia extraintestinal. Les soques patògenes intestinals d'*E. coli* causen

infeccions en una gran varietat d'hostes; aquests patògens indueixen enteritis, enterocolitis i colitis, gràcies a l'entrada dels bacteris via oral a través de l'aigua i els aliments, on després colonitzar l'intestí causen la infecció¹⁴.

Aquestes soques sovint produeixen enterotoxines i l'especificitat de l'hoste depèn del tipus d'adhesines que expressen, per exemple, les fímbries K99 faciliten l'adherència al tracte intestinal dels bous, vedells i porcs. Mentre que l'adherència al tracte intestinal dels humans sovint està relacionada amb les adhesines CFAI i CFAII^{2, 55}.

Al 2000 Russo i Johnson⁹, van definir sis categories enteropatogèniques o patotipus d'*E. coli*: *E. coli* enteropatogènica (EPEC, *Enteropathogenic E. coli*), *E. coli* enterohemorràgica (EHEC, *Enterohaemorrhagic E. coli*), *E. coli* enterotoxigènica (ETEC, *Enterotoxigenic E. coli*), *E. coli* enteroagregativa/enteroadherent (EAEC, *Enteroaggregative E. coli*), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC, *Enteroinvasive E. coli*) i *E. coli* d'adherència difusa (DAEC, *Diffusely adherent E. coli*). Causants de malaltia intestinal en humans encara que, posteriorment al 2012 Clements *et al.*, van proposar incloure dos patotipus addicionals: *E. coli* adherent i invasiu o (AIEC, *Adherent invasive E. coli*) i *E. coli* Enteroagregativa productora de Shiga Toxina (Stx) o (STEAEC, *Shiga Toxin (Stx) producing Enteroaggregative E. coli*), per conformar un total de vuit (taula 6). Encara que, estudis genòmics han demostrat que AIEC s'ha de classificar com a un patotipus extraintestinal (apartat I. 2.2.1.3)⁵⁶.

Adicionalment, a aquests set patotipus típicament productors de diarrea es descriu un altre putatiu patotipus, conegut com: *cell-detaching E. coli* o CDEC present en soques aïllades de nens amb diarrea. L'habilitat característica d'aquestes soques és la de separar cèl·lules epitelials cultivades en recipients de plàstic o vidre. El perfil de virulència en diferents estudis demostra en aquestes soques la presència de fímbries P, i també la relació amb la capacitat de producció d'hemolisina i factor citotòxic necrosant, CNF (*Cytotoxic necrotizing factor*)^{54, 57}.

Si bé cal destacar que hi ha una certa superposició entre certs patotipus diarreics. No obstant això, cada patotipus posseeix una única combinació de determinants de virulència, habitualment adquirits a través de transferència horitzontal mitjançant plasmidis o bacteriòfags lisogènics d'altres gèneres bacterians. El que dóna lloc a mecanismes de patogènia ben diferenciats. Les soques patògenes intestinals s'inclouen en els grups filogenètics A, B1, D o en llinatges no classificats i segons la simptomatologia que provoquen, s'han classificat en els grups representats a la taula 6¹³.

Taula 6. Patotipus d'*E. coli* patògena intraintestinal. Adaptada de Harrison *et al.*, 2009¹¹, Donnenberg, 2010¹ i Clements *et al.* 2012⁵⁸.

Patotipus	Epidemiologia	Malaltia	Patogènesi	Factors de virulència			Element genètic participant	
				Adherència	Toxina	TSS		ATSPE
EPEC*	Transmissió de persona a persona; nens petits i nadons en països en vies de desenvolupament	Diàrrea aquosa i vòmits persistents	Adherència localitzada, fixació i lesions que destrueixen l'epiteli intestinal	Intimina, pili formador de bundle (BFP), adhesines A/E associades (Paa), fimbria polar (LPF), adhesina homòloga a Iga (Iha) i autotransportador codificat en el gen A EHEC (EhaA)	No	Codificada en LEE (loci per l'aplanament A/E d'enteròcits)	Proteïna P secretada per <i>E. coli</i> (EspP)	Plasmidi de factor d'adherència d'EPEC d'illes de patogenicitat LEE
EHEC/STEC*	Aliments, o bé, aigua contaminada, persona a persona; totes les edats, països industrialitzats	Toxiinfecció alimentària, colitis hemorràgica i la síndrome hemolítica urèmica	Shiga toxina	Intimina, Paa, toxina B (ToxB) factor d'adherència 1 d' <i>E. coli</i> (Efa), LPF, adhesina autoaglutinant de STEC (Saa), proteïna d'unió a immunoglobulina d' <i>E. coli</i> (EiBG), proteïna de membrana externa (OmpA) i Iha	Shiga toxina (Stx)	Codificada en LEE	EspP	Stx-1 similar a λ, o bé, Stx-2 que codifica un bacteriòfag i l'illa de patogenicitat EHEC per a l'adhesió i aplanament d'enteròcits
ETEC*	Aliments i aigua contaminada; nens petits (20%) a països desenvolupats viatgers a països no desenvolupats (50-60%) i animals (boví i porcí)	Diàrrea aquosa en nens i diàrrea dels viatgers	Enterotoxines termolàbil i termoestable, elevat nombre de factors de colonització (adhesines fimbrials)	Factors de colonització (CF) i Paa.	Enterotoxina termoestable (ST), enterotoxina termolàbil (LT) i citolisina A (ClyA)	No	EPEC autotransportador A (EaTA)	Plasmidi de virulència i locus cromosòmals que codifiquen gens d'adherència CFaIII, secreció de toxines, etc.
EAE*	Aliments, o bé, aigua contaminada; nens que viuen en països en vies de desenvolupament o viatgers a aquests llocs; totes les edats, països industrialitzats. Patògen entèric d'interès en pacients amb SIDA. No s'ha descrit reservori animal	Diàrrea dels viatgers, diàrrea mucosa i persistent en nens	Adherència agregativa/difusa a través de diverses fimbries i enterotoxines termoestables (EAST1)	Fimbries agregatives d'adherència (AAF) (I, II, III, Hda), loci d'invasió toxigènica A (Tia)	EAE enterotoxina termoestable 1 (EAST1), Shigella enterotoxina (ShET) 1 i hemolisines E (HlyE)	Si?	Toxina codificada en plasmidis (Pet), proteïna involucrada en la colonització intestinal (Pic), autotransportador secretador de toxina (Sat), Proteasa de Shigella homòloga de Iga-like (SigA) i EspE	Cromosomes o gens d'adherència associats a plasmidis i toxines (AFF), AAF/II, factors de virulència regulats per AggR específics per a aquest patotip
STEAEC*	Aliments, o bé, aigua contaminada; en països industrialitzats. Responsable del brot alemany d' <i>E. coli</i> al 2011	Toxiinfecció alimentària	La suma d'EAE + EHEC	AAF i Iha	Stx	No	Pic Pet	Cromosoma, plasmidis de virulència (pAA-like), que codifiquen AAF, AggR, Pet y ShET1; plasmidis de resistència i profags integrats en el locus <i>arhA</i>
EIEC*	Aliments, o bé, aigua contaminada; nens que viuen en països en vies de desenvolupament o viatgers a aquests llocs.	Disenteria (Shigel·losi)	Invasió de les cèl·lules de l'epiteli del còlon, multiplicació intracel·lular, disseminació de cèl·lules a cèl·lules	No	ShET1/2	Codificat pINV	Proteïna (Sep) extracel·lular A de Shigella (SigA)	Múltiples gens que contenen sobre tot plasmidis de gran virulència
DAEC*	Desconegut. Causa important de diàrrea en nens grans en països en via de desenvolupament	Diàrrea aguda en nens menors de 5 anys	Adhesió a la totalitat de la superfície de les cèl·lules epitelials i minva de la capacitat de resposta immune.	Afimbria (Afa) i adhesines fimbrials (Dr)	No	No	Sat	Factors de virulència per l'adhesió (adhesines Afa-Dr)

* Enteropathogenic *E. coli* (EPEC), Enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC), Shiga Toxin (Stx) producing Enterotoxigenic *E. coli* (STEAEC), Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), Enterotoxigenic *E. coli* (EAE), Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) y Diffusely adherent *E. coli* (DAEC)

** ATSPE Autotransportadors Serin Proteasa de Enterobacteriaceae

Per a una revisió més detallada d'*E. coli* com a patògen intestinal (IPEC) veure els següents articles ^{1, 2, 54, 57, 58}. Encara que aquesta tesi es basa en l'estudi d'aspectes relacionat amb *E. coli* extraintestinal, hem inclòs aquest breu resum d'*E. coli* com a patògena intestinal, ja que aquest grup de soques posseeix factors de virulència coneguts i determinats, que fan que aquestes soques siguin anomenades inequívocament com a patògenes IPEC, gràcies a la producció de diarrea o d'enteritis. Per un altre banda, les soques objecte d'aquest estudi posseeixen diversos factors de patogenicitat de difícil correlació patògena.

2.2 *E. coli* patògen extraintestinal

Les soques patògenes extraintestinals d'*E. coli* representen un elevat nombre en les taxes de morbiditat en diversos processos infecciosos i per tant elevats costos per a la sanitat. No obstant això, aquest tipus d'infeccions no solen estar en el punt de mira dels sistemes sanitaris.

Inicialment es va considerar que les soques d'*E. coli* patògenes per a l'home produïen essencialment infeccions urinàries i compartien diverses característiques denominant-se *E. coli* uropatògenes. Posteriorment es va observar que totes les soques d'*E. coli* que causen infeccions extraintestinals en humans posseeixen un perfil semblant. Per això, l'any 2000, Russo i Johnson proposen per a totes elles el nom d'*Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli* (ExPEC). Aquestes soques d'*E. coli* causants d'infeccions extraintestinals són filogenètica i epidemiològicament diferents de les soques comensals o dels patògens intestinals, i així mateix portadores de diferents perfils de virulència.

Aquests clons poden causar importants infeccions extraintestinals en zones anatòmiques concretes o bé en òrgans localitzats, a través de la seva entrada a aquests llocs estèrils des del seu lloc de colonització (colon, perineu o altres). Moltes d'aquestes soques ExPEC pertanyen als grups filogenètics B2 i D, serotipus específics i dominants (O: K: H), i han adquirit diversos gens de virulència que els permeten produir infeccions extraintestinals tant en hostes immunocompetents com immunodeprimits. No obstant això, aquestes soques ExPEC poden colonitzar prolongadament de manera asintomàticament el tracte intestinal humà i ser la població predominant de la pròpia microbiota fecal en individus sans, representant un 20% del total de bacteris aerobis facultatives en humans sans i sota certes condicions poden ser realment més efectives colonitzant que les soques típicament comensals fecals^{13, 59, 60}.

Els factors de virulència típics d'aquestes poblacions ExPEC inclouen diverses adhesines, lipopolisacàrids capsulars, toxines, sideróforos, proteases, invasines, proteïnes de resistència al sèrum; que poden afectar una gran variabilitat de processos cel·lulars, incloent la síntesi de proteïnes, transducció de senyals, funcions de citoesquelet, processos de divisió cel·lular, captació de ferro, transcripció, apoptosi i funcions mitocondrials. Aquest il·limitat nombre de factors que diferencien les soques patògenes de les no patògenes, estan freqüentment localitzats en plasmidis, transposons, bacteriòfags o PAI^{13, 43}.

Un aïllat clínic es defineix ExPEC si posseeix factors de virulència reconeguts com a extraintestinals o bé si ha demostrat la seva capacitat virulenta en un model animal. L'aïllament d'una soca d'*E. coli* d'un pacient amb una infecció extraintestinal no determina que aquesta soca sigui ExPEC, ja que qualsevol comensal d'*E. coli* pot causar infecció extraintestinal si el pacient està immunodeprimit.

Johnson *et al.*, en 2003, van constatar mitjançant multiplex-PCR que les soques ExPEC eren els aïllats que contienien dos o més dels següents factors de virulència: *papA* (subunitat estructural de fimbries P) o *papC* (assemblatge de fimbries P), *sfa/foc* (subunitats de fimbries S i F1C), *afa/dra* (adhesines d'unió de l'antígen Dr), *kpsMT II* (polisacàrid capsular del grup 2), *iutA* (receptor de l'aerobactina)⁶¹. Val la pena destacar que nombrosos autors han descrit diferents factors amb elevats potencials virulents associats a soques ExPEC i que no es tenen en compte en aquesta classificació inicial. Altres marcadors de virulència que poden estar associats amb l'estatus de soques ExPEC es mostren en l'apartat I 2.3.2.1.

2.2.1 Patotipus de soques ExPEC

Aquesta classificació té en compte les característiques intrínseques i distintives de les poblacions ExPEC causants d'aquestes infeccions. El domini d'uns o diversos filogrupos i la presència de factors de virulència específics són aspectes que els permeten aquestes soques resistir favorablement la resposta immune de l'hoste.

La major part d'*E. coli* aïllades d'infeccions simptomàtiques de les vies urinàries, el torrent sanguini, el líquid cefaloraquídi, l'aparell respiratori i la cavitat peritoneal (peritonitis bacteriana espontània) poden diferenciar-se de les soques patògenes intestinals i de les comensals d'*E. coli* gràcies als seus perfils de virulència distintius. Les soques ExPEC

també poden causar infecció de les ferides quirúrgiques, osteomielitis i miositis, però el nombre de casos avaluats fins a la data és molt petit per a la valoració fiable de les proporcions.

2.2.1.1 *E. coli* uropatogen

Les vies urinàries són el lloc més freqüent d'infecció per ExPEC. Aquest patotipus també designat UPEC (*Uropathogenic Escherichia coli*), és el principal agent causal de les infeccions urinàries comptant aproximadament entre el 70-95% de les infeccions comunitàries i un 50% de les nosocomials⁵. Actualment es té clar que en un individu competent immunològicament i sense factors predisponents, els bacteris de l'intestí poden arribar al tracte urinari però allà són ràpidament eliminats.

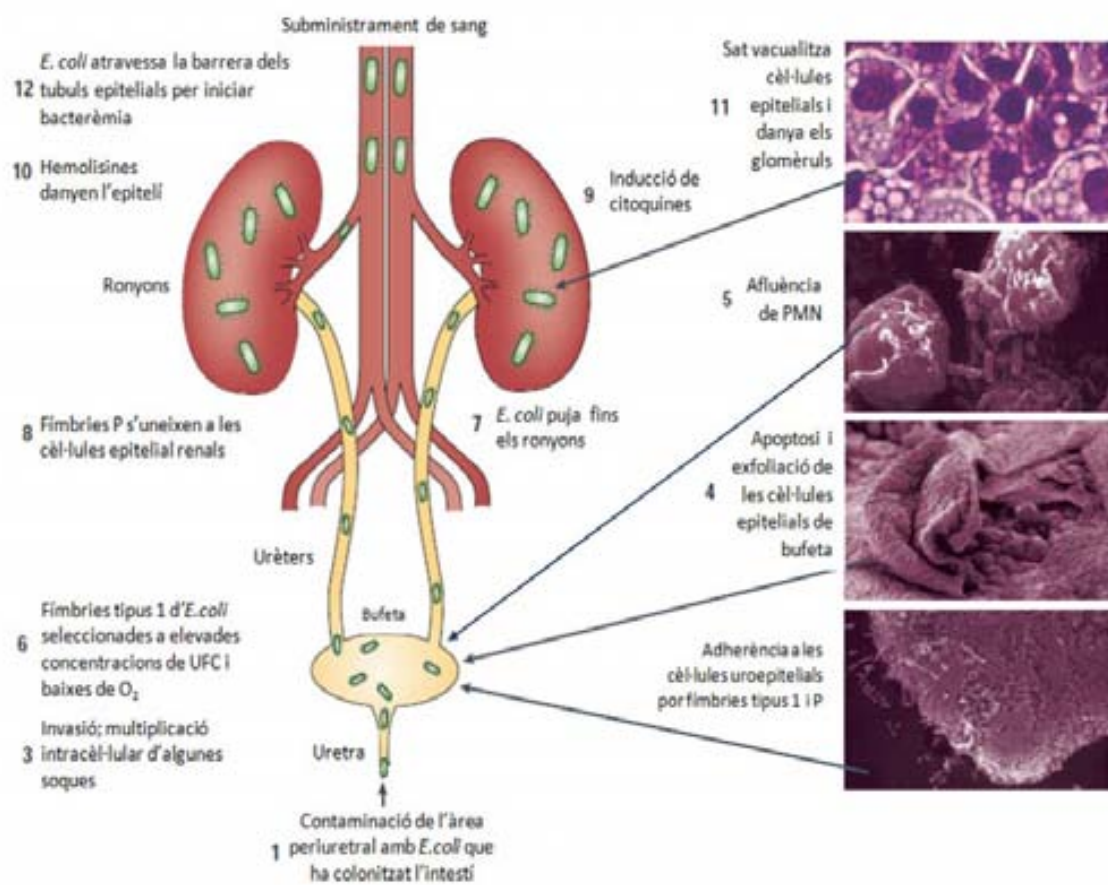
El conjunt de soques que causen cistitis no complicada i pielonefritis aguda és diferent del de les típicament comensals, que comprenen la major població del còlon. Les soques d'*E. coli* d'un petit nombre de serogrupos O (especialment sis grups O causen el 75% de les IU) i són considerades soques epidèmiques per posseir fenotips i grups clonals que s'associen epidemiològicament amb cistitis o pielonefritis en pacients sense cap factor predisposant.

És ben coneguda la patogènesi d'aquestes infeccions (figura 7) que ocorren com a resultat de la interacció del bacteri (potencial virulent) i l'hoste (mecanismes de defensa). La infecció urinària via ascendent (IUA) comença amb la colonització de l'intestí per soques uropatògenes que conviuen amb les soques típicament comensals. Aquestes soques gràcies a la varietat de factors de virulència que codifiquen en les PAI, són capaços d'infectar a persones immunocompetents i colonitzar l'àrea periuretral ascendint a través de la uretra fins a la bufeta. Entre 4 i 24 hores després de la infecció, el nou ambient a la bufeta els confereix l'habilitat per a créixer en l'orina on utilitzen pèptids, aminoàcids i glucosa com a primera font de carboni, que potencien l'expressió de fimbries tipus 1, les quals tenen un paper primordial en el desenvolupament de la infecció urinària, al seu torn tenen mecanismes per a l'adquisició de ferro que els permet tenir més afinitat^{2, 5, 32}.

L'habilitat per a ascendir per l'aparell urinari (figura 8 a) des de la bufeta fins als ronyons reflecteix l'excepcional mecanisme de tropisme amb els òrgans involucrats, evadint la immunitat innata i evitant l'eliminació mitjançant la micció. Les soques d'aquest patotipus expressen factors de virulència específics i característics que contribueixen a la patogènesi, incloent múltiples adhesines, que inclouen les tipus P (Pap), les tipus 1 i altres

fímbries (com F1C, S, M i Dr) per als processos de colonització; secreció de toxines (les hemolisines, CNF i les proteïnes autotransportadores com ara Sat, un citotoxina vacuolitzant, que danya el glomèrul i és citopàtiques per a l'epiteli que l'envolta), múltiples sistemes per a l'adquisició de ferro (les aerobactines) o la resistència al sèrum (polisacàrids capsulars). Aquests factors de virulència es troben en diferents percentatges entre diversos subgrups de soques UPEC. Les soques uropatògenes posseeixen PAI que contenen blocs de gens i que no es troben en el cromosoma de les soques fecals^{2, 5, 32, 54}.

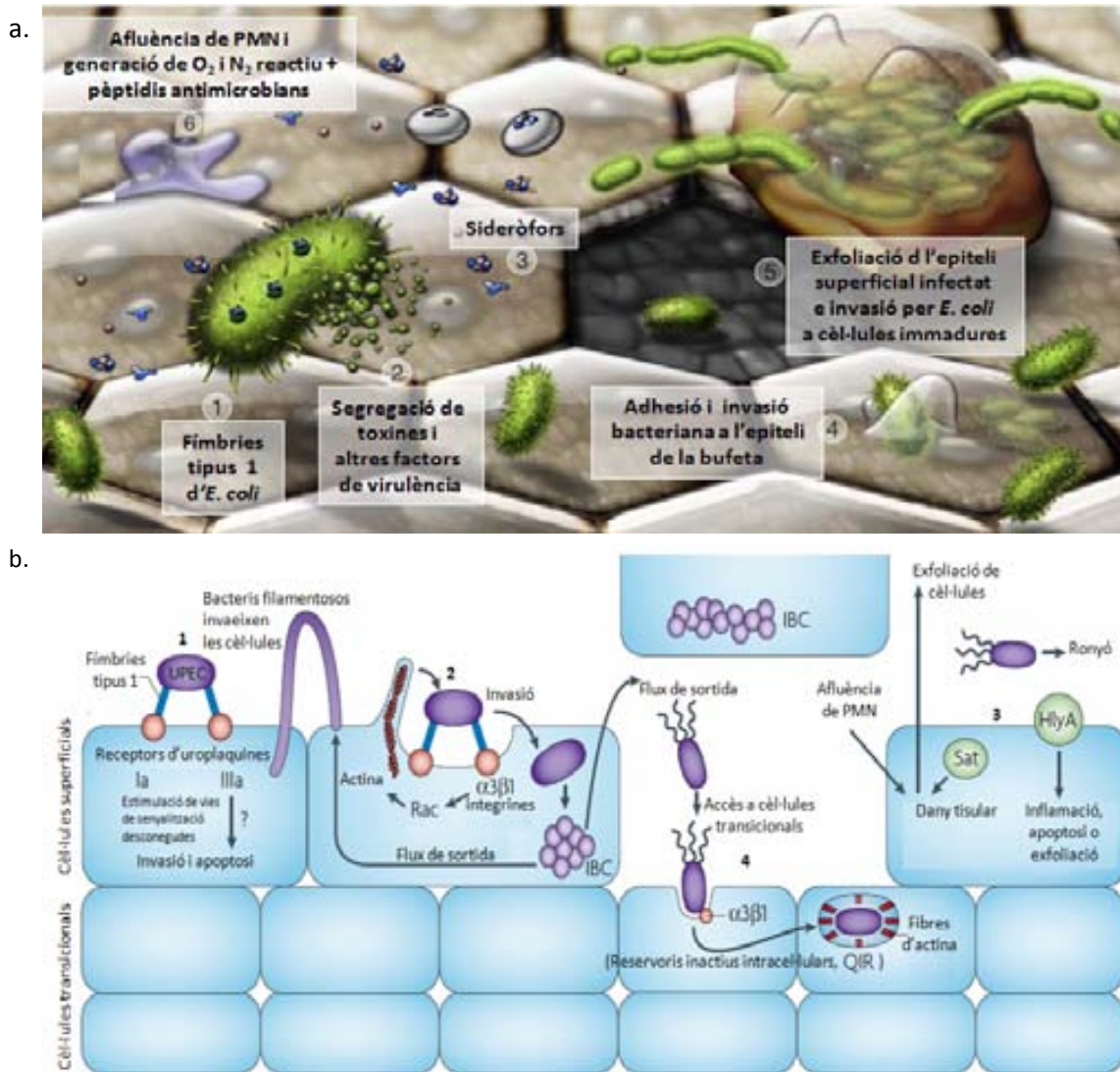
Figura 7. Patogènesi de les infeccions urinàries ascendents produïdes per *E. coli*. Presa de Kaper *et al.*, 2004².



L'entrada de soques UPEC en el sistema urinari és seguida de l'adhesió al uroepiteli. Aquesta unió és intervinguda per les adhesines fimbrials H (FimH), les quals es troben dins de les fímbries tipus 1 de fase variable. FimH s'uneix a la uroplaquina Ia glicosilada de les capes superficials de les cèl·lules de la bufeta. Recentment, s'ha observat que el mecanisme típic de la IU és la interacció entre FimH i la uroplaquina III liderant els esdeveniments de fosforilació que necessiten per a estimular senyals desconegudes que intervenen a favor de la invasió i l'apoptosi. La invasió de soques UPEC és intervinguda per FimH que s'uneix a les integrines $\alpha 3$ i $\beta 1$ que estan relacionades amb l'actina i els llocs

d'invasió, així com amb els microtúbuls de desestabilització. Aquestes interaccions desencadenen la reorganització d'actina per estimulació de les quinases i GTPasa de la família Rho, donant com a resultat del recobriment i internalització del bacteri prèviament unit.

Figura 8. Mecanisme patogènic de les soques UPEC. Adaptada de: a. Wiles *et al.*, 2008⁵ i b. Croxen i Finlay 2010⁵⁴.



Un cop interioritzades les soques UPEC (figura 8 b) es repliquen ràpidament i formen uns complexos també coneguts com a comunitats bacterianes intracel·lulars o IBC (*intracel·lular bacterial communities*), que funcionen com a reservoris que les protegeixen de condicions hostils durant períodes transitoris. Les UPEC poden sortir dels IBC situats dins de les cèl·lules epitel·lials a través de mecanismes de flux, ajudades per la seva motilitat i permetent al lumen de la bufeta posicionar-se novament^{5, 32, 54}.

Durant la infecció, l'afluència de PMN origina dany del teixit, a si mateix les concentracions sublítiqes de toxina formadora de porus (hemolisina A) poden inhibir l'activació de proteïnes AKT i potenciar les UPEC per a la unió i invasió, originant com a resultat l'apoptosi i exfoliació de les cèl·lules de la bufeta. Aquest despreniment de cèl·lules superficials exposa les cèl·lules de transició subjacents a la imminent invasió i disseminació d'UPEC. Dins d'aquestes nova capa de cèl·lules poden endocitar-se dins de vesícules recobertes d'actina per a mantenir-se de manera quiescent a reservoris intracel·lulars, causa principal de les IU recurrents^{5,54}.

Les cistitis poden disseminar cap al ronyó en progressió de la malaltia ascendent. L'ascensió cap a aquest òrgan és influenciada de manera conjunta per la regulació de fimbries tipus 1 i la motilitat en general. Els bacteris que expressen pilis tipus 1 són menys flagel·lades que aquelles que no, suggerint que quan les pili tipus 1 no són expressades les UPEC poden ser encara més mòtils; requisit necessari per a poder ascendir de la bufeta al ronyó. Les soques UPEC aïllades de pielonefritis habitualment expressen les fimbries P que s'adhereixen a les restes de α i β galactosa (Gal α (1-4) Gal β) dels glicolípids que es troben a la superfície de les cèl·lules epitelials del ronyó⁵⁴.

2.2.1.2 E. coli causant de meningitis i sèpsia

Denominades NMEC (*Neonatal Meningitis-associated E. coli*) per a referir-se únicament a les causants de meningitis o SEPEC (*Sèpsia-Causing E. coli*) per a aquelles soques d'*E. coli* associada únicament a sèpsia. Les soques NMEC són un dels dos principals agent de meningitis a nounats (juntament amb estreptococs del grup B). Les soques que causen meningitis són bàsicament de disseminació hematògena, és així com als nivells de bacterièmia es correlacionen amb el desenvolupament de meningitis, per exemple, bacterièmies de $> 10^3$ UFC/ml de sang són significativament més probables de causar meningitis que aquelles en individus amb recomptes més baixos^{2,54}.

La barrera hematoencefàlica en una prima barrera formada per les cèl·lules endotelials microvasculars de l'endoteli cerebral. Els clons NMEC poden travessar la barrera hematoencefàlica, provocant un procés d'inflamació de les meninges. Les soques NMEC estan genèticament ben definides i representen només un limitat nombre de serogrups O. Aquestes s'ancoren mitjançant les fimbries tipus 1 als CD48 i incrementen el Ca^{2+} intracel·lular que estimula els reordenaments d'actina i addicionalment OmpA s'uneix als receptors ECGP96 en la superfície de les cèl·lules endotelials microvasculars de l'endoteli.

Un 80% d'aquestes té l'antigen capsular K1, necessari per a la invasió, ja que permet tenir resistència al sèrum i també propietats antifagocitàries, gràcies a que prevé la fusió lisosomal. De la mateixa manera en un model neonatal de rates es va demostrar l'existència de soques K1 que utilitzen les fimbries S per a unir-se a la superfície de l'endoteli microvascular del cervell. La invasió passa a través de l'acció de proteïnes de membrana, per exemple, IbeA, IbeB, IbeC i AslA. Així mateix, la invasió es correlaciona amb el creixement microaerobi, la captació i utilització de ferro i la producció de CNF^{2, 54}.

Per la seva banda, l'elevada virulència de les soques septicèmiques és degut a que porten un plasmidi que codifica la colicina V (plasmidi ColV), conegut per codificar l'aerobactina (un sistema de captació de ferro) i alhora altres factors de virulència amb propietats per a resistir les activitats pròpies del sèrum (apartat I. 2.2.2.1 iv. b)⁶².

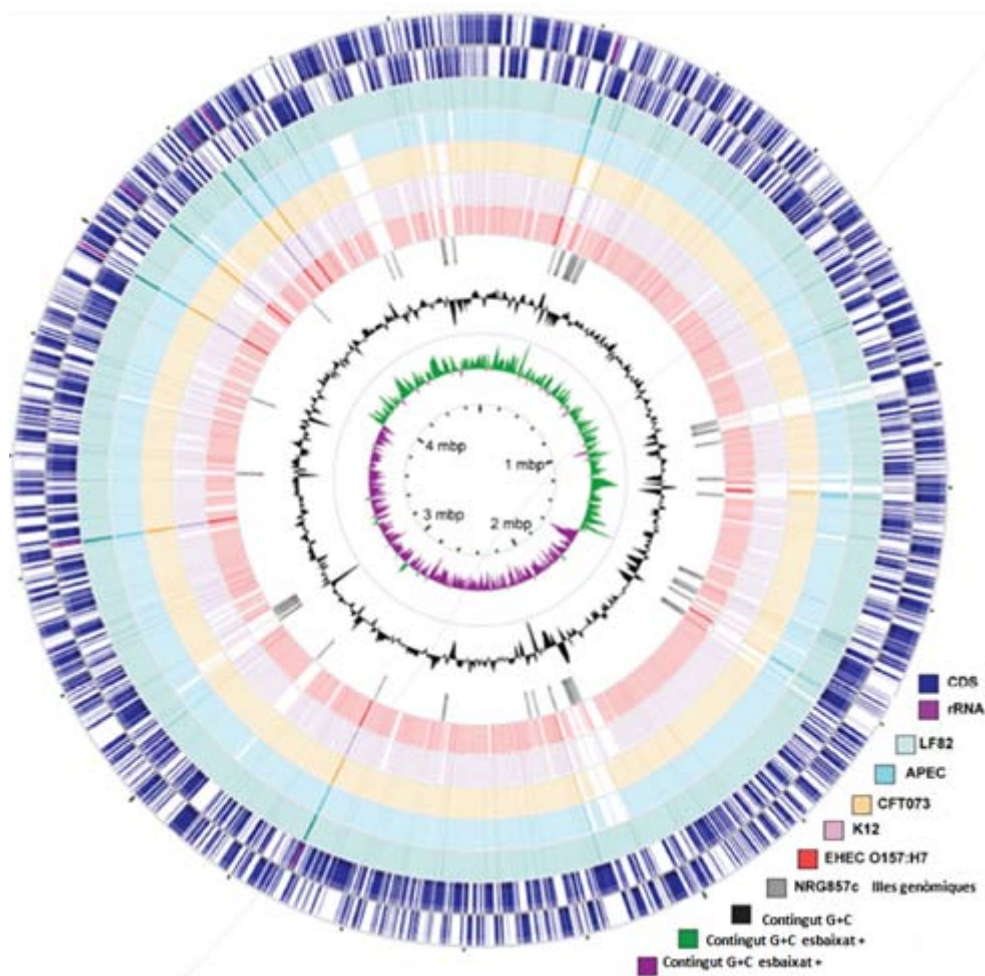
2.2.1.3 E. coli adherent i invasiu

Aquest tipus de soques també denominades AIEC (Adherent invasive *Escherichia coli*) inicialment es va classificar com a un patotipus intestinal, però finalment estudis genòmics han demostrat l'estreta relació del llinatge filogenètic AIEC i ExPEC, que causen UPEC o NMEC. Les soques AIEC comparteixen amb les soques ExPEC característiques fenotípiques que inclouen l'habilitat de colonitzar, envair les cèl·lules eucariotes i induir la resposta inflamatòria en l'hoste. Encara val la pena assenyalar que aquestes anàlisis de seqüenciació del genoma també han demostrat que les soques AIEC contenen gens derivats d'altres enteropatògens com *Salmonella* o *Yersinia*^{56, 63} (figura 9).

L'associació de les soques AIEC en la patogènesi de la malaltia de Crohn (MC) segueix sent un debat obert, però s'ha arribat a implicar en un 36% d'aquests casos. És així, com es creu que la combinació entre la predisposició genètica per a desenvolupar la malaltia i l'augment transitori de la gravetat de la malaltia per participació activa d'aquestes soques i d'altres habitants intestinals es postula com a la millor hipòtesi. Les soques AIEC s'adhereixen a les cèl·lules epitelials a través de fimbries tipus 1, flagels i LPF (*long polar fimbriae*) per l'expressió de CEACAM6 (*Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6*) present en l'ili. Els pacients amb MC tenen una sobreproducció d'aquest antigen que permet que aquest fenomen s'indueixi de manera massiva la producció de TNF- α i INT γ , i per tant un proés inflama ció de la mucosa. Els bacteris poden penetrar a través de la làmina pròpia de l'epiteli intestinal on aquestes interactuen i sobreviuen dins

dels macròfags per a posteriorment exacerbar la inflamació i eventualment formar granulomes^{54, 56}.

Figura 9. Atlas genòmic comparatiu entre soques AIEC i altres patotipus d'*E. coli*. Presa de Nash 2010⁶³. El cromosoma de la soca d'*E. coli* NRG857c (els dos anells més externs representen els CDS; blau fosc), es va comparar amb les següents de soques d'*E. coli*. Començant per l'anell més extern: LF82 (AIEC; blau clar), APEC-O1 (blau), CFT073 (UPEC, groc), MG1655 (K12/commensal, porpra) i *E. coli* O157:H7 (EHEC, vermell). Les illes genòmiques del cromosoma de NRG857c (gris). El contingut de G+C (negre), G/C esbiaixat positiu i negatiu (verd i lila, respectivament).



2.2.1.4 *E. coli* patogen aviari

A més de causar malalties en humans, algunes soques ExPEC poden generar grans pèrdues econòmiques en granges d'engreix i en la indústria avícola. El patotipus APEC (*Avian pathogenic Escherichia coli*), englobat dins de la classificació ExPEC realitzada per Kaper *et al.*, 2004, en particular a els serotipus O78, O1 i O2, causen infeccions extraintestinals tant en aus de corral com a en pollastres, ànecs i altres espècies avícoles^{55, 64}.

2.2.1.5 Altres patotipus

A aquests tres patotipus ExPEC prèviament tractats, s'han d'addicionar tres més descrits en els últims anys en treballs puntuals. i) El primer d'ells causa patologia tant en humans com a animals, denominat *E. coli* necrotoxigènic o NTEC (*Necrotoxicogenic E. coli*), poden allara-se'n d'IU o de femta en animals amb i sense quadres diarreics. Aquestes soques es caracteritzen per secretar toxines com CNF1, CNF2, Cdt (una toxina citotèlia disenterica), fimbries de la família F17 α -hemolisines (HlyA)^{54, 65}. Els altres dos patotipus únicament s'han associat amb malaltia en animals de moment i s'han descrit com: ii) *mammary pathogenic E. coli* (MPEC) i iii) *endometrial pathogenic E. coli* (EnPEC)⁶⁶.

2.2.2 Factors moleculars de patogenicitat

Els microorganismes necessiten factors de nínxol per a promoure la motilitat, la capacitat de colonització, la disseminació o l'adquisició de nutrients⁶⁷. Un patogen extraintestinal com ho són algunes soques d'*E. coli* posseeix en general múltiples adhesines per a fixar-se a diverses cèl·lules de l'hoste (per ex., fimbries: tipus 1, Sfa/Foc o P) i sistemes per a l'obtenció de nutrients (per ex., ferro principalment mitjançant sideròfors), però aquests no són suficients per a tenir èxit com a patogen extraintestinal. La virulència es defineix com l'habilitat d'un microorganisme per a causar malaltia a un hoste prèviament sa. Els factors de virulència (FV) ajuden a determinar quan, una soca pot causar malaltia envaint l'hoste o lesionant-lo per acció de toxines.

En *E. coli* la presència només d'un FV rarament fa que la soca sigui virulenta, únicament les soques dotades dels FV específics seran capaces de produir patologia. En aquest mateix sentit, en molts casos la presència o absència d'un o més gens relacionats amb la virulència i els seus nivells d'expressió poden fer la diferència entre el comportament com a soca patògena o no. En el procés patològic desenvolupat per *E. coli* extraintestinal es necessiten múltiples FV bacterians, ja siguin substancies, estructures o estratègies que contribueixin al potencial d'infecció, internalització o invasió que li permeten resistir l'activitat bactericida del complement o la fagocitosis (per ex., les leucocidines o polisacàrids capsulars).

Sens cap dubte, actualment encara resten per identificar molts gens involucrats en la virulència d'aquest microorganisme. Es per aquest motiu que l'estudi en aquest àmbit de les infeccions causades per *E. coli* ha permès identificar una sèrie de factors bacterians que

determinen la seva capacitat per a causar la infecció. Aquests FV participen principalment en la superació dels mecanismes de defensa innata de l'hoste. Encara que també poden estar implicats en altres funcions crucials de diferents etapes del procés infecció. A continuació es descriuen els factors de virulència més estudiats i amb interès durant el desenvolupament d'aquest document.

2.2.2.1 Factors de virulència associats a infeccions ExPEC

Cada vegada és més clar que els hostes i els seus patògens (p. ex, els humans i les soques ExPEC) s'han adaptat al llarg de l'història evolutiva. Durant aquesta relació hoste patogen, diverses i redundants estratègies han sorgit tant en els agents patògens com als seus hostes, fet que ha permès mantenir la seva coexistència (taula 7).

Taula 7. Interaccions *E. coli* patògena extraintestinal amb l'hoste humà. Presa de Harrison *et al.* 2009¹¹.

Objectiu del bacteri	Obstacles de l'hoste	Solució bacteriana
Fixació extraintestinal	Flux d'orina, neteja mucociliar	Múltiples adhesines (p. ex., fimbries tipus 1, Sfa/Foc, pilositats P)
Obtenció de nutrients per al creixement	Segrest de nutrients (p.ex., ferro a través de emmagatzematge intracel·lular i captació extracel·lular a través de lactoferrina y transferina	Destrucció cel·lular (p. ex., hemolisines); múltiples mecanismes de competència pel ferro extracel·lular (p. ex., sideròfors) i altres nutrients
Elució inicial de la activitat bactericida de l'hoste	Complement, cèl·lules fagocítiques, pèptids antimicrobians	Polisacàrids capsulars, lipopolisacàrids
Transmissió	-	Dany al teixit per irritació, que dona origen a l'increment de la excreció (p. ex., toxines com les hemolisines)
Elució tardia de la activitat bactericida de l'hoste	Immunitat adquirida (p. ex., anticossos específics) Tractament antibiòtic	Entrada en les cèl·lules Adquisició de resistència als antimicrobians

La classificació serològica de 1947 de Kauffmann va resultar molt útil per als estudis epidemiològics, de resistència i de patogènesis en *E. coli*. La combinació dels diferents serogrupos origina els serotipus (O:H:K). Si bé, hi ha una àmplia varietat d'aquests serotips entre les soques comensal, hi ha una predominança de certs antígens entre les soques responsables d'infeccions ExPEC per exemple (O1, O2, O4, O6, O7, O8, O16, O18, O25 O75, O150; i K1, K2, K5, K12)²⁻⁵.

En aquest sentit, la presència de les cadenes polisacàrides de l'antigen O codificat en gens cromosòmics faciliten el procés inicial d'adhesió i donen resistència al bacteri contra l'activitat bactericida del sèrum no immune. Per exemple, es pot determinar la presència del gen *rfa* que codifica l'antigen O4 del lipopolisacàrid. Aquest tipus d'antigen actua com

una coberta termostable i immunògena, responsable del caràcter llis de les colònies i com a conseqüència de l'homogeneïtat *in vitro* de la suspensió bacteriana. Actualment es creu que pertànyer a un determinat serogrup O no confereix major virulència en si mateix a la soca, sinó que determinats serogrupos O s'associen més freqüentment a factors de virulència com posseir antigen K1, fimbries o produir hemolisina. Per tant, la pertinença a un mateix serogrup (serotipus) és un índex d'origen evolutiu comú i en alguns serotipus de virulència³⁵.

Els serogrupos O2 i O78 determinen el potencial virulent de soques ExPEC humanes i aviàries involucrades en un 80% dels casos mundials de septicèmia. Encara que aquests dos serogrupos comparteixen una infinitat de característiques de virulència per exemple les d'adhesió mitjançant pili difereixen en el tipus així: les soques O2 codifiquen als pilis P, mentre que les O78 als pilis AC/I, per a la fimbria polar llarga i adhesines putatives no fimbrials. Una altra variació en els FV entre els dos serotipus és la càpsula; les soques O2 tenen el polisacàrid capsular K1, mentre que les del serotipus O78 els falta aquest antigen capsular, però estan envoltats per una càpsula de tipus IV37³⁵.

De totes maneres, encara que els serotipus s'utilitzen com a un procediment de classificació, que permet determinar clons o llinatges. En alguns casos no es possible determinar-ho en tots el aïllats estudiats. Addicionalment, s'ha observat que encara que els aïllats siguin del mateix grup clonal, aquests no sempre es correlacionen amb el serogrup, però sí amb un conjunt de determinats FV específics. És per aquesta raó que no s'ha d'utilitzar la serotipificació d'antígens com a mètode únic per a comparar soques d' *E. coli*, ja que no és una tècnica apropiada, però si es pot fer servir com una eina complementària a altres metodologies moleculars. En l'última dècada la implementació de la biologia molecular i els avanços tecnològics han proporcionat mètodes per a comparar soques, sent les més recents les de seqüenciació completa de genomes. Aquesta última, però no és una opció pràctica per a comparar un elevat nombre de soques amb finalitats epidemiològiques. Per aquesta raó, s'utilitza la combinació de tipificació: filogenètica, per MLST, camp polsant en gel d'electroforesi, l'anàlisi de plasmidis o el perfil de virulència per a determinar la clonalitat i patogenicitat de soques^{40, 68}.

Estudis recents intenten determinar la correlació entre els FV i la pertinença a un patotipus determinat. En aquest sentit, una varietat de FV s'associen amb soques UPEC, les quals tenen substancialment més FV que les soques fecals. Per exemple, segons Spurbeck

les soques d'ExPEC positives per els gens *vat*, *fyuA*, *chuA* i *yfcV* estan altament associades a soques UPEC, fet que es pot utilitzar com a predictor positiu de potencial uropatogènic⁶⁹.

Els FV es poden agrupar per categories funcionals, per exemple: i) adhesines, ii) sistemes d'adquisició de nutrients (principalment ferro), iii) toxines, iv) mecanismes per a evitar la resposta innata o adquirida (protectines) i v) els trets de funció auxiliar o desconeguda (taula 8). Les soques ExPEC típicament tenen FV especialitzats els quals són poc comuns entre soques comensals o soques patògenes intestinals i que deriven principalment d'*E. coli* dels grups filogenètics B2 i D.

i) Adhesines

Les soques patògenes d'*E. coli* posseeixen factors d'adherència específics que els permeten colonitzar els llocs que normalment no habiten, com l'intestí prim o la uretra per exemple. Durant el procés infecció és fonamental que el microorganisme sigui capaç d'establir i colonitzar les superfícies mucoses de l'hoste. L'adherència bacteriana és el terme que defineix la unió dels bacteris a diferents superfícies i suposa un determinant ecològic important en la colonització de plantes i animals. Hi ha diferents molècules d'adhesió que faciliten l'acostament i la unió del bacteri a receptors específics presents en les cèl·lules dels teixits infectats^{2, 70}.

En l'adherència actuen 2 tipus diferents de mecanismes: inespecífics i específics. Els mecanismes inespecífics estan compostos per forces fisicoquímiques que intervenen un primer contacte entre bacteris i diferents superfícies. Aquest contacte permetrà en segon terme l'actuació de mecanismes específics que s'establiran i organitzaran l'adherència. Entre els mecanismes inespecífics destaquen: les forces electrostàtiques de Van der Waals i les interaccions hidrofòbiques. Els mecanismes específics es regeixen per un sistema adhesina receptor, es consideren específics perquè l'adherència pot ser bloquejada en afegir un excés de receptors, adhesines, anticossos, antireceptors o antiadhesines.

En aquests últims anys, s'ha avançat considerablement en el coneixement de les estructures implicades en els mecanismes específics d'adherència. El microorganisme més extensament estudiat ha estat *E. coli*, al qual s'ha aconseguit relacionar de manera conclouent l'expressió de certes adhesines amb la capacitat de produir infecció. Es creu que els genomes de les soques UPEC poden portar més de 10 gens relacionats amb l'adhesió (taula 9)⁵.

Taula 8. Trets associats amb la virulència de soques d'*E. coli* per categoria funcional.

Adaptada de Russo i Johnson 2009¹⁴ i Johnson i Russo 2005⁷¹.

Categoria	Gen/operó	Descripció	Estudis amb evidència del tret com a factor de virulència	
			Epidemiològica*	Experimental (in vivo)**
Adhesines***	<i>pap</i>	Pili associat amb pielonefritis (fimbries P)	Si (Arthur et al., 1989; O'Hanley et al., 1985)	Si (Roberts et al., 1994); no (Mobley et al., 1993)
	<i>sfa/foc</i>	Fimbries S i F1C	Si (Schönian et al., 1992)	Si (Marre and Hacker, 1987)
	<i>sfa</i>	Fimbries S (específiques de l'àcid siàlic)	Si (Johnson et al., 2002)	Si (Marre and Hacker, 1987)
	<i>foc</i>	Fimbries F1C	Si (Pere et al., 1985)	Si (Marre and Hacker, 1987)
	<i>afa/dra</i>	Operó d'adhesines específiques de l'antigen Dr (AFA I-III, Dr, F1845)	Si (Nowicki et al., 1989; Zhang et al., 1997)	Si (Goluszko et al., 1997)
	<i>afa E-8</i>	Adhesina afimbrial VIII	Si (Le Bougenec et al., 2001)	No
	<i>iha</i>	Adhesina del gen homòlog de regulació del ferro (de soques O157:H7 i CFT073)	Si (Johnson et al., 2000; Kanamura et al., 2003)	Si (Johnson et al., 2005)
	<i>hmo E</i>	Adhesina específica del grup sanguini M	No	No
	<i>gaf D</i>	Adhesina fimbrial específica de N-acetil-D-glucosamina (G, F17c)	Si (Bertin et al., 1996)	No
	<i>cfp G</i>	Adhesina CS31A (relacionada amb K88)	Si (Bertin et al., 1996)	No
	<i>nfa</i>	Adhesina no fimbrial (NFA-1, -2, -3 i -4)	No (Goldhar et al., 1987; Grünberg et al., 1988; Hoschützky et al., 1989)	No
	<i>csg A</i>	<i>Curl</i>	Si (Bian et al., 2000)	Si (Bian et al., 2001)
	<i>fim</i>	Fimbria tipus 1, adhesina específica de D-manosa	Si (Mobley et al., 1987; Sokurenko et al., 1995)	Si (Connell et al., 1996; Langermann et al., 1997)
	Antigen 43	Adhesina de autoreconeixement	Si (Restieri et al., 2007)	Si (Ulett et al., 2007)
	Nutrició	<i>irp, fyu A</i>	Síntesi i receptor de yersinobactina (sideròfor)	Si (Clermont et al., 2001; Schubert et al., 1998)
<i>iuc, iut A</i>		Síntesi i receptor de aerobactina (sideròfor)	Si (Clermont et al., 2001; Fernandez-Beros et al., 1990)	Si (Torres et al., 2001)
<i>iro N</i>		Salmochelina, receptor de catecolat (sideròfor)	Si (Bauer et al., 2002; Johnson et al., 2000b)	Si (Negre et al., 2004; Russo et al., 2002)
<i>ire A</i>		Proteïna externa de membrana. Element regulador de ferro (sideròfor)	Si (Russo et al., 2001)	Si (Russo et al., 2001)
<i>chu A</i>		Hemo receptor	Si (Clermont et al., 2001)	Si (Torres et al., 2001)
<i>ent F</i>		Síntesi d'enterobactina	No	Si (Negre et al., 2004)
<i>ton B</i>		Expressió de sideròfor	-	Si (Negre et al., 2004)
<i>gua A</i>		Síntesi guanina	-	Si (Russo et al., 1996)
<i>arg C</i>		Síntesi arginina	-	Si (Russo et al., 1996)
<i>acr A,B,R,Y</i>		Fosfotransferasa específica de sucrosa	Si (Sorsa et al., 2007)	-
Toxines***	<i>hly</i>	α -hemolisina	Si (Brooks et al., 1980)	Si (O'Hanley et al., 1991; Welch et al., 1981)
	<i>cnf 1</i>	Factor citotòxic necrosant 1	Si (Caprioli et al., 1987)	Si (Khan et al., 2002; Rippere-Lampe et al., 2001, 2001)
	<i>cdt B</i>	Toxina de distesió citoletal	Si (Johnson et al., 2002)	No
	<i>sof</i>	Toxina secretada autotransportadora (autotransportador serina proteasa)	Si (Guyer et al., 2000)	Si (Guyer et al., 2000)
	<i>pic, tsh</i>	PIC i TSH, toxines secretades autotransportadores	Si (Heimer et al., 2004)	Si (Dozois et al., 2000; Heimer et al., 2004)
	<i>ast A</i>	EAST1 (citotoxina termoestable citotoxina associada amb EAEC)	Si (Janben et al., 2001)	No (Savarino et al., 1993)
	Protectines	<i>kps MT II</i>	Síntesi del polisacàrid capsular del grup II (p. ex., K1, K2, K5, K12)	Si (Cross et al., 1984; Johnson and Stell, 2000; Orskov et al., 1982)
<i>kps MT III</i>		Síntesi del polisacàrid capsular del grup III (p. ex., K3, K10, K54)	Si (Cross et al., 1984; Johnson and Stell, 2000; Orskov et al., 1982)	Si (Russo et al., 1994, 2003)
<i>rjc</i>		Síntesi de lipopolisacàrid (LPS) O4	Si (Korhonen et al., 1985; Opal et al., 1988)	Si (Russo et al., 1996, 2003)
<i>cva C</i>		Microcina ColV, en plasmidi amb <i>tra T</i> , <i>iss</i> , gens de resistència, <i>iuc/iut</i>	Si (Fernandez-Beros et al., 1990)	Si (Aguero et al., 1989)
<i>iss</i>		Augment de la supervivència en sèrum	Si (Delicato et al., 2003; Fernandez-Beros et al., 1990)	Si (Binns et al., 1979)
<i>tra T</i>		Exclusió de superfície, associada a supervivència en sèrum (proteïna de membrana externa)	Si (Fernandez-Beros et al., 1990)	No (Montenegro et al., 1985)
<i>pro P</i>		Osmoprotecció, prolina proteasa	-	Si (Culham et al., 1998)
<i>oxy R</i>		Regulador d'estrès	-	Si (Johnson et al., 2006)
Altres	<i>omp T</i>	Proteïna T de membrana externa (proteasa)	Si (Lundrigan and Webb, 1991)	No
	<i>omp A</i>	Proteïna A de membrana externa (invasió cel·lular)	-	Si (Kim, 2001)
	<i>ibe A-C</i>	Invasió de l'endoteli cerebral IbeA (Ibe10), B, i C	Si (IbeA) (Johnson et al., 2002)	Si (Kim, 2001)
	<i>asf A</i>	Invasió cel·lular (gen semblant a una arilsulfatasa)	-	Si (Kim, 2001)
	<i>tra J</i>	Invasió cel·lular (transferència de la regió homòloga del plasmidi F-like)	No	Si (Kim, 2001)
	<i>usp</i>	Proteïna específica de uropatogènesi (bacteriocina)	Si (Kurazono et al., 2000)	Si (Yamamoto et al., 2001)
	PAI	marcador de la illa de patogenicitat (de la soca CFT073)	Si (Johnson et al., 2001a, 2003)	No (Johnson et al., 2002)
	<i>fli</i>	Flagelina	-	Si (Lane et al., 2005)
<i>uko E-K</i>	Desconegut	Si (Sorsa et al., 2007)	-	

* Associació estadística amb aïllaments clínics o amb les característiques de l'hoste específic, o una alta prevalença en una síndrome d'infecció extraintestinal específica

** Sobre la base d'estudis realitzats en models animals d'infecció, no necessàriament utilitzant soques isogèniques o mutants complementats.

*** Certes adhesines i toxines també funcionen com invasives, p. ex., fimbries tipus 1, algunes adhesines d'unió Dr, i CNF1 (Khan et al., 2002; Mulvey et al., 2000; Selvarangan et al., 2001).

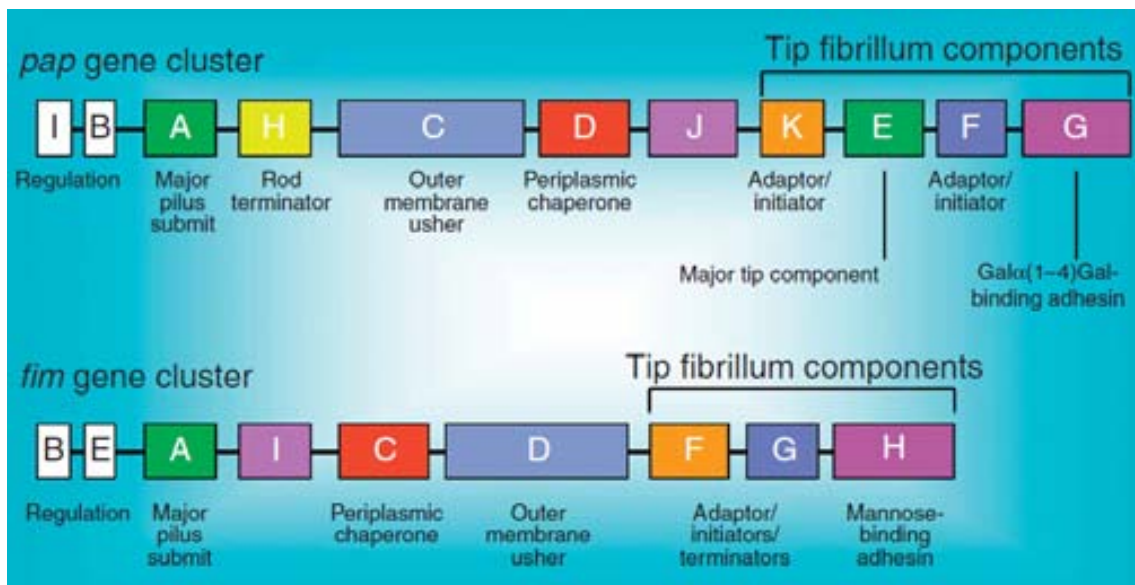
Es coneixen dos tipus d'adhesines en *E. coli*, les fimbriades i les no fimbriades: les fimbries són projeccions filamentoses no flagel·lars que surten de la superfície bacteriana de naturalesa proteica, més curts i prims que els flagels. Poden haver des de molt pocs fins a 400 fimbries per bacteri (el nombre de flagels és d'1 a 4) i en *E. coli* adopten una disposició períttrica. El diàmetre fimbrial està comprès entre 2-7 nm amb una longitud aproximada de 4 micres. Poden ser rígides o flexibles. Estan constituïts per subunitats proteiques globulars (pilina), amb un pes molecular de 15 a 25 kDa/subunitat. De vegades, es troben petites quantitats de fosfats, carbohidrats i fosfolípids associats a les proteïnes. El nombre d'unitats de pilina i la manera d'associar condicionen la longitud, el diàmetre, el pes molecular i l'estructura dels diferents tipus de fimbries. Les fimbries no són òrgans de locomoció sinó d'adhesió i participen en el procés de transferència de material genètic, cadascuna d'aquestes funcions està produïda per diferents fimbries, és de manera que s'ha proposat que es denominin fimbries als filaments implicats en l'adhesió i pili als implicats en la transferència de gens⁷⁰.

Tot i que la possessió de fimbries està codificada genèticament, la seva expressió es modifica per factors fisicoquímics. En una cèl·lula fimbriada, del 1-2% de les proteïnes produïdes s'empren per a la formació de fimbries, si deixa de ser fimbriada, aquestes proteïnes s'empren en el creixement i en la reproducció. Els factors que més influeixen en l'expressió de fimbries són la temperatura, els medis de cultiu, l'etapa de creixement i la variació de fase (canvi d'expressió d'un tipus de pili per un altre més adient pel procés patogènic). En efecte, l'expressió de fimbries és òptima a temperatures fisiològiques i disminueix quan la temperatura baixa fins als 18 °C, en aquest moment es paralitza la producció de fimbries. L'expressió de fimbries tipus 1 és suprimida al subcultivar la soca en medis sòlids, per contra l'expressió de fimbries P és alterada al subcultivar-la en medis líquids. Les fimbries tipus 1 s'expressen en l'etapa estacionària del creixement, encara que alguns autors creuen que la seva expressió es manté constant en totes les etapes. La variació de fase és un fenomen que afecta tant les fimbries tipus 1 com a les fimbries P, en soques que només tenen fimbries tipus 1 aquesta variació implica el pas a la no fimbriació i viceversa, però en microorganismes en què coexisteix més d'un tipus de fimbries, cadascuna d'elles podrien expressar-se en moments diferents, sent la variació de fase el mecanisme que ajudaria a *E. coli* a sortejar els mecanismes de defensa de l'hoste i per exemple colonitzar l'uroepiteli. Aquestes propietats adhesives determinaran la localització del bacteri als òrgans urinaris^{1, 5, 29}.

Taula 9. Tipus d'adhesines en soques ExPEC. Adaptada de Sobel i Kaye 2010²⁹, Donnenberg *et al.*, 2010¹, Antao *et al.*, 2009⁷⁰ i Wiles *et al.*, 2008⁵.

Adhesines	Reacció a la manosa	Seqüència genètica	Receptor	Comentaris
Fimbries tipus 1	Sensibles	<i>pil</i> , <i>fim H</i> , <i>fim B</i> , <i>fim E</i>	Proteïnes manosilades a les cel·lules epitelials i neutròfils. Uroplaquina 1a (bufeta), integrines: subunitats $\alpha 3$ i $\beta 1$ o GTPasas Rho, quinases: d'adhesió focal (QAF), Src i PI-3, i proteïnes adaptors com α -actina i vinculina. Elevats nivells de cAMP a l'hoste (estimulació de receptors TLR4)	IU (cistitis), meningitis (travessa barrera hematoencefàlica). Unió a proteïna de Tamm-Horsfall i SIgA (immunoglobulina A)
Fimbries P	Sensibles	<i>pap GI</i>	Glicolipid [α -D-galactopiranosil-(1-4)- β -D-galactopiranosil-Gal-Gal. Antigen del grup sanguini P i cèl·lules urotelials)	Baixa freqüència
		<i>pap GII</i>	Gal-Gal globoside GbO4 (globotetraosilceramida) i GbO3 (Gal(α 1-4 β)Gal)	IU (pielonefritis i primer cas de cistitis) i bacterièmia
		<i>pap GIII</i>	GbO5 (globopentaosilceramida), GloboA (Gal(α 1-4 β)Gal) i l'antigen de Forssman	IU (cistitis). Predomina entre pacients amb anormalitats de les vies urinàries.
Fimbries S	Resistents	<i>sfa/fac</i>	Sialil-(α -2-3) galactòsid	IU, meningitis (travessa barrera hematoencefàlica), septicèmia i patologia d'aus.
Fimbries tipus F1C	Resistents	<i>foc</i>	Lactosilceramida (glicolípids)	Possible associació amb pielonefritis i epitel·li bucal
Fimbries G	Resistents	<i>gafD</i>	Terminal N-acetil-D-glucosamina	
Fimbries M	Resistents		Galactosal N-acetil-galactosamina	
Fimbries tipus 3	-	<i>mrk ABCDF</i> , <i>bma E</i>	Grup sanguini M (α -glicoforina)	IU (cistitis). Contribueix a la formació de biofilm
Família Dr (fimbriades i no fimbriades)	-	Operó <i>Drb</i> , <i>afa</i> , <i>dra</i> .	Grup sanguini Dr, component de l'antigen DAF (<i>decay accelerating factor</i>) i col·lagen tipus IV	IU (cistitis i pielonefritis)

Figura 10. Representació esquemàtica dels operons *fim* i *pap*. Presa de Hung *et al.*, 2009⁷².



a. Fímbries tipus 1 (FimH): les fímbries tipus 1 o també anomenades pili comú són les que es troben més freqüentment a *E. coli* (més del 95%) i altres enterobacteris. Es tracta d'estructures rígides de 7 nm de diàmetre, formades per subunitats de proteïnes o pilines. Aquestes subunitats estan organitzades com una estructura helicoidal, amb un forat axial i amb interaccions entre elles, tant laterals com en els extrems donant-li rigidesa a l'estructura. El pes molecular de cada subunitat oscil·la entre 15,7 i 17,1 kDa, segons diferents autors. Cada fímbria està composta aproximadament per 1.000 subunitats. Les fímbries tipus 1 estan codificades en un operó integrat per nou gens (de *fimA* a *fimH*) que codifiquen proteïnes estructurals i regulatòries (figura 10)^{29,70}.

Aquestes fímbries permeten la colonització transitòria de l'orofaringe i permeten la transmissió fecal/oral entre hostes. Encara que FimH juga un paper primordial en la IU, també es troben en altres soques ExPEC. El receptor de les fímbries tipus 1 està constituït per unitats de manosa presents en els glucolípidis de les membranes cel·lulars de tots els teixits. Totes les espècies animals posseeixen aquest receptor. Les fímbries tipus 1 tenen una adhesivitat relativament inespecífica ja que es fixen tant a cèl·lules animals com a vegetals i fongs. La regulació d'aquest operó és dependent de la fase de creixement, s'activa entre soques de pacients amb cistitis i es reprimeix en aquells amb pielonefritis.

De la mateixa manera, experimentalment als models *in vivo* s'observen diferències en l'expressió de *fim* en una mateixa soca causant infecció a nivell de bufeta o de ronyó. Igualment, hi ha diferències en l'expressió d'aquest operó entre soques clíniques aïllades

d'IU i comensals, degut a que les clíniques expressen una variant de *fim* que s'uneix als receptors de monomanosa i al mateix temps als de trimanosa per a adaptar-se al procés de colonització de la bufeta, mentre que les soques comensals expressen la variant de *fim* que només reconeix els receptors de trimanosa que són més apropiats per a la colonització intestinal. Aquest exemple, indica que el total enteniment de la virulència de soques ExPEC requereix més d'una simple identificació dels gens de virulència^{13, 40}.

Mitjançant estudis d'experimentació animal s'ha demostrat que l'adhesió per fimbries tipus 1 és un factor important en les infeccions del tracte urinari inferior, ja que permet la colonització de la bufeta pas previ a la infecció renal. Que en condicions normals les soques amb fimbries tipus 1 exclusivament, no colonitzen ni envaeixen la pelvis renal, però que si existeix reflux vesicoureteral, aquestes fimbries juguen un important paper en la colonització renal.

D'altra banda, encara que aquest tipus de fimbria afavoreixi l'establiment inicial del microorganisme a les superfícies mucoses, a les etapes posteriors del procés infecció resulta perjudicial per al bacteri ja que és una estructura reconeguda pels sistemes de defensa de l'organisme. Concretament, les fimbries tipus 1 són reconegudes per receptors que contenen manosa, presents en la superfície dels leucòcits. La unió de l'adhesina a aquests receptors provoca la fagocitosi i la mort del bacteri a l'interior dels leucòcits, mitjançant un procés conegut com a lectinofagocitosi. Per a evitar aquest mecanisme de defensa el bacteri controla l'expressió de les fimbries tipus 1 als teixits, amb capacitat de revertir el fenotip no fimbriat. L'adquisició horitzontal de l'operó *frz* (que codifica una quinasa), ha sigut relacionat amb la capacitat metabòlica de soques EXPEC amb l'expressió de gens requerits per a l'adherència a l'epiteli de la bufeta. La presència d'aquest operó afavoreix la transcripció del promotor invertible de les fimbries tipus 1⁷³.

b. Fimbries P (Pap): anomenades també fimbries PAP (*pyelonephritis associated pili*), ja que es forma un complex entre el receptor i l'antigen del grup sanguini P, present als eritròcits humans i les cèl·lules urotelials. Morfològicament indistingibles de les fimbries tipus 1, Aquestes proteïnes són codificades en l'operó *pap*, que consta d'onze gens (*papA* a *papK*) que donen lloc a la formació d'una fibra helicoidal de 7 nm de diàmetre amb un forat axial i coronada per una proteïna anomenada *papG*, la qual és la responsable de l'especificitat d'unió al receptor (figura 10)⁷².

El receptor de la fimbries P és l'estructura α -D-Galp-(1-4)-BD-Galp, un disacàrid contingut en el glucoesfingolípids situat a la membrana de les cèl·lules dels ronyons. Els glucoesfingolípids s'estructuren en una meitat lipídica (ceramida) enclavada en la membrana cel·lular i una meitat glúsid (globósid) projectada cap a fora de la cèl·lula i que conté l'estructura α -D-Galp-(1-4)- β -D-Galp. Els teixits humans que posseeixen aquest disacàrid són els hematies del grup P i les cèl·lules epitelials de la bufeta, urèter, pelvis renal, túbul proximal i túbul col·lector; alguns autors ho detecten també en vagina. L'home, el porc i el mico són les úniques espècies animals que posseeixen aquest receptor⁷⁰.

Estudis d'experimentació animal han permès concloure que soques d'*E. coli* únicament amb fimbries P i sense altres factors de virulència són capaços de colonitzar la pelvis renal, però no provoquen invasió tissular, mentre que soques d'*E. coli* amb fimbries P i altres FV són capaços de colonitzar i envair, el que indica d'una banda que les fimbries P promouen la colonització renal i per una altra que la colonització i infecció són dos esdeveniments patològics diferents. Addicionalment, també s'ha demostrat que soques d'*E. coli* amb fimbries P, poden conduir a un reflux vesicoureteral permanent i ocasionant pielonefritis i cicatrius renals. Hi ha una predominança de soques d'*E. coli* que expressen la variant II del *papG* de les fimbries P associades a pielonefritis bacterièmiques¹³. Així mateix, l'al·lel III del gen s'associa majoritàriament amb casos de cistitis i comunament present en soques aïllades d'animals domèstics com gossos o gats amb IU. La seqüenciació del pèptid del PapG III aïllat d'humans o animals i els estudis *in vivo* demostren la transmissió interespecie. Addicionalment, un elevat nombre de gens ExPEC es detecten entre les soques canines i felines d'*E. coli*, indicant que comunament les soques ExPEC d'animals domèstics i humanes expressen l'al·lel III de *papG*, el que suggereix que aquests animals poden ser un reservori de soques ExPEC que tenen la capacitat d'induir malaltia extraintestinal en humans ja que els mecanismes patogènics són similars entres espècies. Per aquest motiu, si la colonització en humans es produeix amb soques ExPEC animals, els antimicrobians utilitzats en la pràctica veterinària podrien permetre la selecció de resistència antimicrobiana^{4, 68, 74, 75}.

c. Fimbries S (Sfa): són morfològicament idèntiques a les fimbries tipus 1 i P, amb un diàmetre de 5-7 nm i una longitud d'1-2 micres. El seu receptor cel·lular és l'estructura sialil-(α 2-3)-galactósid, aquesta estructura que es troba en les seqüències terminals de glicoproteïnes i glicolípids de diversos teixits, incloent els hematies i el cervell humà. Les fimbries S mostren una hemoaglutinació que és abolida si prèviament són tractades amb

neuraminidasa o quan a la reacció s'hi afegeixen oligosacàrids amb seqüències sialil-galactosa⁷⁰.

Les fimbries S es troben només en soques pertanyents a un nombre limitat de serotipus, sobretot del serotipus O18ac:K1:H2, sovint en soques productores de meningitis neonatal. Aquesta baixa freqüència de fimbries S en *E. coli* pielonefritis, pot ser deguda a l'abundant presència en l'orina d'oligosacàrids amb seqüències sialil-(α 2-3), els quals s'unirien preferentment a les fimbries S i no als seus receptors cel·lulars¹.

d. Família de fimbries Dr (AFA/Dr): aquesta família de hemaglutinines manosa resistents inclou les adhesines fimbrials Dr, compostes per quatre gens (*draACDE*) que codifiquen la proteïna estructural. A més inclou unes adhesines no fimbriades amb cinc gens a l'operó (*afaAEDBC*) responsables de quatre tipus diferents d'operó (*afa-1* a *afa-4*) que originen les varietats designades com AFA-I a AFA-IV. Químicament són molt similars, però a l'hora morfològicament molt diferents de les altres fimbries d'*E. coli*. Són fimbries que colonitzen l'intestí prim i s'han implicat en diarrea infantil (18 mesos i 5 anys), així mateix en infeccions recurrents del sistema urinari en adults i d'animals, principalment pielonefritis cròniques i nefritis intersticials^{1, 29, 70}. Els receptors presents a la superfície intestinal i de les cèl·lules epitelials urinàries són els diferents epítops de l'antigen del grup sanguini Dr, expressats per soques DAEC i UPEC unides al factor DFA (*Decay-Accelerating Factor*)⁵⁴.

e. Fimbries M (*bmaE*): el seu receptor cel·lular específic és la seqüència àcid-amino-terminal del antigen del grup sanguini M que es troba a una glicoproteïna, la glicoforina A. Aquesta adhesina no fimbrial de 19,5 kDa no té reactivitat creuada i comparteix homologia de seqüència amb altres adhesines d'*E. coli*⁷⁶.

f. Fimbries F1C (*FocG*): són fimbries primes de 7 nm de diàmetre, 1 μ m de longitud, d'estructura molt semblant a les fimbries tipus 1 i genèticament molt homòlogues a les fimbries S. Aquestes fimbries no participen en l'hemoaglutinació d'eritròcits (humans, bous, cavalls, cobais o pollastre), però sí en l'adherència a les cèl·lules uroepitelials i bucal. Freqüentment s'associen amb soques causants de cistitis.^{70, 76}.

g. Adhesina no hemaglutinina (*Iha*): el gen *iha*, codifica una proteïna de membrana externa d'adherència d'*E. coli* patògenes, confereix adherència similar a la produïda per *Vibrio cholerae* amb la proteïna IrgA. *Iha* es va caracteritzar per primer cop en l'*E. coli*

O157:H7 i posteriorment en soques UPEC. Es suggereix que té una doble funció en la patogènesi de la IU, per exemple, a la soca UPEC CFT073 funciona com a un factor d'urovirulència, contribuint a la colonització en la IU durant la inoculació del model murí. Per altra banda, en la soca UPEC UCB34 s'ha identificat com a un sideròfor receptor per a la captació de ferro, sent regulada aquesta última funció per la proteïna reguladora de ferro (FUR)^{77,78}.

h. Aglutinina resistent a la calor (Hra, *Heat resistant agglutinin*): és una hemaglutinina resistent a la manosa, que està present en més de la meitat de soques causants d'IU i únicament a un quart de soques fecals, d'aquí el seu paper virulent. És un FV d'origen IPEC especialment relacionada amb soques ETEC. Funciona com a proteïna extramembranal que actua com a adhesina no fimbrial que promou l'aglutinació d'eritròcits humans i cèl·lules del còlon⁷⁹.

i. Fímbries G (GafD): aquestes fímbries s'uneixen a les fraccions terminals N-acetil-D-glucosamina i aglutinen els eritròcits després del tractament amb endo- β -galactosidasa per exposar els residus interns de GlcNAc. L'estructura N terminal d'aquestes fímbries es similar a les fímbries K99 de les soques IPEC i algunes fímbries P⁷⁶.

j. Família d'adhesines F17 (F17c): aquestes adhesines són prevalents en soques d'*E. coli* aïllades en bovins durant processos diarrèics (ETEC) i septicèmics. La família inclou les adhesines F17a, F17b, F17c i F111 que promouen la inhibició de l'hemoaglutinació de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) en eritròcits bovins. Encara que cada subtipus probablement reconeix diferents seqüències i receptors d'oligosacàrids als teixits de l'hoste. El subtipus F17c es troba altament associat amb la presència de CNF2 al plasmidi Vir⁸⁰.

k. Antigen fimbrial de superfície CS31A o *coli-surface-associated antigen* (ClpG): l'antigen fimbrial CS31A va ser descrit per primera vegada a les soques ETEC i les causants de septicèmia bovina. Actua com a un factor de colonització mitjançant la promoció de l'adhesió a cèl·lules epitelials. Els gens que codifiquen CS31A es troben en plasmidis R auto-transmissibles que tenen un gran pes molecular. Es descriu com una proteïna de 29-kDa relacionada amb el grup de proteïnes dels K88 que s'organitzen en orgànuls molt fins al voltant de les cèl·lules bacterianes^{81,82}.

ii) Sistemes de captura de ferro d'alta afinitat

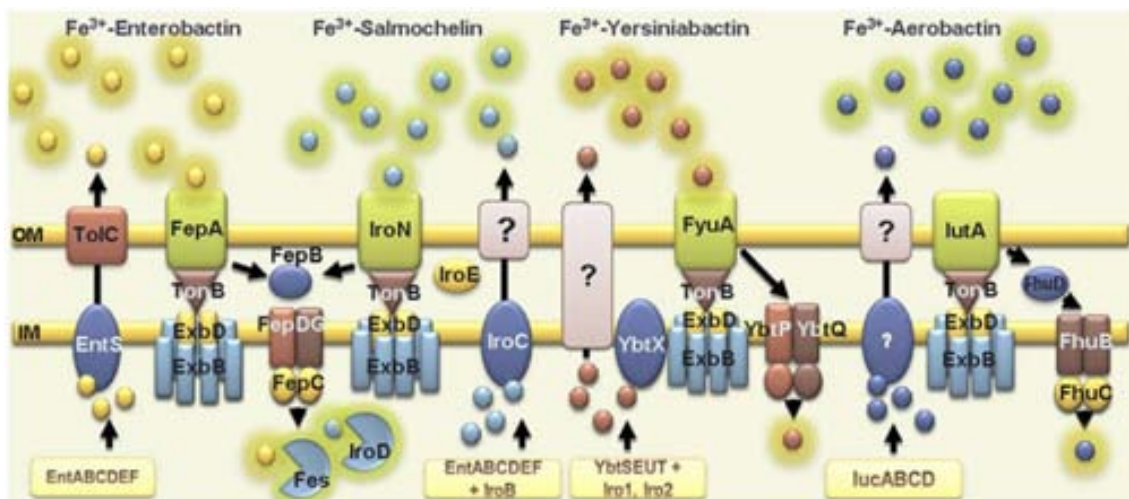
La majoria dels patògens bacterians han de competir amb el seu hoste pel ferro, un nutrient essencial per a la supervivència. Per a molts patògens aquest procés implica la secreció de quelants de baix pes molecular anomenats sideròfors, els quals segresten i solubilitzen d'una altra manera el ferro inaccessible del medi ambient. L'habilitat de secretar sideròfors i subseqüentment la internalització del complex sideròfor-fèrric és crític per a la virulència de molts bacteris patògens. En els bacteris gramnegatius els sideròfors fèrrics són internalitzats de manera conservada utilitzant una família de transportadors de membrana externa, els quals comparteixen semblança estructural i de seqüència amb els anomenats transportadors TonB dependents⁸³.

El creixement bacterià en els teixits infectats es veu limitat no només per l'acció dels mecanismes de defensa de l'hoste, sinó també per la disponibilitat de ferro a l'hoste ($\sim 10^{-25}$ M). Per això, per a captar aquest element, que habitualment no es troba en forma lliure, sinó associat a proteïnes, els bacteris han desenvolupat dues estratègies diferents: i) disposar de receptors dels transportadors de ferro ja siguin intracel·lulars (mioglobina, ferritina, hemoglobina, etc) o extracel·lulars (lactoferrina i transferina) i ii) secretar compostos quelants, denominats sideròfors, de baix pes molecular i capaços de quelar Fe^{+3} associat a les proteïnes transportadores. Els sideròfors tenen una alta afinitat per a aquesta manera de ferro, ja que presenten una constant de dissociació d'entre 1022 i 1055 i són interioritats en el bacteri mitjançant receptors específics, localitzats a la paret bacteriana. Aquest sistema estan sota control d'un regulador transcripcional denominat *FUR* (*ferric uptake regulator*) el qual activa la transcripció de gens quan hi ha baixes concentracions de ferro¹.

L'expressió de sistemes per a l'adquisició de ferro que utilitzen sideròfors per a segrestar ferro de l'ambient i posteriorment concentrar-lo al citosol bacterià és fonamental en l'habilitat per a colonitzar i persistir a l'hoste en nínxols pobres en ferro, com al sistema urinari, ja que limita la disponibilitat de ferro que és una important defensa de l'hoste contra la invasió de patògens bacterians. En alguns casos, la possessió de múltiples sistemes de captació de ferro facilita la supervivència del bacteri en condicions molt diverses és per això que normalment es troba més d'un sistema de captació de ferro en soques d'*E. coli*. La possessió de múltiples sideròfors pot ser un benefici addicional pel bacteri davant diferents condicions ja que cadascun posseeix una afinitat i estabilitat diferent depenent del teixit de l'hoste^{84, 85}.

Els FV involucrats en l'adquisició de ferro tenen una elevada prevalença en les soques ExPEC. En els teixits i sang d'aus i mamífers, el ferro està unit a proteïnes com la transferrina i sistemes per a la quelació de ferro que són el punt clau dels FV necessaris a segrestar el ferro d'aquestes proteïnes de l'hoste. A la família dels enterobacteris s'han descrit dos grups de sideròfors, sent l'enterobactina i l'aerobactina els membres més destacats. Entre les soques ExPEC es coneixen fins a quatre tipus diferents de sideròfors: enterobactines, *salmochelina*, yersiniabactines i aerobactines. Malgrat les seves diferències químiques entre ells cada sistema inclou: síntesi, exportació, recepció de la unió sideròfors+fèrric de la superfície extramembranal, internalització i alliberació de ferro al citoplasma (figura 11)^{5, 40, 86}.

Figura 11. Diferents models per a l'adquisició de ferro en soques ExPEC. Presa de Garénaux *et al.*, 2011⁸⁶.



a. Enterobactina: és produïda per totes les soques d'*E. coli* (patògenes i no patògenes) i per altres enterobacteris patògens com *Salmonella* i *Klebsiella*. 15 gens organitzats en un *cluster* són els responsables de la biosíntesi i transport de l'enterobactina⁸⁶.

b. Salmochelina (iro): el locus IroA identificat per primera vegada en *Salmonella enterica* és el responsable de la producció d'aquest sideròfor. El locus esta comprès per dos regions convergents. Una que conte *iroBCDE* i l'altre que conté el gen *iroN*, que codifica el receptor, reconeix la *salmochelina* amb el ferro unit i el transporta dins del citosol bacterià. A les soques ExPEC aquest gens generalment estan codificats en plasmidis de virulència com ColV o ColBM, encara que també s'han trobat en PAI. *iroN* juga un paper important en la virulència de les soques UPEC, NMEC i APEC^{5, 50, 86}.

c. Aerobactina: va ser aïllada d'*Enterobacter (Aerobacter) aerogenes*. És el sideròfor més efectiu dels molts sistemes per a la quelació del ferro, desenvolupat per les bacteries entèriques. Per això, està present en moltes soques d'*E. coli* aïllades d'infeccions extraintestinals, i en particular amb una elevada prevalença entre les soques SEPEC. Es troba tant al cromosoma, com a en plasmidis de virulència (pColV o ColBM). Actua com a agent quelant del ferro competint amb la transferrina serina. En moltes soques d'*E. coli* la biosíntesi de l'aerobactina està codificada en cinc gens anomenats *iucABCD* (*iron uptake chelate*) i el receptor *iutA* (*iron uptake transport*). La producció de l'aerobactina és regulada per les concentracions intracel·lulars de ferro mitjançant FUR^{76, 86}.

d. Receptor de sideròfors (FyuA i IreA) i d'hemina (ChuA): són receptors específics extramembranals que intervenen en la captació del complex ferro+sideròfor. Per tant són receptors al igual que els d'altres sistemes (*iroN* o *iutA*) dependents de TonB-ExbB-ExbD com a sistema de transducció d'energia mitjançant la utilització de forces protòniques a la membrana citoplasmàtica per a la internalització del complex⁸⁶. ChuA juga un paper primordial en la colonització de la bufeta i el ronyó, així com també en la formació d'IBC en les cèl·lules epitelials de la bufeta⁸⁷.

e. Sistema transportador de metal (*sitABCD*): aquest sistema fa de mediador en el transport de ferro i manganès contribuint a la virulència de soques ExPEC i en particular a les APEC^{55, 86}.

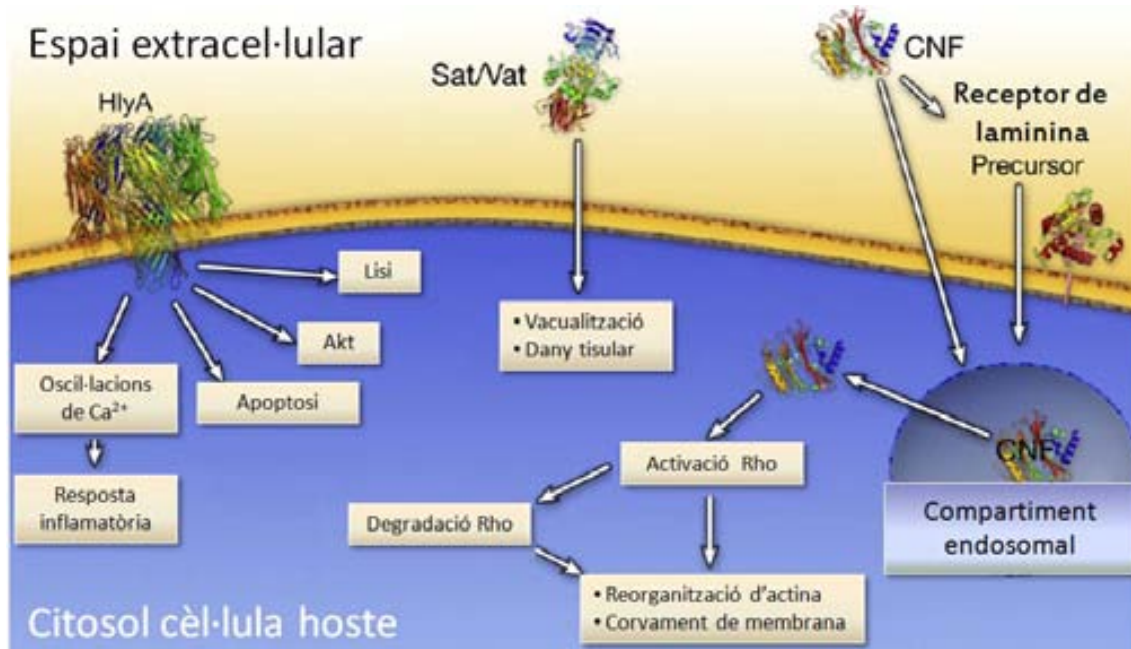
iii) Toxines

Les toxines van ser els primers FV bacterians millor estudiats en general. Aquestes substàncies poden ser alliberades directament pel bacteri tant a l'ambient o dirigits a les cèl·lules hoste. Les toxines són nombroses i poden ser categoritzades en diversos sistemes, per funció, objectiu, activitat o semblança estructural. En la seva major part, les soques UPEC tenen manca del sistema de secreció de tipus III que utilitzen altres patògens per a injectar molècules dins de les cèl·lules de l'hoste i en el seu lloc utilitzen sovint els sistemes de secreció anomenat de tipus I i tipus V⁵.

Els gens que codifiquen toxines estan presents en les soques ExPEC i són per tant freqüentment utilitzats per a categoritzar-les. Entre totes les descrites són les hemolisines (*hlyA*) i el factor citotòxic necrosat 1 (CNF1) els que tenen un paper més rellevant en la virulència de soques UPEC. Aquest tipus de toxines causen dany tissular,

faciliten la disseminació bacteriana, permeten l'alliberament de nutrients de l'hoste i modular senyals; afectant varis processos que inclouen resposta inflamatòria, supervivència a les cèl·lules de l'hoste i dinàmiques del citoesquelet (figura 12)^{5, 40}.

Figura 12. Toxines associades a soques UPEC. Presa de Wiles *et al.*, 2008⁵.



a. Hemolisines: són toxines de la família RTX d'exotoxines o *Repeats-in-toxin* capaces de produir lisi a les cèl·lules hoste. Les soques que produeixen aquest factor habitualment indueixen zones clares en plaques d'agar sang. *E. coli* produeix tres tipus d'hemolisines: les α -hemolisines o factor hemolític extracel·lular, les β -hemolisina o factor hemolític unit a la cèl·lula i les δ -hemolisines, produïda per mutants resistents a l'àcid nalidíxic. Tant les α com les β -hemolisines són produïdes en la fase logarítmica del creixement bacterià i poden ser produïdes simultàniament per la mateixa soca¹.

Els gens que regulen la producció de δ -hemolisina poden residir en el cromosoma bacterià (soques UPEC) o en un plasmidi (soques ETEC, STEC o EPEC), posseint tant uns com altres seqüències de DNA molt similars entre si. En la majoria d'*E. coli* aïllats en l'espècie humana els gens codificadors de l'hemolisina resideixen en el cromosoma, mentre que en els aïllats en animals resideixen a plasmidis. Aquesta proteïna és secretada en un sol pas a través de membranes interiors i exteriors per un aparell de tres proteïnes conegudes com sistema de secreció tipus I. Aquest sistema de secreció està compost d'una membrana integral interior d'adenosina trifosfatasa (HlyD) i una altra proteïna integral de la membrana interna (HlyB), tots dos són capaços de reconèixer un senyal de secreció

carboxil-terminal i obligar la unió de l'hemolisina. El complex hemolisina HlyD-HlyB és llavors capaç d'acoblar-se a un túnel o canal de proteïna anomenada TolC, que s'estén per l'espai periplàsmic i la membrana externa, obrint-se per a permetre el pas de l'hemolisina a través de la membrana externa, i després es desenganxa del complex HlyD-HlyB. Es per això, que la producció de l'hemolisina sembla estar regulada per un mecanisme de retroalimentació, en el què el senyal seria el nivell sèric de ferro¹.

L'hemolisina té funcions fonamentals que es podrien resumir en: citotoxicitat i estimulació del creixement bacterià. En una primera etapa, l'hemolisina provoca la lisi dels hematies per formació de canals catiónics a la membrana dels mateixos, els quals alliberen hemoglobina i aquesta actua com a font de ferro necessari per al creixement bacterià. A la sang de la majoria d'animals, el ferro es troba unit a la transferrina o formant part de l'hemoglobina dels hematies, és a dir, es troba en forma inabordable per als microorganismes. Addicionalment, contribueixen a la inflamació i el dany tissular⁷⁷.

Altres mecanismes d'acció coadjuvants són que l'hemolisina produeix disminució de la fagocitosi per part dels PMN, reduint així, la mortalitat dels microorganismes. L'hemoglobina interfereix també en la fagocitosi, ja que inhibeix el quimiotactisme dels PMN. Els elevats nivells de ferro alterarien alguns mecanismes de defensa de l'hoste, com als lisosomes continguts dins de les cèl·lules renals. L'hemolisina indueix l'alliberament de mediadors de la resposta inflamatòria (com histamina i leucotriens, especialment leucotriens B4). Aquests mediadors produeixen un augment de la permeabilitat vascular, quimiotaxis, quimioagregació, alliberament de lisosomes i contracció de la musculatura llisa; tot això facilita la disseminació bacteriana i la seva penetració en el teixit inflamat. L'hemolisina també inhibeix el poder bactericida del sèrum facilitant la invasió renal.

Diversos estudis han demostrat que les soques hemolítiques d'*E. coli* s'aïllen amb més freqüència en infeccions extraintestinals (IU, bacterièmia, peritonitis, etc) que en femta d'individus sans. L'associació entre activitat hemolítica i infecció extraintestinal, ha portat a diversos investigadors a preguntar-se si les soques d'*E. coli* hemolítiques són més virulentes que les que no ho són o si els factors virulents de les soques hemolítiques són diferents dels de les soques no hemolítiques. Aproximadament, un 50% de les soques UPEC expressen α -hemolisines (HlyA) i la seva expressió està associada amb el increment de la severitat clínica en pacients amb IU, resistents al poder bactericida del sèrum, tòxiques per al ratolí en model *in vivo*, adherents a l'epiteli urinari provocant despreniment de l'uroepiteli, hemorràgies a la bufeta i causants de hemaglutinació MR^{5,50}.

b. Factor necrosant citotòxic (CNF1 i CNF2): aproximadament una tercera part de les soques UPEC aïllades codifiquen CNF1. Aquesta toxina és una proteïna citoplasmàtica termolàbil de 115 kDa, amb localització cromosòmica. L'habilitat de CNF rau en l'activació de la família de GTPases de tipus RhoA, Rac o Cdc42. L'activació d'aquestes GTPases tipus Rho afecta a nombroses funcions cel·lulars en eucariotes, incloent la formació de fibres d'estrès d'actina, inducció de porus a les membranes i modulació de les vies de senyalització de la inflamació. Sota condicions experimentals utilitzant el model d'IU en ratolins s'ha demostrat que les soques amb aquest FV tenen una avantatge addicional a la bufeta i ronyó. L'expressió de CNF1 per part de soques UPEC pot afectar la patogènesi en múltiples vies. Específicament, CNF1 pot promoure l'apoptosi de les cèl·lules de la bufeta estimulants la seva exfoliació i permeten que els bacteris arribin a cèl·lules immadures incapaces de defensar-se. En conclusió la mediació dels efectes de CNF1 poden facilitar la disseminació i persistència de soques UPEC al sistema urinari. En soques UPEC, hi ha una associació freqüent entre la producció de l'hemolisina i la de CNF, ja que sovint estan codificades en operons adjacents. Aquesta associació podria ser deguda a la presència d'un clon de gens que governés la síntesi d'aquestes toxines^{2,5}.

c. Subunitat ABC: les diverses toxines són transportades des del citoplasma bacterià cap a les cèl·lules de l'hoste per diferents mecanismes. Les toxines termolàbils són clàssicament de dos subunitats (toxina AB), que es secreten al medi extracel·lular mitjançant el sistema de secreció II. Les concentracions de missatgers intracel·lulars, com ara AMP cíclic, GMP cíclic i Ca²⁺, poden augmentar a causa de la secreció d'ions per acció d'enterotoxines termolàbils o termosensibles (LT, *heat-labile enterotoxin*) o termostables (STa i STb, *heat-stable enterotoxins A and B*), respectivament.

- **Toxina Shiga (STX, Shiga Toxin):** també és coneguda com a verotoxina (VT), ja que aquesta toxina és citotòxica per a les cèl·lules Vero en cultiu, posseeix semblança estructural amb la toxina produïda per *Shigella dysenteriae*. La família Stx conté dos subgrups (Stx1 i Stx2), les quals comparteixen aproximadament un 55% d'homologia en aminoàcids. Aquesta última codificada en un bacteriòfag temperat. Stx és produïda al colon i viatja pel sistema circulatori fins als ronyons, on danya les cèl·lules endotelials renals i les clou a través d'una combinació de toxicitat directa i inducció/producció de citoquines i quimioquines. Esta present en les soques EHEC i s'uneix al RNA ribosomal, alterant d'aquesta manera la síntesi de proteïnes i maten per intoxicació epitelial o endotelial les cèl·lules. Les diverses toxines són

transportades des del citoplasma bacterià a les cèl·lules hoste per diversos mecanismes^{1, 2}.

- **EAST1, *Enteroaggregative E. coli heat-stable enterotoxin 1 (AstA)***: està present en moltes soques EAEC, es considera que les soques que codifiquen el gen *astA* responsable de la producció d'EAST1 contribueixen en gran mesura en les diarrees aquoses. No obstant això, aquesta toxina es pot trobar en moltes soques comensals. Per tant, es manté sota qüestió la seva implicació en aquests casos^{1, 2}. És homologa a la toxina termostable (STA) de les soques ETEC, té funcions similars i associa a patologia humana. La toxina s'uneix al receptor de la guanilat ciclase de l'enteròcit estimulando la seva activitat i incrementant els nivells intracel·lulars de GMP cíclic. D'aquesta manera impeding tant l'absorció de Na⁺ com l'activació del regulador CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) i elevar la secreció d'electròlits^{38, 54}.

d. Toxina de distensió citoletal (CDT): aquesta toxina té una activitat DNasaI que bloqueja la divisió cel·lular en la fase G2/M del cicle cel·lular. CDT es troba freqüentment en diferents patotipus d'*E. coli* i en més d'una soca que s'ha demostrat que està codificada en un bacteriòfag. Les soques que codifiquen CDT tenen altres FV com CNF, STX o LEE².

e. Autotransportadors serin proteasa d'*Enterobacteriaceae* (SPATE, *Serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae*): Les soques ExPEC també codifiquen diverses toxines secretades mitjançant sistemes de secreció tipus V, conegudes col·lectivament com autotransportadores. Són una família de FV putatius amb 20 proteases amb diferents funcions. S'anomenen autotransportadors perquè part d'aquestes toxines formen un porus en l'estructura de barril- β de la membrana externa que permet l'accés a l'altra part de la proteïna extracel·lular, són considerades com a maquinària de secreció cel·lular. Les SPATEs són una subfamília d'autotransportadors serin proteasa que són produïdes per *E. coli* diarreogèniques (EPEC, EHEC i EIEC), uropatogèniques i soques de *Shigella*. Aquestes proteïnes inclouen diverses toxines categoritzades per tenir un efecte citopàtic i toxines que provoquen la secreció de fluids des de l'epiteli intestinal. Les SPATE es poden dividir filogenèticament en dos classes, designades com 1 i 2. Les SPATE classe 1 són citotòxiques *in vitro* i indueixen dany a la mucosa intestinal, mentre que les de classe 2 inclouen^{1, 88}:

- **Pic:** és una proteasa autotransportadora amb activitat mucinosa, present en soques EAEC i *Shigella*. Està involucrada en la colonització, indueix l'alliberament de moc, la unió a mucina i confereix una subtil avantatge a la colonització de la mucosa^{2,88}.
- **Hemaglutinina termostable (Tsh):** és una hemoaglutinina autotransportadora de les soques APEC. És homòloga a la proteïna d'unió a hemoglobina (Hbp) de soques ExPEC en humans i presenta una millor expressió a baixes temperatures. S'ha relacionat amb diverses funcions de virulència, com adhesines, proteases, citosines i proteïnes d'invasió cel·lular, i particularment a infeccions intraabdominals en humans i per descomptat a infeccions respiratòries en aus de corral^{2, 70, 88}.
- **Toxina proteolítica secretadora autotransportadora (Sat):** és una serin proteasa de soques UPEC que promou efectes citopàtics al induir la vacuolització en el citoplasma de les vies urinàries humanes. Al model murí d'IUA s'ha vist que indueix dany dramàtic al ronyó. Causa dissolució de la membrana glomerular, pèrdua de les cèl·lules epitelials tubulars i vacuolització del teixit renal. També ha sigut implicada en les lesions de les unions estretes que es troben a les infeccions de soques DAEC i que incrementen la permeabilitat per a les fimbries Afa-Dr^{5, 54}.
- **Toxina vacuolant autotransportadora (Vat):** es troba altament expressada en aïllats UPEC encara que el seu paper patogènic a la IU no està àmpliament estudiat. D'altre banda, sí que millora la virulència de soques APEC quan s'inoculen en models animals. Inicialment, les soques amb aquest FV es caracteritzen per l'habilitat d'induir una varietat d'efectes citopàtics en les cèl·lules diana de l'hoste, que inclouen vacuolització i reacció inflamatòria⁵.

iv) **Protectines**

a. Càpsula: és l'estructura més externa de l'embolcall cel·lular i és el component que protegeix al microorganisme enfront les condicions ambientals adverses, com la dessecació. La càpsula és essencial per a la virulència del bacteri, ja que constitueixen una barrera antifagocitària que protegeix al bacteri dels PMN, impeding la deposició del complement i la lisi. Generalment a mesura que augmenta el gruix de la càpsula, més elevada és la virulència de la soca.

Originalment els antígens K van ser separats en tres grups diferents, basant-se en la seva termoestabilitat relativa durant les anàlisis de serotipificació. Posteriorment es va redefinir la classificació mantenint les característiques serològiques, però tenint en compte addicionalment la variabilitat bioquímica i genètica⁸⁹.

Taula 10. Classificació de càpsules present en *E. coli*. Adaptada de Whitfield i Roberts 1999⁸⁹.

Característiques	Grup			
	1	2	3	4
Classificació típica de l'antigen K	IA	II	I/II o III	IB
Coexpressió amb serogrup O	Baixa freqüència (O8, O9, O20, O101)	Elevada	Elevada	Habitualment O8, O9 però algunes vegades cap
Coexpressió amb àcid colànic	No	Si	Si	Si
Termoestabilitat	Si	No	No	Si
Reste lipídica terminal	Lípid A en K _{PS}	α-Glicerofosfat	α-Glicerofosfat?	Lípid A en K _{PS}
Locus genètic	<i>cps</i> , <i>his</i> i <i>rfb</i>	<i>kps</i> i <i>serA</i>	<i>kps</i> i <i>serA</i>	<i>his</i> i <i>rfb</i>
Termoregulació sota 20°C	No	Si	No	No
Sistema model	Serotip K30	Serotip K1 i K5	Serotip K10 i K54	Serotip K40, O111
Similar a	<i>Klebsiella</i> , <i>Erwinia</i>	<i>Neisseria</i> , <i>Haemophilus</i>	<i>Neisseria</i> , <i>Haemophilus</i>	Molts gèneres

La presència de l'antigen K s'associa a la virulència i nefrotoxicitat. Els antígens K juguen un paper important en les infeccions extraintestinals. La majoria de soques d'*E. coli* productores d'IU i altres infeccions extraintestinals pertanyen a uns pocs serogrupos: K1, K2, K3, K5, K12, K13 i K18.

En alguns casos, els models animals han suggerit el rol de la càpsula en la patogènesi particular de les infeccions. Per exemple, el polisacàrid K1, és una estructura poli-N-àcid acetilneuroamínic, idèntica a la trobada a la càpsula de *Neisseria meningitidis* grup B, aïllada de pacients amb sèpsia neonatal o meningitis per *E. coli*. En aquest últim cas, es relaciona amb la capacitat de travessar la barrera hematoencefàlica. La majoria dels estudis denominen els serotipus capsulars K2 i K5 com als més comuns aïllats de pacients amb infeccions del tracte urinari (bacteriúries asimptomàtiques, cistitis i pielonefritis). Per la seva part, les soques d'*E. coli* que posseeixen el polisacàrid capsular del grup 3 (K54) tenen més capacitat proinflamatòria, estimulació de la resposta defensiva de l'hoste i s'associa a infeccions sistèmiques^{1, 50}.

b. Microcina V o colimicina V (*cvaC*): les colícines són especialment tòxiques i són proteïnes d'aproximadament 56 kDa. La seva síntesi està regulada per plasmidis i mediada per la temperatura, a 42 °C es sintetitza 10 vegades més colicina E1 que a 30 °C. Una d'aquestes colícines, anomenada Colicina V o Colimicina V està codificada en el plasmidi pColV. Les soques ExPEC causants de septicèmia en qualsevol hoste porten aquest

plasmidi el qual posseeix gens involucrats en la captació de ferro i la resistència al sèrum. Encara que també s'han trobat soques intestinals amb codificació cromosomal. A més aquest FV s'ha associat amb la patogènesi de pielonefritis^{62, 90}.

c. *Increased serum survival (iss)*: aquest gen està estretament relacionat amb la colicinaV produïda pel pColV. Això es pot relacionar amb la seva elevada incidència entre les soques APEC. És responsable del increment (aproximadament 100 vegades) de la resistència al sèrum de l'hoste.

d. Resistència al sèrum (TraT): és un gen de codificació plasmídica present de manera habitual a les soques ExPEC. Dóna la capacitat d'evitar l'activitat bactericida del sèrum, és una característica important en la patogènesi que li permet al bacteri persistir als fluids biològics i òrgans interns. És per aquesta raó que aquesta proteïna extramembranal juga un paper destacat conferint un grau moderat de resistència al sèrum per interferència amb el complement i la defensa del bacteri contra la mort^{64, 76}.

v) Altres trets de funció auxiliar o desconeguda

a. Proteasa T extramembranal (*ompT*): els aïllats d'*E. coli* amb aquest gen de virulència presenten un elevat valor predictiu de bacterièmia i s'associen a IU, ja que es troben en processos de cistitis, pielonefritis i prostatitis. D'altra banda, aquesta proteasa contribueix a la virulència per inactivació de les proteïnes de defensa de l'hoste, escindint el pèptids antimicrobians a la superfície cel·lular, activant el plasminogen humà, i degradant algunes proteïnes heteròlogues recombinants. Aquest fet li confereix propietats de persistència durant els diferents estats d'infecció^{91, 92}.

b. Proteïnes Ibe10 (*IbeA*): és una proteïna de 50 kDa, el gen es troba codificat en la illa genòmica GimA, present en soques ExPEC amb funcions per a la invasió de cèl·lules eucariotes en particular les NMEC, per a aquelles cèl·lules del l'endoteli microvascular cerebral. És responsable del quadre causant de la meningitis neonatal en humans i addicionalment també s'ha demostrat que té un paper important en la patogenicitat de soques APEC en pollastres. Diferents autors han demostrat que aquest gen únicament es troba present en soques del grup filogenètic B2^{50, 93, 94}.

c. Motilidad mediada per *fliC_{H7}*: s'ha determinat que les soques UPEC portadores d'aquest gen IPEC, originàriament de soques EHEC i EPEC amb serotipus H7 tenen més

facilitat per a ascendir des de la bufeta fins als ronyons i disseminar-se a l'hoste. Addicionalment també s'ha vist implicada en la formació de les comunitats bacterianes intracel·lulars o IBC a la bufeta^{95,96}.

d. Proteïna específica d'uropatogenicitat (*usp*): és una bacteriocina de codificació cromosòmica en PAI de soques UPEC i homologa amb la proteïna Zot (*zonula occludens toxin*) de *Vibrio cholerae* serotipus O1. Millora la infectivitat en els models murins d'IU, però el seu paper encara no es coneix amb exactitud. Així mateix altres resultats indiquen que també estaria implicat en la persistència i recurrència de les IU^{95,97}.

e. Illa de patogenicitat (PAI_{CF1073}): els FV poden estar codificats en PAIs, és per aquesta raó que també es valora a les soques ExPEC i particularment en les UPEC la seva presència. Els aïllats que porten PAI són habitualment soques amb elevada capacitat de colonització i invasió degut a la presència de múltiples FV.

Actualment els factors de virulència associat a infeccions ExPEC revisats en l'apartat I 2.2.2.1 són els que més interès desperten, ja que s'ha demostrat la seva implicació patogènica. Per tant, són els FV detectats amb major freqüència en diferents poblacions mostrals amb l'objectiu de definir les seves prevalències específiques (taula 11).

Categoria	Gen o operó	Prevalença de diferents factors de virulència estudiats durant els últims anys (%)					
		Fecal	UPEC (Cistitis)	UPEC (Pielonefritis)	SEPEC (Sang)	(NMEC) LCR	APEC
Adhesines	<i>papC</i>	33 ^a , 31 ^b , 15 ^f , 30 ^l , 0 ^j	61 ^a , 80 ^b , 60 ^e , 41 ^f , 52 ^g , 41 ^j	82 ^a	91 ^c , 68 ⁱ	87 ^c , 36 ^e	100 ^c , 41 ^e , 39 ^g
	<i>sfa/focDE</i>	9 ^f , 15 ^j , 6 ^j	26 ^e , 41 ^f , 47 ^j	-	0 ^c , 38 ⁱ	1 ^c , 51 ^e	0 ^c , 4 ^e
	<i>sfaS</i>	7 ^a , 11 ^b , 7 ^l , 0 ^j , 13 ^o	26 ^a , 26 ^b , 32 ^d , 14 ^e , 26 ^e , 18 ^j , 13 ⁿ	23 ^a , 4 ^d , 31 ^o , 12 ⁿ	0 ^c , 13 ⁱ	1 ^c , 47 ^e , 59 ^h , 29 ^k	0 ^c , 4 ^e , 4 ^g
	<i>focG</i>	4 ^a , 13 ^b , 6 ^l , 0 ^j	58 ^a , 50 ^b , 37 ^d , 14 ^e , 13 ^e , 0 ^j , 39 ⁿ	56 ^a , 23 ^d , 35 ⁿ	0 ^c , 21 ⁱ	0 ^c , 2 ^e , 1 ^h , 4 ^k	0 ^c , 0 ^e , 0 ^g
	<i>afa/draBC</i>	1 ^a , 2 ^b , 0 ^f , 6 ^l , 6 ^o	11 ^a , 15 ^b , 16 ^d , 2 ^f , 0 ⁿ	15 ^a , 39 ^d , 6 ^o , 12 ⁿ	0 ^c , 5 ⁱ	0 ^c , 26 ^h	0 ^c
	<i>iha</i>	14 ⁱ , 0 ^j	26 ^d , 39 ^e , 27 ^g , 6 ^j	39 ^d	40 ^j	27 ^e	4 ^e , 3 ^g
	<i>bmaE</i>	0 ^a , 0 ^b , 0 ⁱ	0 ^a , 1 ^b , 1 ^e , 2 ^g , 0 ⁿ	2 ^a , 18 ⁿ	0 ^c , 3 ⁱ	0 ^c , 2 ^e , 6 ^h	0 ^c , 0 ^e , 0 ^g
	<i>gafD</i>	0a, 0b	1 ^a , 1 ^b , 0 ^g , 0 ⁿ	2 ^a , 18 ⁿ	0 ^c	0 ^c , 3 ^h	0 ^c , 0 ^g
	<i>fimH</i>	88 ^a , 89 ^b , 96 ^f , 92 ^j , 94 ^j , 99 ^o	96 ^a , 96 ^b , 100 ^d , 98 ^f , 99 ^g , 100 ^j , 100 ⁿ	97 ^a , 96 ^d , 99 ^o , 88 ⁿ	87 ^c , 97 ^j	87 ^c	100 ^c , 98 ^g
<i>fimAv_{MT78}</i>	-	-	-	43 ^c	40 ^c	10 ^c	
Sideròfors	<i>fyuA</i>	27 ^a , 16 ^b , 34 ^f , 55 ⁱ , 35 ^j	83 ^a , 78 ^b , 90 ^d , 81 ^e , 88 ^f , 80 ^g , 88 ^j	91 ^a , 77 ^d	100 ^c , 81 ⁱ	100 ^c , 69 ^e	95 ^c , 58 ^e , 59 ^g
	<i>iutA</i>	16 ^a , 12 ^b , 30 ^f , 20 ^j , 44 ^j	83 ^a , 67 ^b , 37 ^d , 49 ^e , 62 ^f , 34 ^g , 29 ^j	84 ^a , 46 ^d	87 ^c , 54 ⁱ	87 ^c , 78 ^e	95 ^c , 81 ^e , 80 ^g
	<i>iroN</i>	19 ^a , 29 ^b , 25 ⁱ , 24 ^j	75 ^a , 68 ^b , 53 ^d , 35 ^e , 40 ^g , 53 ^j	82 ^a , 53 ^d	43 ^c , 44 ⁱ	33 ^c , 63 ^e	100 ^c , 87 ^e , 87 ^g
	<i>ireA</i>	7 ^j	26 ^e , 24 ^g	-	32 ^j	18 ^e	48 ^e , 46 ^g
Toxines	<i>hlyA</i>	19 ^a , 19 ^b , 9 ^f , 14 ⁱ , 6 ^l , 15 ^o	74 ^a , 68 ^b , 53 ^d , 36 ^f , 31 ^g , 41 ^j , 43 ⁿ	76 ^a , 31 ^d	13 ^c , 44 ⁱ , 47 ⁿ	20 ^c , 9 ^h	0 ^c , 1 ^g
	<i>hlyF</i>	-	6 ^e	-	-	59 ^e	75 ^e
	<i>cnf1</i>	10 ^a , 15 ^b , 5 ^f , 13 ⁱ , 12 ^j , 10 ^o	52 ^a , 38 ^b , 32 ^d , 23 ^e , 33 ^f , 28 ^g , 39 ⁿ	83 ^a , 35 ^d , 28 ^o , 47 ⁿ	0 ^c , 37 ^j , 21 ^m	0 ^c , 4 ^e , 9 ^h , 10 ^k	0 ^c , 1 ^e , 1 ^g
	<i>cdtB</i>	1 ⁱ , 0 ^j	9 ^e , 8 ^g , 6 ⁱ , 9 ⁿ	12 ⁿ	0 ^c , 10 ⁱ	1 ^c , 36 ^e , 46 ^h	0 ^c , 1 ^e , 1 ^g
	<i>sat</i>	22 ^p	-	55 ^p	48 ^c	66 ^c	0 ^c
	<i>vat</i>	-	62 ^e	-	-	74 ^e	33 ^e
	<i>tsh</i>	-	3 ^e , 40 ^g	-	9 ^c	7 ^c , 31 ^e	33 ^c , 53 ^e , 63 ^g
	Protectines	<i>kps</i> MT II	18 ^a , 15 ^b , 24 ^f , 48 ^j , 24 ^j	66 ^a , 60 ^b , 79 ^e , 81 ^f , 78 ^g , 47 ^j	76 ^a	79 ^j	86 ^e
<i>kps</i> MT III		0 ^a , 0 ^b , 0 ⁱ , 12 ^j	12 ^a , 7 ^b , 4 ^e , 7 ^g , 4 ^j	17 ^a	3 ⁱ	2 ^e	2 ^e , 2 ^g
<i>rfc</i>		3 ⁱ , 6 ^j	5 ^e , 8 ^g , 18 ^j	-	5 ⁱ	4 ^e	0 ^e , 1 ^g
<i>cvaC</i>		3 ⁱ , 0 ^j	6 ^e , 8 ^g , 6 ^j	-	26 ^c , 10 ⁱ	20 ^c , 54 ^e	62 ^c , 67 ^e , 67 ^g
<i>iss</i>		6 ^j	27 ^g , 61 ^g	-	35 ^c , 10 ⁱ	20 ^c , 57 ^e	95 ^c , 83 ^e , 82 ^g
<i>traT</i>		32 ^a , 31 ^b , 42 ^f , 44 ⁱ , 41 ^j	82 ^a , 77 ^b , 68 ^e , 57 ^f , 71 ^g , 18 ^j	84 ^a	87 ^c , 63 ⁱ	80 ^c , 86 ^e	95 ^c , 78 ^e , 78 ^g
Altres	<i>ompT</i>	19 ^a , 48 ^b , 15 ⁱ , 24 ^j	74 ^a , 70 ^b , 6 ^e , 84 ^g , 53 ^j	89 ^a	81 ⁱ	64 ^e	82 ^e , 70 ^g
	<i>ibeA</i>	6 ^f , 15 ⁱ , 6 ^j	19 ^e , 19 ^f , 30 ^g , 29 ^j , 13 ⁿ	29 ⁿ	4 ^c , 11 ⁱ	13 ^c , 59 ^e , 33 ^h , 38 ^k	10 ^c , 14 ^e , 15 ^g
	<i>usp</i>	23 ^a , 25 ^b	70 ^a , 73 ^b	84 ^a	100 ^c	93 ^c	95 ^c
	PAI _{ICFT073}	19 ⁱ , 49 ^j , 29 ^j	68 ^e , 69 ^f , 75 ^g , 53 ^j	-	100 ^c , 70 ^j	93 ^c , 57 ^e	95 ^c , 15 ^e , 17 ^g
	<i>fli_{H7}</i>	-	16 ^e , 20 ^g	-	-	48 ^e	5 ^e , 5 ^g

^aKudinha *et al.*, 2013 [98]; ^bKudinha *et al.*, 2012 [99]; ^cMora *et al.*, 2009 [100]; ^dMabbett *et al.*, 2009 [101]; ^eJohnson *et al.*, 2008 [102]; ^fMoreno *et al.*, 2008 [60]; ^gRodriguez-Sie 2005 [103]; ^hJohnson *et al.*, 2005 [104]; ⁱSannes *et al.*, 2004 [91]; ^jJohnson *et al.*, 2003 [105]; ^kBonacosi *et al.*, 2003 [106]; ^lSrinivasan *et al.*, 2003 [79]; ^mBingen-Bidois *et al.*, 2002 [107]; ⁿJohnson *et al.*, 2002 [108]; ^oMarrs *et al.*, 2002 [109] i ^pGuyer *et al.*, 2000 [110].

Taula 11. Prevalença expressada en percentatges dels diferents factors de virulència aïllats en soques ExPEC. Adaptada de Kudinha *et al.*, 2013⁹⁸; Kudinha *et al.*, 2012⁹⁹; Mora *et al.*, 2009¹⁰⁰; Mabbett *et al.*, 2009¹⁰¹; Johnson *et al.*, 2008¹⁰²; Moreno *et al.*, 2008⁶⁰; Rodriguez-Siek *et al.*, 2005¹⁰³; Johnson *et al.*, 2005¹⁰⁴; Sannes *et al.*, 2004⁹¹; Johnson *et al.*, 2003¹⁰⁵; Bonacosi *et al.*, 2003¹⁰⁶; Srinivasan *et al.*, 2003⁷⁹; Bingen-Bidois *et al.*, 2002¹⁰⁷; Johnson *et al.*, 2002¹⁰⁸; Marrs *et al.*, 2002¹⁰⁹ i Guyer *et al.*, 2000¹¹⁰.

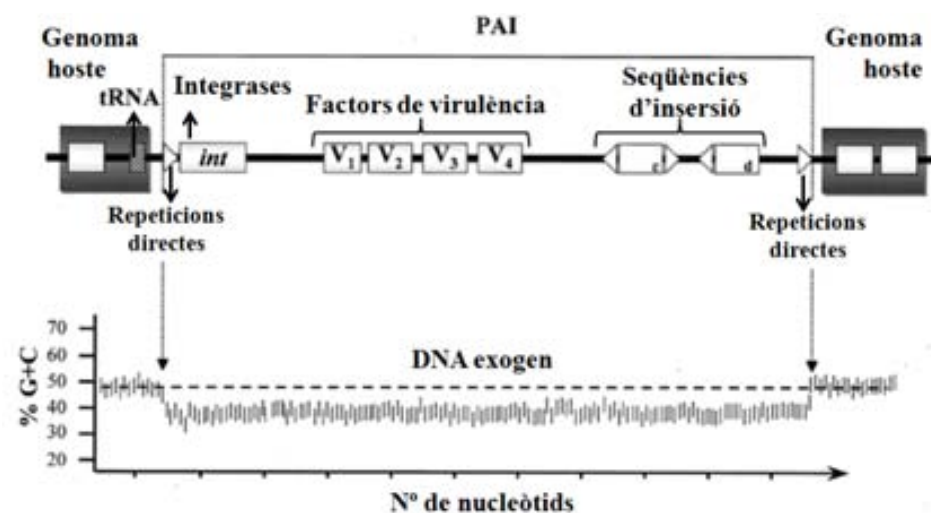
2.2.2.2 Illes de patogenicitat

El nucli del genoma compartit per totes les soques d'*E. coli* representa aproximadament 2.000 gens, mentre que el *pangenoma* per a totes les soques seqüenciades d'*E. coli* supera els 10.000 gens. La pèrdua o el guany d'elements genètics mòbils són els responsables de la capacitat d'algunes soques d'*E. coli* per a causar una àmplia gamma de malalties.

Les illes de patogenicitat (PAI, *pathogenicity-associated islands*) són un subtipus d'illes genòmiques (GEI, *genomic islands*) sent les PAI d'*E. coli* les primeres descrites fa mes de 10 anys per Hacker *et al.*, 1990. S'ha demostrat que les PAI són elements que contribueixen a la difusió de la patogenicitat i de la resistència del bacteri gràcies a la seva capacitat de transferència horitzontal de material genètic. Les PAI són fragments de DNA que estan presents en soques patògenes i absents o amb presència esporàdica en soques no patògenes de la mateixa espècie o properes i que tenen les següents característiques: i) Estan constituïdes per grans blocs de DNA (10-200 Kb), que codifiquen freqüentment gens de virulència (adhesines, toxines, càpsules, modeladors immunes, sistemes de secreció o captació de ferro que ajuden a evitar els mecanismes de defensa de l'hoste). ii) Es troben en el cromosoma, en les zones adjacents d'inserció de gens tRNA i tenen associació amb altres elements genètics mòbils (repeticions directes, seqüències d'inserció, integrases, transposades o plasmidis). iii) Són d'origen exogen pel diferent contingut de G+C (40-60%) de la resta de DNA cromosòmic de l'hoste bacterià. Trobar-se com a unitats diferents i compactes i vi) presenten certa inestabilitat (figura 13)^{13, 94, 111}.

Dels patotipus d'*E. coli*, els aïllats ExPEC generalment tenen un gran nombre de PAI, cada un amb una combinació distintiva de FV, el que permet que una mateixa soca tingui múltiples còpies d'un particular FV, per exemple les fimbries P (*pap* o *prs*), hemolisines (*hly*) o toxines (*cnf*)^{29, 71}. Les soques UPEC que ha sigut caracteritzades amb major detall són els prototips 536, J96 i CFT073 (taula 12). Específicament, la soca pielonefítica CFT073 que va ser seqüenciada per primera vegada en 2002 i reanotada al 2009 conté 12 GEI de les quals vuit són PAI i quatre són regions fàgiques. Sent el genoma més gran seqüenciat que conté 5.030 gens codificants de proteïnes dins de les soques d'*E. coli*. El que mostra l'existència d'un gran nombre de gens no essencials, la majoria dels quals són elements mòbils que poden proporcionar una major flexibilitat metabòlica i promouran la persistència dins del competitiu microambient intestinal^{73, 112, 113}.

Figura 13. Estructura general de les PAI. Presa de Schmidt i Hensel 2004⁹⁴.



Taula 12. Principals PAI descrites en soques UPEC. Adaptada de Vejborg *et al.*, 2011¹¹²; Tourret *et al.*, 2010¹¹⁴; Luo *et al.*, 2009¹¹³; Lloyd *et al.*, 2009¹¹⁵; Hacker 2008¹¹⁶; Manson i Gilmore 2006¹¹⁷; Schmidt i Hensel 2004⁹⁴; Middendorf *et al.*, 2004¹¹⁸; David i Waldor 2002¹¹¹; Dobrindt *et al.*, 2002¹¹⁹ i Hacker *et al.*, 1999¹²⁰.

Soca UPEC	Nomenclatura Antiga	Nomenclatura Actual	tRNA associat	Tamany (Kb)	Factors de virulència i colonització associats	Inestabilitat	Integrasa codificada	Repeticions directes (pb)	% G+C	Centisoma o CDs en illa
536	PAI ₁₅₃₆	-	<i>selC</i>	76,8	<i>hly, sac, F17 i CS12</i>	Si	1 (P4-like)	16	46	82
	PAI ₁₀₃₆	-	<i>leuX</i>	102,2	<i>hly, pap, prf, Hek, hemaglutinina, sat i cnf</i>	Si	1 (P4-like)	18	46	97
	PAI ₁₀₃₆	-	<i>thrW</i>	68	<i>sfa, sac, Ag43, ira i proteases</i>	Si	2 (P4-like i Sfx-like)	48	47	5,6
	PAI _{V536}	-	<i>asnT</i>	30,2	<i>Yersiniabactina i sac</i>	No	1 (P4-like)	17 (Únicament una de les dues)	57	44
	PAI _{V536}	-	<i>pheV</i>	79,6	<i>Ag43, sac, Kps_{x23} i pix</i>	Si	1 (P4-like)	23	48	-
	PAI _{V536}	-	<i>asnW</i>	54,4	Polipèptid-policètid sintasa (<i>pks</i>)	No	1 (P4-like)	16	53	-
	PAI _{V1536}	-	<i>serU</i>	20	<i>Shufflo, proteïnes d'histona</i>	-	-	-	-	-
J96	PAI _{U96}	-	<i>pheV</i>	~170	<i>hly i pap</i>	-	-	-	41	64
	PAI _{U96}	-	<i>pheR</i>	~110	<i>hly, pap, prs, cnf1 i hra</i>	-	-	135	41	94
CFT073	PAI _{CFT073}	PAI-CFT073- <i>pheV</i>	<i>pheV</i>	123	<i>sis, hlyA, pap, iha, sat, iutA, iucABCD, flu, kpsTM i Ag43</i>	-	-	9	47	c3556-c3698
	PAI _{CFT073}	PAI-CFT073- <i>pheU</i>	<i>pheU</i>	52	<i>pap_2 operó i sat</i>	-	-	-	48	c5143-c5216
	PAI _{CFT073}	PAI-CFT073- <i>aspV</i>	<i>aspV</i>	100	<i>fpbABCD, cdIA, picU, tosCBDA, vat, cdIA (c0033r), cdIB (c0034r) i picU (c0350)</i>	-	-	-	47	c0253-c0368
	-	PAI-CFT073- <i>serX</i>	<i>serX</i>	113	<i>mchBCDEF, Ag43, sfa/foc, iraBCDEN, flu, mcmA (c0097r) i mcmI (c0096r)</i>	-	-	-	49	c1165-c1293
	-	PAI-CFT073- <i>icdA</i>	-	54	<i>stABCD</i>	-	-	-	50	c1518-c1601
	-	PAI-CFT073- <i>serU</i>	<i>serU</i>	-	<i>tcpC</i>	-	-	-	-	c2392-c2416
	HPL _{CFT073}	PAI-CFT073- <i>asnT</i>	<i>asnT</i>	32	<i>fyuA</i>	-	-	-	57	c2418-c2436
-	PAI-CFT073- <i>metV</i>	<i>metV</i>	32	<i>hcp, clpB i c3405 hasta c3409</i>	-	-	-	53	c3385-c3410	

Adicionalment, durant els últims anys s'han descrit noves GEI i PAI en soques ExPEC amb possibles factors de virulència (FV) que s'han inclòs en els protocols per a determinar els FV de soques d'*E. coli*. Un exemple d'aquest fet són els següents elements mòbils: PAI *usp* (*usp*), GEI *pks* (*clbB* i *clbN*), PAI I_{AL862} i PAI II_{AL862} (*afa-8*), PAI_{C5} (*prs*, *hly*, *cnf1* i *hra*), PAI II_{UT189} (*pap*, *hly*, *cnf1*, *hek* i *cdiA*) o GEI GimA (*ibeA*).

Històricament, s'ha postulat que els FV de soques ExPEC es troben principalment en PAI dins del cromosoma bacterià. En efecte, els genomes de les soques prototip UPEC s'han caracteritzat per posseir-los al cromosoma. El rol que exerceixen els FV de soques UPEC codificats en plasmidis i pròfags encara no està ben establert, però si és veritat que ajuden al bacteri a incrementar la seva patogenicitat dins de l'hoste. En contrast, s'han descrit molts plasmidis que s'associen amb la virulència de soques APEC o NTEC, com als plasmidis ColV i ColBM de les APEC o el Vir de les NTEC-2¹²¹.

2.2.2.3 Correlació patogenicitat versus filogrup i MLST

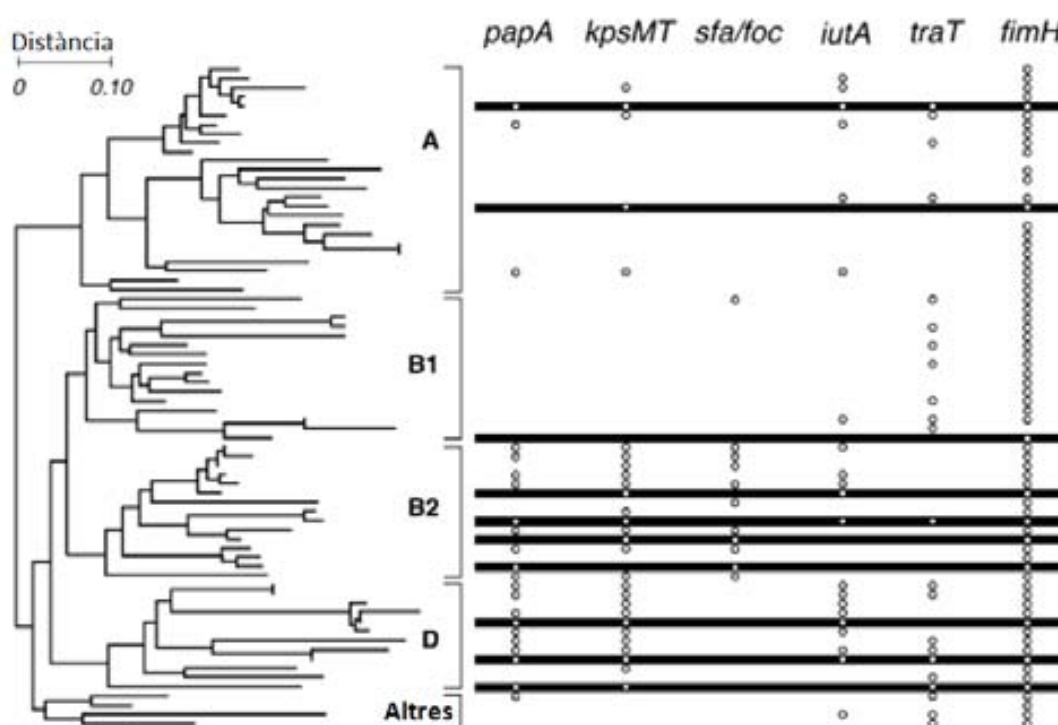
L'evolució de les soques ExPEC segueix sent poc clara, però alguns autors apunten que l'aparició d'aquests clons virulents es deu a l'acumulació de FV dins dels filogrups B2 i D. D'aquesta manera, s'assenyala que el grup B2 és molt divergent enfront de la resta de grups i inclou la gran majoria de les soques involucrades en les infeccions extraintestinals. S'ha proposat que existeix una compatibilitat especial entre el fons genètic de les soques B2 i els gens de virulència, explicant l'adquisició dels mateixos per transferència horitzontal en períodes de pressió selectiva^{4, 10, 68}. Aquesta hipòtesi explicaria la concentració selectiva de gens de virulència en el genotip B2. S'ha suggerit també que una transferència horitzontal d'aquests mateixos FV cap a soques comensals podria convertir aquestes en patògens potencials⁹. En algunes poblacions estudiades el grup B2 és el filogrup predominant entre les soques fecals, tal i com es presenta en la taula 13.

Els grups clonals ExPEC deriven principalment dels grups filogenètics B2 i en menor mesura del D, explicant en certa manera la predominança dels grups B2 i D entre els aïllats clínics. Molts dels tradicionals FV extraintestinal reconeguts (*pap*, *sfa/foc*, *hly* i *kps*) estan concentrats en aquest grups i en particular als B2 i D, mentre que altres FV com *afa/dra*, *iuc/iut* i *traT*) estan més àmpliament distribuïts entre els quatre GF (figura 14).

Taula 13. Prevalença de grups filogenètics d'*E. coli* en diferents poblacions d'estudi. Adaptada de Duriez *et al.*, 2001¹²²; Zhang *et al.*, 2002¹²³; Obata-Yasuoka *et al.*, 2002¹²⁴ i Sannes *et al.*, 2004⁹¹.

Cita	Població d'estudi	Mostra	Prevalença de clons		Observacions
			Grup filogenètic	n %	
Duriez <i>et al.</i> , 2001	Persones sanes en França, Croàcia y Mali	168 aïllats fecals	A	67 40	Els factors de virulència van ser més freqüentment trobats en les soques B2: tant en les soques fecals com en les extraintestinals, quan es van comparar versus els altres filogrupos.
			B1	57 34	
			B2	18 11	
			D	26 15	
	Pacients amb meningitis i altres malalties extraintestinals (De les col·leccions de Bingen <i>et al.</i> , 1998 (n=69) i Picard <i>et al.</i> , 1999 (n=49))	118 soques extraintestinals	A	11 9	
			B1	3 2,5	
			B2	19 16	
			D	85 72	
Zhang <i>et al.</i> , 2002	Dones sanes sense cap episodi recurrent d'IU en Michigan (EUA)	88 aïllats fecals	A	18 20,5	Les Soques del filogrup B2 tenien gairebé dues vegades el número de gens associats amb virulència versus les soques fecals B2.
			B1	11 12,5	
			B2	42 47,7	
			D	17 19,3	
	Dones amb un primer episodi de cistitis Michigan (EUA)	93 aïllats urinaris	A	7 7,5	
			B1	3 3,2	
			B2	64 68,8	
			D	19 20,4	
Obata-Yasuoka <i>et al.</i> , 2002	Dones i homes sans a Tòquio (Japó)	61 aïllats fecals	A	17 27,9	Estudi de suport al concepte que les soques d' <i>E. coli</i> residents a la vagina són un reservori important per a transmissió fecal-vaginal-urinària/neonatal a les infeccions neonatals.
			B1	0 0	
			B2	27 44	
			D	17 28	
	Dones amb vaginosis a Mito (Japó)	88 aïllats de isopats vaginals	A	7 8	
			B1	0 0	
			B2	67 76	
			D	14 16	
Sannes <i>et al.</i> , 2004	Controls sans a Minnesota (EUA)	71 aïllats fecals	A	11 15	
			B1	13 18	
			B2	38 54	
			D	9 13	
	Pacients amb bacterièmia a Minnesota (EUA)	63 aïllats de sang	A	7 11	
			B1	2 3	
			B2	42 67	
			D	12 19	

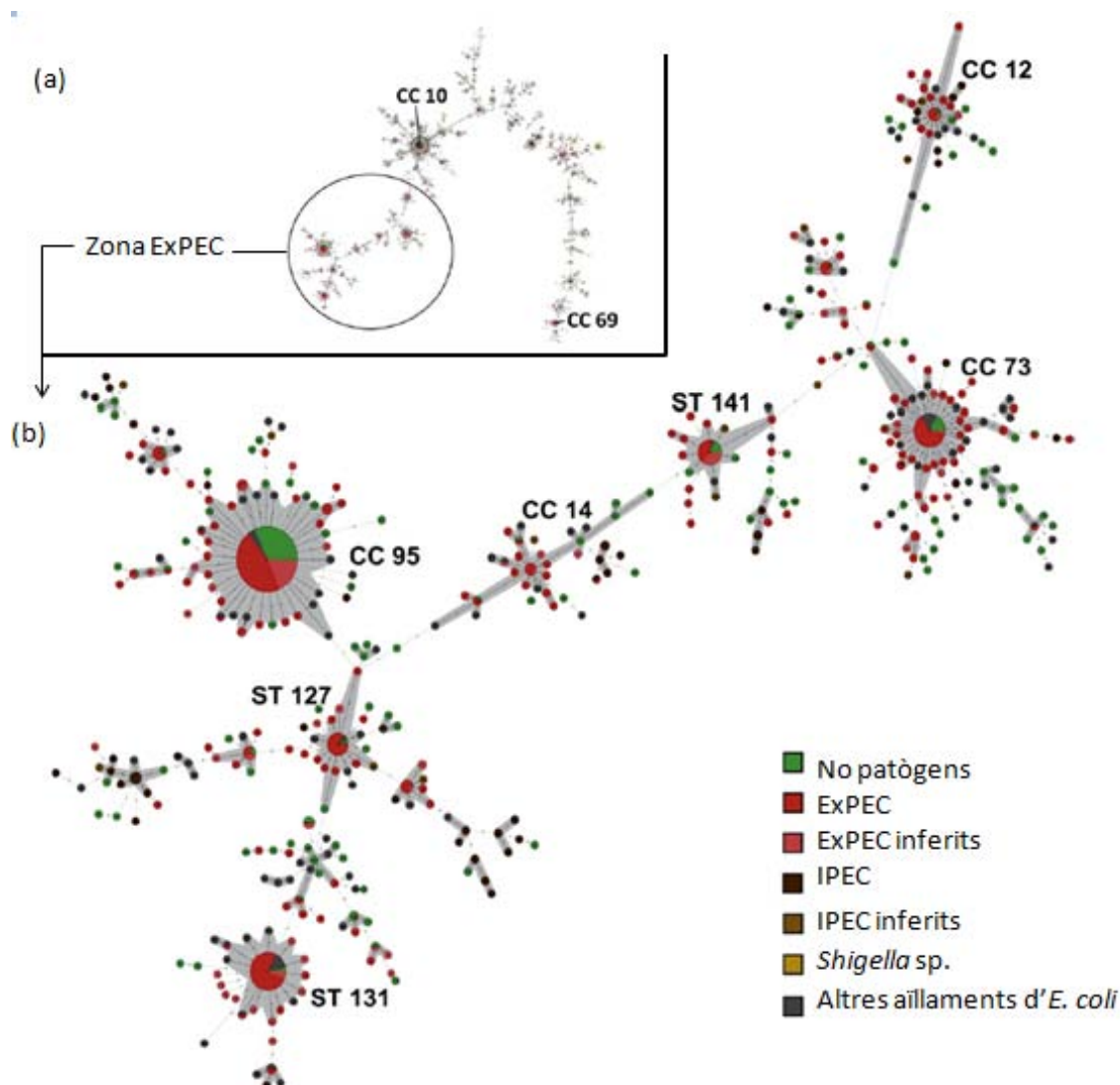
Figura 14. Distribució filogenètica de factors de virulència associats a soques d'*E. coli*. Presa de Johnson i Russo 2005⁷¹.



L'epidemiologia molecular basada en MLST demostra que les espècies d'*E. coli* estan composades d'una varietat de soques individuals amb diferents transfons filogenètics. Addicionalment, les dades proporcionades pel MLST recolzen la teoria del filogrup B2, que inclou la majoria dels aïllats ExPEC ja que s'ha demostrat que és el llinatge evolutiu més antic dins de l'espècie.

A la figura 15, es pot trobar al centre el complexos clonals 10 (CC10) representant el major nombre de seqüència tipus (STs, *sequence types*) present a la base de dades. Aquest CC inclou moltes soques d'*E. coli* patògenes intestinals i no patògens, però només una petita proporció de soques ExPEC. De la mateixa manera, la branca dreta està dominada pel CC comprenen principalment IPEC, no patogen, així com altres aïllaments d'*E. coli* o *Shigella* spp i només una fracció molt petita de soques ExPEC.

Figura 15. Representació de l'anàlisi filogenètic dels resultats de la base de dades del MLST per a *E. coli*. Presa de Köhler i Dobrindt 2011³⁹.



A la branca esquerra s'inclouen principalment les soques ExPEC i no-patògenes. En aquesta zona de soques ExPEC, es troben nou dels 15 majors CC ExPEC (CC 95, 73, 131, 127, 141, 17, 14, 12, 144), alguns dels quals representen els clons ExPEC amb més èxit. La branca ExPEC inclou gairebé totes les soques B2 dipositats a la base de dades, corroborant així que el GF B2 es correlaciona amb el patotipus ExPEC (taula 14).

Taula 14. Complexos clonals predominants entre les soques ExPEC de la base de dades del MLST per a *E. coli*. Presa de Köhler i Dobrindt 2011⁶⁶.

Complex Clonal (CC)	Nº entrades base de dades	Fració de ExPEC del CC (%)	Fració del total d'ExPEC a la base de dades (%)	Nº ST del CC
95	95	47,7	11,6	37
73	69	62,7	8,4	38
131	61	66,3	7,5	15
127	37	74	4,5	13
14	24	55,8	2,9	26
141	23	41,8	2,8	12
12	19	50	2,3	24
117	16	72,7	2	6
372	13	59,1	1,6	7
144	9	50	1,1	4

2.2.3 Resistència antimicrobiana en soques ExPEC

Les cefalosporines, les fluoroquinolones i el trimetoprima-sulfametoxazol s'utilitzen sovint per a tractar infeccions comunitàries i hospitalàries causades per *E. coli*. A causa d'aquest fet la taxes de resistència han augmentat considerablement. Fins a finals dels 90 les soques d'*E. coli* eren relativament susceptibles als antibiòtics de primera línia, però diversos estudis de vigilància durant l'última dècada arreu del món han demostrat que entre el 20-45% de les soques ExPEC són resistents als antibiòtics de primera línia, incloses les cefalosporines, les fluoroquinolones i el trimetoprima-sulfametoxazol^{19, 125}.

El tractament de les infeccions causades per aquestes soques ha estat complicat a causa de l'emergència de les resistències antibiòtiques. Entre les soques ExPEC és important destacar el increment durant l'última dècada de soques productores de β -lactamases mitjançant la disseminació plasmídica d'aquests gens i en especial les de tipus AmpC (CMY, FOX, ACT, MOX, ACC i DHA), de les β -lactamases d'espectre estès (BLEE) com la CTX-M, TEM o SHV, de metallo- β -lactamases (MBL) com IMP, VIM o NDM, carbapenemases (KPC) o β -lactamases de tipus OXA (OXA-48 o 181)^{30, 37, 125}. És així com en els països asiàtics diferents estudis de prevalença en resistència demostren una incidència d'*E. coli* productores de BLEE així: Índia (64%), Tailàndia (5,1%), la Xina (11-15%), Malàisia (7-8%)¹²⁶. Addicionalment, és relativament freqüent trobar

un altre tipus de resistència a altres antibiòtics associades en un mateix element mòbil, per tant aquest fet facilita l'aparició i difusió de soques multiresistents amb gran impacte en l'àmbit intra i extrahospitalari^{44, 50}.

Respecte a les soques UPEC, diversos estudis apunten que existeix una relació entre la pèrdua de FV i la resistència a les quinolones i a les fluoroquinolones. L'explicació a aquest fet rau principalment en dos aspectes: i) una mutació puntual al codó 83 de la DNA-girasa (GyrA) i ii) la possible pèrdua del material genètic per deleció o transposició de regions que codifiquen PAI per la pressió selectiva davant l'antibiòtic^{127, 128, 129}.

3. Relació dels factors de virulència amb el filogrup i amb les infeccions extraintestinals. Justificació d'un model experimental

Actualment es coneixen un ampli repertori de factors en *E. coli*, relacionats amb la virulència d'aquestes soques. Sens dubte, encara hi ha molts FV sense identificar, però progressivament es van incloent al llistat actual possibles nous FV, per la implementació de nous mètodes com la seqüenciació massiva. Però la participació d'aquest factors en la virulència no es pot confirmar si no amb la utilització de models experimentals ja siguin *in vivo* o *in vitro*.

Un dels principal objectius dels models d'experimentació animals és valorar la capacitat *in vivo* de l'associació d'un possible FV en la patogènesis d'una malaltia en particular. Aquesta acció permet aprofundir sobre el caràcter virulent de les soques involucrades en el procés infecció. És per això, que el model animal es crea per a investigar la causa i la fisiopatologia de les malalties humanes i animals. A l'hora és una eina que permet l'avaluació de noves estratègies terapèutiques per a la profilaxi i tractament.

Aquests models han de ser discriminatoris, previsibles, reproduïbles, mimetitzables, extrapolables (del comportament *in vivo* de la interacció microorganisme-hoste) i analitzables. Han de tenir una tècnica d'infecció simple amb una semblança important amb el procés que ocorre en l'ésser humà pel que fa a gravetat, curs i durada de la malaltia.

S'han utilitzat diversos models d'infecció en diversos animals que han ajudat a entendre la fisiopatologia de les diverses infeccions. Bons exemples són els models de pneumònia, tuberculosi, infeccions per fongs, endocarditis, osteomielitis o infeccions sistèmiques en

neutropènics. Addicionalment, també es fan servir per a l'estudi farmacocinètic i farmacodinàmic de nous medicaments i vacunes.

Els estudis dels models animals són una prova més directa de si un determinat factor contribueix a la patogènesi, fet que justifica la designació de ser un FV (taula 8). La possessió de gens de virulència especialitzats és el que permet definir una soca com a ExPEC, davant de les comensals i és allò el que els permet infectar l'hoste de manera eficient¹⁴.

Existeixen diversos treballs que relacionen la virulència amb la filogènia realitzats amb diferents soques patògenes d'*E. coli*, tant intestinals com extraintestinal (IPEC i ExPEC), indicant que hi ha clares diferències respecte al grup filogenètic del que deriven i també en relació al nombre de determinants de virulència que porten.

Un cas particular que exemplifica la importància de la valoració individualitzada de FV amb l'objectiu de dilucidar el seu valor més enllà de determinar simplement la presència o absència d'un marcador de virulència, el representa l'operó *fim*, que codifica les fimbries tipus 1, específiques per a la unió als receptors de manosa l'hoste (apartat I 2.2.2.1 i a). La regulació d'aquest operó és dependent de la fase de creixement. Experimentalment en models *in vivo*, s'observen diferències en l'expressió de *fim* en una mateixa soca entre la infecció a bufeta o ronyó. Igualment, hi ha diferències en l'expressió d'aquest operó entre soques clíniques aïllades d'IU i comensals. Pel fet que les clíniques expressen una variant de Fim que s'uneix als receptors de monomanosa i al mateix temps els de trimanosa per tal d'adaptar-se al procés de colonització de la bufeta, mentre que les soques comensals expressen la variant de *fim* que només reconeix els receptors de trimanosa que són més apropiats per a la colonització intestinal. Aquest exemple indica que la total comprensió de la virulència de soques ExPEC requereix més que una simple identificació dels gens de virulència¹³.

El millor mètode per a aprofundir en el coneixement de la relació entre determinats factors de virulència i el grup filogenètic amb la patogenicitat, és sens dubte, un model d'experimentació animal en ratolí. Si es tracta d'estudiar la uropatogenicitat, el millor model és la IUA ja que mimetitza l'aparell urinari de la població humana. A més, per a avaluar la virulència extraintestinal intrínseca no urinària s'empra el model murí subcutani, determinant fora de les vies urinàries la patogenicitat en ratolins de les soques causants d'infecció extraintestinal, incloent-hi les d'origen comensal.

Mitjançant models experimentals, la literatura consultada estudia principalment el paper i la importància d'alguns factors de virulència en soques d'*E. coli* aïllades d'una població concreta (pacients amb infecció urinària), o bé s'estudia la patogènia en soques individuals d'*E. coli*. No obstant això, al llarg dels anys la comparació de la virulència entre soques d'*E. coli* productores d'infecció urinària i soques d'*E. coli* d'origen fecal de diferents grups filogenètics i perfils de virulència ha estat objecte de pocs estudis.

L'excepció la constitueixen alguns estudis com a per exemple el de Picard *et al.*, 1999¹⁰, utilitzant un model d'infecció subcutània en ratolí, en el qual s'avalua el potencial patogen de soques d'*E. coli* amb molts factors de virulència i pertanyents als grups filogenètics B2-D amb soques dels grups A-B1 amb pocs factors de virulència. D'aquests estudis s'extreu que determinats factors de virulència associats al grup filogenètic B2 són factors predictius de la virulència experimental. A més que les soques pertanyents als grups filogenètics A-B1 són poc virulentes, a diferència de les que pertanyen als grups filogenètics B2-D. Aquesta relació és coherent, si s'assumeix que els factors de virulència s'acumulen en soques dels grups filogenètics B2-D¹⁰.

En estudis previs realitzats per Moreno *et al.*, entre el 2006 i 2008, s'han trobat soques d'*E. coli* pertanyents als grups filogenètics A-B1 productores d'IU amb el mateix perfil de virulència que soques dels grups filogenètics B2-D. D'altra banda, s'han aïllat soques d'*E. coli* d'origen fecal amb el mateix patró de virulència que soques productores d'IU, pel que és de suposar que aquestes soques en condicions favorables (presència de factors predisposants en l'hoste) serien capaces de produir infecció urinària. Per tant creiem d'interès estudiar aquestes soques d'*E. coli* en el model individualitzat d'IUA en ratolí i subcutani, amb la finalitat d'avaluar si la virulència és independent del grup filogenètic i de l'origen d'*E. coli*^{59,60}.

3.1 Models experimentals per a l'avaluació de la virulència de soques d'*E. coli* causants d'infeccions extraintestinals

Des de finals de la dècada dels 60, un remarcable increment de coneixement ha revelat alguns aspectes de la patogenicitat d'*E. coli*. Esforços per elucidar la patogènesi d'*E. coli* han donat com a fruit la posada a punt de diferents models d'infecció en animals d'experimentació, els quals ha estat reeixits per utilitzar tant soques ExPEC com a soques comensal, que actuen a l'hora com a soques control de la femta de pacients sans, amb l'objectiu de determinar el paper *in vivo* de determinats FV sota condicions normalitzades d'experimentació.

Aquest estudis s'han desenvolupat amb l'objectiu d'aclarir quins són els elements afavoridors en la patogènia d'*E. coli*. La confirmació del paper de la implicació dels gens de virulència en la patogènia d'aquestes soques, requereix que aquests gens d'interès siguin analitzats en els models animals apropiats. És per aquesta raó, que gràcies als models animals actualment podem assegurar que un sense nombre de FV actuen durant el procés patogènic de les soques d'*E. coli*.

És així com es sap que soques aïllades d'orina de pacients amb IU i sense factors afavoridors, mostren un complex sistema patogènic basat en la combinació de diversos i heterogenis FV, que manifesta un origen evolutiu comú. Mentre que s'ha demostrat que en persones amb factors afavoridors d'IU (sondes permanents, cicatrius renals, etc), no és necessària una soca virulenta per a produir la infecció, sinó que qualsevol soca seria capaç de produir-la. Un altre exemple, és d'interacció de soques capsulades, en les quals s'ha demostrat que són més virulentes que les variants encapsulades de la mateixa soca.

Actualment, es disposen de diferents models d'experimentació animals per a valorar la implicació de soques ExPEC dins del sense nombre de quadres clínic que pot arribar a causa. Dins del món particular de les IU s'han postulat dues rutes potencials d'infecció: i) la via ascendent que fa infecció des de la uretra fins la bufeta per a posteriorment pujar pels urèters i arribar als ronyons, per a la qual s'utilitzen models d'IUA i ii) la via hematògena causada per la disseminació la infecció des de focus concrets durant el curs d'una bacterièmia, per a aquesta última s'utilitzen models de bacterièmia o septicèmia.

Els models d'infecció murina, tant el d'infecció extraintestinal com al d'IUA, són una eina valuosa per a avançar en la comprensió de la patogènesi de les soques d'*E. coli* uropatògenes en éssers humans. La combinació de les tecnologies de genètica bacteriana i tècniques d'experimentació animal proporcionen informació que amplia la comprensió d'aquesta malaltia i la recerca de teràpies futures. Les dues tècniques d'inoculació tenen com a objecte avaluar el potencial patògen de soques d'*E. coli* uropatògenes, les dues es troben descrites i utilitzades prèviament en la literatura per diferents autors per a simular les diferents vies d'infecció del microorganisme.

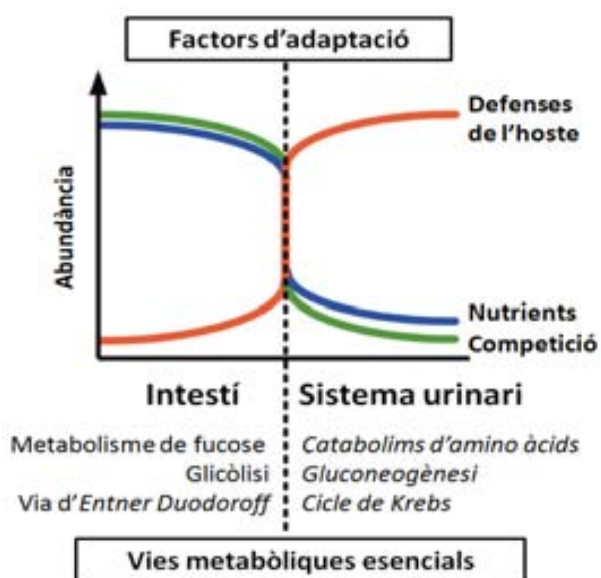
3.1.1 Infecció urinària ascendent (IUA)

Durant molts anys s'han utilitzat diferents models tant *in vitro* com *in vivo* per a valorar la patogènesi del aparell urinari induïda per soques UPEC, tant per a causar cistitis com

pielonefritis. Dins dels models *in vitro* es poden trobar treballs que utilitzen cèl·lules epitelials renals de gos (MDCK, *Madin-Darby canine kidney epithelial cells*) per a la comparació de virulència de soques clíniques UPEC causants de cistitis o altres que utilitzen cèl·lules epitelials humanes de bufeta (*PD07i cell line*) per a valorar invasió, escapament e infeccions secundaries en soques UPEC^{130, 131}. Però per altre banda, els models *in vivo* són els més utilitzats i els que es postulen com una eina per a donar suport a les diferents teoria existents en la patogènesi de la IU per via d'ascendent.

Dues teories han sigut presentat per un elevat nombre d'investigadors: i) La teoria de l'especial patogenicitat, on les soques d'*E. coli*, pertanyen a grups selectius (GF o serotipus) amb propietats especials, que els permet envair l'aparell urinari. On a més, es valora la microbiota normal de l'hoste, que s'ha vist que juga un paper molt important en la patogènesi de la IU i actua com a reservori fecal d'aquestes soques. ii) La teoria de la prevalença quantitativa, que es base en l'elevat predomini a la microbiota de fecal de soques d'*E. coli* que posteriorment colonitzen el introit vaginal i l'àrea periuretral, afavorint el desenvolupament de la IUA⁷⁷.

Figura 16. Adaptació metabòlica i fisiològica d'*E. coli* a microambients. Presa d'Alteri i Mobley 2012⁷³

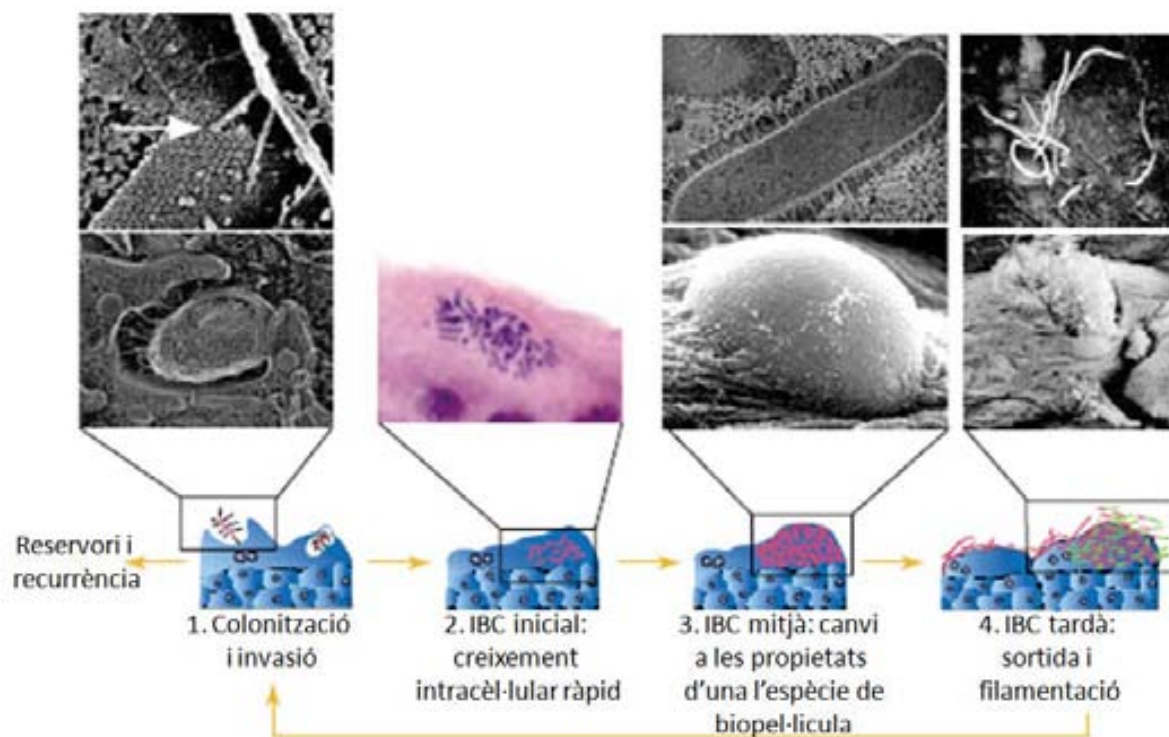


El model muri d'IU aporta una eina indispensable per a avançar en el coneixement de la patogènesi de soques UPEC en humans. És ben sabut, que en contrast amb la diversitat nutricional de l'intestí (figura16), l'orina a la bufeta té una elevada osmolaritat, una concentració moderada d'oxigen i és un ambient amb limitació de ferro, que conté molts aminoàcids (arginine, glutamina, etc.) i petits pèptids. Per tant, no és sorprenent que les vies de les pentoses fosfat, la ruta d'*Entner-Doudoroff* o la de la glucòlisi siguin limitades. Gràcies a models animals s'ha aconseguit donar respostes al comportament metabòlic i fisiològic de soques d'*E. coli* dins de diferents

condicions ambientals. S'ha demostrat que el creixement en l'orina no representa cap efecte negatiu per a les soques d'*E. coli*, degut a que s'adapten a la nova situació i utilitza altres rutes (d'aminoàcids, gluconeogènesi o el cicle de l'àcid tricarboxílic (*Krebs*)) per a metabolitzar els nous substrats i mantenir-se als microambients de la bufeta o el ronyó^{29, 73}.

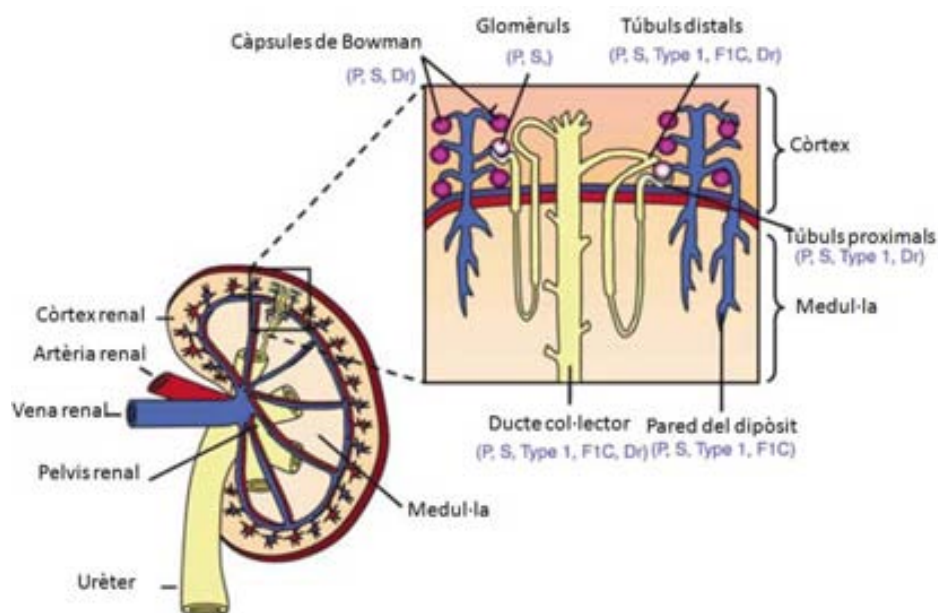
Al model animal en ratolí també s'ha demostrat que una vegada les soques d'*E. coli* entren dins de la bufeta dels IBC (*intracel·lular bacterial communities*), aquesta espècie de biopel·licula, protegeixen les soques UPEC de la resposta innata de defensa de l'hoste, mitjançant la fagocitosi i la neteja per micció, gràcies a la interacció de FimH amb les cèl·lules epitelials de la bufeta. Produint una senyal de transducció en cascades que origina l'anclament del bacteri a les cèl·lules superficials. La cascada per a la formació d'IBC és part d'un mecanisme que revela com *E. coli* es capaç d'evadir la defensa innata i addicionalment podria explicar les característiques clíniques de les IU, com a podria ser la predisposició o la recurrència³² (figura17).

Figura 17. Formació i maduració del *intracel·lular bacterial communities*. Adaptada de Kau *et al.*, 2005³².



De la mateixa manera es coneix que durant el procés de la IUA tenen un paper primordial els FV que codifiquen elements d'adhesió, ja que són els que permeten l'ascensió de soques UPEC fins al ronyó i causar pielonefritis. En aquest sentit el model animal ha permès esquematitzar la interacció de les diferent adhesines al ronyó del ratolí i extrapolar-les a l'anatomia humana (figura 18).

Figura 18. Participació de les diferents adhesines durant el procés d'infecció per soques UPEC al ronyó. Presa de Lane i Mobley 2007¹³².



Actualment es disposa d'un elevat nombre de publicacions que utilitzen models animals per a causar IU (taula 15). Tots ells utilitzen diferents permutacions pel desenvolupament de la tècnica per exemple: animal (espècie, estirp, edat, pes, etc), via d'inoculació (dins de la bufeta o uretral), inòcul (concentració o volum), perfusió, etc.

El model d'IUA s'utilitzarà, amb el propòsit de comprovar la capacitat de producció d'infecció de l'aparell urinari en funció dels factors de virulència que continguin i el grup filogenètic al qual pertanyin. Depenent de la capacitat de virulència de cadascuna de les soques s'espera obtenir animals amb diferents graus d'infecció de les vies urinàries, que podran variar des de la no visualització de símptomes clínics compatibles amb malaltia urinària, passant per quadres de cistitis, pielonefritis o en casos extrems d'infecció generalitzada. Aquest model s'ha seleccionat ja que mimetitza les condicions fisiològiques humanes en molts aspectes i per tal motiu ha estat utilitzat prèviament per altres autors (taula 15) per a estudis similars d'infecció de les vies urinàries.

Taula 15. Diferents models d'experimentació animals descrits a la literatura per a valorar infecció urinària.

Publicat per	Animal utilitzat					Tipus d'inoculació	Obstrucció	Medi de cultiu	Preparació	Inòcul			Seguiment (dies)	
	Especie	Estirp	Sexe	Edat o pes	n per grup					Vehicle	[UFC] o [UFC/ml] ¹	Perfusió		Volum (ul)
Resum a la 334 ICAAT 1993 (Roberts, et al.)	Mico	-	-	6-8 setmanes	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Hopkings et al., 1987	Mico	Mococa fuscicornis	Femelles	2-3 kg	4-5	Transvesical	No	CFA agar	Resuspensió i centrifugació	PBS	2×10^7 o 2×10^8	Manual	2000	45
Mame et al., 1986	Rata	-	-	-	10	Transuretral	No	ON AS	Resuspensió	PBS	5×10^8	Manual	1500	7
Hopkins et al., 1998	Ratolí	C3H/HeN, DBA/1, DBA/2, SJL, SWR, AKR i BALB/c, C57BL/6	Femelles	-	-	Transvesical	-	-	-	-	10^8	-	50	14
Nagy et al., 2002	Ratolí	CFP	-	3-4 dies	7-15	Transvesical	-	ON LB	Centrifugació i resuspensió	PBS	10^8	Manual	25	21
Nagy et al., 2006	Ratolí	Lactants NMRI	-	3-4 dies	7-15	Transvesical	-	ON LB	Centrifugació i resuspensió	PBS	10^8	Manual	100	21
Hagberg et al., 1983	Ratolí	CBA, BALB/c, C57 i C3H/HeN	Femelles	6-8 setmanes	5	Transuretral	No	ON LB líquid	2,000 g per 20 min i resuspensió	PBS	10^7 fins 10^{11}	Manual	50, 100 i 200	7
Hultgren et al., 1985	Ratolí	BALB/c	Femelles	6-8 setmanes	8	Transuretral	No	ON BHI líquid	Centrifugació per 1 min i resuspensió	PBS	10^{10}	Manual	50	7
Johnson et al., 1987	Ratolí	CBA/J	Femelles	6-8 setmanes (20-22 g)	5	Transuretral	No	ON LB líquid	2,000 g per 20 min i resuspensió	PBS	10^8	Bomba d'infusió	50	7
Schaeffer et al., 1987	Ratolí	BALB/c	Femelles	8-10 setmanes	8	Transvesical i transuretral	No	ON BHI líquid	Centrifugació per 1 min i resuspensió	PBS	6×10^8 - 1×10^{10}	Manual	50-250 (t.u.) i 10-50 (t.u.)	5
Mobley et al., 1990	Ratolí	CBA/J	Femelles	22-24 g	5	Transuretral	No	ON LB líquid	2,000 g per 20 min i resuspensió	PBS	2.4×10^{10}	Manual	50	2
Johnson et al., 1993	Ratolí	CBA/J	Femelles	22-34 g	10	Transuretral	Si	ON TSA	-	PBS	2×10^8	Manual	50	48
Johnson, J.R i Brown, J.L. 1996	Ratolí	Swiss-Webster	Femelles	6-8 setmanes (17-28 g)	5	Transuretral	No	ON LB líquid	Centrifugació i resuspensió	PBS	10^8	Bomba d'infusió	25 i 50	2
Russo et al., 1996	Ratolí	Swiss-Webster	Femelles	8 setmanes	5	Transuretral	No	ON LB líquid	Centrifugació i resuspensió	PBS	10^8	Bomba d'infusió	1,25 ul bacteri/g pes corporal	2
Langermann et al., 1997	Ratolí	C3H/HeJ	Femelles	7 setmanes	5	Transuretral	No	48h líquid	-	PBS	5×10^7	Manual	50	7
Johnson et al., 1998	Ratolí	CBA/J/Hsd	Femelles	22-24 g	6	Transuretral	No	TSA	Resuspensió	PBS	2×10^{10}	Bomba d'infusió	50	7
Mulvey et al., 1998	Ratolí	C57BL/6	Femelles	-	8-10	Transuretral	No	ON LB	-	PBS	1×10^{10}	Manual	50	2
Hvidberg et al., 2000	Ratolí	SSc-CF1	Femelles	30 ± 2 g	6	Transuretral	No	ON orina humana filtrada	6,500 g per 10 min i resuspensió	PBS	10^{10}	Manual	50	28
Bahrani-Mougeot et al., 2002	Ratolí	CBA/J/Hsd	Femelles	6-8 setmanes	6	Transuretral	No	ON LB	3,000 g 10 min i resuspensió	PBS	10^8	Bomba d'infusió	50	2
Kern et al., 2003	Ratolí	SSc-CF1	Femelles	30 ± 2 g	6	Transuretral	No	ON AS	Resuspensió	PBS	5×10^7 - 5×10^8	Manual	50	>3
Jhonson et al., 2005	Ratolí	CBA/J	Femelles	6-10 setmanes	-	Transuretral	No	On LB	Centrifugació i resuspensió	PBS	2×10^8	Bomba d'infusió	1 ul bacteri/g pes corporal ⁴	2
Roos et al., 2006	Ratolí	CBA	Femelles	8-10 setmanes	7	Transuretral	No	ON orina humana filtrada o LB	-	PBS	10^8	Manual	25	7
Hannan et al., 2008	Ratolí	C3H/HeN	Femelles	6-8 setmanes	-	Transuretral	-	ON LB	5,500 r.p.m i resuspensió	PBS	$1-2 \times 10^7$	Manual	50	48
Hung et al., 2009	Ratolí	C3H/HeJ	Femelles	7-9 setmanes	-	Transuretral	No	48h LB líquid	5,000 g per 5 min	PBS	$1-2 \times 10^7$	Manual	50	7
Hagan et al., 2010	Ratolí	CBA	Femelles	6-8 setmanes	6-8	Transuretral	No	ON LB	3,000 g per 30 min	PBS	2×10^{10}	Bomba d'infusió	50	-
Jakobsen et al., 2010	Ratolí	CFW1	Femelles	26-30 g	4-6	Transuretral	No	-	-	-	5×10^8	Manual	50	3
Thai et al., 2010	Ratolí	CBA	Femelles	8-12 setmanes	-	Transuretral	No	48 h LB líquid	-	PBS	$1-2 \times 10^7$	Manual	50	-
Sivick et al., 2010	Ratolí	C57BL/6	Femelles	6-15 setmanes	-	Transuretral	No	-	-	PBS	5×10^7	Bomba d'infusió	50	7
Mosberg et al., 2011	Ratolí	CBA/J	Femelles	6-8 setmanes	-	Transuretral	No	ON	4,000 g per 10 min	PBS	2×10^8	Bomba d'infusió	25	2

3.1.2 Septicèmia

Per aquest tipus d'infecció generalitzada els models d'experimentació animal són més limitats. No pel fet de la seva poca utilització, sinó per la gran estandardització que van generar dues publicacions (Picard *et al.*, 1999¹⁰ i posteriorment Johnson *et al.*, 2006¹³³). El primer va descriure el model experimental en ratolí en sí mateix i posteriorment el segon utilitzant la mateixa metodologia del primer i va afegir els criteris de valoració que posteriorment altres autors utilitzen conjuntament. Encara així, es poden trobar altres protocols diferents que valorar la infecció generalitzada causada per soques ExPEC.

El model d'infecció murí subcutani, s'utilitzarà amb l'objectiu d'avaluar la virulència de les soques d'*E. coli* de diferents orígens. Aquest model ha estat utilitzat prèviament per altres autors (taula 16) amb l'objectiu de determinar el potencial patogen de soques causants d'infecció extraintestinal.

3.1.3 Altres models experimentals utilitzats per a valorar soques d'*E.coli*

Adicionalment aquestes dos models prèviament presentats, que valoren biològicament la implicació de soques ExPEC a nivell urinari i generalitzat; es poden trobar altres tècniques d'experimentació animal (taula 17) que es poden utilitzar actualment per a valorar diversos quadres clínic causats per les soques ExPEC. En particular, s'han descrit models animals per a soques d'*E. coli* causants de meningitis, peritonitis, mastitis, endometritis, queratoconjuntivitis en humans; patologia en aus o simplement per a demostrar la colonització intestinal d'un tipus particular de soca.

Taula 16. Diferents models d'experimentació animals descrits a la literatura per a valorar bacterièmia o septicèmia.

Publicat per	Animal utilitzat					Tipus d'inoculació	Inòcul			Seguiment (dies)
	Espècie	Estirp	Sexe	Edat o pes	n per grup		Vehicle	[(UFC) o (UFC/ml*)]	Volum (ml)	
Nagy, et al., 2006	Ratolins	NMRI	Femelles	8 setmanes	10	Intravenosa (vena de la cua)	Solució salina	$6,17 \times 10^5$ - 5×10^8	0,3	14
Mobley, et al., 2010	Ratolins	CBA/J mice	Femelles	6-8 setmanes	-	Intravenosa (vena de la cua)	PBS	$\sim 10^2$ i $\sim 10^6$	0,1	-
Picard, et al., 1999	Ratolins	Swiss-IOPS Orl	Femelles	6-8 setmanes (25-30 g)	10	Subcutània (abdominal) o intraperitoneal	Ringer	$\sim 10^8$	0,2	7
Khan, et al., 2002	Ratolins	ICR	Femelles	8 setmanes	5	Intraperitoneal	-	$\sim 10^8$	-	-
Le Gall, et al., 2007	Ratolins	OF1	Femelles	3-4 setmanes (14-46 g)	10	Subcutània (abdominal)	Ringer	$\sim 10^8$	0,2	7
Dartois, et al., 2005	Ratolins	ICR (neutropenic)	Femelles	4 setmanes (21-24 g)	-	Intramuscular (cuixa)	PBS	$\sim 10^{8*}$	0,1	-
Bulik, et al., 2010	Ratolins	ICR (neutropenic)	Femelles	18-20 g	-	Intramuscular (cuixa)	-	$\sim 10^{8*}$	0,1	-
Bull, et al., 2011	Ratolins	Hsd:NIH Swiss	Femelles	4-6 setmanes	-	Intramuscular (cuixa)	-	$2-3 \times 10^8$	0,04-0,05	-
Li, et al., 2012	Ratolins	ICR (neutropenic)	Femelles	18-20 g	6	Intramuscular (cuixa)	-	5×10^5	-	-

Taula 17. Diferents models d'experimentals utilitzats per a avaluar la virulència de soques d'*E. coli*.

Model experimental	Publicat per	Animal utilitzat				Tipus d'inoculació	Altres aspectes rellevants
		Espècie	Estirpe	Sexe	Edat o pes		
Pneumònia	Esposito i Pennington, 1983	Ratolí	C57BL/6	Femelles	14-16 g	Intratraqueal	Models per a testar diferents bacteris (<i>A. Baumannii</i> , <i>S. aureus</i> i <i>K. Pneumoniae</i>)
	Ricard, J., 2012	Ratolí	BALB/C	Mascles	6-8 setmanes	Nasal	
Meningitis	Bortolussi, et al., 1978/Kim, K.S., 1985	Rata	Sprague-Dawley	Mascles i femelles	5 dies	Intraperitoneal	Model de tractament antibiòtic (CTX, IMI-cilastatin, AMP-GEN i AMP- CLR)
Patogènesis aviar							
Cocobacilosis	Peighambari, et al., 2000	Pollets	-	-	2-4 setmanes	Aerosol intranasal	
	Dozois, et al., 2000	Pollets	White Leghorn	-	3.5 setmanes	Sac toràxic d'aire	
	Tivendale, et al. 2010	Pollets	Leghorn	-	8 dies	Intratraqueal	
	Zhao, et al., 2009	Pollets	-	-	1 dia	Subcutània	
Letalitat embrionaria	Nolan, 1992	Pollastre	Ous	-	12 dias	Cavitat alantoidea	
	Tivendale, et al. 2010	Pollastre	Ous	-	12 dias	Cavitat alantoidea	
Altres models							
Colonització intestinal	Maura, et al., 2012	Ratolí	BALB/C YJ	Femelles	7 setmanes	Oral (per mitjà de l'aigua)	Test de resistència a bacteriòfags
	Vimont, et al., 2012	Ratolí	CD-1	Femelles	6 setmanes	Oral	Modificació de l'assaig clàssic de colonització del ratolí
Mastitis	Elezar, et al., 2010	Ratolí	C3H/HeN i C57BL/6	Femelles	7-8 setmanes	Intramamari	Assaig de competició bacteriana intramamària
Endometritis	Sheldon, et al., 2010	Ratolí	C57BL/6	Femelles	6-8 setmanes	Intrauterina	Model de inflamació pelvica del bestia bovi i roedors
Queratoconjuntivitis	Sereny, 1957 i Ruiz-Perez, et al., 2011	Conillet d'índies	-	-	-	Ocular	

II. Objectius

L'objectiu principal del treball que es presenta ha estat el desenvolupament de models murins d'experimentació animal per a l'avaluació de la virulència i patogenicitat de soques d'*Escherichia coli*. Per això s'han proposat els següents objectius concrets:

1. Determinar el grup filogenètic, els factors de virulència i altres característiques biològiques d'un grup de soques d'*E. coli* d'origen urinari i intestinal; amb la finalitat de seleccionar les soques utilitzades per als estudis amb els models experimentals *in vivo*.
2. Estandarditzar dos models murins d'experimentació animal per a l'avaluació d'infeccions extraintestinals causada per *E. coli*.
3. Avaluar el potencial virulent i patogen en dos models murins de les soques d'*E. coli* aïllades de femta i d'orina de dones durant el curs d'una cistitis.

III. Materials i Mètodes

1. Selecció de soques bacterianes

Amb la finalitat d'avaluar el potencial patogen de soques d'*E. coli* en models d'experimentació animal murins. Es van seleccionar 20 soques clíniques pertanyents a una col·lecció prèvia de 111 soques utilitzada per Moreno *et al.*, 2008⁶⁰. Aquestes van ser aïllades de 42 dones amb sospita de cistitis aguda no complicada. De les quals 42 es van aïllar d'orina i 69 de mostres de frotis rectals de les mateixes dones, que van consultar el servei d'urgències de l'Hospital Vall d'Hebron en Barcelona entre gener de 2004 i març de 2006. Els criteris d'inclusió de les pacients van ser: i) edat compresa entre 18 i 65 anys, ii) evidències clíniques i de laboratori compatibles amb cistitis no complicada, tenint en compte els descrits prèviament per Moreno *et al.*, 2006⁵⁹; iii) sense tractament antibiòtic previ dins dels 21 dies següents a la presentació i iv) *E. coli* com a l'únic microorganisme aïllat a l'orina.

En aquest estudi previ de Moreno *et al.*,⁶⁰ es va estudiar el grup filogenètic (GF) i la presència de únicament 16 gens que codifiquen factors de virulència (FV). Per aquest motiu, aquesta vegada es va seleccionar la totalitat de les soques (111) amb l'objectiu de determinar la presència de vuit illes de patogenicitat (PAI).

Adicionalment, es van utilitzar dues soques d'*E. coli*; que van actuar com a controls de procediment al llarg dels experiments. Com a control negatiu es va escollir la soca de laboratori sense virulència K-12 (MG1655), mentre que com a control positiu es va utilitzar la soca uropatògena CFT073. La qual va ser aïllada d'un procés pielonefític i que posteriorment va causar septicèmia.

2. Mètodes microbiològics

2.1 Medis i condicions de cultiu

Com a medis de cultiu es van utilitzar medis sòlids, semi sòlids i líquids. Per a la seva preparació es va utilitzar per a tots, aigua ultra pura MQ obtinguda mitjançant l'aparell *Ultra-pure water system Milli-Q_{plus} 185* (Millipore). La composició de tots els medis de cultiu, suplementes i solucions utilitzades en aquest estudi es detalla a l'annex A.

Un cop preparats tots els medis de cultiu i solucions, es van esterilitzar per calor humida a 121 °C durant 15 min en un autoclau S100 (*Siemens*). En el cas dels medis sòlids, després

d'autoclavar-los es van deixar refredar fins a una temperatura aproximada de 50 °C i es van dispensar en volums de 20 ml en plaques de Petri de plàstic estèrils (*Sterilin*); i una vegada solidificats van ser emmagatzemats a 4 °C fins la seva utilització.

La inoculació dels microorganismes en medis líquids es va realitzar a partir d'un cultiu de nit fresc (ON, *Over-Night*). El qual, es preparà el dia anterior a l'assaig per resuspensió d'una colònia fresca; prèviament sembrada en agar sang i incubada a 37 °C per 18–24 h en 10 ml de medi LB (*Luria Bertani*) líquid estèril en una ampolla (*Pyrex*®). Es va deixar incubant tota la nit (durant un mínim de 16 h) i al dia següent es va realitzar una dilució de l'ON en la quantitat requerida de medi nou estèril (dilució 1/1.000, 1/100 o 1/50 en funció de l'estudi). La incubació dels cultius es feia a 37 °C i sol ser en agitació, a no ser que s'especifiqui el contrari, la qual es va fer a 140 rpm en un agitador *Thermoshake* (*Gerhardt*).

Les mesures de creixement bacterià es basen en i) recompte de bacteris viables en medi sòlid (UFC, Unitats Formadores de Colònies) ii) i també utilitzant la determinació espectrofotomètrica de la densitat òptica (DO) dels cultius líquids a una longitud d'ona dependent del medi de cultiu utilitzat: 550 nm pel medi ric LB i 600 nm per a solució salina o PBS. Per a fer la lectura d'absorbància es va fer servir un espectrofotòmetre *UV-1700 PharmaSpec* (*Shimadzu*) el qual utilitza per a llegir les lectures d'emissió, cubetes d'espectrofotometria de metracrilat *SMPM-010* (*Labbox*); carregades amb un mil·lilitre de cultiu.

Per a les centrifugacions es van utilitzar diferents tipus de centrífuga, dependent del volum de mostra, de manera que:

- Per a volums per sota a 200 µl es va utilitzar la centrífuga *mikro 20* amb rotor *2036* (*Hettich Zentrifugen*) amb una velocitat màxima de 13.000 rpm.
- Per a volums inferiors a 1,5 ml es va utilitzar la centrífuga *Biofuge 13* amb rotor *3757* (*Heraeus Instruments*) amb una velocitat màxima de 13.000 rpm.
- Per a volums iguals o inferiors a 50 ml es va centrifugar els cultius en tubs de polipropilè (*Nirco*) de 50 ml en la centrífuga *Z326K* amb rotor *221.18* (09/018). La qual permet a més, la centrifugació refrigerada amb una velocitat màxima de 18.000 rpm.

2.2 Serotipificació

La presència dels antígens O i H es va determinar per aglutinació seguint el mètode de Guinée *et al.*, 1981¹³⁴. Emprant tots els antisèrums disponibles O (O1-O185) i H (H1-H56). Aquestes tècniques van ser realitzades al *Laboratorio de Referencia de E. coli* (LREC) en Lugo (Espanya). <http://www.usc.es/ecoli/>

2.2.1 Determinació de l'antigen O

Es van emprar els 173 antisèrums O capaços de reaccionar específicament amb els antígens O1 a O185 d'*E. coli*. Aquests antisèrums es van obtenir al LREC immunitzant conills i van ser absorbits per a eliminar les reaccions creuades causants de falsos positius.

Els 173 antisèrums O monovalents es van repartir en 25 antisèrums polivalents formats per 6 o 7 antisèrums monovalents. La dilució final dels antisèrums individuals en el polivalent coincideix amb la dilució d'assaig (1/40 o 1/80).

2.2.1.1 Preparació de les suspensions bacterianes

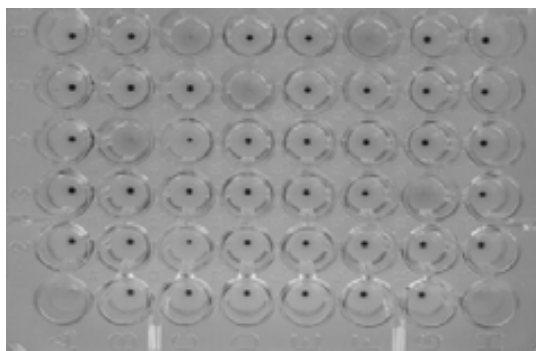
- Cultivar les soques en *Tryptic Soy Agar* (TSA) (*Oxoid*) (37 °C durant 18h).
- Resuspendre els bacteris en 2 ml de solució salina (0,9% NaCl) i ajustar la concentració bacteriana ($1,8 \times 10^9$ bacteris/ml) per comparació amb el tub n. 6 de l'escala de Mc Farland.
- Escalfar la suspensió bacteriana a 100 °C durant 1 h per a eliminar la paret cel·lular i desemascarar l'antigen O.
- Un cop refredat, afegir 2 ml de solució salina formalinitzada (0,5%) contenint violeta de genciana (0,005%). Conservar les suspensions bacterianes a 4 °C durant un màxim de dues setmanes.

2.2.1.2 Determinació presumptiva del serogrup O

- Enfrontar les suspensions escalfades a 100 °C durant 1 h amb els 25 antisèrums polivalents a la dilució d'assaig. Per això, afegir a 50 µl de cada antisèrum, 50 µl

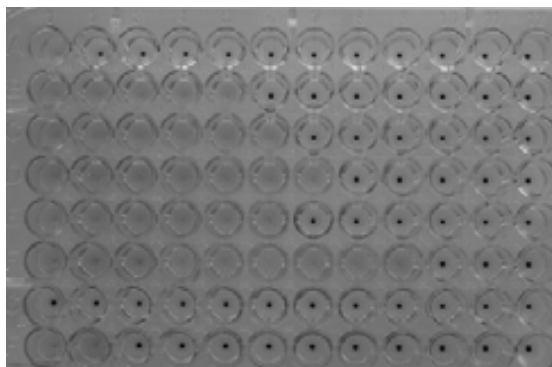
de la suspensió bacteriana escalfada, formalinitzada i tenyida. Tapar la placa i incubar (37 °C durant 18 h).

- Si la soca bacteriana dóna aglutinació amb algun dels antisèrums polivalents empleats, es realitza a continuació el mateix procés amb els antisèrums O monovalents inclosos en el polivalent corresponent. Realitzar la confirmació del serogrup O amb les soques que hagin estat aglutinades per un o més antisèrums O monovalents. Si la soca és negativa amb tots els antisèrums es considera no tipable (ONT).



2.2.1.3 Confirmació del serogrup O

- Col·locar 50 µl de solució salina en tots els pouets de cada fila, excepte en el n. 1.
- Afegir als pouets núm. 1 i núm. 2 de cada fila 50 µl de la dilució d'assaig del antisèrum O corresponent. Fer dilucions seriades (1/2) transferint 50 µl de la barreja del pouet núm. 2 al núm. 3, barrejant i repetint l'operació fins a arribar al pou núm. 10. Utilitzar els pous núm. 11 i 12 com a controls negatius, rebutjant els 50 µl que sobren després de barrejar en el pouet n. 10.
- Afegir 50 µl de la suspensió bacteriana escalfada, formalinitzada i tenyida als 12 pouets de cada fila, començant pel n. 12 i avançant fins el n. 1. Tapar les plaques i incubar (37 °C durant 18 h) i fer la lectura dels resultats determinant els títols.



2.2.2 Determinació de l'antigen H

Es van emprar 53 antisèrums (H1 a H56-*l'Statens Sèrum Institut*, Copenhaguen). Els 53 antisèrums H monovalents es van repartir en 10 antisèrums polivalents formats per 5 o 6

antisèrums monovalents. La dilució final dels antisèrums individuals en el polivalent coincideix amb la dilució d'assaig (1/200).

2.2.2.1 Procediment per a la detecció

- Donar a les soques tres passades consecutives (37 °C durant 48 h) en tubs en forma d'U amb medi semi sòlid per a mobilitat MIL (*Motility-Indole-Lysine, Difco™*) a fi de potenciar l'expressió dels flagels. Si la soca és mòbil continuar el procés. En cas contrari, donar tres noves passades i, si continua sent immòbil, es considerarà H- o HNM (H no mòbil).
- Sembrar en 7 ml de BHI (*Brain-Heart Infusion, Difco™*) i incubar (37 °C durant 6-8 h a 80 rpm). Afegir 7 ml de solució salina formalinitzada sense violeta de genciana i deixar els tubs a temperatura ambient una nit. La terbolesa dels tubs tractats amb solució salina formalinitzada ha de ser comparable a la del tub n. 2 de l'escala de Mc Farland.
- En tubs de vidre tipus Kahn, afegir 0,5 ml de la suspensió bacteriana formalinitzada i 0,5 ml d'antisèrum polivalent H diluït a 1/200 i incubar (45 °C durant 2 h en bany serològic). Realitzar aquest procés amb cadascun dels antisèrums H monovalents inclosos en els antisèrums polivalents positius.



Figura 19. Reacció d'aglutinació per als antígens H. L'aglutinació es tradueix en la formació d'una pel·lícula en el fons del tub, amb el sobrenedant transparent (tub de l'esquerra). En els cultius negatius la manca d'aglutinació suposa que el sobrenedant continua tèrbol (tub de la dreta). Si hi ha aglutinació amb algun dels antisèrums s'estableix l'antigen H. Si no hi ha aglutinació amb cap dels antisèrums, es considera que té un antigen H no tipable (H? O HNT).

2.3 Determinació fenotípica de resistència

L'estudi de sensibilitat als antimicrobians es va realitzar mitjançant la tècnica de disc difusió en placa de medi de cultiu *Mueller Hinton* (Biomérieux) utilitzant tablettes (*Neo-*

Sensitabs™) carregades amb concentracions específiques d'antibiòtic (*Rosco Diagnostica AS*) (Peu de taula 45).

Figura 20. Resistència fenotípica d'una de les soques d'*E. coli* (14334) del present estudi.



2.4 Recompte de bacteris viables en placa

Aquesta tècnica va ser de vital importància durant els procediments portats a terme durant el desenvolupament experimental d'aquesta tesi. Els recomptes d'unitat formadores de colònies (UFC) o també anomenats recomptes de cèl·lules o bacteris viables en placa va ser necessari per a conèixer el nombre de microorganismes "vius" o UFC en una mostra determinada (preparacions d'inòcul o mostres recuperades dels animals d'experimentació). Per tal de determinar aquest nombre, es determina la quantitat de microorganismes amb capacitat de dividir-se en el medi adient, que anomenem viables.

- Es parteix d'una mostra líquida a la que es vol determinar la concentració de cèl·lules desconeguda. Utilitzant plaques de microdilució de 96 pous estèrils (*Nirco*) es dispensa 180 μ l de solució dilusora (Ringer o PBS) a tots els pous necessaris més 20 μ l de mostra, per a arribar a un volum de 200 μ l. Seguidament es preparen banc de dilucions decimal per a cada mostra i es sembren 40 μ l de la dilució escollida en agar LB, fer la sembra per duplicat i com a mínim a de dues dilucions.
- Passat el temps d'incubació (24 h a 37°C) necessari perquè els microorganismes creixin i es formin colònies visibles, es compten el nombre de cèl·lules viables

considerant que cada colònia visible prové originalment d'un únic microorganisme aïllat.

Si la realització del recompte ha estat correcta, han d'aparèixer un nombre aproximadament igual de colònies a cada rèplica, indicatiu del fet que la manipulació ha estat adequada. Alhora, s'ha de mantenir una relació decimal decreixent entre les dilucions sembrades. Per a fer els recomptes, únicament es consideren vàlides les plaques amb un nombre entre 15 i 300 colònies (com més colònies hi ha a la placa, més possibilitats que hi hagi solapament de diverses UFC en una sola colònia).

El resultat final s'expressa com a la mitjana del nombre de microorganismes UFC per mil·lilitre o gram. Per a conèixer el nombre de microorganismes viables per unitat de volum en el cultiu inicial, s'ha de seguir les indicacions següents:

- Comptar el nombre de colònies presents a cada placa sembrada, expressant-ho com a UFC. Una placa serà invàlida per al comptatge si presenta menys de 15 UFC o més de 300 UFC. Per a fer aquest comptatge es va fer servir el sistema de captura d'imatges *GelDoc™ XR* amb llum blanca (*Bio-Rad*) i el programari d'anàlisi de la mateixa casa comercial *Quantity One-Colony Count*.
- Calcular la concentració cel·lular (UFC/ml o g) per a cada placa vàlida i posteriorment informar la mitjana dels recomptes per a cada mostra.

$$\frac{\text{UFC}}{\text{mL}} = \frac{\sum \text{colònies}}{\text{volum mostra sembrada a la placa} \times \text{dilució mostra sembrada}}$$

2.5 Cinètiques de creixement en medi líquid

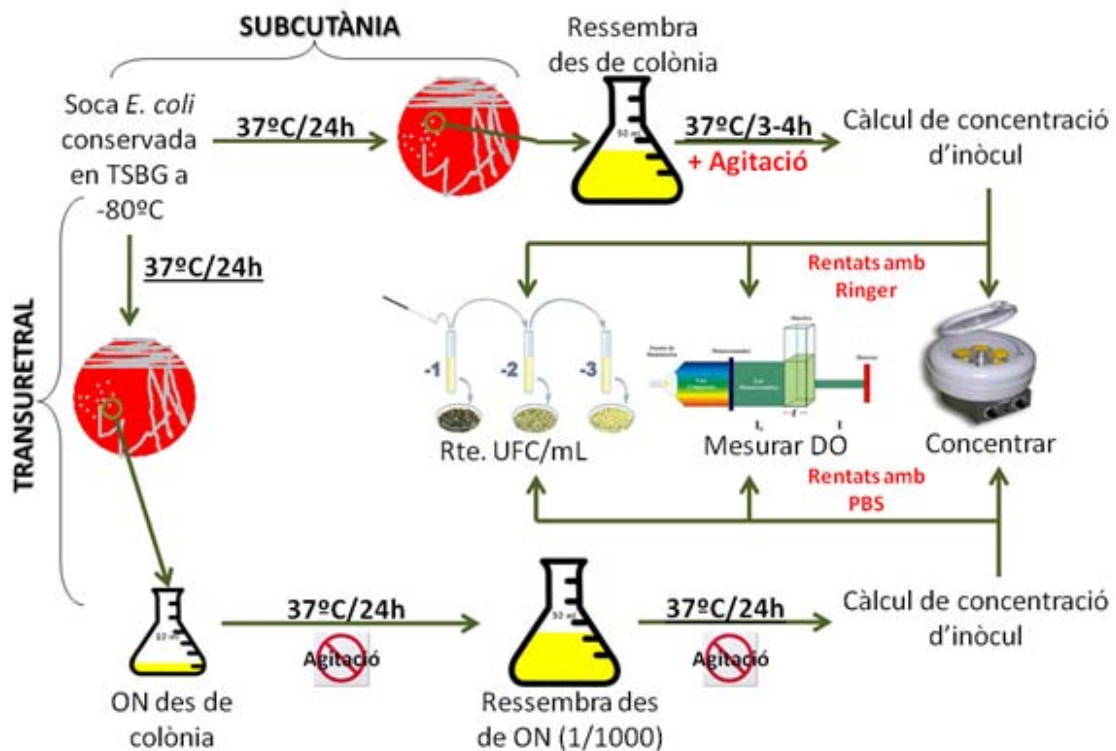
Per a estandarditzar els inòculs es van realitzar cinètiques de creixement per a cada una de les soques a inocular en als models d'experimentació animal, amb l'objectiu d'establir una correlació entre DO i recompte bacterià.

La realització dels estudis de cinètica de creixement de les diferents soques bacterianes es va realitzar des d'una ressebra inicial d'1/1000, d'un cultiu ON de la soca desitjada en medi LB, es van incubar les ressebres a 37 °C amb agitació i es va avaluar la DO₅₅₀ del cultiu cada 20 minuts fins la seva entrada a la fase estacionària.

2.6 Preparació dels inòculs d'experimentació animal

Les mostres que es van inocular en els ratolins es van preparar abans de la seva administració al model animal. Es va partir sempre d'una soca d'*E. coli* conservada a -80°C en medi líquid TSBG (*Tryptic Soy Broth + Glicerol*), la qual es va sembrar per esgotament dins d'una placa d'agar sang (*Biomérieux*) incubant-se a 37°C durant 24 h. L'objectiu d'aquest pas és confirmar la puresa del cultiu i obtenir colònies aïllades en una placa fresca. Després d'aquest creixement es van continuar dos protocols de preparació independents i diferents per a cadascuna de les vies d'inoculació (figura 21).

Figura 21. Preparació dels inòculs per a les vies d'inoculació subcutània i transuretral.



2.6.1 Inoculació subcutània

Partint des d'una colònia aïllada en una placa fresca sembrada en agar sang el dia anterior i després de fer una ressebra d'una única colònia en 50 ml de LB líquid a 37°C durant com a màxim 3-4 hores en agitació (figura 21). Un cop obtingut el creixement amb una DO_{550} de $\pm 0,8$ es va aturar el creixement refredant els cultius en gel i tot seguit centrifugant-los a 4°C durant 5 minuts a $5,000\text{ g}$. Posteriorment, es va a decantar el sobrenedant i es va rentar el *pellet* bacterià dues vegades amb solució de Ringer (NaCl 0.9%). Finalment, el *pellet* es va resuspendre en al vehicle d'inoculació (solució Ringer)

fins una DO_{600} entre 0,020 i 1,499 dependent de la concentració final d'inoculació al model animal (1×10^7 - 5×10^9 UFC/ml) que es va confirmar per recompte en placa de bacteris viables.

2.6.2 Inoculació transuretral

La preparació dels inòculs bacterians per a la via transuretral (figura 21) van començar amb la sembra d'una placa d'agar sang amb 72 h d'anticipació a la inoculació. Això, degut a que previ al dia de preparació d'inòcul s'hauran de preparar dos cultius en dies consecutius. El primer dia en 10 ml de LB líquid, on es farà l'ON des de colònia pura i el segon dia en 50 ml de LB líquid on es farà una ressembla 1/1.000 del ON del dia anterior. Cada un dels dos cultius es van incubar ON a 37 °C, però cap d'ells amb agitació, per a afavorir l'expressió de fimbries. Posterior aquest pretractament del cultiu es va seguir el mateix protocol que per a la preparació del inòcul d'administració per via subcutània fins una DO_{600} entre 0,150 i 2.400 dependent de la concentració final d'inoculació al model animal (2×10^7 - 5×10^{10} UFC/ml) que es va confirmar per recompte en placa de bacteris viables.

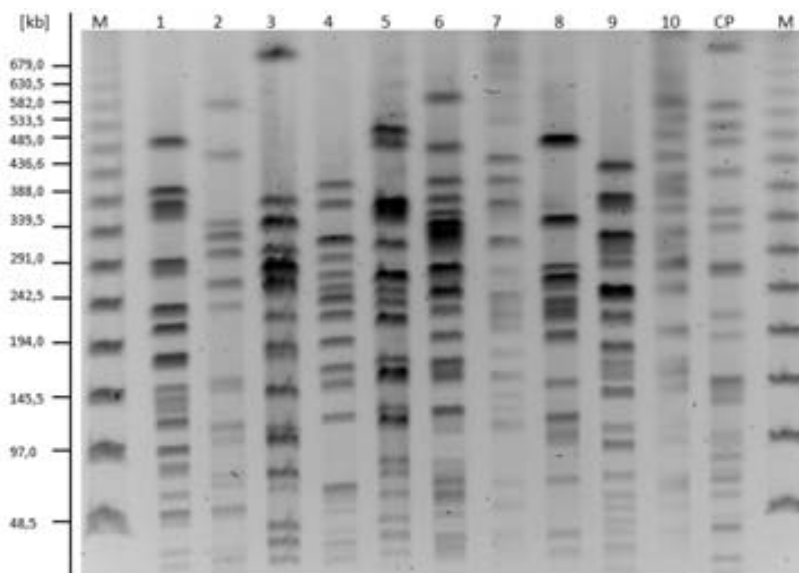
3. Mètodes de caracterització molecular

3.1 Electroforesi en gel de camp polsant

Els perfils de PFGE (*Pulsed field gel electrophoresis*) que es van generar per restricció de DNA encastat en agarosa SKG al 1,2% (*Seakem Gold Agarosa, Lonza*) es va aconseguir amb 0,2 U/ μ l XbaI (*Roche*) d'acord a les instruccions del fabricant. El DNA genòmic digerit amb XbaI es va analitzar en gel d'agarosa a l'1% en 0,5X de TBE a 14 ° C mitjançant l'ús de *CHEF-DR®II (BioRad)*. Quan va ser necessari repetir el procediment degut l'obtenció de mostres no tipables, es va afegir *thiourea (Thiocarbamide; (NH₂)₂CS, Sigma-Aldrich®)* a una concentració de 20 mg/ml. El temps d'execució va ser de 21 hores a 6 V/cm, amb temps de connexió inicial i final de 2,2 i 54,2 s, respectivament segons el protocol estandarditzat de PulseNet. El gel es va tenyir amb bromur d'etidi (1 mg/ml) (*Sigma-Aldrich®*), observat amb UV (figura 22) en el sistema *Gel Doc™ XR (Bio-Rad)*, i es van analitzar amb el programari *Gel Compar II (Applied Maths, St-Martens-Latem, Bèlgica)*. L'anàlisi dels perfils de macrorrestricció es va analitzar utilitzant l'índex estadístic *Dice* basat en el mètode d'agrupament de parells no ponderat utilitzant mitjanes aritmètiques (UPGMA) amb un valor de tolerància de posició a 1,0% per a generar dendrogrames que reflecteixen la

distribució de les soques entre els perfils de PFGE. Els aïllats es van considerar clonals si el seu índex de similitud (coeficient de discriminació) era > 85% segons els criteris de Tenover (≤ 6 bandes de diferència)¹³⁵.

Figura 22. Gel d'electroforesis en camp polsant al 1%.



3.2 Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)

Els productes d'amplificació es van obtenir després d'utilitzar termocicladors (*Gene Amp® PCR System 2700 (Applied Biosystem)*) programats per a realitzar cicles de temperatura que permetessin l'amplificació dels fragments per la polimerasa. En cada reacció d'amplificació es va introduir un control negatiu amb aigua destil·lada per a eliminar la possibilitat de qualsevol contaminació. De la mateixa manera sempre es van utilitzar control positius per a cadascun dels gens en estudi.

3.2.1 Extracció de DNA cromosòmic des de cultiu pur

- Agafar una o unes colònies i resuspendre-les en 100 µl d'aigua MQ contenida dins d'un tub eppendorf per a PCR.
- Escalfar la suspensió 95 °C durant 10 minuts.
- Centrifugar la suspensió escalfada a 13.000 rpm durant 3 min.
- Del sobrenedant fer una dilució 1/1 i finalment tindrem l'extracció de DNA feta.

3.2.2 Oligonucleòtids utilitzats en l'estudi

Els oligonucleòtids que es van utilitzar a les distintes tècniques de manipulació del DNA van ser proporcionats per les cases comercials *Invitrogen™* o *Sigma-Aldrich®* i es detallen a la taula 18. Van ser reconstituïts a una concentració final de 200 µM i conservats a -20 °C.

Taula 18. Gens amplificats i primers utilitzats en les diferents reaccions de PCR.

Categoria	Gen	Oligonucleòtid (5' - 3')	Amplificat per PCR (bp)	Referència	
Factors de virulència	Adhesines	<i>fimH</i>	FimH f TGCAGAACGGATAAGCCGTGG	508	Johnson, et al., 2000
			FimH r GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA		
	<i>fimAV_{urms}</i>	FimAVMT78-f TCTGGCTGATACTACACC	250	Moulin-Schouler, et., 2007	
		FimAVMT78-r ACCTTAGGATGAGTACTG			
	<i>papAH</i>	PapA f ATGGCAGTGGTGCTTTTGGTG	720	Johnson, et al., 2000	
		PapA r CGTCCCACCATACGTGCTCTTC			
	<i>papC</i>	PapC f GTGGCAGTATGAGTAATGACCGTTA	200	Johnson, et al., 2000	
		PapC r ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA			
	<i>papEF</i>	PapEF f GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT	336	Johnson, et al., 2000	
		PapEF r AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA			
	<i>papG</i>	papGII + GIII r ACTATCCGGCTCCGGATAAACCAT	1070	Johnson, et al., 2000	
		papGI f CTGTAATTACGGAAGTGATTCTG	1190		
		papGI' r TCCAGAAATAGCTCATGTAACCCG			
	papG allele I	papG-I f TCGTGCTCAGGTCCGGAATTT	461	Johnson, et al., 2000	
		papG-I r TGGCATCCCCAACATTATCG			
	papG allele I'	papG-I' f CTACTATAGTTTCATGCTCAGGTC	474	Johnson, et al., 2000	
		papG-I' r CTGCATCCTCCACCATTATCGA			
	papG allele II	papG-II f GGGATGAGCGGGCTTTGAT	190	Johnson, et al., 2000	
		papG-II r CGGGCCCCCAAGTAACCTCG			
	papG allele III	papG-III f GGCTGCAATGGATTACCTGG	258	Johnson, et al., 2000	
		papG-III r CCACCAAATGACCATGCCAGAC			
	papG allele IV	papGIV f GACTATTCTGGTTATGATTC	371	Manning, et al., 2001	
		papGIV r CAATGAATTAAGGTTTAG			
	papG allele V	-	-	-	*
		-	-	-	*
	<i>sfaS</i>	sfa1 CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC	410	**	
		sfa2 CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA			
		sfaS f GTGGATACGACGATTACTGTG	240	Johnson, et al., 2000	
		sfaS r CCGCCAGCATTCCCTGTATTC			
	<i>afa/draBC</i>	Afa f GGCAGAGGGCCGGCAACAGGC	559	Johnson, et al., 2000	
		Afa r CCCCTAACGCGCCAGCATCTC			
	<i>afaEB</i>	afaEB f CTAACTGCCATGCTGTGACAGTA	302	Le Bougenec, et al., 2001	
afaEB r TTATCCCTGCGTAGTTGTGAATC					
<i>focG</i>	focG f CAGCACAGGCAAGTGGATACGA	360	Johnson, et al., 2000		
	focG r GAATGTGCGCTGCCCATTTGCT				
<i>bmaE</i>	bmaE1 ATGGCGTAACTGCCATGCTG	507	Johnson, et al., 2000		
	bmaE2 AGGGGGACATATAGCCCCCTTC				
<i>gafD</i>	gafD r CTCCGGAACTCGCTGTTACT	952	Johnson, et al., 2000		
	gafD f TGTTGGACCGTCTCAGGGCTC				
<i>clpG</i>	clpG f GGGCGCTCTCTCCTTCAAC	384	Bertin, et al., 1998		
	clpG r CGCCCTAATTGCTGGCGAC				
<i>iha</i>	IHA-F CTGGCGGAGGCTCTGAGATCA	827	Johnson, et al., 2000b		
	IHA-R TCCTTAAGTCCCCGGCTGA				
<i>hra</i>	hra f CGAATCGTTGTACAGTTTCAG	162	Bingen, et al., 2002		
	hra r TATTTATCGCCCCACTCGTC				
<i>f17</i>	f17 f CGGAGCTAATACTGCATCAACC	615	Bertin, et al., 1996		
	f17 r TGTTGATATCCGGTAAACCGTAC				

(Continuació) **Taula 18.** Gens amplificats i primers utilitzats en les diferents reaccions de PCR.

Categoria	Gen	Oligonucleòtid (5' - 3')	Amplificat per PCR (bp)	Referència	
Sideròfors	iro N	ironec-F	AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG	665	Johnson, et al., 2000b
		ironec-r	GACGCCGACATTAAGACGCAG		
	iucD	iucD f	TACCGGATTGTGCATATGCAGACCGT	850	Maulin-Schouler, et., 2007
		iucD r	AATATCTTCTCCAGTCCGGAGAAG		
	iutA	AerJ f	GGCTGGACATCATGGGAAGCTGG	300	Johnson, et al., 2000
AerJ r		CGTCGGGAACGGGTAGAATCG			
fyuA	FyuA f	TGATTAACCCCGCAGCGGGAA	880	Johnson, et al., 2000	
ireA	FyuA r	CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	254	Russo, et al. 2001	
	ireA2-F	GATGACTCAGCCACGGGTAA			
	ireA2-R	CCAGGACTCACCTCACGAAT			
Toxines	hlyA	hly f	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	1177	Johnson, et al., 2000
		hly r	ACCATATAAGCGGTGATCCCGTCA		
	hlyD	hlyD f	CTCCGGTACGTGAAAAGGAC	904	Hacker, te al., 1988
		hlyD r	GCCCTGATTACTGAAGCCTG		
	hlyF	hly f	TCGTTTAGGGTCTTACCTCAAC	444	Morales, et al., 2004
		hly r	TTTGGCGTTTAGGCATTCC		
	cnf1	concnf f	ATCTTATACTGGATGGGATCATCTGG	974	**
		concnf r	GCAGAACGACGTTCTTCATAAGTATC		
	astA	east1 f	CCATCAACACAGTATATCCG	100	Yamamoto, et al., 1996
		east1 r	GGTCGCGAGTGACGGCTTTG		
	cdtB	cdts f	GAAAATAAATGGAACACACATGTCCG	430	Johnson, et al., 2000
		cdts r	AAATCTCTGCAATCATCCAGTTA		
		cdtS-F'	GAAAGTAAATGGAATATAAATGTCCG		
		cdtS-R'	AAATCACCAAGAATCATCCAGTTA		
	clbB	clbB f	GATTTGGATACTGGCGATAACCG	579	Johnson, et al., 2008
		clbB r	CCATTTCCCGTTTGAGCACAC		
	clbN	clbN f	GTTTTGCTCGCCAGATAGTCATTC	733	Johnson, et al., 2008
		clbN r	CAGTTCCGGGATGTGTGGAAGG		
	pic	pic f	GGGTATTGTCCGTTCCGAT	1200	Wallace-Gadsden, et al., 2007
pic r		ACAACGATACCGTCTCCCG			
tsh	tsh f	CCGTACACAAATACGACGG	300	Maurer, et al., 1998	
	tsh r	GGATGCCCTGCAGCGT			
sat	sat-F	GCAGCTACCGCAATAGGAGGT	937	Guyer, et al., 2000	
	sat-R	CATTGAGTACCGGGGCTTA			
vat	vat f	AGAGACGAGACTGTATTGTC	289	Marrs, et al., 2003	
	vat r	GTCAGGTCAAGTAAACGAGCAC			
Protectines	kpsM II	kil f	GCGCATTGCTGATACTGTTG	272	Johnson, et al., 2000
		kii r	CATCCAGACGATAAGCATGAGCA		
	kps MT II-K1 (neu C)	k1 f	TAGCAAACGTTCTATTGGTGC	153	Johnson, et al., 2000
		kps MT II-K2 (kf/C)	k2 f		
	kps MT II-K5	k2 r	CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	300	Nowrouzian, et al., 2001
		k5 f	GCCACCAACTGTCGCAAAA		
	kps MT III	k5 r	TGTCGCCCAAAACAAAAGATT	809	**
		kpsIII f	TCCTCTGCTACTATTCCCCCT		
	kps K15	kpsIII r	AGGCGTATCCATCCCTCCTAAC	392	Johnson, et al., 2000
		k15 f	ACGGATTACGACAAAGCTC		
	cvaC	k15 r	GGCAAATATCGCTTGGGTTA	581	Schneider, et al., 2004
		cvaC f	CACACACAAACGGGAGCTGTT		
	iss	cvaC r	CTTCCCGCAGCATAGTTCCAT	680	Johnson, et al., 2000
		iss f	CAGCAAACCCGAACCACTTGATG		
traT	iss r	AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA	323	Johnson, et al., 2002	
	TraT f	GGTGTGGTGCATGAGCACAG			
rfc	TraT r	CACGGTTACGCCATCCCTGAG	290	Johnson, et al., 2000	
	rfc f	ATCCATCAGGAGGGACTGGA			
	rfc r	AACCATACCAACCAATGCGAG	788	Johnson, et al., 2000	

(Continuació) **Taula 18.** Gens amplificats i primers utilitzats en les diferents reaccions de PCR.

Categoria	Gen		Oligonucleòtid (5' - 3')	Amplificat per PCR (bp)	Referència
Altres	ompT	ompT f	ATCTAGCCGAAGAAGGAGGC	559	Thomassin, et al., 2012
		ompT r	CCCGGGTCATAGTGTTCATC		
	ibeA	ibe10 f	AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC	170	Johnson, et al., 2000
		ibe10 r	TGGTGCTCCGGCAAACCATGC		
	fliC _{wt}	H7 f	ACGATGCAGGCAACTTGACG	547	Gannon, et al., 1997
		H7 r	GGGTGGTCTGTGCGAACC		
usp	usp f	ACATTACCGCAAGCCTCAG	440	Bauer, et al., 2002	
	usp r	AGCGAGTTCCTGGTGAAAGC			
PAI _{CF703}	RPAI f	GGACATCCTGTTACAGCGCGCA	930	Johnson, et al., 2000	
	RPAI r	TCGCCACCAATCACAGCCGAAC			
Grup filogenètic	chuA	ChuA.1	GACGAACCAACGGTCAGGAT	279	Clermont, et al., 2000
		ChuA.2	TGCCCCAGTACCAAAGACA		
	yjaA	YjaA.1	TGAAGTGCAGGAGACGCTG	211	
		YjaA.2	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC		
TSPÉ4.C2	TspE4C2.1	GAGTAATGTCGGGGCATTCA	152		
	TspE4C2.2	CGCGCCAACAAAGTATTACG			
Ilfes de patogenicitat	PAI ₅₃₆	I.9	TAATGCCGGAGATTCATTGTC	1800	Sabaté, et al., 2006
		I.10	AGGATTTGTCTCAG GCT TT		
	PAI ₅₃₆	orf1up	CATGTCCAAAGCTCGAGCC	1000	Sabaté, et al., 2006
		orf1down	CTACGTCAAGCTGGCTTTG		
	PAI ₁₁₃₆	sfaAI.1	CGGGCATGCATCAATTATCTTTG	200	Dobrindt, et al., 2003
		sfaAI.2	TGTGTAGATGCAGTCACTCCG		
	PAI ₁₅₃₆	IRP2 FP	AAGGATTCGCTGTTACCGGAC	300	Karch, et al., 1999
		IRP2 RP	TCGTCGGGCAGCGTTTCTCT		
	PAI ₁₃₆	papGif	TCGTGCTCAGGTCGGGAATT	400	Johnson, et al., 2000
		papGlr	TGGCATCCCACATTATCG		
PAI ₁₃₆	hlyd	GGATCCATGAAAACATGGTTAATGGG	2300	Landraud, et al., 2003	
	cnf	GATATTTTGTGGCATTGGTTACC			
PAI _{CF703}	RPAI	GGACATCCTGTTACAGCGCGCA	930	Johnson, et al., 2000	
	RPAf	TCGCCACCAATCACAGCGAAC			
PAI _{CF703}	cft073.2Ent1	ATGGATGTTGTATCGCGC	400	Sabate, et al., 2006	
	cft073.2Ent2	ACGAGCATGTGGATCTGC			
Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus		ERIC-1	ATGTAAGCTCTGGGGATTAC	Variable (100-21000)	Zhang, et al., 2002
		ERIC-2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG		

*Comunicació personal amb J. Blanco, 2012, **Comunicació personal amb JR, Johnson 2012.

3.2.3 ERIC PCR

Aquesta tècnica permet determinar la variabilitat genètica de soques d'*E. coli* gràcies a l'amplificació de zones consensos intergèniques repetitives en enterobacteries (ERIC, *enterobacterial repetitive intergenic consensus*) (figura 24), es va realitzar mitjançant el mètode descrit per Zhang *et al.*, 2002¹²³.

Per a l'amplificació es va utilitzar el kit *Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific)* que inclou l'enzim Taq DNA polimerasa, un tampó amb clorur de potassi (MgCl₂), un tampó amb (NH₄)₂SO₄ i una solució de MgCl₂ 25 mM. En la majoria de casos es va usar el primer tampó, de manera que quedava a una concentració final de MgCl₂ d'1,5 mM (taules 18, 19 i 20).

Taula 19. Preparació de la mescla de reacció per a l'ERIC PCR.

Reactius	[Inicial]	[Treboll]	Volum
Tampó	10X	1X	2,5 µl
MgCl ₂	25 mM	3 mM	3 µl
dNTPs (Fermentas)	10 µM	0,2 µM	0,5 µl
Primer ERIC1	10 µM	1 µM	2,5 µl
Primer ERIC2	10 µM	1 µM	2,5 µl
Taq DNA polimerasa*	5U/µl	1,25 U	0,25 µl
Agua destil·lada			11,75 µl
DNA			2 µl
Total reacció			25 µl

* Taq DNA Polymerase (Fermentas)

Taula 20. Programa de termociclador per a l'ERIC PCR.

Fase	Temperatura	Temps	Cicles
Desnaturalització inicial	95°C	5 min	1
Desnaturalització	95°C	1 min	35
Hibridació	52°C	1 min	
Elongació	68°C	3 min	
Elongació final	72°C	10 min	1
Conservació	4°C	Indefinit	

3.2.4 Multiplex PCR

3.2.4.1 Determinació del grup filogenètic

La identificació dels principals filogrupos d'*E. coli* (A, B1, B2 i D) es va realitzar mitjançant l'amplificació de tres gens (taula 18 i 23) utilitzant una Multiplex PCR descrita per Clermont *et al.*, 2000⁷.

Per a l'amplificació es va utilitzar el kit *Expand™ High Fidelity PCR System (Roche)* que inclou l'enzim Taq DNA polimerasa, un tampó amb clorur de magnesi (MgCl₂), un tampó sense MgCl₂ i una solució de MgCl₂ 25 mM. En la majoria de casos es va usar el primer tampó, de manera que quedava a una concentració final de MgCl₂ d'1,5 mM (taules 21, 22 i figura 27).

Taula 21. Preparació de la mescla de reacció per a la Multiplex PCR de grups filogenètics.

Reactius	[Inicial]	[Treboll]	Volum
Tampó amb MgCl ₂	10X	1X	2,5 µl
dNTPs (Fermentas)	10 mM	0,25 mM	0,5 µl
Primer ChuaA.1	20 µM	0,3 µM	0,3 µl
Primer ChuaA.2	20 µM	0,3 µM	0,3 µl
Primer YjaA.1	20 µM	0,9 µM	0,9 µl
Primer YjaA.2	20 µM	0,9 µM	0,9 µl
Primer TspE4C2.1	20 µM	0,3 µM	0,3 µl
Primer TspE4C2.2	20 µM	0,3 µM	0,3 µl
Taq DNA polimerasa*	3,5U/µl	1,05 U	0,3 µl
Agua destil·lada			10,7 µl
DNA			3 µl
Total reacció			20 µl

* Expand™ High Fidelity PCR System (Roche)

Taula 22. Programa de termociclador per a PCR de grups filogenètics.

Procés	Temperatura	Temps	Cicles
Desnaturalització inicial	94°C	4'	1
Desnaturalització	94°C	5"	30
Hibridació	59°C	10"	
Extensió/elongació	72°C	30"	
Extensió final	72°C	7'	1
Conservació	4°C	∞	

Taula 23. Correspondència de l'amplificació dels productes de PCR per a cadascun dels quatre grups filogenètics (figura 27).

Grupo filogenètic	Gens	Gens		
		<i>chu A</i>	<i>yja A</i>	<i>TspE4.C2</i>
A	A1	-	-	-
	A2	-	+	-
B1	B1	-	-	+
	B2	+	+	-
B2	B22	+	+	-
	B23	+	+	+
D	D1	+	-	-
	D2	+	-	+

3.2.4.2 Detecció de gens de virulència

Per tal d'avaluar el potencial virulent de tots els aïllats clínics d'*E. coli*, es van determinar mitjançant múltiple PCR i utilitzant primers específics (taula 18) per a 55 gens (taula 24) distribuïts en sis *pools* que codifiquen 41 FV (taula 25). Aquests *pools* van incloure la detecció de: 13 adhesines, sis sideròfors, 10 toxines, set protectines i cinc FV addicionals; distribuïts de la següent manera que es mostren a la figura 25. El protocol de la tècnica i els control positius va ser proporcional per JR. Jhonson, 2012.

Es va utilitzar el kit *Gene Amp AmpliTaq®* (Applied Biosystems) per a les amplificacions dels factors de virulència que inclou l'enzim *AmpliTaQ® Gold DNA polimerasa*, un tampó sense MgCl₂ i una solució de MgCl₂ 25 mM (taula 26, 27 i 28). Es van repetir totes les amplificacions tres vegades per a assegurar la reproductibilitat i reduir la possibilitat de falsos negatius.

El nombre total de FV es va calcular com a la suma de tots els gens de virulència detectats a cada soca aïllada, ajustant la detecció múltiple de l'operó *pap* (fimbries P), l'operó *hly* (α -hemolisines), l'operó *clb* (colibactina) i *kpsMT II* (càpsules del grup 2).

Alguns dels aïllats van complir els criteris per a ser considerats com a soques ExPEC segons la definició de Johnson *et al.*, 2003⁶¹, és a dir que van contenir com a mínim dos

dels següents cinc gens de virulència *papA* o *papC*, *sfa/foc*, *afa/dra*, *iutA* o *kpsMT II*. Aquesta classificació es va definir després de fer l'anàlisi estadística dels resultats de virulència en tres col·leccions de soques. (infeccions urinàries asimptomàtiques, fecals i estudis de virulència intestinal en animals). La presència de dos o més dels cinc marcadors estudiats va ser el criteri de discriminació entre les soques amb capacitat o no de causar infecció extraintestinal (ExPEC o No-ExPEC, respectivament).

Taula 24. Detecció de 55 gens de virulència en soques d'*E. coli* per Multiplex PCR.

Category	Gene	Description
Adhesins	<i>fim H</i>	Minor component of type 1 fimbriae (D-mannose-specific adhesin)
	<i>fim AV_{MTTB}</i>	Variant form of type 1 fimbriae of APEC MT78
	<i>pap</i>	P fimbriae: Pilus associated with pyelonephritis
	<i>pap AH</i>	Major pilin structural subunit of P fimbrial
	<i>pap C</i>	Outer-membrane usher protein [pilus assembly (central region of pap operon)]
	<i>pap EF</i>	Fimbrial tip components PapEF
	<i>pap G</i>	Gal(α1-4)Gal-specific pilus tip adhesin molecule
	<i>pap G</i> allele I	PapG class I adhesin of P-fimbriae [(rare) J96-associated papG variant]
	<i>pap G</i> allele II	PapG class II adhesin of P-fimbriae (pyelonephritis-associated)
	<i>pap G</i> allele III	PapG class III adhesin of P-fimbriae (cystitis-associated)
	<i>pap G</i> allele IV	PapG class IV adhesin of P-fimbriae
	<i>pap G</i> allele V	PapG class V adhesin of P-fimbriae
	<i>sfa S</i>	S fimbriae minor subunit SfaS (sialic acid-specific)
	<i>afa/dra BC</i>	Dr antigen-specific adhesin operons [AFA (afimbrial adhesin I), Dr, F1845]
	<i>afa EB</i>	Afimbrial adhesin VIII
	<i>foc G</i>	F1C minor fimbrial subunit protein G precursor (sialic acid-specific)
	<i>bma E</i>	M-agglutinin subunit gene (blood group M fimbria)
<i>gaf D</i>	N-acetyl-D-glucosamine-specific fimbrial lectin (G, F17c)	
<i>clp G</i>	Major subunit of CS31A adhesin (K88-related)	
<i>iha</i>	Bifunctional enterobactin receptor/adhesin protein [novel nonhemagglutinin adhesin (from O157:H7 and CFT073)]	
<i>hra</i>	Heat resistant agglutinin	
<i>f17</i>	F17c fimbriae	
Siderophores	<i>iro N</i>	Salmochelin outer-membrane receptor (novel catecholate siderophore receptor)
	<i>iuc D</i>	Ferric aerobactin receptor (iron uptake: transport)
	<i>iut A</i>	Ferric aerobactin receptor (iron uptake: transport)
	<i>fyu A</i>	Pesticin/yersiniabactin receptor protein (siderophore receptor of ferric yersiniabactin uptake)
	<i>chu A</i>	Outer membrane heme/hemoglobin receptor
	<i>ire A</i>	Putative iron-regulated outer-membrane virulence protein [iron-regulated element (novel siderophore receptor)]
Toxins	<i>hly A</i>	α-hemolysin transport protein
	<i>hly D</i>	α-hemolysin transport protein
	<i>hly F</i>	Hemolysin F (APEC)
	<i>cnf I</i>	Cytotoxic necrotizing factor I
	<i>ast A</i>	Enterotoxigenic E. coli heat stable enterotoxin (EAST 1)
	<i>cdt B</i>	Cytolethal distending toxin type IV subunit B
	<i>clb B</i>	Hybrid peptide-polyketide synthase (colibactin)
	<i>clb N</i>	Non ribosomal synthetase (colibactin)
	<i>pic</i>	Protein involved in intestinal colonization a serine protease
	<i>tsh</i>	Temperature-sensitive hemagglutinin a serine protease
	<i>sat</i>	Secreted autotransporter toxin
	<i>vat</i>	Vaculating autotransporter a serine protease
	Protectins	<i>kps M II</i>
<i>kps MT II-K1 (neu C)</i>		Specific for K1 (subgroup II) kpsM
<i>kps MT II-K2 (kfi C)</i>		Specific for K2 (subgroup II) kpsM
<i>kps MT II-K5</i>		Specific for K5 (subgroup II) kpsM
<i>kps MT III</i>		Group III capsular polysaccharide synthesis (e.g. K3, K10, K54)
<i>kps K15</i>		K15 specific KpsM protein (polysialic acid transport)
<i>cvu C</i>		Calicin V structural protein (ColV)
<i>iss</i>		Increased serum survival (outer membrane protein)
<i>tra T</i>		Conjugal transfer surface exclusion protein [serum resistance (outer membrane protein)]
<i>rfa C</i>	O-antigen (O4 LPS synthesis)	
Others	<i>omp T</i>	Outer membrane protein (protease) T
	<i>ibe A</i>	Invasion of brain endothelium protein
	<i>flh C₁₀₃</i>	Flagellar-filament structural protein (H7 flagellin variant)
	<i>usp</i>	Uropathogenic-specific protein (bacteriocin)
	<i>PAI_{CFT073}</i>	Pathogenicity-associated island marker (PAI)

Taula 25. Preparació dels sis pools d'oligonucleòtids per a la detecció dels gens de virulència.

Pool	Gen	Oligonucleòtid	Per una reacció (µl)		Pool	Gen	Oligonucleòtid	Per una reacció (µl)	
				Aigua MQ					Aigua MQ
1	PAI ₁ CF7073	RPAi f	0,299	10,659	<i>cnf</i>	concnf f	0,449	2	
		RPAi r	0,299			concnf r	0,449		
	<i>papA</i>	PapA F	0,299		<i>fyuA</i>	FYUA F	0,150		
		PapA R	0,299			FYUA R	0,150		
	<i>kps</i> MT K15	k15 f	0,299		<i>iroN</i>	IRONEC - F	0,075		
		k15 r	0,299			IRONEC - R	0,075		
	<i>fimH</i>	FIMHF	0,075		<i>clbB</i>	clbB f	0,075		
		FimH R	0,075			clbB r	0,075		
	<i>kps</i> MT III	kpsIII f	0,075		<i>bmaE</i>	bma E1	0,075		
		kpsIII r	0,075			bma E2	0,075		
	<i>papEF</i>	Pap EF - F	0,075		<i>sfa</i>	Sfa1	0,075		
		Pap EF -R	0,075			Sfa2	0,075		
	<i>vat</i>	Vat - F	0,299		<i>iutA</i>	aer J - F	0,075		
		Vat - R	0,299			aer J - R	0,218		
	<i>ireA</i>	ireA2 - F	0,299		<i>papG</i> III	allele III - F	0,075		
ireA2 - R		0,299	allele III - R	0,459					
<i>ibe10</i>	IBE10F	0,075	<i>hra</i>	hra f	0,075				
	IBE10R	0,075		hra r	0,075				
<i>pic</i>	pic f	0,299	<i>gafD</i>	gafD f	0,299				
	pic r	0,299		gafD r	0,299				
<i>hlyD</i>	hlyD f	0,150	<i>kps</i> MT K5	k5 f	0,299				
	hlyD r	0,150		k5 r	0,299				
<i>rfc</i>	rfc f	0,075	<i>cvaC</i>	cvaC f	0,075				
	rfc r	0,075		cvaC r	0,075				
<i>ompT</i>	ompT f	0,075	<i>fliC_{H7}</i>	H7 f	0,075				
	ompT r	0,075		H7 r	0,075				
<i>papG</i> I'	papG-I' f	0,299	<i>cdtB</i>	cdts f	0,075				
	papG-I' r	0,299		cdts r	0,075				
<i>papG</i> I	papG allele I_F	0,075		cdts f'	0,075				
	papG allele I_R	0,227		cdts r'	0,075				
<i>iss</i>	iss f	0,075	<i>focG</i>	focG f	0,075				
	iss r	0,075		ficG r	0,075				
<i>kps</i> MT II	kii f	0,075	<i>traT</i>	TraT F	0,075				
	kii r	0,075		TraT R	0,075				
<i>papC</i>	papC F	0,276	<i>papG</i> II	ALLELEII F	0,150				
	PAPC R	0,075		ALLELEII R	0,150				
<i>papG</i> I	papGI f	0,299	<i>sat</i>	Sat - F	0,299				
	papGI 1'r	0,299		Sat - R	0,299				
<i>papG</i> II&III	pap GII - GIII r	0,299	<i>clbN</i>	clbN f	0,075				
<i>iha</i>	IHA - F	0,075		clbN r	0,075				
	IHA - R	0,075	<i>f17</i>	f17 f	0,075				
<i>afa</i>	Afa F	0,075		f17 r	0,075				
	Afa R	0,469	<i>kps</i> MT II	kii f	0,075				
<i>hlyF</i>	hly f	0,075		Kps II r	0,075				
	hly r	0,075	<i>uidA</i>	uidA f	0,075				
<i>tsh</i>	tsh f	0,449		uidA r	0,075				
	tsh r	0,449	<i>usp</i>	usp f	0,075				
<i>sfaS</i>	sfaS f	0,075		Usp - R	0,075				
	sfaS r	0,075	<i>clpG</i>	clpG f	0,075				
<i>kps</i> MT K1	K1 f	0,075		clpG r	0,075				
	kii r	0,075	<i>afaE8</i>	afae8 f	0,075				
				afae8 r	0,075				
			<i>astA</i>	east1 f	0,075				
				east1 r	0,075				

* Concentració inicial dels oligonucleòtids (200 µM)

Taula 26. Preparació de la mescla per a la reacció de Multiplex PCR de factors de virulència.

Reactius	Concentració		Volum
	[Inicial]	[Treball]	
Tampó	10X	1X	2,5 µl
MgCl ₂	25 mM	4 mM	4 µl
dNTPs (Fermentas)	10 µM	0,8 µM	2 µl
Pool de primers	200 µM	0,6 µM	14,25 µl
Taq DNA polimerasa*	5 U/µl	1,25 U	0,25 µl
DNA			2 µl
Total reacció			25 µl

* AmpliTaq® Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems)

Taula 27. Programa de termociclador per a PCR de factors de virulència.

Fase	Temperatura	Temps	Cicles	
Desnaturalització inicial	95°C	12 min	1	
Desnaturalització	94°C	30 s	28	
Hibridació	Pool 1, 2, 3, 4 i 5	63°C		30 s
	Pool 6	58°C		30 s
Elongació	68°C	3 min		
Elongació final	72°C	10 min	1	
Conservació	4°C	Indefinit		

Taula 28. Control positius de l'amplificació per a la PCR de factors de virulència.

Pool 1	bp	J96	536	RS218	CFD73
PAI	925	1	1	1	1
papA	717	1	1	1	1
K15	581	0	1	0	0
fimH	508	1	1	1	1
kps III	392	1	0	0	0
papEF	326	1	1	1	1
vat	289	1	1	1	1
ireA	254	0	0	0	1
ibe10	171	0	0	1	0

Pool 2	bp	PM9	RS218	31A
cnf	974	0	1	0
fyvA	787	1	1	1
iroN	667	1	1	0
cibB	579	0	1	0
bmaE	507	1	0	0
sfa	410	0	1	0
autA	302	1	0	1
papG III	258	0	1	0
hra	162	1	1	1

Pool 3	bp	J96	L31	2H16	PM9	V27
pic	1200	0	0	1	0	1
hlyD	904	1	1	1	0	0
rfc	788	1	0	0	0	0
opmT	559	0	0	0	0	1
papGI	479/461	1	1	0	0	0
iss	323	0	0	0	1	0
kps II	272	0	1	0	0	1
papC	205	1	1	1	0	1

Pool 4	bp	RS218	PM9	V27
gafD	952	0	1	0
K5	809	0	0	1
cvaC	679	0	1	0
flhC _{H7}	547	1	0	0
cdtB	466	0	0	1
focG	364	0	0	1
traT	290	1	1	
papG II	190	0	0	1

Pool 5	bp	2H16	PM9	2H25	L31	483
papGI/II+III	1140/1070	1	0	1	1	0
iha	829	1	0	0	0	0
afa	594	1	0	0	0	0
hlyF	444	0	1	0	0	1
tsh	300	0	1	0	0	1
sfa5	244	0	0	1	1	1
K1	153	0	0	1	0	0

Pool 6	bp	2H16	PM9	31A	11A	RS218
sat	937	1	0	0	0	0
cibN	733	1	0	0	0	1
f17	615	0	0	0	1	0
kps II	570	1	0	0	0	1
uidA	508	1	1	1	1	1
usp	440	0	0	0	0	1
cipG	384	0	0	1	0	0
afaES	302	0	1	0	0	0
astA	100	1	0	0	0	0

3.2.4.3 Determinació de la presència d'illes de patogenicitat

La determinació de vuit de les principals illes de patogenicitat descrites per *E. coli* es va fer segons la Multiplex PCR (taula 29, 30 i 31) descrita per Sabaté *et al.*, 2006¹³⁶ (figura 26).

Al igual que per a la detecció del grup filogenètic, també es va utilitzar per a amplificar els productes de PCR la Taq polimerasa de Roche del kit *Expand™ High Fidelity PCR System*.

Taula 29. Preparació del dos *pools* d'oligonucleòtids per a la detecció d'illes de patogenicitat.

Pool	Gen	Oligonucleòtid	Concentració (µM)
POOL A	PAI ₁₀₃₀	sfaA1.1	0,5
		sfaA1.2	0,5
	PAI ₁₀₃₆	IRP2 FP	0,5
		IRP2 RP	0,5
	PAI _{ICFT073}	cft073.2Ent1	0,7
	cft073.2Ent2	0,7	
POOL B1	PAI ₁₀₃₆	hlyd	1,2
		cnf	1,2
	PAI ₁₀₃₀	orf1up	0,1
		orf1down	0,1
POOL B2	PAI ₁₀₃₀	I.9	0,8
		I.10	0,8
	PAI _{ICFT073}	RPAI	0,6
		RPAF	0,6
	PAI ₁₀₃₆	papGif	0,04
	papGir	0,04	

Taula 30. Preparació de la mescla per a la reacció de Multiplex PCR de detecció d'illes de patogenicitat.

Pool	Reactius	Concentració		Volum
		[Inicial]	[Treball]	
POOL A	Tampó	10X	1X	2,5 µl
	MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	2,5 µl
	dNTPs (Fermentas)	10 mM	0,5 mM	1,25 µl
	Pool primer A	*	*	2,5 µl
	Taq DNA polimerasa**	3,5 U/µl	1,7 U	0,25 µl
	Agua destil·lada			15 µl
	DNA			1 µl
	Total reacció			25 µl
POOL B	Tampó	10X	1X	2,5 µl
	MgCl ₂	25 mM	3 mM	4 µl
	dNTPs (Fermentas)	10 mM	0,5 mM	1,25 µl
	Pool primer B1	*	*	2,5 µl
	Pool primer B2	*	*	2,5 µl
	Taq DNA polimerasa**	3,5 U/µl	2,4 U	0,4 µl
	Agua destil·lada			9,35 µl
	DNA			2,5 µl
Total reacció			25 µl	

* Per les concentracions d'oligonucleòtids revisar la taula de preparació de pools
 ** Expand™ High Fidelity PCR System (Roche)

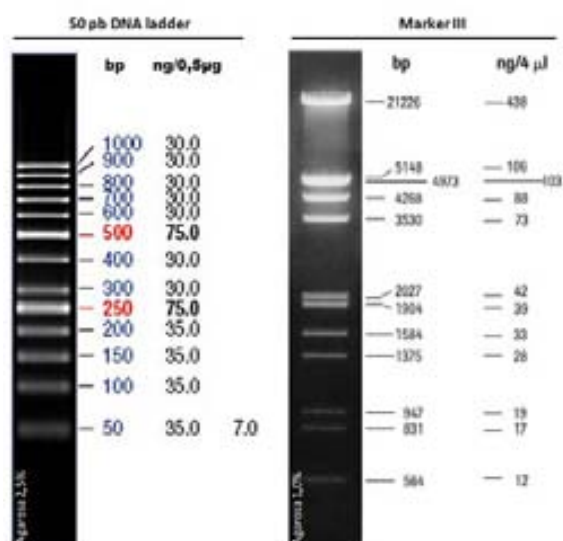
Taula 31. Programa de termociclador per a PCR d'illes de patogenicitat.

Fase	Temperatura	Temps	Cicles
Desnaturalització inicial	94°C	5 min	1
Desnaturalització	94°C	1 s	30
Hibridació	55°C	1 min	
Elongació	72°C	1 min	
Elongació final	72°C	10 min	1
Conservació	4°C	Indefinit	

3.3 Electroforesi de DNA en gels d'agarosa

A més dels reactius propis de la tècnica es van fer servir marcadors de pes molecular per a poder adjudicar els productes d'amplificació pesos molecular. Per als fragments entre 50-1.000 pb es va utilitzar el marcador *GeneRuler™ 50 bp DNA ladder (Thermo Scientific)* i per a fragments entre 0,125-21,2 kb es va utilitzar el marcador *DNA Molecular Weight Marker III, Digoxigenin-labeled (Roche)*.

Figura 23. Marcadors de pes molecular.



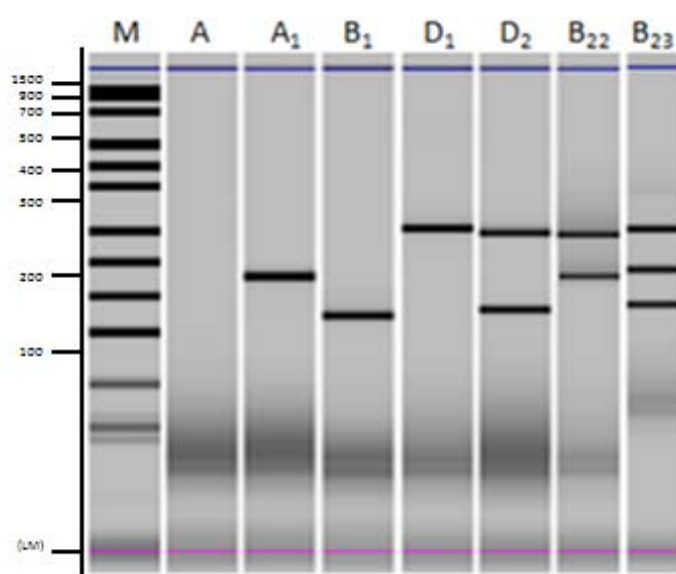
3.3.1 Electroforesi convencional

L'electroforesi per a l'observació del DNA es va realitzar en gels d'agarosa convencionals (LWO EEO (Roche), la qual es va diluir en tampó TBE (Tris Borate EDTA, Sigma-Aldrich®) 1X (preparat a partir de TBE 10X) A més es va afegir 2.5 µl de bromur d'etidi a 10 mg/ml (Sigma-Aldrich®) per cada 50 ml de gel per a obtenir una concentració de 0.5 µg/ml. Aquest agent mutagen s'intercala entre les molècules de l'àcid nucleic, permetent visualitzar els fragments al irradiar-se el gel amb llum UV. En el moment de carregar el gel es va afegir solució comercial transportadora 6 X (Thermo Scientific) a les solucions de DNA en una relació 1:6 respecte al volum final de mostra. A més sempre es va reservar un pou del gel per a ser carregat amb el marcador de pes molecular adient. L'electroforesi es va realitzar en tampó TBE 0,5 X, a un voltatge entre 100-160 V en cubetes horitzontal (Wide Mini-SUB-CELL® GT o SUB-CELL® GT, Bio-Rad). L'observació dels fragments de DNA als gels es va realitzar amb radiació UV utilitzant el sistema de captura Gel Doc™ XR (BioRad) figures 24, 25 i 26).

3.3.2 Electroforesi per capil·lar

Per a la visualització dels amplificats producte de la reacció de PCR de grup filogenètic (figura 27) es va utilitzar l'equip MultiNa (*Microchip Electrophoresis System for DNA Analysis, Shimadzu*) (amb el kit de reactius DNA-1.000, que permet fer separacions de DNA en un rang de 100-1.000 pb. En tot moments es van seguir les instruccions de la casa comercial tant per a la preparació, carrega i anàlisi de les mostres. A més sempre es va reservar una posició per a corre el marcador de pes molecular *GeneRuler™ 50 bp DNA ladder* (*Thermo Fisher Scientific*).

Figura 27. Detecció d'amplificats de grups filogenètics utilitzant el sistema MultiNa.



4. Mètodes alternatius a l'experimentació animal

Tal i com es va deixar constància al Comitè de Ètica i Experimentació animal (CEEA) de la nostre institució, no existeix cap altre mètode alternatiu al procediment proposat per a aconseguir als objectius que es van definir. Però val la pena aclarir que encara que no hi ha aquesta possibilitat, durant el desenvolupament d'aquesta tesi es van aplicar dos dels tres principis que regeixen l'experimentació animal (principis de les 3R: refinament, reducció i reemplaçament). A continuació es descriuen algunes d'aquestes accions en cada un dels dos principis:

- Refinament:

- ✓ Els dos models d'infecció (IUA i septicèmia) imiten les ruta d'infecció reals en l'esser humà.

- ✓ La inoculació de la suspensió bacteriana a una velocitat baixa i volum petit, en el model d'infecció IUA, evitar les probabilitats de causar reflux vesicoureteral, ja que al introduir un elevat volum d'inòcul bacterià directament en el tracte urinari, es poden causar lesions hidrostàtiques en el parènquima renal i una inadequada inducció de la infecció urinària, que serà difícil distingir entre la pròpia IUA o la que resulta del mateix procediment d'inoculació. Per a minimitzar aquest impacte es treballen amb volums de 50 ml i una velocitat baixa d'inoculació per a evitar aquest reflux^{72, 137, 138}.
 - ✓ El benestar dels animals es garanteix portant a terme un protocol de supervisió estricta i continu al llarg dels experiments. En cas de dolor intens es van aplicar els criteris de punt final per al sacrifici dels animals afectats, d'aquesta manera s'evita el patiment excessiu i l'obtenció en bon estat dels òrgans dels animals. Durant l'estandardització de l'inòcul, els criteris del protocol de supervisió van ser valorats i ajustats a les necessitats reals del curs de la infecció *in vivo*.
- Reducció:
 - ✓ La utilització de ratolins consanguinis va oferir l'avantatge de la uniformitat entre subjectes. D'aquesta manera per a un determinat nombre de ratolins estudiats s'incrementa les probabilitats de trobar diferències significatives durant el desenvolupament del model d'infecció.
 - ✓ La caracterització molecular prèvia de 111 soques d'*E. coli* d'origen humà per als procediments d'inoculació en el model animal, van permetre escollir únicament els representants per grup, origen i perfil de virulència adients.
 - ✓ L'estandardització de l'inòcul bacterià és un punt rellevant, ja que va permetre ajustar les condicions experimentals i assegurar la concentració exacta d'inòcul bacterià per a aconseguir els nivells d'infecció desitjats.

5. Models d'experimentació animal

Per a la investigació amb animals de laboratori és necessari realitzar cursos de manipulació d'animals tal com a recull el Decret 214/1.997 del 30 de juliol de la Generalitat de Catalunya (DOGC núm. 2450 del 7 d'agost). Per aquesta raó només es donaran unes quantes directrius, partint de la base que s'han de tenir uns coneixements previs per a realitzar aquest tipus de treballs.

Aquest mateix Decret estableix a més, l'obligatorietat d'establir comitès d'ètica que vetllin pel benestar dels animals d'experimentació i d'altres activitats científiques. Per aquesta raó, tots els protocols experimentals que es detallen a continuació van ser aprovats pel CEEA del Institut de Recerca Vall d'Hebron (VHIR) amb procediment intern núm. 38/10 i addicionalment segons l'article 36 de l'esmentat Decret va requerir l'emissió d'un informe sobre la realització de procediments que necessiten autorització expressa amb registre núm. 5592 del Departament de Medi Ambient i Habitatge (DMAH) de la Generalitat de Catalunya.

Tot el procés experimental s'ha dut a terme en l'estabulari de VHIR. Aquestes instal·lacions compleixen les normes de factors ambientals i de nutrició seguint les recomanacions de la *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA) i del CEEA. Els diferents procediments dels ratolins es van portar a terme a la sales núm. 3 i a la de quarantena de les zones adaptades per a rosegadors del estabulari dotades dels equips necessaris per a la seva manipulació.

Per a estandarditzar els dos models animals es van seguir les descripcions prèvies de la literatura per a cadascun dels dos models (taula 15 i 16).

5.1 Model animal

Per a l'experimentació amb animals es van utilitzar ratolins femella JAX™ CBA/J de 7 setmanes i 9 setmanes d'edat per a les inoculacions subcutànies i transuretrals respectivament, amb un pes entre 16-25 g subministrats per *Charles River (The Jackson Laboratory)*. Aquest ratolins eren llibres de patògens i es van transportar amb caixes amb filtres HEPA.

Els ratolins CBA/J són consanguinis i s'utilitzen àmpliament com una soca de propòsits generals. En 1920, Strong va desenvolupar la soca endogàmica CBA producte d'un encreuament d'una femella albina Bagg i un mascle DBA. Es va introduir a *The Jackson Laboratory* a 1948 a la generació F-67 i després en els Laboratoris *Charles River* a França a l'agost de 1982 en la generació F-186.

5.1.1 Nombre d'animals

Es va utilitzar un total de 499 ratolins distribuïts en diferents protocols per a cadascun dels dos models d'experimentació animal, tal i com es detalla a continuació a la taula 32.

Taula 32. Nombre total d'animals per als procediments d'experimentació animal.

Protocol d'infecció	Procediment	Nombre d'animals	
		Parcial	Total
Subcutani	Estandardització d'inòcul	45	265
	Control procediment amb Ringer	20	
	Estudi de virulència	200	
Ascendent	Estandardització d'inòcul	50	234
	Control procediment amb PBS	16	
	Control de reflux	8	
	Estudi de virulència	160	
Total			499

El nombre d'animals per grup d'inoculació va ser el que habitualment es va utilitzar en altres estudis per a detectar diferències en la virulència entre soques segons les dades recollides en la literatura (taula 15 i 16).

5.1.2 Estabulació i dieta

Els ratolins van ser entregats en el servei d'Estabulari d'Institut de Recerca de l'Hospital Vall d'Hebron (número de registre B9900062), on van ser estabulats dins de la sala de quarantena en grups de cinc per gàbia. Als animals van ser aclimatats en aquest espai de l'estabulari durant un mínim d'una setmana posterior a la recepció. Les gàbies permetien un ambient lliure de patògens gràcies a l'ús bastidors ventilats amb filtres HEPA (*High Efficiency Particulate Air*). La sala va ser mantinguda a una temperatura constant (20-24 °C) i a una humitat relativa del 50-60%. La il·luminació, de tipus artificial, presentava un fotoperíode constant amb cicles de llum/fosc de 12 h, per a mantenir el ritme circadià dels animals.

La sala contava amb una cabina de flux laminar vertical, la qual es va utilitzar per a les inoculacions subcutànies i la supervisió dels animals dels dos models.

L'alimentació subministrada en règim *ad libitum*, va consistir en una dieta natural de grànuls lliure d'antibiòtics i esterilitzada per radiació UV. Al mateix temps l'aigua filtrada i

esterilitzada també per radiació UV, va ser aportada de manera estèril en bevedors, era d'accés lliure i il·limitat per als ratolins.

5.2 Inoculació

Un cop establerts els animals, es van deixar en un període de quarantena de set dies per a permetre l'adaptació dels ratolins al nou ambient i per a assegurar que no presentaven cap patologia. Transcorregut aquest temps es va passar finalment a la inoculació dels ratolins amb als cultius preparats prèviament al laboratori (apartat III 2.6). Per a cada soca bacteriana es van inocular 10 animals, aquest animals van ser dividits en dos grups de cinc cadascun d'ells amb una diferència de com a mínim un mes entre inoculació, per a assegurar la reproductibilitat de la tècnica i els resultats.

5.2.1 Protocols d'inoculació

Amb l'objectiu de facilitar l'estandardització, instauració i la transmissibilitat dels dos models d'experimentació animal desenvolupats durant la tesi, s'ha preparat un vídeo per a fer-lo servir com a eina pedagògica (Annex B). Aquest material audiovisual al igual que les imatges que es presenten a continuació han estat realitzades íntegrament en les instal·lacions de l'estabulari de la nostra institució. Particularment, el vídeo ha estat produït i editat per la unitat de comunicació i imatge del institut i va contar amb l'aprovació i vistiplau del CEEA.

5.2.1.1 Inoculació via subcutània

El model d'infecció sistèmica d'*E. coli* en ratolí es va realitzar segons el descrit per Picard *et al.*, 1999¹⁰. A continuació es descriu el protocol del modelo en ratolins CBA femelles de 7 setmanes d'edat (17 a 22 grams).

- a. Pesar i identificar amb marques a les orelles per a individualitzar els animals.



- b. Per a les inoculacions es van utilitzar xeringues estèrils d'1 ml *BD Plastipak™* (*Becton Dickinson SA*) utilitzant agulla 25G 5/8 de 0,5 mm x 16 mm, inoculant 200 µl del preparat a una concentració determinada d'UFC/ml.
- c. Per a realitzar la inoculació subcutània en primer lloc és necessari immobilitzar l'animal de manera adequada. Per a la qual cosa s'ha de dipositar el ratolí sobre d'una reixeta per a permetre que s'agafi amb les potes i tenir així millor manipulació de l'animal. La inoculació es realitza immobilitzant el ratolí per les orelles, aixecant la pell de la nuca/esquena amb els dits polze i índex i just inocular en el triangle de pell que es forma sota dels dits de subjecció (zona posterior al mig de les orelles).



- d. Introduir l'agulla (25G) a la base de la zona de pell que estem subjectant mantenint l'agulla paral·lela al cos del ratolí per a evitar inocular en capes inferiors a la pell, sense arribar a tocar mai el múscul i injectar 200 µl de mostra a una velocitat moderada (30 s aproximadament).
- e. Retirar l'agulla i pressionar la pell a la zona d'injecció per a evitar que el fluid surti pel punt de pell perforada.
- f. Observar que no es produeix sagnat.
- g. A causa de que la mostra es diposita a la zona subcutània, i si aquesta s'ha inoculat correctament, podem observar la formació d'un nòdul o protuberància al lloc d'injecció que anirà desapareixent a mesura que el fluid és dispersat.
- h. Una vegada inoculada la suspensió bacteriana es retorna a l'animal a les mateixes pautes d'establació inicial (apartat III 5.1.2).
- i. Repetir el mateix procediments per a la resta d'animals del mateix grup d'inòcul. Si es desitja es pot utilitzar la mateixa xeringa carregada des del inici amb el volum corresponen per al total d'animals del grup.

5.2.1.2 Inoculació via transuretral

El model d'IUA d'*E. coli* en ratolí es va realitzar principalment segons el descrit per Hung *et al.*, 2009⁷², però també utilitzant algunes de les adaptacions d'altres autors descrits a la

taula 15. A continuació es descriu el protocol del modelo en ratolins CBA/J femelles (per raons anatòmiques) de 9 setmanes d'edat (19-24 grams).

a. Per a les inoculacions transuretrals prèviament es va preparar un sistema de catèter casolà. Per a la seva fabricació es van utilitzar xeringues estèrils de 0,05 ml insulina U-100 (*ICOPIUMA-SPAZIONULLO*) amb agulla incorporada 30G x 5/16" de 0.30 mm x 8 mm adaptades a un catèter de polietilè *INTRAMEDIC™* (*Becton Dickinson SA*) (0,28 mm (.011") de diàmetre intern x 0,61 (0,024") de diàmetre extern i 25 mm de longitud). El sistema de catèter preparat de manera casolana es va irradiar amb raigs UV dins d'una càmera de flux laminar per a assegurar la seva esterilitat durant la inoculació dels 50 µl del preparat bacterià a una concentració determinada d'UFC/ml.



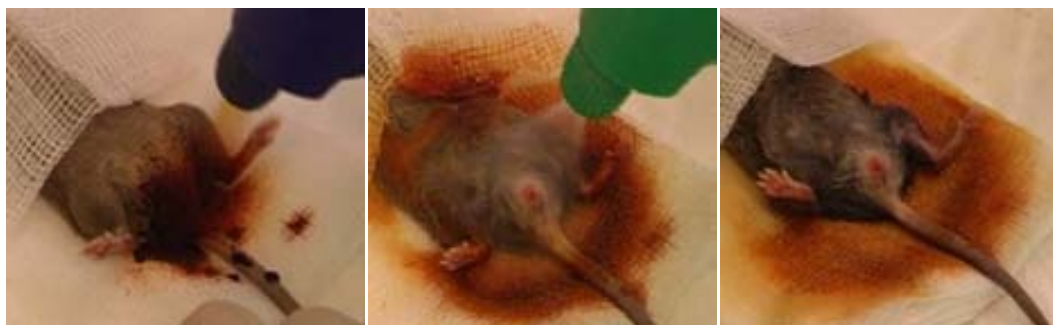
b. En el cas de les inoculacions transuretrals, per ser una tècnica invasiva amb cateterització de l'animal, es va fer necessari instaurar un protocol d'anestèsia general inhalatòria per vapor amb Isofluorà *FORANE®* (*Abbott*) amb una dosi de 5% per inducció en càmera amb 2 L d'oxigen i 2% de manteniment en mascareta individualitzat amb 0,8-1 L d'oxigen.



c. Comprovar que la profunditat de l'anestèsia és correcta. Això ocorre quan no hi ha presència del reflex podal, signe de que es pot començar amb el procediment.

d. Pesar i identificar amb marques a les orelles per a individualitzar els animals de la mateixa manera que es va fer per al pas (a.) de la inoculació via subcutània.

e. Desinfectar la zona abdominal i periuretral amb solució de povidona iodada al 10%, seguida de PBS estèril per a retirar la solució iodada.



f. 24 h prèvies a la inoculació i just abans de la inoculació de cada animal, es va recollir una mostra d'orina (10-50 μ l com a màxim). Aquesta es va obtenir després de fer un massatge pelvíc i pressionant la bufeta amb els dits polze i índex per a afavorir la micció espontània. Amb aquesta mostra es va fer uroanàlisi amb *Combur¹⁰ Test[®] M (Roche)* i urocultiu en medi cromogènic *CPS-ID3 (Biomérieux)* amb l'objectiu d'excloure els ratolins que poguessin presentar una infecció del tracte urinari preexistent i buidar la bufeta al màxim possible abans d'instil·lar l'inòcul.



g. Carregar la xeringa+catèter amb l'inòcul previament suplementat amb 0,05% *CSB (Chicago Sky Blue, Sigma-Aldrich[®])*. Aquesta solució no tòxica i sense efectes bactericides o bacteriostàtics, s'utilitza amb l'objectiu de visualitzar el reflux descendent (sortida de líquid per l'orifici uretral durant o després de la inoculació) o reflux ascendent RVU, reflux vesicoureteral) que s'evidència en el moment de sacrificar el ratolí que actua com a control de reflux dins del grup d'inoculació.

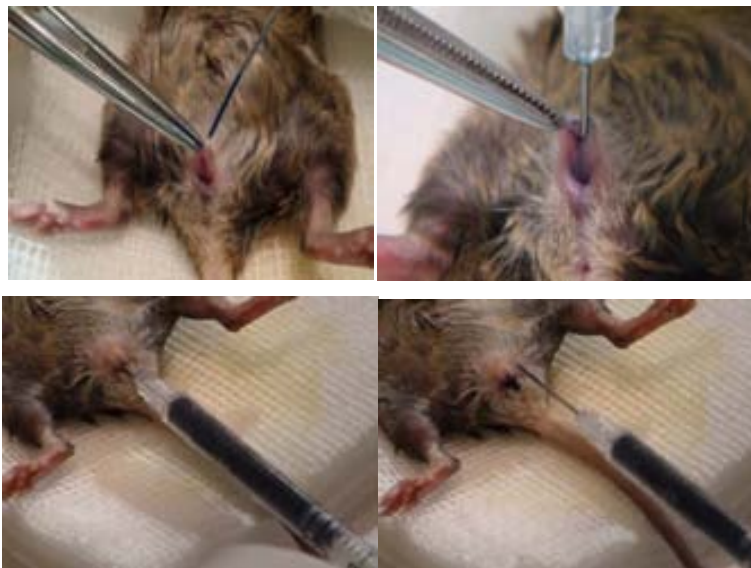




h. Impregnar el catèter amb el lubricant urològic amb tretracaïna *Organon (Schering-Plough)* per a minimitzar els efectes propis de la cateterització.



i. Seguidament localitzar l'orifici uretral i fer la maniobra d'introducció molt suaument del catèter estèril de polietilè directament a la bufeta a través de la uretra, aproximadament 10-15 mm. Deixant 50 μ l de la suspensió bacteriana mitjançant instal·lació directa dins de la bufeta usant una xeringa de tuberculina d'1 ml adaptada a una agulla de 0,3 mm unida a catèter amb un temps de perfusió de 30 s aproximadament.



j. Retirar el sistema de cateterització un cop inoculada la suspensió bacteriana i passar a l'animal a una gàbia de recuperació individual amb llum vermella per a mantenir la temperatura corporal. Supervisar la correcta recuperació d'aquests després de l'anestèsia.

Una vegada passats els efectes de l'anestèsia retornar l'animal amb les mateixes condicions d'establació inicials.

k. Desinfectar la zona de treball i estris abans de la següent infecció.

i. Utilitzar el mateix procediment des del punt b. d'aquests protocol per a l'animal número 2, i així successivament fins al total de ratolins utilitzats en cada experiment.

5.2.2 Estandardització de l'inòcul bacterià

Amb l'objectiu de determinar l'inòcul amb el qual fos possible detectar diferències en la virulència entre les diferents soques a avaluar, va ser necessari previ als experiments de virulència, estandarditzar la concentració de l'inòcul bacterià que es van utilitzar en els models. Ja que existien algunes divergències en la literatura entre els diferents autors, referents a les concentració utilitzades (taules 15 i 16).

Es van utilitzar les dues soques d'*E. coli* escollides per als controls de procediment (taula 40 i 46): i) la soca de laboratori sense virulència K-12 (MG1655) i ii) la soca uropatògena i bacterèmica CFT073.

Per al model de septicèmia es va determinar la DL50 (Dosis Letal 50), què és la dosi mínima necessària de bacteri per causar la mort al 50% dels individus al final de l'assaig. La DL50 de la soca virulenta d'*E. coli* CFT073 es va determinar utilitzant un rang de quatre concentracions que van oscil·lar entre 10^6 i 10^9 UFC/200 μ l d'inòcul bacterià (taula 33).

Per altre banda, utilitzant la mateixa soca (*E. coli* CFT073), prèviament estudiada per altres autors en altres models *in vivo* d'infecció urinària, degut principalment al elevat nombre de factors de virulència que codifica i que pertany al grup filogenètic B2 (taula 46). Aquesta soca ens va servir com a referent d'aquella soca amb capacitat per a ocasionar una infecció urinària real (cistitis, pielonefritis o disseminació hematògena) que ens va permetre determinar l'inòcul apropiat per a poder comparar la virulència de les soques a estudiar. Es van inocular quatre concentracions que van oscil·lar entre 10^6 i 10^9 UFC/50 μ l d'inòcul bacterià (taula 33), utilitzant 10 animals per a cada concentració.

Adicionalment, per als dos models animals es va comprovar que la concentració bacteriana escollida de la soca virulenta, no va causar infecció sistèmica quan es van inocular la soca avirulenta d'*E. coli* K12 en cinc animals per a la via d'inoculació subcutània i 10 animals per a la via d'inoculació transuretral.

Taula 33. Rang de concentracions dels estudis d'estandardització de l'inòcul.

Via d'inoculació	Soca d' <i>E. coli</i>	Inòcul bacterià	Nombre d'animals	
			Parcial	Total
Subcutània	CFT073	1-3 x 10 ⁵ UFC/200 µl	10	45
		1-3 x 10 ⁷ UFC/200 µl	10	
		1-3 x 10 ⁸ UFC/200 µl	10	
		1-3 x 10 ⁹ UFC/200 µl	10	
	K12	Seleccionat en l'estandardització de CFT073	5	
Ascendent	CFT073	5-7 x 10 ⁵ ufc/50 µl	10	50
		5-7 x 10 ⁷ ufc/50 µl	10	
		5-7 x 10 ⁸ ufc/50 µl	10	
		5-7 x 10 ⁹ ufc/50 µl	10	
	K12	Seleccionat en l'estandardització de CFT073	10	
			95	

Les soques es van cultivar i preparar tal i com es descriu prèviament (apartat III 2.6). Partint des de cultius de nit fresc en agar sang (*Biomérieux*) es van tractar fins a resuspendre-les al vehicle d'inoculació per a cada una de les dos vies: Ringer (subcutània) o PBS (transuretral). Les suspensions bacterianes es va ajustar a DO₆₀₀ específica utilitzant un espectrofotòmetre *UV-1700 PharmaSpec (Shimadzu)*. La concentració real va ser confirmada mitjançant la determinació del recompte de bacteris viables com es descriu a l'apartat III 2.4. i segons els paràmetres de la taula 33).

Per a l'assaig d'estandardització del inòcul, es van utilitzar 10 ratolins per a cadascuna de les quatre concentracions bacterianes amb la soca virulenta, el que va suposar 40 animals i cinc animals addicionals amb la soca avirulenta. Considerant que aquest nombre va ser una mida mostral òptima per a obtenir les dades que van permetre la posada a punt de les condicions dels assajos d'infecció individualitzada segons es desprèn de les dades publicades en la literatura.

5.2.3 Estudis de virulència

Per a cada soca es va utilitzar un total de 10 animals distribuïts en dos grups d'inoculacions independents cada una amb cinc animals. Per al model d'infecció sistèmica es van estudiar les diferències en la virulència de 20 soques de diferents grups filogenètics, de diferent procedència i diversos nombre acumulat d'illes de patogenicitat i de factors de virulència. A l'hora que per al model d'IUA es van estudiar les diferències en la capacitat per a produir IUA i la intensitat de la mateixa existents entre 16 soques de l'estudi. (taula 46 i 48).

5.2.4 Controls d'inoculació

El nombre d'animals adequats per a treballar es va estipular a un màxim de 20 animals per grup d'inoculació. Per tant, per a cobrir el total d'animals, s'han de distribuir en 8 i 10 subgrups d'inoculació per via transuretral i subcutània, respectivament. Cadascun d'aquests subgrups amb dos animal, que van actuar com a control de procediment.

En el moment de realitzar els experiments setmanals de virulència (inoculació de quatre soques setmanals (model d'infecció sistèmica) o dues soques setmanals (model d'IUA)) amb grups de cinc animals per a cada soca inoculada, s'utilitzaran controls d'inoculació per als vehicles (Ringer o PBS) durant cada setmana d'inoculació i no cada soca inoculada. Aquest criteri es basa en el principi de la reducció, ja que vam aconseguir reduir el nombre animals en un 50% en comparació si utilitzéssim controls per a cada soca inoculada per setmana.

Si tenim en compte les adequades pautes d'estabulació, s'ha d'oferir als animals un benestar (llarg termini) i un bon estat (curt termini), que permetin augmentar els efectes positius i reduir els negatius, per aquest motiu és important mantenir l'homeòstasi (estat en què l'animal està en harmonia amb el i amb l'entorn), per a evitar el desenvolupament d'estrès que es pot manifestar en forma d'una conducta anormal o una malaltia.

Per aquest motiu és important enriquir l'entorn social i salut cognitiva, aquesta va ser la justificació d'utilitzar dos animals en comptes d'un únic. Així, s'evita tenir un animal estabulat en una única gàbia. Aquesta mesura va pretendre evitar possibles períodes d'estrès que augmentaran les possibilitats de perdre els grups controls i per tant perdre els grups d'inoculació de soques virulentes, que automàticament invalidaria els nostres resultats obligant a reemplaçar el total d'animals del grup d'inoculació de l'estudi de virulència.

En el model d'infecció sistèmica es va incloure un grup de 20 animals per a confirmar que el vehicle en què es va resuspendre l'inòcul (solució Ringer) no tenia cap efecte sobre l'animal (taula 34). Al seu torn, en el model d'IUA es van incloure 16 animals destinats a comprovar que el vehicle de la inoculació (solució PBS) no té cap efecte sobre l'animal. Així mateix, es va incloure un control de reflux (inòcul bacteri + colorant de contrast *CBS* (*Chicago Sky Blue, Sigma-Aldrich*®) (figura 28) per a confirmar l'absència de reflux vesicoureteral provocat per l'efecte mecànic de la inoculació, per això es van inocular un

total de vuit animals, un per cada grup setmanal d'inoculació (taula 34), el qual va ser sacrificat immediatament després de la inoculació, per a analitzar la bufeta, els urèters i els ronyons que van ser inspeccionats visualment per la prova de taca de colorant (figura 28).

Figura 28. Control de correcta inoculació.



Taula 34. Representació dels grups controls del procediment d'experimentació animal.

Grupo control		N. d'animals
Control 1	Subcutània amb solució Ringer	20
Control 2	Ascendent amb solució PBS	16
Control 3	Reflux vesicoureteral	8
Total		44

5.3 Supervisió i seguiment

Un cop realitzades les inoculacions dels ratolins, es va seguir un protocol de supervisió i seguiment diari fent servir la campana de flux laminar de la sala de quarantena o de la sala de manipulació núm. 3. Es va utilitzar a una taula de supervisió aprovada pel CEEA amb la finalitat d'enregistrar els paràmetres valorats cada dia (taula 35).

El procediment es va classificar dins de l'escala de severitat de lleu-moderat, ja que els animals van ser propensos a experimentar a curt termini, sofriment o angoixa a causa del procediment propi de l'anestèsia. Per altre banda, moderat durant el procediment d'administració d'inòcul bacterià per via subcutània o transuretral, ja que en alguns es va poder causar un deteriorament moderat del benestar, per tal motiu es va realitzar un control acurat dels animals durant tot l'experiment amb ajuda de les avaluacions clíniques que van determinar els criteris de punt final per a evitar el patiment. Les mesures correctores pel que fa a l'establiment d'una pauta d'analgèsia o antimicrobianes van ser incompatibles amb els dos models experimentals ja que modificarien els resultats i per tant no van ser aplicables durant el procediment.

Amb aquestes justificacions els animals van ser observats cada hora durant les primeres 6h, durant el segon dia a les 18 h i 24 h i posteriorment cada 12 hores fins al setè dia posterior a la inoculació.

És important ressaltar que cada soca té un perfil de virulència diferent, que oscil·la entre baixa i elevada virulència, depenent de l'acumulació d'aquests factors. Per aquest motiu en les soques que presenten un perfil molt virulent es podria arribar a una escala de procediment sever, però s'evitarà en tot moment aplicant eutanàsia als animals moribunds seguint els criteris de punt final.

5.3.1 Criteris de punt final

Sempre que va ser possible, l'estat moribund ha estat utilitzat com a extrem d'experimentació, en lloc de la mort, perquè s'assumeix que l'eutanàsia a un animal moribund evita o redueix l'angoixa terminal. Aquest van ser algunes de les pautes utilitzades com a criteris de punt final:

- Interferència dels processos per a caminar o per a estar dret en quatre potes que van evidenciar atròfies musculars.
- Pèrdua marcada de la condicions corporals producte de la pertorbació del sistema nerviós central: inclinació del cap, convulsions, tremolors, parèsia, etc.
- Períodes perllongats d'inapetències per a alimentar-se (menjar o beure), que van generar una pèrdua major al 20% del pes corporal o deshidratació.
- Interferència en l'habilitat per a orinar (poliúria, anúria, hematúria) o defecar (diarrea crònica o restrenyiment).
- Manca de pautes de socialització, postura anormal (encorbament) o vocalitzacions.
- Presència de secrecions en mucosa o altres líquids corporals no habituals.
- Pautes persistents d'agressivitat que autoindueixin al trauma o mutilacions.

Durant el període d'observació els animals que sobrepassaven la puntuació dels criteris de punt final (taula 35), van ser eutanasiats per dislocació cervical i subjectes al protocol d'extracció d'òrgans.

Additional i únicament per al model d'infecció urinària a partir del segon dia i durant cada dia a primera hora de supervisió es van reproduir el punts b, c, d, e i f de l'apartat III 5.2.1.2. Amb la finalitat d'agafar mostra urinària per a fer el seguiment de l'evolució de la infecció mitjançant uroanàlisi amb *Combur¹⁰ Test[®] M (Roche)* i urocultiu en medi cromogènic *CPS-ID3 (Biomérieux)*.

Taula 35. Quadre de supervisió individual per a cada animal d'experimentació.

**PROTOCOL DE SEGUIMENT PER ALS ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ 38/10 CEEA (MICROBIOLOGIA)
INFECCIÓ EXTRAINTestinal (SUBCUTÀNEA)**

Data inici experiment: _____

ID animal: _____

Gàbia: _____

Prova inoculada: _____

Edat: _9 setmanes_____

Pes inicial: _____

DADES DE SEGUIMENT DIARI:

	Indicacions	Puntuació*	1r Dia						2n Dia			3r Dia		4t Dia		5è Dia		6è Dia		7è Dia		Altres
			1ah	2ah	3ah	4ah	5ah	6ah	18h	24h	36h	48h	60h	72h	84h	96h	108h	120h	132h	144h	156h	
Pes	Normal	0																				
	<10% pèrdua de pes	1																				
	10-20% pèrdua pes	2																				
	>20% pèrdua de pes	3																				
Aparença física	Normal	0																				
	Desapareix empolainament	1																				
	Pelatge en mal estat, secrecions nasals, dispnea, mucoses violàcies	2																				
	Pelatge en molt mal estat, postura anormal	3																				
Comportament	Normal	0																				
	Canvis menors: dèbil	1																				
	Anormal: mobilitat reduïda, inactiu	2																				
	Immòbil o molt quiet, vocalitzacions, automutilacions	3																				
Total puntuació																						

* Criteris de Punt final: Animals amb qualificacions de 3 o > punts diaris seran eutanasiats.

DADES DE DIA D'EUTANÀSIA:

	Animal	Sang	Melsa	Bufeta	Ronyons
Volum o Pes (ul o g)					
Aparença					

OBSERVACIONS ADDICIONALS: _____

5.4 Eutanàsia i necròpsia

Cada un dels procediments experimental es van donar per finalitzat si es tenien evidències que demostraren la possible insuficiència d'un òrgan o sistema (animals amb puntuacions elevades per als criteris de punt final), per tal motiu es va dur a terme el sacrifici mitjançant exsanguinació per punció cardíaca sota anestèsia (apartat III 5.2.1.2 b i c), seguida de dislocació cervical. Així, es va assegurar el correcte estat dels òrgans a processar i el refinament de la tècnica per a evitar el patiment excessiu de l'animal. Al que fa a la resta d'animals que van sobreviure durant als set dies de l'experiment, es van sacrificar seguint la mateixa pauta.

En finalitzar el procediment (màxim 7 dies posteriors a la inoculació inicial) i sota anestèsia es va desinfectar la cavitat toràcica amb etanol (90%) i es va practicar toracotomia per punció cardíaca en ventricle esquerre per a prendre una mostra de sang utilitzant xeringues estèrils d'1 ml *BD Plastipak™* (*Becton Dickinson SA*) utilitzant agulla 25G 5/8 de 0,5 mm x 16 mm, per a recollir un volum entre 50-700 µl que posteriorment es va dipositar en un tubs *Microvette 500® LH* amb heparina de liti (*SARSTEDT*). Totes les dades generades durant el procés de necròpsia es van anotar al quadre de procediments apartat "dades dia d'eutanàsia" (taula 35).

Després de la presa de sang sota anestèsia es va aplicar la correcta eutanàsia mitjançant dislocació cervical. Un cop morts, es va practicar la necròpsia dels animals utilitzant pinces i tisores de dissecció d'acer inoxidable (*Miltex*). En primer lloc, es va utilitzar un joc de pinces dentades i tisores romes per a fer una incisió mitjana de l'abdomen obrint i apartant la pell que cobreix la cavitat gastrointestinal. En segon lloc, es va utilitzar un segon joc de pinces més fines i tisores punxegudes per a obrir la cavitat abdominal. Utilitzant aquest mateix joc d'instruments es va extraure asèpticament els òrgans d'interès (melsa, fetge o bufeta i ronyons) que van ser dispensats en bosses de *Stomacher* sense filtre de 80 ml de capacitat o tubs de plàstic de 15 ml de polipropilè (*Nirco*) adients segons el protocol d'anàlisi a seguir (apartat III 5.5). Les mostres obtingudes durant aquest procediment van ser pesades en una balança analítica *Ohaus (Pioneer)* i conservades a 4 °C fins el seu processament microbiològic o en formaldehid (10%) per a l'estudi histològic.

Posteriorment a la necròpsia, les gàbies buides van ser tractades pel personal encarregat de l'estabulari i el cossos dels ratolins es van dipositar dins de bosses plàstiques a un congelador horitzontal, fent registre al llibre de baixes d'animals perquè una empresa

externa es fes càrrec de la seva eliminació per incineració, mentre que el material utilitzat per a la necròpsia va ser esterilitzat per a nou ús.

5.5 Processament de mostres

Una vegada es van sacrificar el ratolins correctament per dislocació cervical i es van fer els procediments de dissecció, diferents mostres van ser preses per ser cultivades o analitzades microscòpicament de la següent manera:

5.5.1 Anàlisi microbiològic

5.5.1.1 Sang

Les mostres de sang preses per a confirmar els quadres bacteriemics, obtingudes per punció cardíaca i conservades en tubs *Microvette 500® LH* amb heparina de liti (*SARSTEDT*), es van sembrar amb nansa calibrada 1/1.000 per a fer cultiu quantitatiu del UFC/ml de sang.

5.5.1.2 Orina

Un volum d'orina entre 10-50 µl com a màxim, obtinguda de cada animal per massatge pelvic suau sota anestèsia, es va dipositar dins d'un tub d'1,5 ml estèril (*ependorf*). Les mostres d'orina corresponents a les 24 h i just abans de la inoculació van tenir per objectiu d'excloure els ratolins que poguessin presentar una IU preexistent. Així mateix, l'establiment i persistència de bacteris en les vies urinàries del ratolí es va controlar per cultius seqüencial (24, 48, 72, 96, 120 i 144 hores) fins el moment del sacrifici.

Les mostres d'orina es van utilitzar per fer uroanàlisi amb *Combur¹⁰ Test® M (Roche)*, amb l'objectiu de determinar en orina densitat específica, pH, leucòcits, nitrits, proteïnes glucosa, cossos cetònics, urobilinogen, bilirubina i sang (eritròcits i hemoglobina). Per la seva banda l'urocultiu es va realitzar per a determinar quantitativament el nombre d'UFC/ml o log UFC/ml, per a portar-lo a terme la mostra d'orina es va sembrar en medi cromogènic *CPS-ID3 (Biomérieux)* amb una nansa 1/1.000.

El diagnòstic de compatible amb IU es va confirmar mitjançant la presència de leucòcits, eritròcits, nitrits, proteïnes i cultiu positiu d'orina amb recomptes $\geq 10^3$ UFC/ml d'orina o log UFC/ml.

5.5.1.3 Òrgans

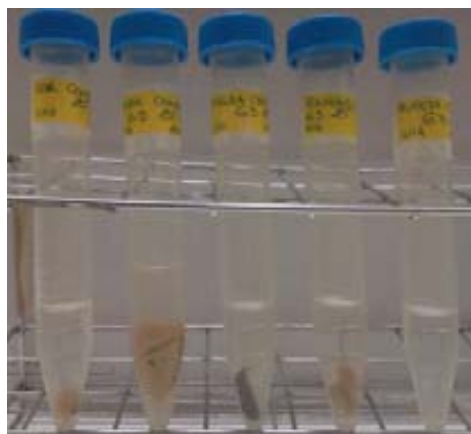
Els òrgans van ser extrets i rentats asèpticament dues vegades amb Ringer (model septicèmia) o PBS (model IUA). Posteriorment, es va eliminar l'excés d'aigua, es van introduir de manera individualitzada en bosses de *Stomacher* sense filtre de 80 ml de capacitat i es van pesar en una balança analítica *Ohaus (Pioneer)*. Per al model d'IUA la bufeta va ser tallada longitudinalment per a permetre a la vegada els estudis microbiològics i histològics en paral·lel. Així mateix, els ronyons es van separar disposant un representant per a cada àrea d'estudi.

Fins el seu processament al laboratori les mostres per a anàlisi microbiològics van ser conservades a 4 °C. Posteriorment als teixits dins de les bosses es van afegir volums definits de Ringer i PBS segons el model experimental: 1 ml per a les bufetes, 5 ml per a la melsa i els ronyons, 10 ml pel fetge. Les bosses amb els òrgans i la solució homogeneïtzadora prèviament macerats manualment es van passar per l'homogeneïtzador (IUL Masticator).

Els diferents homogeneïtzats es van sembrar en plaques d'agar LB per la tècnica de recompte de bacteris viables (apartat III 2.4). Després de 24 hores d'incubació a 37 °C, es va comptar el nombre de bacteris viables amb el programari *Quantity One-Colony Count*. Els resultats dels cultius quantitius es van expressar en UFC/g de teixit o log UFC/g de teixit.

5.5.2 Anàlisi histològic

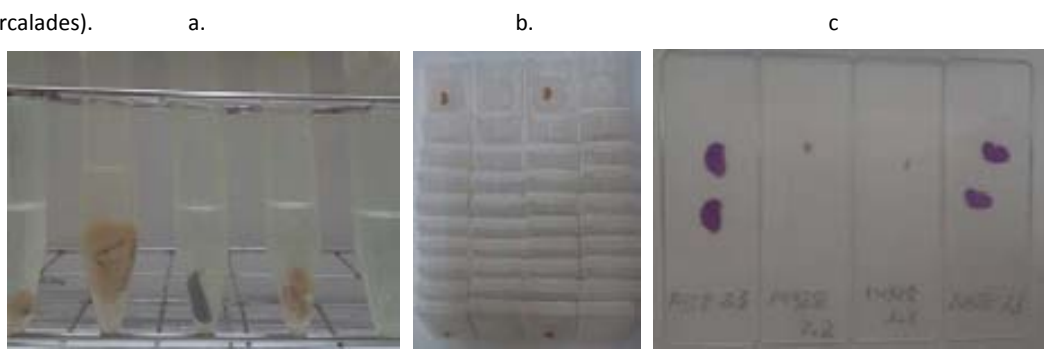
L'anàlisi histopatològic va ser realitzat pel servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Vall d'Hebron. La finalitat d'aquests estudis va ser comprovar la presència de canvis o lesions tissular producte de la IU. Una vegada disseccionats els òrgans dels ratolins corresponents a les segones inoculació de cada soca, es van separar 88 mostres de bufetes (únicament la meitat del òrgan després de fer un tall longitudinal per a generar mostres equitatives per a l'estudi microbiològic i histològic) i 88 ronyons (indistintament de qualsevol dels dos flancs). Posteriorment, es van introduir en un tub plàstic de 15 ml de polipropilè (*Nirco*) per a ser fitxades



amb 3 ml de formaldehid (*Sigma-Aldrich*[®]) al 10% amb un canvi de la mateixa solució a les 24 h per a descartar residus alliberat pel òrgan durant aquell temps i mantenir la seva preservació fins l'anàlisi.

Els teixits es posar en blocs de parafina, seguidament es van tallar amb microdissector en seccions de 5 mm de gruix i finalment es van tenyir amb hematoxilina-eosina (figura 29 i 46).

Figura 29. Mostres per a l'anàlisi histològic. a. Conservació d'òrgans (cor, fetge, melsa, ronyons i bufeta) en formaldehid al 10%, b. blocs de parafina (a la foto mostres de de ronyó i bufeta intercalades) i c. Preparacions en portaobjecte tenyides amb hematoxilina-eosina (a la foto mostres de de ronyó i bufeta intercalades).



La patòloga (M. S) va avaluar les lesions de bufeta i ronyons segons els criteris histològics descrits per Hopkins *et al.*, 1998¹³⁹. La valoració microscòpica de 176 mostres de teixit, que van incloure la totalitat de soques estudiades en els segons grups dels assajos de virulència, així com a mostres corresponents els grups control de procediment d'inoculació amb PBS i soques patògenes van ser cegament incloses. Aquestes mostres van ser analitzades per part de l'històloga sense coneixement de la procedència, característiques de cada soca, ni resultats previs de cultiu microbiològic.

Taula 36. Escala de classificació histopatològica per al grau d'inflamació. Presa de Hopkins *et al.*, 1998¹³⁹.

Grau	Condicions	
	Bufeta	Ronyó
0	Normal	Normal
1	Infiltració de cèl·lules inflamatòries subepitelials (focal i multifocal)	Inflamació focal (infiltració cel·lular i/o edema a la pelvis)
2	Edema i infiltració de cèl·lules inflamatòries subepitelials (difusa)	Inflamació focal (més greu) de la pelvis a la medul·la amb o sense edema moderat
3	Marcad de cèl·lules inflamatòries subepitelials amb necrosi i neutròfils en l'epiteli de la bufeta i la mucosa	Inflamació multifocal i cèl·lules de la pelvis a la medul·la
4	Extensió d'infiltrat de cèl·lules inflamatòries en el múscul, a més dels criteris per al grau 3	Inflamació extensa i necrosi segmentària evident a partir de la pelvis per al còrtex
5	Pèrdua de la superfície de l'epiteli (necrosi total amb infiltrat de cèl·lules inflamatòria)	Necrosi tissular difusa i infiltració de cèl·lules inflamatòries estesa des de la pelvis al còrtex

6. Mètodes d'anàlisi estadístics

Les anàlisis es van realitzar utilitzant el software *SPSS Statistics 19 (IBM-SPSS Inc)*. Les comparacions de les associacions entre els marcadors de PAI i els grups filogenètics, per a avaluar les diferències entre els grups definits, mitjançant els mètodes de *Mann-Whitney* i la prova exacta de *Fisher*. Quan va ser possible, es van calcular els *Odds ratios* (amb un interval de confiança (CI) del 95%). $p \leq 0,05$ va ser el punt de tall de les diferències estadísticament significatives.

Així mateix utilitzant el mateix programari, quan va ser possible les diferències entre grups filogenètics i els diferents percentatges de mortalitat es van calcular fent servir la prova exacta de *Fisher* o de *Chi-quadrat* en taules de contingència. Per la seva banda la comparació del nombre d'UFC que es van trobar en els diferents teixits i líquids analitzats es va efectuar mitjançant el test *U de Mann Whitney*. L'hipòtesi nul·la va ser rebutjada, i tots els resultats es van considerar estadísticament significatius per a valors de $p \leq 0,05$.

Finalment, la resta de paràmetres i gràfics estadístics es van calcular i dissenyar utilitzant el programari *Microsoft® Office Excel*. La recuperació bacteriana dels diferents òrgans es va expressar en UFC per ml de líquid d'orina o de sang, i per grams de teixit homogeneïtzat. A causa de la gran inclinació positiva de valors de recuperació bacteriana es va fer una transformació dels valors per a graficar a escala logarítmica. Es van calcular la mitjana aritmètica i la mediana corresponents a cada grup inoculat per a fer les anàlisis estadístiques.

IV. Resultats

1. Determinació de la virulència intrínseca *in vitro* d'una col·lecció de soques d'*E. coli* aïllades simultàniament del tracte intestinal i de l'orina de dones amb infecció urinària no complicada

1.1 Determinació de les illes de patogenicitat en soques d'*E. coli* aïllades de femta i d'orina de dones durant el curs d'una cistitis no complicada

Per tal d'avaluar la presència de vuit marcadors d'illes de patogenicitat (PAI) en soques d'*E. coli* aïllades d'infeccions urinària (IU) tant d'orina com de femta, es va dur a terme un estudi amb una col·lecció de 111 soques utilitzada prèviament per Moreno *et al.*, 2008⁶⁰ a les quals en aquell estudi es va determinar el grup filogenètic (GF) i la presència de 16 gens codificants de factors de virulència (FV). Aquestes soques van ser aïllades de 42 dones amb cistitis aguda no complicada, que van consultar el servei d'urgències de l'Hospital Vall d'Hebron en Barcelona entre gener de 2004 i març de 2006.

1.1.1 Prevalença de PAI i distribució segons l'origen dels aïllats

Dels 111 clons d'*E. coli* analitzats, 69 (62,16%) es van aïllar de la femta i 42 (37,83%) de l'orina. D'aquests 103 portaven PAI amb una mitjana (\bar{x} PAI) de 4 en els clons d'orina i 2 en els de femta ($p < 0,001$). Les soques urinàries tenien una probabilitat (*Odd Ratio*) del 8.55 de tenir 4 o més PAI quan es van comparar respecte a les fecals.

A la taula 37 es presenta la prevalença de les vuit PAI analitzades en el total d'aïllats, ordenats per GF i alhora per origen. On es pot observar que la major prevalença és de la PAI_{VI536} (71% fecal vs 90% UPEC), seguida per PAI_{ICFT073} (48% vs 79%), PAI_{I536} (28% vs 64%), PAI_{II96} (19% vs 57%), PAI_{IIICFT073} (17% vs 60%), PAI_{II536} (32% vs 24%), PAI_{IIII536} (7% vs 2%), PAI_{II96} (48% vs 79%) i la PAI_{II96} no va ser detectada en cap aïllat.

En 14 de les 42 dones estudiades, el clon urinari causant de la infecció va ser l'únic clon recuperat a la femta. Per aquesta raó, es va determinar la diferència quantitativa en el nombre de PAI dels aïllats d'*E. coli* d'orina o de femta en la resta de 28 dones, trobant que la comparació simultània del clon(s) intestinal(s) i el causant de la infecció tenien una \bar{x} PAI de 3 vs 4 respectivament ($p = 0,04$).

Taula 37. Prevalença de PAI segons origen.

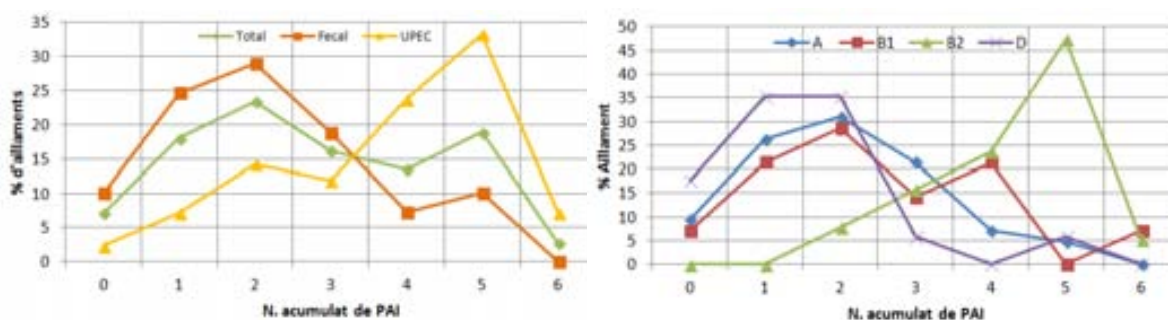
Origen	n	Prevalència PAI [n d'aïllaments (%)]							
		PAI I536	PAI II536	PAI III536	PAI IV536	PAI IJ96	PAI IIJ96	PAI ICFT073	PAI IICFT073
E. coli Fecal									
A	37 (53,62)	10 (27,02)	13 (35,13)	1 (2,70)	23 (62,16)	0	8 (61,62)	17 (45,94)	3 (8,10)
B1	12 (17,39)	2 (16,66)	8 (66,66)	4 (33,33)	8 (66,66)	0	0	2 (16,66)	2 (16,66)
B2	9 (13,04)	6 (66,66)	0	0	9 (100)	0	5 (55,55)	9 (100)	7 (77,77)
D	11 (15,94)	1 (9,09)	1 (9,09)	0	9 (81,81)	0	0	5 (45,45)	0
Total	69 (62,16)	19 (27,53)	22 (31,88)	5 (7,24)	49 (71,01)	0	13 (18,84)	33 (47,82)	12 (17,39)
E. coli UPEC									
A	5 (11,9)	1 (20)	3 (60)	0	4 (80)	0	2 (40)	2 (40)	1 (20)
B1	2 (4,76)	1 (50)	2 (100)	0	2 (100)	0	2 (100)	1 (50)	1 (50)
B2	29 (69,04)	24 (82,75)	4 (13,79)	1 (3,44)	28 (96,56)	0	18 (62,06)	29 (100)	22 (75,86)
D	6 (14,28)	1 (16,66)	1 (16,66)	0	4 (66,66)	0	2 (33,33)	1 (16,66)	1 (16,66)
Total	42 (37,83)	27 (64,28)	10 (23,8)	1 (2,38)	38 (90,47)	0	24 (57,14)	33 (78,57)	25 (59,52)
Total	111	46 (41,44)	32 (28,82)	6 (5,4)	86 (77,47)	0	37 (33,33)	66 (59,45)	37 (33,33)

n: nombre de soques estudiades per cadascuna de les agrupacions mencionades dins dels dos origen dels aïllaments (fecal o comensal) i amb la Prevalença específica per a cadascuna de les vuit PAI estudiades.

Per el que respecta als GF, dins de les soques fecals la distribució seguida en ordre descendent va ser A (54%), B1 (17%), D(16%) i B2 (13%), encara que en les soques urinàries va ser B2 (69%), D (14,28%), A (12%) i B1 (5%). L'anàlisi de la relació entre la presència de PAI i la pertinença a algun dels quatre grups filogenètics va demostrar que per als aïllats del GF A i B1 en associació, la \bar{x} PAI va ser 2 per als de femta i 3 per als d'orina ($p=0.06$), però per als del GF B2 i D en associació, va ser de 2 i 4, respectivament ($p=0.009$).

Quan es va analitzar el nombre acumulat de PAI segons el GF (figura 30, i taula 38) es va posar en evidència que B2 va ser el GF amb major nombre de PAI aïllades d'una mateixa soca i amb major Prevalença, acumulant fins 5 PAI, tant en les soques fecals com a en les urinàries (56% i 45%, respectivament) seguida en les soques fecals del GF D amb 2 PAI (45%), B1 amb 2 PAI (33%) i A amb 1 PAI (30%). Mentre que en les soques urinàries després del GF B2 trobem B1 amb 3 i 6 PAI (50% cadascun), A amb 2 PAI (60%) i finalment D amb 2 i 5 PAI (17% cadascun).

Figura 30. Nombre acumulat de PAI segons origen i grup filogenètic.



Taula 38. Nombre acumulat de PAI segons grup filogenètic i origen.

Grup filogenètic	Nombre acumulat de PAI [n d'aïllaments (%)]							
	n	0	1	2	3	4	5	6
<i>E. coli</i> Fecal								
A	37 (53,62)	4 (10,81)	11 (29,72)	10 (27,02)	8 (21,62)	2 (5,40)	2 (5,40)	0
B1	12 (17,39)	1 (8,33)	3 (25)	4 (33,33)	1 (8,33)	3 (25)	0	0
B2	9 (13,04)	0	0	1 (11,11)	3 (33,33)	0	5 (55,55)	0
D	11 (15,94)	2 (18,18)	3 (27,27)	5 (45,45)	1 (9,09)	0	0	0
Total	69 (62,16)	7 (10,14)	17 (24,63)	20 (28,98)	13 (18,84)	5 (7,24)	7 (10,14)	0
<i>E. coli</i> UPEC								
A	5 (11,9)	0	0	3 (60)	1 (20)	1 (20)	0	0
B1	2 (4,76)	0	0	0	1 (50)	0	0	1 (50)
B2	29 (69,04)	0	0	2 (6,89)	3 (10,34)	9 (31,03)	13 (44,82)	2 (6,89)
D	6 (14,28)	1 (16,66)	3 (50)	1 (16,66)	0	0	1 (16,66)	0
Total	42 (37,83)	1 (2,38)	3 (7,14)	6 (14,28)	5 (11,90)	10 (23,80)	14 (33,33)	3 (7,14)
Total	111	8 (7,20)	20 (18,01)	26 (23,42)	18 (16,21)	15 (13,51)	21 (18,91)	3 (2,70)

1.1.2 Determinació de la distribució de les PAI en les soques d'*E. coli*

En el 51,5% de les diverses soques, les PAI s'agrupen d'una manera numèricament progressiva i qualitativament ordenada.

La distribució de PAI en el total de soques estudiades d'*E. coli* independentment del seu origen va demostrar que 58 aïllats presentaven la mateixa combinació i mateix nombre acumulat de PAIs. A la figura 32 es pot observar l'organització en ordre ascendent del nombre acumulat de PAI i alhora per patró de distribució majoritari (emmarcat i amb asterisc en un requadre verd).

Per tant, es va confirmar per camp polsant la clonalitat d'aquestes soques majoritàries demostrant-se la clonalitat (>85% similitud, línia vermella) en nou d'elles (figura 33). D'aquesta manera es va confirmar que del total de soques estudiades el 51,46% de les soques tenien diferent clonalitat i albergaven el mateix nombre i la mateixa combinació de PAI (figura 31).

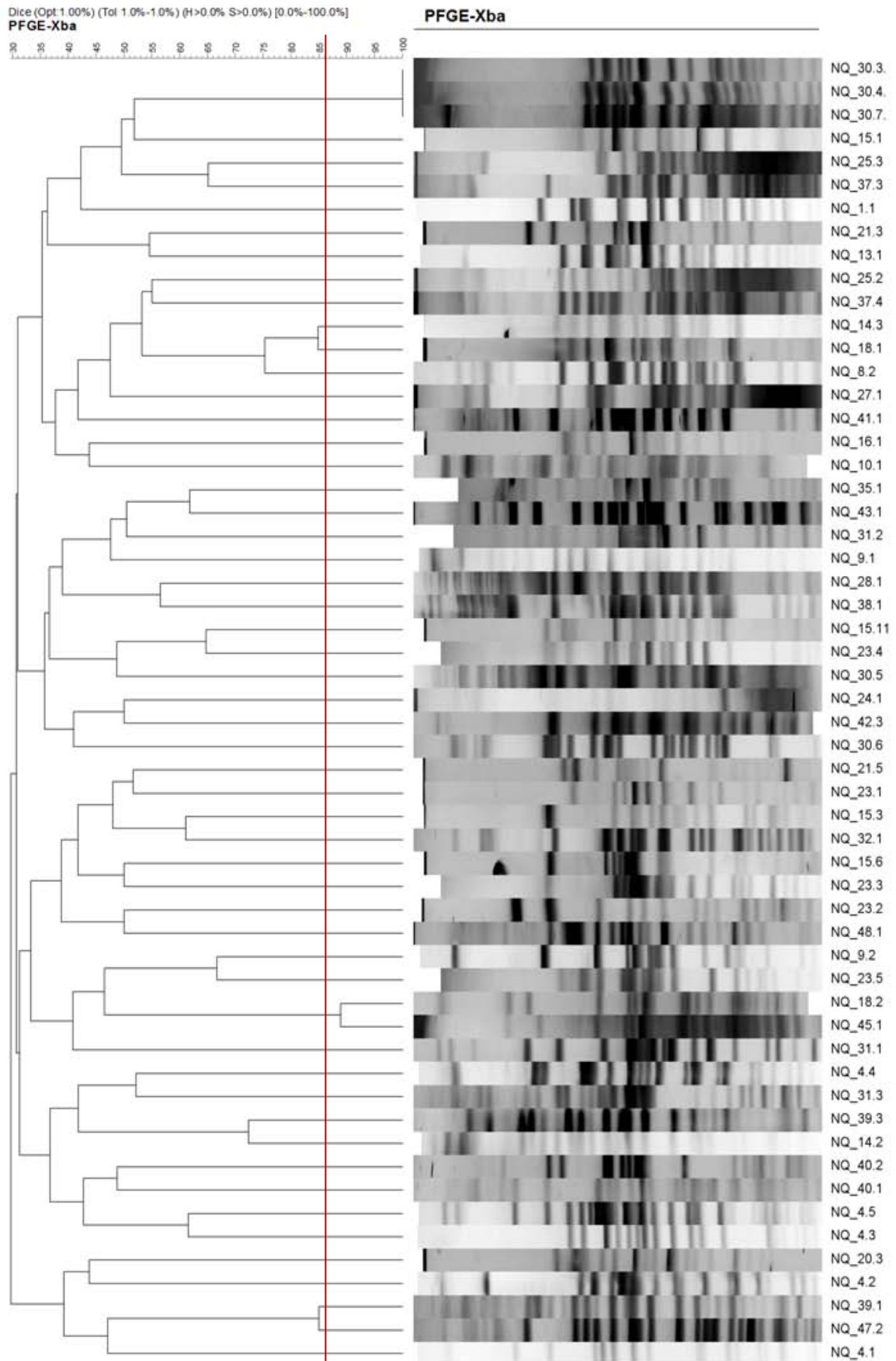
Figura 31. Soques amb diferent clonalitat, mateix nombre i mateixa combinació de PAI.

Nº PAIs	majoritàries no clonals [n(%)]	Combinacions de PAI					
		PAI _{IV_536}	PAI _{I_CFT073}	PAI _{I_536}	PAI _{II_CFT073}	PAI _{II_196}	PAI _{II_536}
1 PAI	12 (60)	+					
2 PAI	11 (42,3)	+	+				
3 PAI	5 (27,8)	+	+	+			
4 PAI	6 (40)	+	+	+	+		
5 PAI	17 (81)	+	+	+	+	+	
6 PAI	2 (67)	+	+	+	+	+	+
Total	53 (51,46)						

Figura 32. Distribució de PAI en tots els aïllats segons nombre acumulat.

N. PAI	n aïllats	n de combinació	Combinació de PAI detectades						
0 PAI	8	n=8							
1 PAI	20	n=14	PAI IV ₅₃₆	*					
		n=2	PAI I _{CF1073}						
		n=1	PAI II ₇₉₆						
		n=1	PAI II ₅₃₆						
		n=2	PAI III ₅₃₆						
2 PAI	26	n=12	PAI IV ₅₃₆	PAI I _{CF1073}	*				
		n=8	PAI IV ₅₃₆	PAI II ₅₃₆					
		n=2	PAI I _{CF1073}	PAI I ₅₃₆					
		n=1	PAI I _{CF1073}	PAI II ₅₃₆					
		n=1	PAI I ₅₃₆	PAI II ₇₉₆					
		n=1	PAI II ₇₉₆	PAI II ₅₃₆					
		n=1	PAI II ₅₃₆	PAI III ₅₃₆					
3 PAI	18	n=5	PAI IV ₅₃₆	PAI I _{CF1073}	PAI I ₅₃₆	*			
		n=3	PAI IV ₅₃₆	PAI I _{CF1073}	PAI II _{CF1073}				
		n=1	PAI IV ₅₃₆	PAI I _{CF1073}	PAI II ₇₉₆				
		n=1	PAI IV ₅₃₆	PAI I _{CF1073}	PAI II ₅₃₆				
		n=2	PAI IV ₅₃₆	PAI II ₇₉₆	PAI II ₅₃₆				
		n=1	PAI IV ₅₃₆	PAI II ₅₃₆	PAI III ₅₃₆				
		n=1	PAI I _{CF1073}	PAI II ₇₉₆	PAI II ₅₃₆				
		n=1	PAI I _{CF1073}	PAI I ₅₃₆	PAI II ₅₃₆				
		n=1	PAI I _{CF1073}	PAI II ₇₉₆	PAI II ₅₃₆				
		n=2	PAI II _{CF1073}	PAI II ₇₉₆	PAI II ₅₃₆				
4 PAI	15	n=6	PAI IV ₅₃₆	PAI I _{CF1073}	PAI I ₅₃₆	PAI II _{CF1073}	*		
		n=2	PAI IV ₅₃₆	PAI I _{CF1073}	PAI I ₅₃₆	PAI II ₇₉₆			
		n=2	PAI IV ₅₃₆	PAI I _{CF1073}	PAI I ₅₃₆	PAI II ₅₃₆			
		n=1	PAI IV ₅₃₆	PAI I _{CF1073}	PAI II ₇₉₆	PAI II ₅₃₆			
		n=1	PAI IV ₅₃₆	PAI I ₅₃₆	PAI II _{CF1073}	PAI II ₅₃₆			
		n=2	PAI IV ₅₃₆	PAI I ₅₃₆	PAI II ₇₉₆	PAI II ₅₃₆			
		n=1	PAI IV ₅₃₆	PAI II _{CF1073}	PAI II ₅₃₆	PAI III ₅₃₆			
		n=1	PAI I _{CF1073}	PAI I ₅₃₆	PAI II _{CF1073}	PAI II ₇₉₆			
5 PAI	21	n=19	PAI IV ₅₃₆	PAI I _{CF1073}	PAI I ₅₃₆	PAI II _{CF1073}	PAI II ₇₉₆	*	
		n=1	PAI IV ₅₃₆	PAI I _{CF1073}	PAI I ₅₃₆	PAI II _{CF1073}	PAI II ₅₃₆		
		n=1	PAI IV ₅₃₆	PAI I _{CF1073}	PAI I ₅₃₆	PAI II ₇₉₆	PAI II ₅₃₆		
6 PAI	3	n=2	PAI IV ₅₃₆	PAI I _{CF1073}	PAI I ₅₃₆	PAI II _{CF1073}	PAI II ₇₉₆	PAI II ₅₃₆	*
		n=1	PAI IV ₅₃₆	PAI I _{CF1073}	PAI I ₅₃₆	PAI II _{CF1073}	PAI II ₇₉₆	PAI III ₅₃₆	

Figura 33. Dendograma de les soques majoritàries que albergaven el mateix nombre i la mateixa combinació de PAI.



Després d'analitzar els resultats de les 111 soques estudiades del apartat IV 1.1 i ordenar-les segons els següents criteris: i) nombre total de PAI i de FV, ii) grup filogenètic i iii) origen (fecal o urinari). Es van seleccionar únicament 20 soques clíniques (taula 39) que van representar la diversitat genètica de l'espècie de la següent manera: i) quatre soques dels GF A, B1, B2 i vuit soques del GF D, per les raons que se esmenten més a baix, ii) de totes aquestes 50% eren d'origen fecal i l'altre 50% d'origen urinari, iii) depenent de l'origen, la meitat amb un perfil típic de virulència segons el seu grup filogenètic (A i B amb baix nombre de FV i B2 i D amb elevat nombre de FV) i l'altra meitat amb un perfil no típic (A i B elevat nombre de FV i B2 i D amb baix nombre de FV) (taula 40).

Taula 39. Determinació específica de vuit PAI en les soques escollides.

ID	GF	Origen	I ₅₃₈	II ₅₃₈	III ₅₃₈	VI ₅₃₈	I ₂₉₆	II ₂₉₆	I _{CFT073}	II _{CFT073}	Nº total de PAI
14318-K12	A	Control negatiu (CN)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14329	A	Cistitis	0	0	0	1	0	0	0	0	1
14333	A	Cistitis	0	0	0	1	0	0	0	0	1
14326	A	Fecal	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14324	A	Fecal	0	0	0	1	0	0	0	1	2
14334	B1	Cistitis	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14321	B1	Cistitis	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14328	B1	Fecal	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14325	B1	Fecal	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14331	B2	Cistitis	0	0	0	1	0	0	1	1	3
14330	B2	Cistitis	1	0	0	1	0	1	1	1	5
14322	B2	Fecal	0	0	0	1	0	0	1	1	3
14323	B2	Fecal	1	0	0	1	0	1	1	1	5
14332	D	Cistitis	0	0	0	1	0	0	0	0	1
14332.d	D	Cistitis	0	0	0	1	0	0	0	0	1
14327	D	Cistitis	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14327.d	D	Cistitis	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14319	D	Fecal	0	0	0	1	0	0	1	0	2
14319.d	D	Fecal	0	0	0	1	0	0	1	0	2
14320	D	Fecal	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14320.d	D	Fecal	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14335-CFT073	B2	Control positiu (CP)	0	0	0	1	0	0	1	1	3

ID: identificació, GF: grup filogenètic, CN: soca de laboratori K12 (MG 1655) i CP: UFEC CFT073

Taula 40. Soques escollides després de fer l'anàlisi dels resultats de l'estudi de PAI.

Soques d' <i>E. coli</i>	ID	Nº total de PAI	Nº total de FV*	GF	Origen	Perfil de virulència
Control negatiu (CN)	14318-K12	0	1	A	Soca de laboratori	Típic
1	14329	1	2	A	Cistitis	Típic
2	14333	1	4	A	Cistitis	Elevat nombre de FV
3	14326	0	2	A	Fecal	Típic
4	14324	2	4	A	Fecal	Elevat nombre de FV
5	14334	0	2	B1	Cistitis	Típic
6	14321	0	4	B1	Cistitis	Elevat nombre de FV
7	14328	0	1	B1	Fecal	Típic
8	14325	0	3	B1	Fecal	Elevat nombre de FV
9	14331	3	4	B2	Cistitis	Baix nombre de FV
10	14330	5	10	B2	Cistitis	Típic
11	14322	3	5	B2	Fecal	Baix nombre de FV
12	14323	5	10	B2	Fecal	Típic
13	14332	1	5	D	Cistitis	Típic
14	14332.d	1	6	D	Cistitis	Típic
15	14327	0	3	D	Cistitis	Baix nombre de FV
16	14327.d	0	4	D	Cistitis	Baix nombre de FV
17	14319	2	7	D	Fecal	Típic
18	14319.d	2	7	D	Fecal	Típic
19	14320	0	2	D	Fecal	Baix nombre de FV
20	14320.d	0	2	D	Fecal	Baix nombre de FV
Control positiu (CP)	14335-CFT073	3	8	B2	Pielonefritis	Típic

ID: identificació, PAI: illes de patogenicitat, FV: factors de virulència, GF: grup filogenètic, CN: soca de laboratori K12 (MG 1655), CP: UFEC CFT073.

* Nº total de FV: nombre total de factors de virulència d'un màxim de 16 FV. Calculat com la suma de tots els gens detectats, ajustant a un la detecció de l'operó pap.

Aquesta classificació ajustada segons els criteris prèviament enumerat es va fer amb la finalitat de fer una caracterització més acurada, ja que posteriorment aquestes soques es van utilitzar per a realitzar els estudis experimental *in vivo* en els dos models animals estandarditzats al apartat IV 2.

1.2 Histories clíniques de les dones amb cistitis de les quals es van aïllar les soques per a experimentació *in vivo*

De les 42 dones amb diagnòstic de cistitis no complicada, participants en l'estudi inicial de caracterització de PAI (apartat IV 1.1), finalment es van escollir 18, seguint els criteris de selecció preestablerts, per a aconseguir un total de 20 soques (taula 40). D'aquestes 18 dones (taula 41), dues (42UR i 44UR) van aportar cada una dos aïllats. La primera d'elles, dos clons del GF B1, el causant de la IU i un altre de l'intestí amb diferent perfil de virulència. Mentre que la segona, dos clons intestinals de diferent GF amb diferent perfil de virulència.

Analitzant els factors predisponents a IU de la població d'estudi (taula 41) s'ha trobat que un 41,17% havien presentat un episodi previ d'IU en mesos anterior (\bar{x} : 5 mesos) i d'aquestes un 12,5% estaven embarassades. Addicionalment, els resultats de laboratori de l'anàlisi de les orines (taula 42) va demostrar leucocitúria en rangs des de 110 a 6000 leucòcits/mm³, presència d'eritròcits a un 61% de les dones i cultius amb recomptes d'*E. coli* com a únic microorganisme causant d'infecció superiors de 10⁶ UFC/ml.

Taula 41. Història clínica de les pacients incloses a l'estudi.

Soca	ID LREC	ID EM	Data	Pacient	Edat	Mostre clínica	Embaràs	IU prèvia	Signes i símptomes clínics		
									Dísuria*	Dolor pelvíc*	T ^o corpora*
1	14329	9UR	02/04/2004	LJ	28	Orina	No	No	1	0	<37°C
2	14333	40UR	04/01/2004	SFM	25	Orina	No	No	1	0	<37°C
3/11	14326/14322	44UR	12/11/2005	CBL	22	Femta	No	No	-	-	-
4	14324	25UR	27/06/2004	GMAM	25	Femta	Si	Si (6 meses)	3	1	<37°C
5	14328	8UR	31/01/2004	AVZ	22	Femta	No	No	2	0	37-38°C
6/8	14334/14325	42UR	12/11/2005	RRC	65	Orina/Femta	No	Si (1 mes)	-	-	-
7	14321	15UR	30/11/2004	ADA	52	Orina	No	No	2	1	37-38°C
9	14331	21UR	23/08/2004	NRS	20	Orina	No	Si (4 meses)	2	1	<37°C
10	14330	16UR	19/10/2004	LHM	23	Orina	No	No	2	1	37-38°C
12	14323	23UR	30/01/2005	AM	18	Femta	No	Si (3 meses)	2	0	<37°C
13	14332	32UR	27/10/2004	SA	27	Orina	No	No	3	0	<37°C
14	14332.d	43UR	12/12/2005	CBL	24	Orina	-	-	-	-	-
15	14327	3UR	17/09/2004	SSF	19	Orina	No	No	2	1	<37°C
16	14327.d	47UR	25/03/2006	MMS	27	Orina	-	Si	-	2	<37°C
17	14319	4UR	16/09/2004	VVA	21	Femta	No	No	2	1	37-38°C
18	14319.d	17UR	27/05/2004	GRAI	37	Femta	No	Si (4 meses)	1	2	37-38°C
19	14320	14UR	16/05/2005	RGM	23	Femta	No	Si (11 meses)	0	3	<37°C
20	14320.d	13UR	30/12/2004	GMAM	27	Femta	Si	Si (6 meses)	3	1	No

*0= ítem negatiu o absent, 1= leve, 2= moderat i 3= grave

Taula 42. Resultats de les dades de laboratori de les mostres processades.

Soca	ID LREC	Uroanàlisi							Anàlisi microscòpic		Cultiu (UFC/ml)	Diagnòstic
		pH	Glucosa	Proteïnes	Cetones	Hemoglobina	Hematuria	Nitris	Leucòcits/mm ³	Eritròcits		
1	14329	6	No	No	No	No	No	Si	467	No	<i>E. coli</i> >10 ⁸	Cistitis
2	14333	6	No	No	No	Si	No	Si	1103	Si	<i>E. coli</i> >10 ⁸	Cistitis
3/11	14326/14322	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>E. coli</i> >10 ⁸	Cistitis
4	14324	6	No	No	No	Si	Si	Si	6000	Si	<i>E. coli</i> >10 ⁸	Cistitis
5	14328	5	No	No	No	Si	No	Si	2300	Si	<i>E. coli</i> >10 ⁸	Cistitis
6/8	14334/14325	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>E. coli</i> >10 ⁸	Cistitis
7	14321	5	No	No	No	Si	Si	Si	6000	Si	<i>E. coli</i> >10 ⁸	Cistitis
9	14331	6	No	No	Si	No	No	Si	-	No	<i>E. coli</i> >10 ⁸	Cistitis
10	14330	6	No	No	Si	Si	No	Si	850	Si	<i>E. coli</i> >10 ⁸	Cistitis
12	14323	5,9	No	No	No	Si	No	Si	718	Si	<i>E. coli</i> >10 ⁸	Cistitis
13	14332	6	No	No	No	No	No	Si	110	No	<i>E. coli</i> >10 ⁸	Cistitis
14	14332.d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>E. coli</i> >10 ⁸	Cistitis
15	14327	5	No	No	Si	Si	Si	Si	356	Si	<i>E. coli</i> >10 ⁸	Cistitis
16	14327.d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>E. coli</i> >10 ⁸	Cistitis
17	14319	5,5	No	No	No	Si	Si	-	800	Si	<i>E. coli</i> >10 ⁸	Cistitis
18	14319.d	5	No	No	Si	Si	-	Si	1222	Si	<i>E. coli</i> >10 ⁸	Cistitis
19	14320	6,3	No	No	No	Si	No	No	230	Si	<i>E. coli</i> >10 ⁸	Cistitis
20	14320.d	6	No	No	No	Si	-	Si	6000	Si	<i>E. coli</i> >10 ⁸	Cistitis

1.3 Confirmació del grup filogenètic

La confirmació del GF de la selecció de soques va demostrar un 100% de similitud amb els resultats prèviament tractats per a l'estudi de les PAI. A més, es va incloure aquesta vegada les dues soques de control de procediment, per a tenir així: 22,7% corresponent a cinc aïllats dels GF A (quatre clínics i un control negatiu de procediment), 18,2% corresponent a quatre aïllats clínics B1, 22,7% corresponent a cinc aïllats B2 (quatre clínics i un control positiu de procediment i 36,4% corresponent a vuit aïllats clínics del grups filogenètic D (taula 43).

1.4 Serotipificació dels antígens O i H de les soques d'*E. coli*

A la taula 44 es mostren els resultats del serotipat de les 22 soques estudiades, l'anàlisi serològic tant de les soques clíniques (20) com dels control de procediment (2) van mostrar la presència de 22 serotipus diferents, entre ells tres (dos O1, un O6 i un O16, aquest últim corresponent en particular a la soca control positiu CFT073), que pertanyen als antígens descrits com a predominats entre les soques responsables d'infeccions ExPEC. Alhora, sis soques no van ser tipables per a l'antigen O, dos per a l'antigen H i tres no van ser mòbils.

Taula 43. Resultats de la Multiplex PCR de determinació dels grups filogenètics.

GF Previ	ID	Origen	Resultat PCR
A	14318-K12	Control negatiu (CN)	A2
A	14329	Orina	A2
A	14333	Orina	A1
A	14326	Fecal	A2
A	14324	Fecal	A2
B1	14334	Orina	B1
B1	14321	Orina	B1
B1	14328	Fecal	B1
B1	14325	Fecal	B1
B2	14331	Orina	B23
B2	14330	Orina	B23
B2	14322	Fecal	B23
B2	14323	Fecal	B23
D	14332	Orina	D1
D	14332.d	Orina	D1
D	14327	Orina	D1
D	14327.d	Orina	D1
D	14319	Fecal	D1
D	14319.d	Fecal	D1
D	14320	Fecal	D1
D	14320.d	Fecal	D1
B2	14335-CFT073	Control positiu(CP)	B2

GF: grup filogenètic, ID: identificació, CN: soca de laboratori K12 (MG 1655) i CP: UPEC CFT073

Taula 44. Resultats de serotipificació dels antígens O i H.

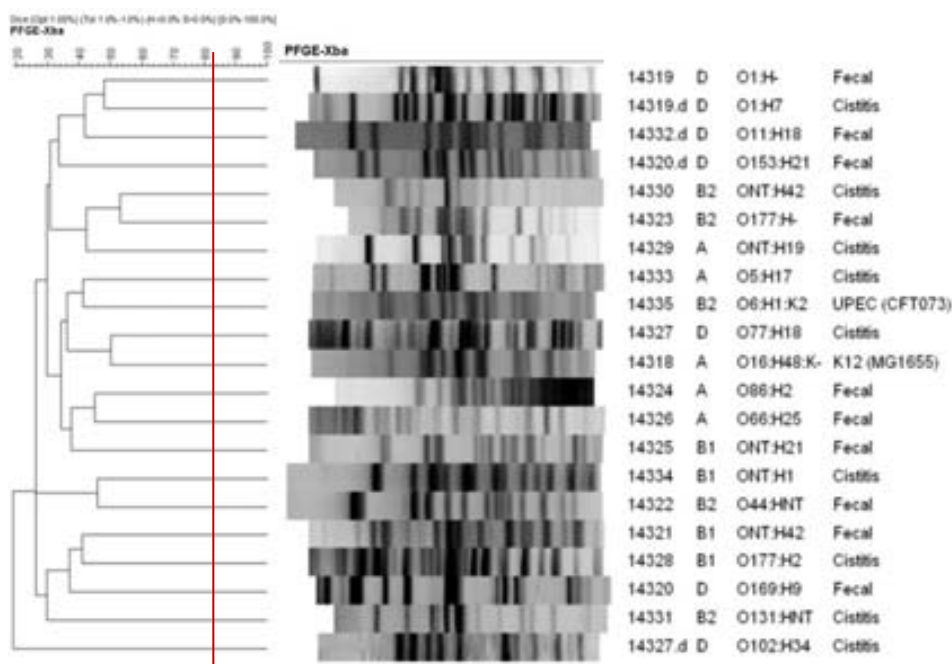
ID	GF	Origen	Antigen O (títol)	Antigen H	Resultat serotipat
14318-K12	A	Control negatiu (CN)	O16	H48	O16:H48:K-
14329	A	Orina	ONT	H19	ONT:H19
14333	A	Orina	O5: 1/1280	H17	O5:H17
14326	A	Fecal	O66: 1/640	H25	O66:H25
14324	A	Fecal	O86: 1/1280	H2	O86:H2
14334	B1	Orina	ONT	H1	ONT:H1
14321	B1	Orina	ONT	H42	ONT:H42
14328	B1	Fecal	O177:1/320	H2	O177:H2
14325	B1	Fecal	ONT	H21	ONT:H21
14331	B2	Orina	O131: 1/320	HNT	O131:HNT
14330	B2	Orina	ONT	H4	ONT:H42
14322	B2	Fecal	O44: 1/320	HNT	O44:HNT
14323	B2	Fecal	O177: 1/1280	HNM	O177:H-
14332	D	Orina	ONT	HNM	ONT:H-
14332.d	D	Orina	O11: 1/320	H18	O11:H18
14327	D	Orina	O77: 1/640	H18	O77:H18
14327.d	D	Orina	O102:1/320	H34	O102:H34
14319	D	Fecal	O1: 1/2560	HNM	O1:H-
14319.d	D	Fecal	O1:1/640	H7	O1:H7
14320	D	Fecal	O169: 1/2560	H9	O169:H9
14320.d	D	Fecal	O153: 1/640	H21	O153:H21
14335-CFT073	B2	Control positiu(CP)	O6: 1/1280	H1	O6:H1:K2

ID: identificació, GF: grup filogenètic, CN: soca de laboratori K12 (MG 1655), CP: UPEC CFT073, ONT: antigen O no tipable, HNT: antigen H no tipable i HNM: soca no mòbil i antigen H negatiu.

1.5 Avaluació de la clonalitat de les soques seleccionades

L'anàlisi dels 20 aïllats clínics més els dos controls de procediment evidència 21 pulstotipus diferents, definits segon el criteri de Tenover (figura 34). Únicament una soca (14332) no va ser tipable per aquest mètode encara que s'ha fet tractament amb *thiourea* (Apartat III 3.1). Les quals en l'anàlisi del *PFGE* presenten coeficients de similitud inferiors al 52,5% i per tant es van definir com a clons únics cada un d'ells.

Figura 34. Dendograma de les mostres utilitzades per als assajos de virulència.



1.6 Determinació de resistència

L'estudi del perfil de resistència (taula 45) de les diferents soques va demostrar que nou (40%) de de les 22 soques no tenien cap tipus de resistència als antimicrobians avaluats, mentre que les 13 soques restants (59,1%) eren resistents a dos o més antimicrobians. Específicament, el 54,5% d'aquestes codificaven una resistència associada a betalactamases d'espectre estès (BLEE) de tipus TEM, de la mateixa manera altres resistències detectades van ser: ampicil·lina (59,1%), cefalosporines de primera generació (27,3% a cefalotina), cotrimoxazol (36,4%) i fluoroquinolones (13,6% a ciprofloxacín).

Taula 45. Resistència fenotípica i genotípica.

ID	Gr	Origen	Resistència fenotípica*													Resistència genotípica a BLEE**					
			AMP10	AMC30	CFP30	CFD30	COM30	CTX30	CAZ30	FFP30	IM100	AZT30	SxTZ5	CPR5	AMK30	GEN. 10	CO150	PivTZ	CIM-k	SHV	TEM
14328-K12	A	Control negatiu (CN)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14329	A	Cistitis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14333	A	Cistitis	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
14326	A	Fecal	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
14324	A	Fecal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14334	B1	Cistitis	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1
14321	B1	Cistitis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14328	B1	Fecal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14325	B1	Fecal	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1
14331	B2	Cistitis	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
14330	B2	Cistitis	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
14322	B2	Fecal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14323	B2	Fecal	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
14332	D	Cistitis	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1
14332.d	D	Cistitis	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
14327	D	Cistitis	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
14327.d	D	Cistitis	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
14319	D	Fecal	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
14319.d	D	Fecal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14320	D	Fecal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14320.d	D	Fecal	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
14335-CFT073	B2	Control positiu(CP)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ID: Identificació, Gr: grup filogenètic, CN: soca de laboratori K12 [MG 1655] i CP: UPEC CFT073, S: serotípic, I: resistència intermèdia, R: resistent, 1: amplificació per PCR positiva, 0: amplificació per PCR negativa
 *Resistència fenotípica (AMP10: Ampicil·lina 10 µg, AMC30: Amoxicil·lina + Clav 20 + 10 µg, CFP30: Cefalotina 30 µg, CFD30: Cefixim 30 µg, COM30: Cefuroxime 30 µg, CTX30: Cefotaxime 30 µg, CAZ30: Cefazidime 30 µg, FFP30: Cefepime 30 µg, IM100: Imipenem 30 µg, AZT30: Aztreonam 30 µg, SxTZ5: Trimetoprim + Sulf 1,25+ 23,75 µg, CPR5: Ciprofloxacín 5 µg, AMK30: Amikacín 30 µg, GEN10: Gentamicín 10 µg, CO150: Polymyxins PivTZ: Piperacil·lina+ tazobactam 100+10 µg.
 **BLEE: Beta-lactamases d'espectre estès

1.7 Detecció de factors de virulència

La nova caracterització dels factors de virulència va suposar l'augment de 16 a 55 en el nombre de gens estudiats, d'aquesta manera s'ajusta al màxim el perfil virulent de les soques que s'inocularan en als models *in vivo* (taula 46). Per exemple, la soca utilitzada com a control positiu de procediment (*E. coli* CFT073) a la qual s'havien detectat vuit FV en l'estudi posterior, durant la nova caracterització es van detectar 20 gens de FV; amb la posada a punt de la nova tècnica es va generar un augment de 12 gens de virulència en la seva caracterització (taula 47).

Taula 46. Detecció específica de FV en les mostres d'*E. coli* per a experimentació animal.

Soca	ID	GF	Origen	Perfil virulent*	Nº total FV**	FV detectats***																																		
CN	14318 (CN)	A	K12	Típic	2	<i>fimH</i>	<i>ompT</i>																																	
3	14326	A	Fecal	Típic	2	<i>fimH</i>	<i>traT</i>																																	
1	14329	A	Cistitis	Típic	3	<i>fimH</i>	<i>fimAV_{MT78}</i>	<i>fyuA</i>																																
5	14334	B1	Cistitis	Típic	3	<i>fimH</i>	<i>fimAV_{MT78}</i>	<i>traT</i>																																
6	14321	B1	Fecal	Típic	3	<i>fimH</i>	<i>fimAV_{MT78}</i>	<i>iha</i>																																
7	14328	B1	Cistitis	Elevat nombre de FV	3	<i>fimH</i>	<i>hra</i>	<i>tsh</i>																																
2	14333	A	Cistitis	Elevat nombre de FV	5	<i>fyuA</i>	<i>iutA</i>	<i>iucD</i>	<i>kpsMT II-K2</i>	<i>traT</i>																														
8	14325	B1	Fecal	Elevat nombre de FV	5	<i>fimH</i>	<i>hra</i>	<i>iutA</i>	<i>iucD</i>	<i>traT</i>																														
15	14327	D	Cistitis	Baix nombre de FV	7	<i>fimH</i>	operó pap ACEFG I	<i>chuA</i>	<i>iutA</i>	<i>iucD</i>	<i>traT</i>	<i>ompT</i>																												
16	14327.d	D	Cistitis	Baix nombre de FV	7	<i>fimH</i>	<i>chuA</i>	<i>iutA</i>	<i>iucD</i>	<i>kpsMT II-K1</i>	<i>ibeA</i>	<i>usp</i>																												
4	14324	A	Fecal	Elevat nombre de FV	8	<i>fimH</i>	<i>fimAV_{MT78}</i>	<i>iha</i>	<i>fyuA</i>	<i>iutA</i>	<i>iucD</i>	<i>pic</i>	<i>kpsMT II-K2</i>																											
11	14322	B2	Fecal	Baix nombre de FV	8	<i>fimH</i>	<i>fyuA</i>	<i>chuA</i>	<i>vat</i>	<i>kpsMT II-K1</i>	<i>ibeA</i>	<i>PAI_{1CF7073}</i>	<i>usp</i>																											
19	14320	D	Fecal	Baix nombre de FV	8	<i>fimH</i>	<i>iha</i>	<i>chuA</i>	<i>ireA</i>	<i>iutA</i>	<i>iucD</i>	<i>astA</i>	<i>ompT</i>																											
9	14331	B2	Cistitis	Baix nombre de FV	10	<i>fimH</i>	<i>fyuA</i>	<i>chuA</i>	<i>iroN</i>	<i>hlyF</i>	<i>vat</i>	<i>pic</i>	<i>iss</i>	<i>traT</i>	<i>PAI_{1CF7073}</i>																									
20	14320.d	D	Fecal	Baix nombre de FV	10	<i>fimH</i>	operó pap ACG II	<i>afaE8</i>	<i>iha</i>	<i>hra</i>	<i>chuA</i>	<i>iutA</i>	<i>iucD</i>	<i>astA</i>	<i>kspMT III</i>																									
13	14332	D	Cistitis	Típic	10	<i>fimH</i>	operó pap ACEFG II	<i>fimAV_{MT78}</i>	<i>iha</i>	<i>fyuA</i>	<i>chuA</i>	<i>iutA</i>	<i>iucD</i>	<i>sat</i>	<i>kpsMT II-K2</i>																									
14	14332.d	D	Cistitis	Típic	11	<i>fimH</i>	operó pap ACEFG II	<i>iha</i>	<i>fyuA</i>	<i>chuA</i>	<i>iutA</i>	<i>iucD</i>	<i>sat</i>	<i>kpsMT II</i>	<i>traT</i>	<i>ompT</i>																								
17	14319	D	Fecal	Típic	14	<i>fimH</i>	<i>fimAV_{MT78}</i>	operó pap(ACEF)	<i>iha</i>	<i>fyuA</i>	<i>chuA</i>	<i>iutA</i>	<i>iucD</i>	<i>sat</i>	<i>kpsMT II-K1</i>	<i>traT</i>	<i>fliC_{H7}</i>	<i>PAI_{1CF7073}</i>	<i>usp</i>																					
18	14319.d	D	Fecal	Típic	15	<i>fimH</i>	<i>fimAV_{MT78}</i>	operó pap(ACGII)	<i>iha</i>	<i>fyuA</i>	<i>chuA</i>	<i>ireA</i>	<i>iutA</i>	<i>iucD</i>	<i>sat</i>	<i>kpsMT II-K1</i>	<i>traT</i>	<i>fliC_{H7}</i>	<i>PAI_{1CF7073}</i>	<i>usp</i>																				
10	14330	B2	Cistitis	Típic	18	<i>fimH</i>	operó pap ACEFG III	<i>hra</i>	<i>fyuA</i>	<i>chuA</i>	<i>iroN</i>	<i>iutA</i>	<i>iucD</i>	<i>Operó hly(AD)</i>	<i>hlyF</i>	<i>cnf 1</i>	<i>kpsMT II-K2</i>	<i>iss</i>	<i>cvaC</i>	<i>traT</i>	<i>ibeA</i>	<i>PAI_{1CF7073}</i>	<i>usp</i>																	
12	14323	B2	Fecal	Típic	18	<i>fimH</i>	operó pap ACEFG III	<i>hra</i>	<i>fyuA</i>	<i>chuA</i>	<i>iroN</i>	<i>iutA</i>	<i>iucD</i>	<i>Operó hly(AD)</i>	<i>hlyF</i>	<i>cnf 1</i>	<i>kpsMT II-K2</i>	<i>iss</i>	<i>cvaC</i>	<i>traT</i>	<i>ibeA</i>	<i>PAI_{1CF7073}</i>	<i>usp</i>																	
CP	14335 (CP)	B2	UPEC	Típic	20	<i>fimH</i>	operó pap ACEFG II	<i>focG</i>	<i>iha</i>	<i>fyuA</i>	<i>chuA</i>	<i>iroN</i>	<i>ireA</i>	<i>iutA</i>	<i>iucD</i>	<i>Operó hly(AD)</i>	<i>hlyF</i>	<i>Operó clb(BN)</i>	<i>vat</i>	<i>sat</i>	<i>pic</i>	<i>kpsMT II-K2</i>	<i>ompT</i>	<i>PAI_{1CF7073}</i>	<i>usp</i>															

ID: identificació, GF: grup filogenètic, CN: soca de laboratori K12 (MG 1655), CP: UPEC CFT073

*perfil virulent segons el seu grup filogenètic: típic (A i B amb baix nombre de FV i B2 i D amb elevat nombre de FV) i no típic (A i B elevat nombre de FV i B2 i D amb baix nombre de FV).

** Nº total de FV: nombre total de factors de virulència. Calculat com la suma de tots els gens detectats, ajustant les múltiples deteccions de l'operó *pap* (fimbries P), l'operó *hly* (α -hemolisines), l'operó *clb* (colibactina) i *kpsM II* (càpsules del grup 2)

***En negreta: gens de la classificació ExPEC: *Extraintestinal Escherichia coli*. Definida com la presència de ≥ 2 FV: *papAH* o *papC* (ensamblatge i subunitat estructural de les fimbries P), *sfa/foc* (fimbries tipus S i F1C), *afa/dra* (adhesines de la família Dr), *iutA* (aerobactina) i *kpsM II*. Descripció de cadascun dels gens a l'apartat 1.2.2.1.

Taula 47. Comparació de les dues caracteritzacions de FV en soques d'*E. coli*.

ID	Caracterització de FV (Nº total)*			Classificació **	
	Antiga	Nova	Diferència FV detectats	ExPEC	Nº total gens ExPEC
14318-K12	1	2	+2	NO	0
14329	2	3	+2	NO	0
14333	4	5	+1	SI	2
14326	2	2	+1	NO	0
14324	4	8	+5	SI	2
14334	2	3	+1	NO	0
14321	4	3	-1	NO	0
14328	1	3	+2	NO	0
14325	3	5	+2	NO	1
14331	4	10	+7	NO	0
14330	10	18	+9	SI	3
14322	5	8	+4	NO	2
14323	10	18	+9	SI	3
14332	5	10	+5	SI	3
14332.d	6	11	+5	SI	3
14327	3	7	+4	SI	2
14327.d	4	7	+3	SI	2
14319	7	14	+7	SI	3
14319.d	7	15	+8	SI	3
14320	2	8	+6	NO	1
14320.d	2	10	+8	SI	2
14335-CFT073	8	20	+12	SI	4

ID: identificació, GF: grup filogenètic, CN: soca de laboratori K12 (MG 1655), CP: UPEC CFT073.

* Nº total de FV: nombre total de factors de virulència. Calculat com la suma de tots els gens detectats ajustant les múltiples deteccions de l'operó *pap* (fimbries P), l'operó *hly* (α -hemolisines), l'operó *clb* (colibactina) i *kps M II* (càpsules del grup 2).

** Classificació ExPEC: *Extraintestinal Escherichia coli*. Definida com la presència de ≥ 2 FV: *pap AH* o *pap C* (ensamblatge i subunitat estructural de les fimbries P), *sfa/foc* (fimbries tipus S i F1C), *afa/dra* (adhesines de la família Dr), *iut A* (aerobactina) i *kps MT II*.

L'avaluació del potencial virulent de 55 gens de virulència (apartat III 3.2.4.2) en tots els aïllats clínics i els controls de procediment d'*E. coli* van donar com a resultat un nou i més ampli perfil virulent de cadascun dels aïllats (taula 46). Addicionalment, alguns dels aïllats van complir els criteris per a ser considerats com a soques ExPEC segons la definició de Johnson *et al.*, de 2003⁶¹, que requereix tenir com a mínim dos dels següents cinc gens de virulència *papA* o *papC*, *sfa/foc*, *afa/dra*, *iutA* o *kpsMT II*.

L'estudi de virulència en relació a la mediana de FV (Me) va ser de vuit en el total de mostres analitzades amb un mínim de dos i un màxim de 18 FV, sense diferències entre l'origen amb Me=7 i 8 segons els aïllaments d'orina o fecal, respectivament. Però si s'ha de destacar la Me=14 i 10 FV de les mostres dels GF B2 i D, en comparació a la Me=4 i 3 dels GF A o B1 ($p=0,0002$).

A la taula 48 es presenten les prevalències de cadascun dels FV, agrupats a la columna de l'esquerra per categoria funcional, i a la fila superior segons: origen, GF o perfil virulent.

Taula 48. Factors de virulència determinats a les 20 soques clíniques.

Categoria		Total		Origen				Grup filogenètic								Perfil virulent*											
		n=20	%	Orina		Fecal		A		B1		B2		D		Típic		Típic (A+B1)		Típic (B2+D)		No típic		No típic (A+B1)		No típic (B2+D)	
				n=10	%	n=10	%	n=4	%	n=4	%	n=4	%	n=8	%	n=10	%	n=4	%	n=6	%	n=10	%	n=4	%	n=6	%
Colonització i fitness																											
Adhesines**																											
Fimbries tipus 1	<i>fim H</i>	19	95	9	90	10	100	3	75	4	100	4	100	8	100	10	100	4	100	6	100	9	90	3	75	6	100
	<i>fim AV_{UT75}</i>	7	35	4	40	3	30	2	50	2	50	0	0	3	38	5	50	2	50	3	50	2	20	2	50	0	0
Fimbries P	<i>Operó pap</i>	8	40	4	40	4	40	0	0	0	0	2	50	6	75	6	60	0	0	6	100	2	20	0	0	2	33
	<i>pap A</i>	7	35	3	30	4	40	0	0	0	0	2	50	5	63	6	60	0	0	6	100	1	10	0	0	1	17
	<i>pap C</i>	8	40	4	40	4	40	0	0	0	0	2	50	6	75	6	60	0	0	6	100	2	20	0	0	2	33
	<i>pap EF</i>	6	30	4	40	2	20	0	0	0	0	2	50	4	50	5	50	0	0	5	83	1	10	0	0	1	17
	<i>pap G</i>	7	35	4	40	3	30	0	0	0	0	2	50	5	63	5	50	0	0	5	83	2	20	0	0	2	33
	<i>pap G I</i>	1	5	1	10	0	0	0	0	0	0	0	0	1	13	0	0	0	0	0	0	1	10	0	0	1	17
	<i>pap G II</i>	4	20	2	20	2	20	0	0	0	0	0	0	4	50	3	30	0	0	3	50	1	10	0	0	1	17
	<i>pap G III</i>	2	10	1	10	1	10	0	0	0	0	2	50	0	0	2	20	0	0	2	33	0	0	0	0	0	0
	Fimbries Dr	<i>afa E-B</i>	1	5	0	0	1	10	0	0	0	0	0	0	1	13	0	0	0	0	0	0	1	10	0	0	1
<i>iba</i>		8	40	3	30	5	50	1	25	1	25	0	0	6	75	4	40	0	0	4	67	4	40	2	50	2	33
<i>hra</i>		5	25	1	10	4	40	0	0	2	50	2	50	1	13	3	30	1	25	2	33	2	20	1	25	1	17
Sistemes de captura de ferro																											
<i>Salmochelina</i>	<i>iro N</i>	3	15	2	20	1	10	0	0	0	0	3	75	0	0	2	20	0	0	2	33	1	10	0	0	1	17
<i>Aerobactina</i>	<i>iuc D</i>	13	65	6	60	7	70	2	50	1	25	2	50	8	100	6	60	0	0	6	100	7	70	3	75	4	67
Receptors de sideròfors	<i>iut A</i>	13	65	6	60	7	70	2	50	1	25	2	50	8	100	6	60	0	0	6	100	7	70	3	75	4	67
	<i>fyu A</i>	11	55	6	60	5	50	3	75	0	0	4	100	4	50	7	70	1	25	6	100	4	40	2	50	2	33
	<i>chu A</i>	12	60	6	60	6	60	0	0	0	0	4	100	8	100	6	60	0	0	6	100	6	60	0	0	6	100
	<i>ire A</i>	2	10	0	0	2	20	0	0	0	0	0	0	2	25	1	10	0	0	1	17	1	10	0	0	1	17
Toxines**																											
Hemolisines	<i>Operó hly</i>	2	10	1	10	1	10	0	0	0	0	2	50	0	0	2	20	0	0	2	33	0	0	0	0	0	0
	<i>hly A</i>	2	10	1	10	1	10	0	0	0	0	2	50	0	0	2	20	0	0	2	33	0	0	0	0	0	0
	<i>hly D</i>	2	10	1	10	1	10	0	0	0	0	2	50	0	0	2	20	0	0	2	33	0	0	0	0	0	0
	<i>hly F</i>	3	15	2	20	1	10	0	0	0	0	3	75	0	0	2	20	0	0	2	33	1	10	0	0	1	17
CNF	<i>cnf 1</i>	2	10	1	10	1	10	0	0	0	0	2	50	0	0	2	20	0	0	2	33	0	0	0	0	0	0
Subunitat ABC	<i>ast A</i>	2	10	0	0	2	20	0	0	0	0	0	0	2	25	0	0	0	0	0	0	2	20	0	0	2	33
SPATE	<i>pic</i>	2	10	1	10	1	10	1	25	0	0	1	25	0	0	0	0	0	0	0	0	2	20	1	25	1	17
	<i>tsh</i>	1	5	0	0	1	10	0	0	1	25	0	0	0	0	1	10	1	25	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>sat</i>	4	20	2	20	2	20	0	0	0	0	0	0	4	50	4	40	0	0	4	67	0	0	0	0	0	0
<i>vat</i>	2	10	1	10	1	10	0	0	0	0	2	50	0	0	0	0	0	0	0	0	2	20	0	0	2	33	
Protectines**																											
Càpsula																											
Grup 2	<i>kps MT II</i>	10	50	5	50	5	50	2	50	0	0	3	75	5	63	6	60	0	0	6	100	4	40	2	50	2	33
	<i>kps MT II-K1</i>	4	20	1	10	3	30	0	0	0	0	1	25	3	38	2	20	0	0	2	33	2	20	0	0	2	33
	<i>kps MT II-K2</i>	5	25	3	30	2	20	2	50	0	0	2	50	1	13	3	30	0	0	3	50	2	20	2	50	0	0
Grup 3	<i>ksp MT III</i>	1	5	0	0	1	10	0	0	0	0	0	0	1	13	0	0	0	0	0	0	1	10	0	0	1	17
Altres	<i>cva C</i>	2	10	1	10	1	10	0	0	0	0	2	50	0	0	2	20	0	0	2	33	0	0	0	0	0	0
	<i>iss</i>	3	15	2	20	1	10	0	0	0	0	3	75	0	0	2	20	0	0	2	33	1	10	0	0	1	17
	<i>tra T</i>	11	55	6	60	5	50	2	50	2	50	3	75	4	50	7	70	2	50	5	83	4	40	2	50	2	33
Altres trets de funció auxiliar o desconeguda																											
<i>omp T</i>	3	15	2	20	1	10	0	0	0	0	0	0	3	38	1	10	0	0	1	17	2	20	0	0	2	33	
<i>ibe A</i>	4	20	2	20	2	20	0	0	0	0	3	75	1	13	2	20	0	0	2	33	2	20	0	0	2	33	
<i>fliC₁₀₀</i>	2	10	0	0	2	20	0	0	0	0	0	0	2	25	2	20	0	0	2	33	0	0	0	0	0	0	
<i>usp</i>	6	30	2	20	4	40	0	0	0	0	3	75	3	38	4	40	0	0	4	67	2	20	0	0	2	33	
<i>PAI₁ i crotos</i>	6	30	2	20	4	40	0	0	0	0	4	100	2	25	4	40	0	0	4	67	2	20	0	0	2	33	
Puntuació de Virulència																											
Mediana de FV per grup		8		7		8		4		3		14		10		11		3		15		8		5		9	
Rang mínim-màxim de FV		2-18		3-18		2-18		3-8		3-5		8-18		7-15		2-18		2-3		10-19		3-10		3-9		7-11	

*Perfil virulent: Típic (A i B amb baix nombre de FV i B2 i D amb elevat nombre de FV) i no típic (A i B elevat nombre de FV i B2 i D amb baix nombre de FV).

** Totes les mostres van ser negatives per als gens de: adhesines (*pap G IV*, *pap G V*, *sfo 5*, *afa/ara BC*, *foc G*, *ama E*, *gaf D*, *cip G i f17*); toxines (*cdt B*, *cdt B i cdt N*); càpsules (*kps MT II-K5 i kps K15*) i *gfe*

Una vegada s'ha finalitzat la caracterització de les soques d'*E. coli* disposem de 22 aïllats, dels quals 20 són clínics i dos corresponen als control de procediment utilitzat durant l'estandardització dels dos models *in vivo*. En resum, a la taula 49 es presenten les dades compilades de la caracterització de les soques seleccionades per els assajos d'experimentació animal.

Taula 49. Caracterització de les soques d'*E. coli* per a inoculació dels assajos de virulència en els dos models murins.

Soques d' <i>E. coli</i>	ID	Nº total de PAI	Nº total de FV*	GF	Perfil de virulència**	Origen	Serotipat***
Control negatiu (CN)	14318-K12	0	2	A	Típic	Soca laboratori	O16:H48:K-
1	14329	1	3	A	Típic	Cistitis	ONT:H19
2	14333	1	5	A	Elevat nombre de FV	Cistitis	O5:H17
3	14326	0	2	A	Típic	Fecal	O66:H25
4	14324	2	8	A	Elevat nombre de FV	Fecal	O86:H2
5	14334	0	3	B1	Típic	Cistitis	ONT:H1
6	14321	0	3	B1	Típic	Cistitis	ONT:H42
7	14328	0	3	B1	Elevat nombre de FV	Fecal	O177:H2
8	14325	0	5	B1	Elevat nombre de FV	Fecal	ONT:H21
9	14331	3	10	B2	Baix nombre de FV	Cistitis	O131:HNT
10	14330	5	18	B2	Típic	Cistitis	ONT:H42
11	14322	3	8	B2	Baix nombre de FV	Fecal	O44:HNT
12	14323	5	18	B2	Típic	Fecal	O177:H-
13	14332	1	10	D	Típic	Cistitis	ONT:H-
14	14332.d	1	11	D	Típic	Cistitis	O11:H18
15	14327	0	7	D	Baix nombre de FV	Cistitis	O77:H18
16	14327.d	0	7	D	Baix nombre de FV	Cistitis	O102:H34
17	14319	2	14	D	Típic	Fecal	O1:H-
18	14319.d	2	15	D	Típic	Fecal	O1:H7
19	14320	0	8	D	Baix nombre de FV	Fecal	O169:H9
20	14320.d	0	10	D	Baix nombre de FV	Fecal	O153:H21
Control positiu (CP)	14335-CFT073	3	20	B2	Típic	Pielonefritis	O6:H1:K2

ID: identificació, PAI: illes de patogenicitat, GF: grup filogenètic, CN: soca de laboratori K12 (MG 1655), CP: UPEC CFT073.

* Nº total de FV: nombre total de factors de virulència. Calculat com la suma de tots els gens detectats, ajustant les múltiples deteccions de l'operó *pap* (fimbries P), l'operó *hly* (a-hemolisines), l'operó *cib* (colibactina) i *Agg M II* (càpsules del grup 2).

**Perfil virulent: típic (A i B amb baix nombre de FV i B2 i D amb elevat nombre de FV) i no típic (A i B elevat nombre de FV).

*** ONT: antígen O no tipable, HNT: antígen H no tipable i H-: soca no mòbil antígen H negatiu.

2. Estandardització de models murins per a l'avaluació de soques d'*E. coli* extraintestinals

S'ha seleccionat el ratolí per ser l'animal de menor sensibilitat neurovegetativa en què es poden realitzar aquests estudis comparatius de virulència. Així mateix, el ratolí és l'animal utilitzat habitualment en estudis de virulència i patogenicitat segons es troba àmpliament descrit en la literatura. Els ratolins són triats per aquests models d'infecció, ja que semblen ser sensibles a moltes de les mateixes propietats dels bacteris que causen infecció, i en particular la infecció urinària en els éssers humans. Per exemple, s'ha demostrat que l'adhesió de soques d'*E. coli* pielonefritis a les cèl·lules uroepiteliais *in vitro* és similar a la *in vivo*. Així, inoculacions directes del bacteri dins de la bufeta sense manipulacions obstructives van ser considerades la manera menys artificial per a induir la infecció experimental al ratolí¹⁴⁰⁻¹⁴².

S'utilitzarà la soca de ratolí CBA/J, ja que prèviament ha estat utilitzada per altres autors amb objectius similars. L'homogeneïtat genètica d'aquests animals permet que la composició genètica no hagi de ser considerada com una variable en la investigació. Pel que fa a la variabilitat dels resultats de les investigacions es poden deure a factors ambientals o metodològics^{138, 142}.

Per obtenir resultats reproduïbles i un punt de tall d'interpretació de les dades, és important primer estandarditzar el model. Per a això, la concentració de l'inòcul de 10^6 a 10^9 UFC va ser provada per la soca control positiu de procediments (*E. coli* CFT073), una soca amb nombrosos determinants virulents i un altre soca sense determinats de virulència, la soca control negatiu de procediment (*E. coli* K12). Per a aquestes dues soques, es van assajar dues vies d'inoculació (subcutània i transuretral). Els ratolins es van observar contínuament durant les primeres 6 h després de la inoculació per detectar si hi havia una mort ràpida lligada a un xoc endotòxic o una alteració de les vies urinàries.

2.1 Normalització d'un model murí d'experimentació animal per a l'avaluació d'infeccions extraintestinals a part de la infecció urinària causada per *E. coli*

La via subcutània s'utilitza àmpliament com a via d'inoculació, ja que és menys invasiva comparada amb altre tipus d'inoculació. Utilitzant les soques d'*E. coli* K-12 (MG1655) i UPEC CFT073 que van actuar com a control negatiu i positiu durant els procediments d'estandardització respectivament (apartat III.1). S'ha determinat la DL50 (Dosis Letal 50), que és la dosi mínima necessària de bacteri per a causar la mort al 50% dels individus al final de l'assaig. La DL50 de la soca virulenta d'*E. coli* CFT073 es va determinar utilitzant un rang de quatre concentracions que van oscil·lar entre 10^6 i 10^9 UFC/200 μ l d'inòcul bacterià (taula 33).

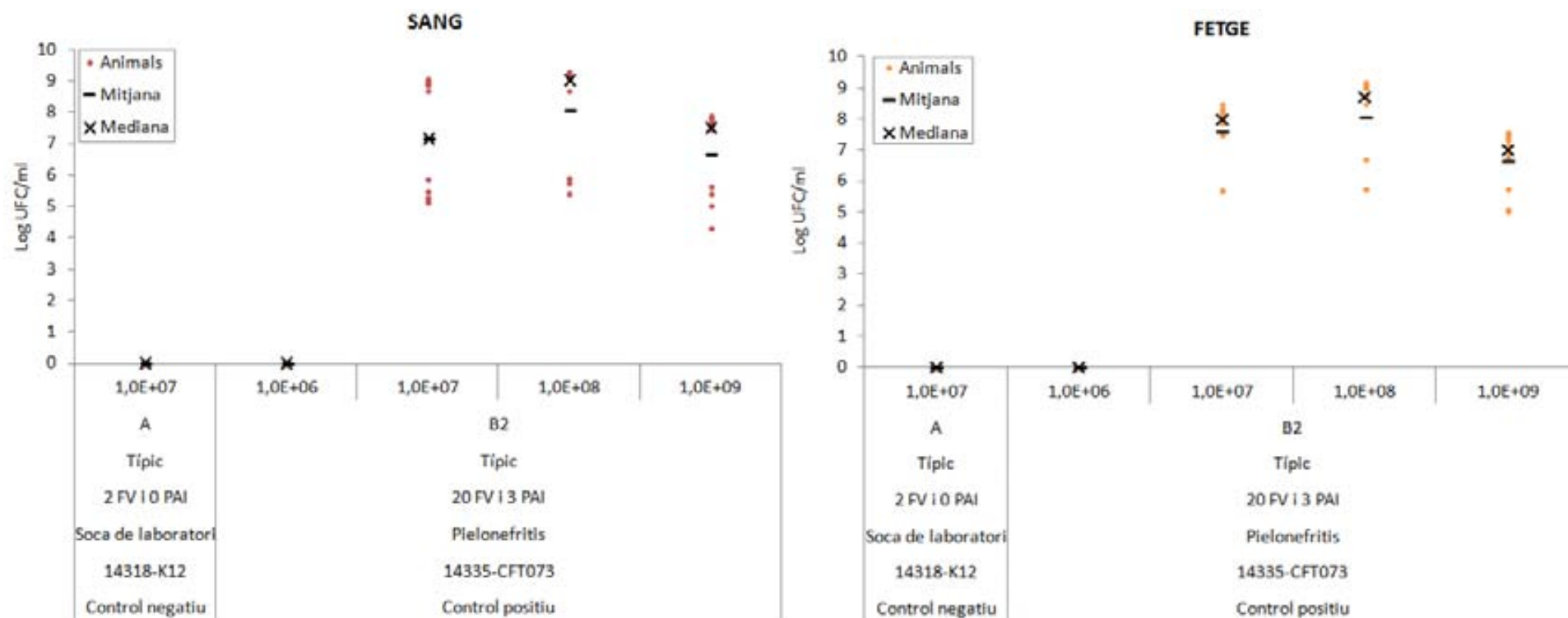
D'aquesta manera i seguint els protocols experimental dels apartat III 5.2.1.1 per la inoculació via subcutània, inoculant la soca virulenta d'*E. coli* CFT073 en concentracions ascendents (taula 50 i figura 35), es va obtenir que l'inòcul corresponent a 1×10^6 UFC/200 μ l no va causar la mort de cap dels ratolins, per tant s'ha considerat com a una concentració no letal. Per altre banda, la corresponent a 1×10^7 UFC/200 μ l va causar la mort al 50% dels ratolins inoculats en les primeres 48 h de l'experiment amb una mitjana (\bar{x}) 6.5 Log UFC/ml o g i una mediana (Me) de 5.9 Log UFC/ml o g. Alhora, les concentracions corresponents a 1×10^8 UFC/200 μ l i 1×10^9 UFC/200 μ l van causar la mort del 60% dels ratolins a les 48 hores d'inoculació amb \bar{x} = 6.8 Log UFC/ml o g i

Taula 50. Resultats de la inoculació via subcutània de les soques control negatiu i positiu de procediment.

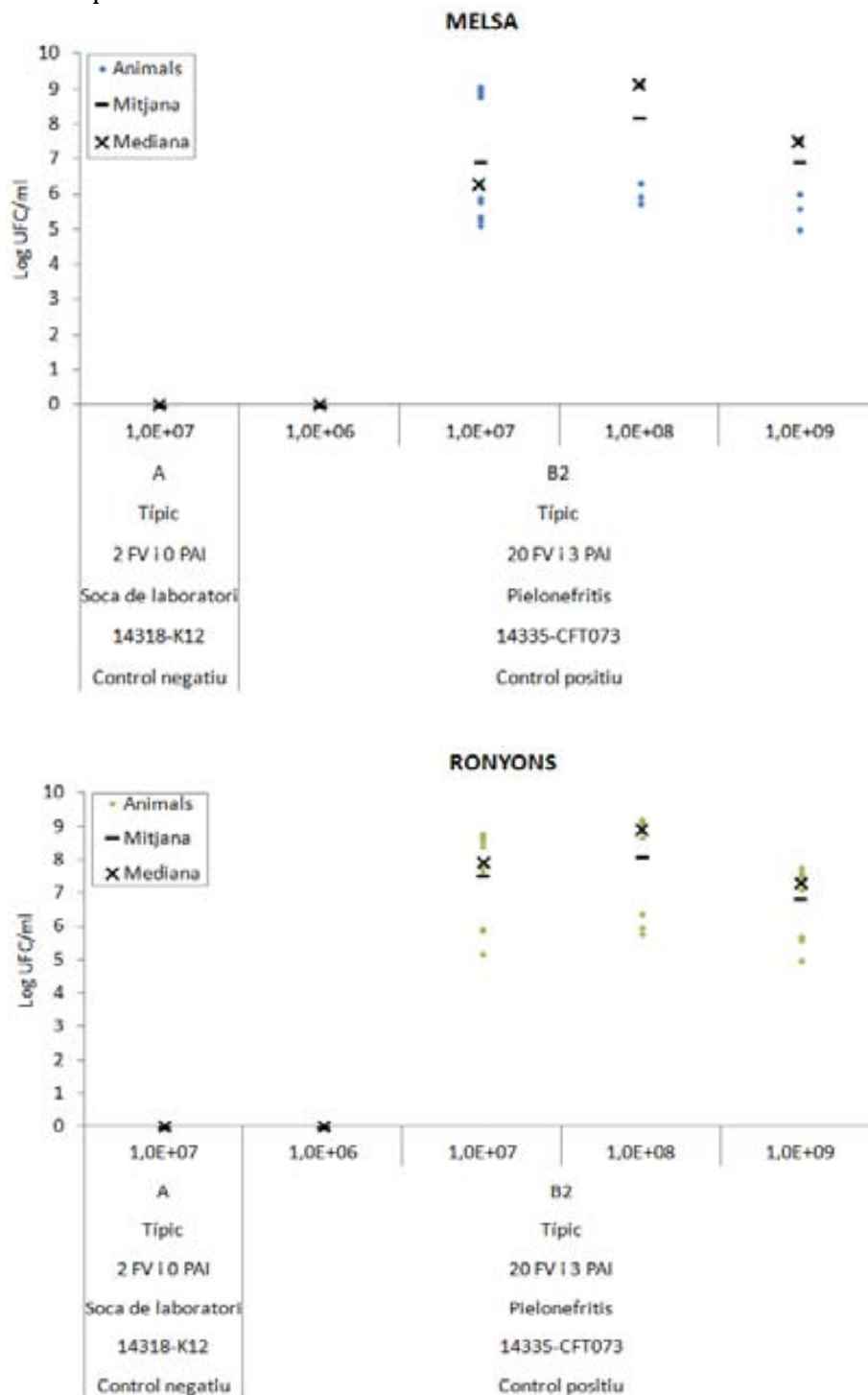
Control	ID	Característiques										Resultats <i>in vivo</i>													
		Epidemiològiques		Filogenètiques		Virulència			Concentració inòcul	Letalitat	Puntuació	Temps (h)	Cultiu microbiològic (Log UFC/ml o g)												
				Serotipus	GF	PAI	FV	ExPEC					Sang			Fetge			Melsa			Ronyons			
		Mitjana	Mediana						DE	Mitjana	Mediana	DE	Mitjana	Mediana	DE	Mitjana	Mediana	DE							
Negatiu	14318-K12	Soca de laboratori (MG1655)	O16:H48:K-	A	0	2	No (0)	1 x 10 ⁷ UFC/200 µl	0/5	0,0	0	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
								1 x 10 ⁶ UFC/200 µl	0/10	0,0	0	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
								1 x 10 ⁵ UFC/200 µl	0/10	0,0	0	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Positiu	14335-CFT073	UPEC (Pielonefritis)	O6:H1:K2	B2	3	20	Si (3)	1 x 10 ⁷ UFC/200 µl	5/10	0,5	48	7,2	7,2	1,85	7,63	8,00	1,05	6,95	6,30	1,75	7,57	7,90	1,38		
								1 x 10 ⁸ UFC/200 µl	6/10	0,6	48	8,1	9,1	1,65	8,09	8,72	1,42	8,21	9,13	1,52	8,13	8,89	1,45		
								1 x 10 ⁹ UFC/200 µl	6/10	0,6	24	6,6	7,5	1,39	6,67	7,00	1,00	6,94	7,52	0,99	6,88	7,30	1,02		

ID: identificació, GF: grup filogenètic, PAI: nombre total d'illes de patogenicitat, FV: nombre total de factors de virulència, ExPEC: Classificació ExPEC (nombre de gens ExPEC), DE: Desviació estàndard

Figura 35. Recuperació bacteriana dels diferents líquids i òrgans processats del model de septicèmia.



(continuació) **Figura 35.** Recuperació bacteriana dels diferents líquids i òrgans processats del model de septicèmia.



Me=6.3 Log UFC/ml o g; i a les 24 hores d'inoculació amb \bar{x} = 6 Log UFC/ml o g i Me=5.72 Log UFC/ml o g, respectivament.

Els resultats de les inoculacions van determinar que la dosi a administrar podia ser igual o superior a la DL50; d'aquesta manera gairebé tots els ratolins desenvoluparien tots els

estadis de la infecció. Així doncs, la concentració d'inòcul finalment seleccionada va ser de 10^7 UFC en 200 μ l per a ser inoculada en tots els estudis de virulència de les soques incloses en aquest treball. Sota aquestes condicions, cap ratolí va morir dins de les primeres 6 h i els animals podria ser clarament classificat com "morts" producte una infecció sistèmica o sense infecció "supervivents". Els recomptes de bacteris en la sang, el fetge, la melsa i els ronyons dels ratolins morts van ser iguals o majors a $1,53 \times 10^5$ UFC per ml o g.

Addicionalment, la comprovació de la concentració bacteriana escollida de la soca virulenta (10^7 UFC), no va causar infecció sistèmica en cap ratolí quan es van inocular la mateixa concentració i volum de la soca avirulenta d'*E. coli* K12 en cinc animals per la via subcutània (taula 50 i figura 35), confirmant que 10^7 UFC, és la concentració ideal d'inòcul i per tant s'estandarditza el model de septicèmia amb aquesta concentració per a realitzar els assajos de virulència.

2.2 Estandardització d'un model murí d'experimentació animal per a l'avaluació de la infecció urinària causada per *E. coli*

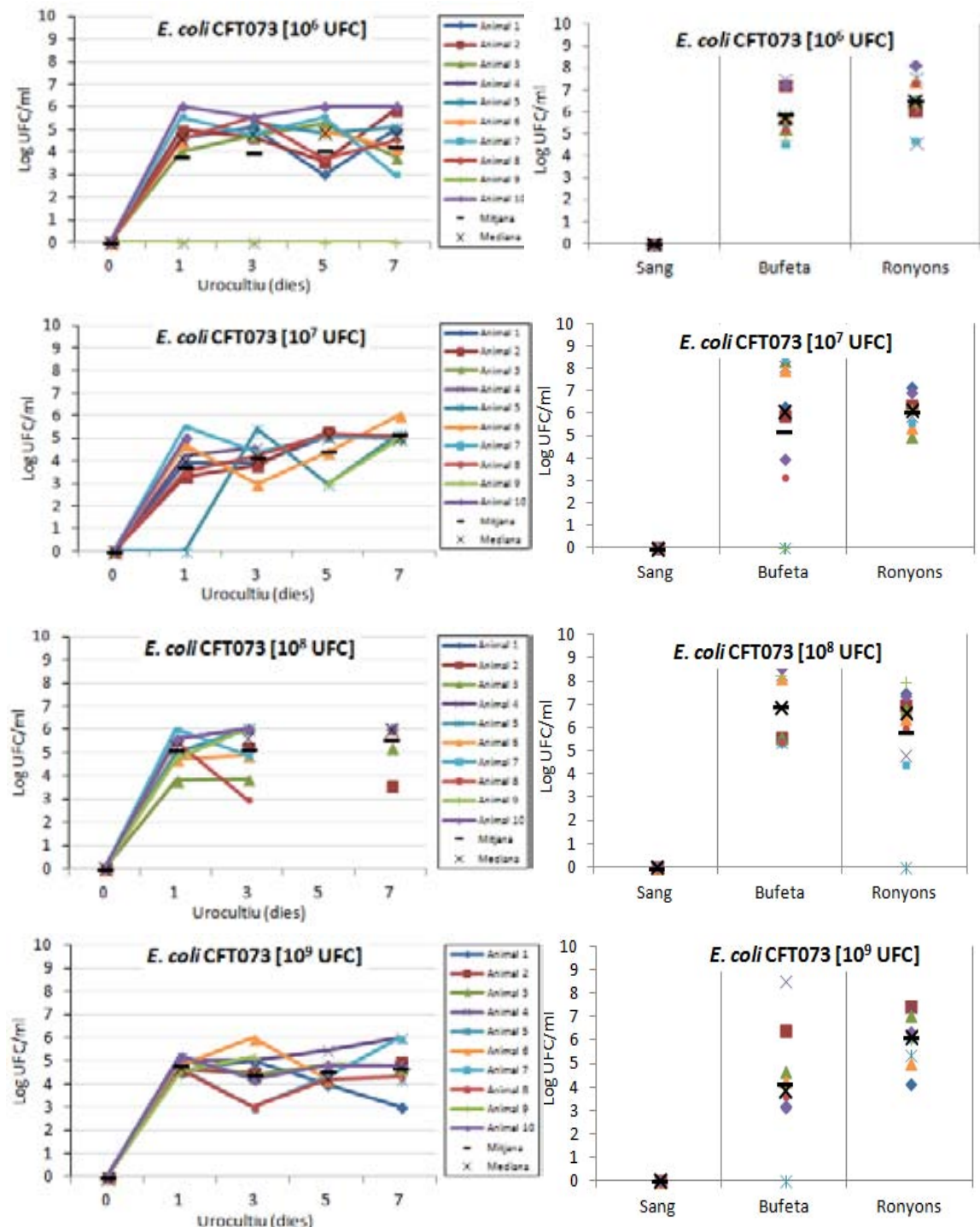
Utilitzant la soca uropatògena d'*E. coli* CFT073 que té un elevat nombre de factors de virulència i que pertany al grup filogenètic B2, com a indicadora de la capacitat de causar infecció urinària (cistitis, pielonefritis o disseminació hematògena) per a determinar la concentració d'inòcul apropiat. Es van inocular quatre concentracions que van oscil·lar entre 10^6 i 10^9 UFC per cada 50 μ l d'inòcul bacterià (taula 33), utilitzant 10 animals per cada concentració.

Seguint els protocols experimentals del apartat III 5.2.1.2 per la inoculació via transuretral, es van obtenir els resultats que es presenten a la taula 51, figures 36, 37 i 38.

Encara que la concentració bacteriana per a inocular a la soca d'*E. coli* virulenta CFT073 es situa entre les quatre concentracions ascendents provades (10^6 a 10^9 UFC), degut a que en totes elles es pot valorar la capacitat patògena i diferents graus d'afectació del sistema urinari, com prèviament ha sigut descrit per altres autors (taula 15). Els recomptes es van mantenir iguals o superiors a 1×10^3 UFC/ml o g., fet que no determina un punt de tall concret (figura 36). Es així com, es pot observar clarament una bona instauració de bacteriúria al llarg dels set dies de l'experiment amb una mitjana de (\bar{x}) 5 Log UFC/ml o i una mediana de (Me) 4.9 Log UFC/ml; alhora que bones recuperacions de bacteris tant de

bufeta (\bar{x} = 5.6 Log UFC/ml i Me= 5.9 Log UFC/ml) com de ronyons (\bar{x} = 6.1 Log UFC/ml i Me= 6.4 Log UFC/ml). Per altre banda, en cap de les quatre concentracions s'han arribat a aïllar bacteris de les mostres de sang; amb aquest resultat de la soca virulenta es va decidir que era necessari realitzar inoculacions amb la soca no virulenta a concentració intermèdia d'1 x 10⁷ UFC i alta d'1 x 10⁹ UFC.

Figura 36. Monitorització en orina de la IUA durant els 7 dies d'experiment, i recuperació bacteriana de sang i òrgans del 7è dia.



Taula 51. Resultats de la inoculació via transuretral de les soques control negatiu i positiu de procediment.

a. Uroanàlisi.

Control	ID	Característiques						Resultats <i>in vivo</i>								
		Epidemiològiques	Filogenètiques		Virulència		Concentració	Uronanàlisi 7è dia								
			Serotipus	GF	PAI	FV		ExPEC	inòcul	Leucocitúria	Proteïnúria	Hematúria	Bacteriúria	Mitjana	Mediana	DE
Negatiu	14318-K12	Soca de laboratori (MG1655)	O16:H48:K-	A	0	2	No (0)	1 x 10 ⁷ UFC/50 µl	0/4	0/4	0/4	0/5	0	0	0	
								1 x 10 ⁸ UFC/50 µl	0/3	0/3	0/3	0/5	0	0	0	
								1 x 10 ⁹ UFC/50 µl	3/3	3/3	3/3	9/10	4,2	4,8	1,7	
Positiu	14335-CFT073	UPEC (Pielonefritis)	O6:H1:K2	B2	3	20	Si (3)	1 x 10 ⁷ UFC/50 µl	1/1	1/1	1/1	6/6	5,2	5,1	0,4	
								1 x 10 ⁸ UFC/50 µl	2/2	2/2	2/2	8/8	5,6	6,0	0,9	
								1 x 10 ⁹ UFC/50 µl	2/2	2/2	2/2	9/9	4,7	4,8	0,9	

b. Cultiu de líquids i òrgans.

Control	ID	Característiques						Resultats <i>in vivo</i>																				
		Epidemiològiques	Filogenètiques		Virulència		Concentració	Cultiu microbiològic (Log UFC/ml o g)																				
			Serotipus	GF	PAI	FV		ExPEC	Bufeta					Ronyons					Sang									
							inòcul	Cultiu	Puntuació	Mitjana	Mediana	DE	Cultiu	Puntuació	Mitjana	Mediana	DE	Cultiu	Puntuació	Mitjana	Mediana	DE						
Negatiu	14318-K12	Soca de laboratori (MG1655)	O16:H48:K-	A	0	2	No (0)	1 x 10 ⁷ UFC/50 µl	0/5	0	0	0	0	0/5	0	0	0	0	0/5	0	0	0	0	0				
								1 x 10 ⁸ UFC/50 µl	0/5	0	0	0	0	0/5	0	0	0	0	0/5	0	0	0	0	0/5	0	0	0	0
								1 x 10 ⁹ UFC/50 µl	10/10	1	5,9	5,7	1,1	10/10	1	5,9	5,7	1,1	0/10	0	6,5	6,6	1,2					
Positiu	14335-CFT073	UPEC (Pielonefritis)	O6:H1:K2	B2	3	20	Si (3)	1 x 10 ⁷ UFC/50 µl	8/10	0,8	5,2	6,1	3,3	10/10	1	5,2	6,1	3,3	0/10	0	6,1	6,2	0,7					
								1 x 10 ⁸ UFC/50 µl	10/10	1	7,0	6,9	1,6	10/10	1	7,0	6,9	1,6	0/10	0	5,8	6,7	2,3					
								1 x 10 ⁹ UFC/50 µl	9/10	0,9	4,1	3,8	2,2	10/10	1	4,1	3,8	2,2	0/10	0	6,1	6,1	1,1					

ID: identificació, GF: grup filogenètic, PAI: nombre total d'illes de patogenicitat, FV: nombre total de factors de virulència, ExPEC: Classificació ExPEC (nombre de gens ExPEC), DE: Desviació estàndard

Per a determinar la capacitat de la soca avirulenta d'*E. coli* K12 de mantenir-se en les vies urinàries, es van inocular cinc animals amb dues concentracions (1×10^7 UFC/50 μ l i 1×10^9 UFC/50 μ l) cadascuna per via transuretral. A la figura 37, es poden observar diferències en el comportament *in vivo*, principalment en la concentració 10^9 UFC, observant-se una bacteriúria heterogènia i una negativització tardana. Pel contrari, a la concentració 10^7 UFC no es va observar aquest comportament; ja que es va obtenir una clara negativització prèvia a les 48h de l'experiment. En relació als cultius microbiològics (figura 38) de sang, bufeta i ronyons posterior a la dissecció durant el 7è dia de l'experiment es pot observar que no s'aïllen bacteris en cap de les mostres processades a les dues concentracions inoculades.

Figura 37. Recuperació bacteriana dels diferents líquids i òrgans processats del model d'IUA.

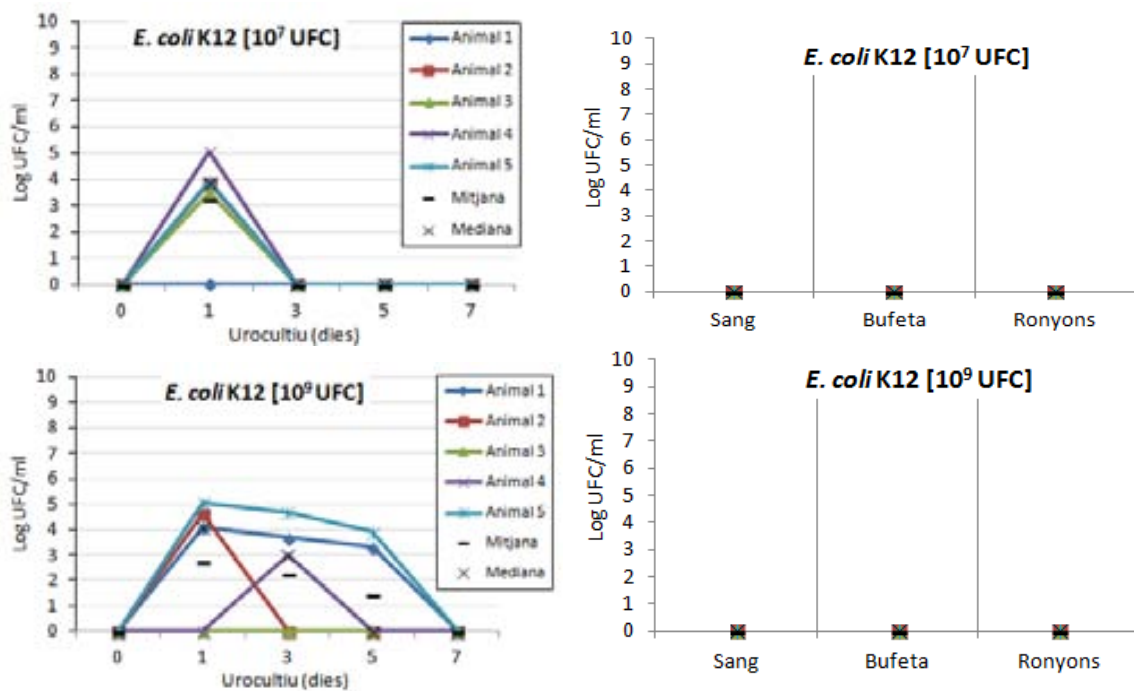
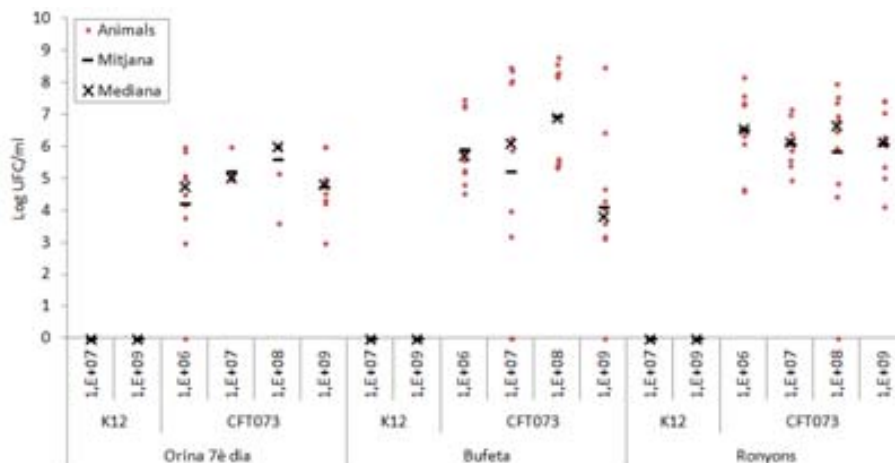


Figura 38. Recuperació bacteriana del 7è dia d'experiment en orina, bufeta i ronyons.



Els resultats de l'estandardització del model d'IUA permeten normalitzar la concentració òptima d'inòcul bacterià per a la via transuretral a la concentració d'1 x 10⁷ UFC per a ser inoculat a totes les soques dels assajos de virulència.

3. Avaluació del potencial virulent i patogen en dos models murins de soques d'*E. coli* aïllades de femta i d'orina de dones durant el curs d'una cistitis no complicada

Es van inocular un total de 20 soques (taula 52) distribuïdes de la següent manera: 20 per via subcutània per al model d'infecció sistèmica (soques núm. 1-20) i 16 per via transuretral per al model d'IUA (soques núm. 1-13, 15,17 i 19).

Taula 52. Distribució segons grup filogenètic de les soques per a inoculació a cadascuna de les dos vies en els models *in vivo*.

Soques d' <i>E. coli</i>	ID*	GF*	Perfil de virulència**	Experiments de virulència <i>in vivo</i> ***
1	14329	A	Típic	Septicèmia i IUA
2	14333	A	Elevat nombre de FV	Septicèmia i IUA
3	14326	A	Típic	Septicèmia i IUA
4	14324	A	Elevat nombre de FV	Septicèmia i IUA
5	14334	B1	Típic	Septicèmia i IUA
6	14321	B1	Típic	Septicèmia i IUA
7	14328	B1	Elevat nombre de FV	Septicèmia i IUA
8	14325	B1	Elevat nombre de FV	Septicèmia i IUA
9	14331	B2	Baix nombre de FV	Septicèmia i IUA
10	14330	B2	Típic	Septicèmia i IUA
11	14322	B2	Baix nombre de FV	Septicèmia i IUA
12	14323	B2	Típic	Septicèmia i IUA
13	14332	D	Típic	Septicèmia i IUA
14	14332.d	D	Típic	Septicèmia segones soques GF D
15	14327	D	Baix nombre de FV	Septicèmia i IUA
16	14327.d	D	Baix nombre de FV	Septicèmia segones soques GF D
17	14319	D	Típic	Septicèmia i IUA
18	14319.d	D	Típic	Septicèmia segones soques GF D
19	14320	D	Baix nombre de FV	Septicèmia i IUA
20	14320.d	D	Baix nombre de FV	Septicèmia segones soques GF D

*ID: identificació, GF: grup filogenètic

**Perfil virulent: típic (A i B amb baix nombre de FV i B2 i D amb elevat nombre de FV) i no típic (A i B elevat nombre de FV i B2 i D amb baix nombre de FV).

*** IUA: infecció urinària ascendent

3.1 Model d'infecció sistèmica via subcutània

L'avaluació del potencial virulent extraintestinal dels aïllats es va determinar inoculant les diferents soques escollides (taula 52) a un model murí de septicèmia estandarditzat a

l'apartat III 5.2.1.1 i IV 2.1. Cada una d'aquestes soques es van inocular via subcutània a la concentració òptima estandarditzada d' $1-3 \times 10^7$ UFC en fase logarítmica i resuspeses en solució de Ringer. Es van inocular ratolins CBA/J de 7 setmanes d'edat i el seguiment dels mateixos es va fer al llarg de 7 dies com a màxim per a determinar el seu comportament *in vivo*. Els criteris de valoració van determinar que els animals que sobreviuen durant més de 7 dies, es consideraven supervivents permanents, ja que els cultius dels teixits i de la sang eren estèrils¹⁰. Així mateix, es van classificar de la següent manera: i) sense capacitat per a causar la mort fins a un màxim de dos de 10 animals (no letal), ii) mentre que es donava la classificació de letal, si ho feia en nou o 10 animals, iii) les soques que no es podien classificar en cap de les dues modalitats anterior es consideraven letals intermedis segons la classificació descrita prèviament per Landraud, *et al.*, 2011¹⁴³.

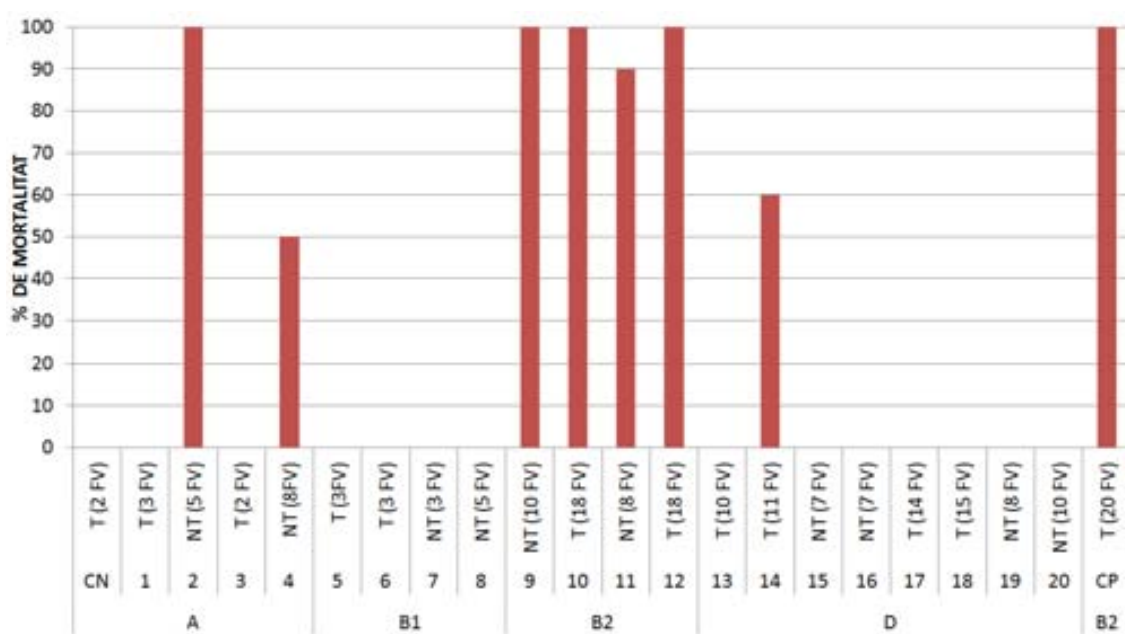
L'anàlisi per grups d'inoculació es va realitzant utilitzant els paràmetres estadístics de mitjana, mediana i desviació estàndard, on aquesta última mostrava una variabilitat proporcionada a l'efecte d'inoculació si era inferior a 2,0¹⁴⁴. Per a confirmar l'especificitat d'efecte, *post-mortem* es van realitzar cultius quantitius de sang i dels homogeneïtzats de fetge, melsa i ronyons. D'aquesta manera es va determinar si els ratolins s'havien de classificar com a sans, per tant una soca no letal havia de produir cultius estèrils, mentre que els cultius de ratolins malalts van ser uniformement i clarament positius; per tant es van classificar com a soques de letalitat total. Addicionalment, en tots els aïllats obtingut als diferents cultius es va confirmar l'espècie en cultiu cromogènic CPS-ID3 amb prova d'indol positiva; i proves moleculars per a GF, FV de categoria ExPEC i ERIC PCR; per a confirmar les característiques moleculars i de clonalitat amb la soca originalment inoculada.

Un cop finalitzats els estudis de virulència mitjançant el model d'infecció sistèmica de les 16 soques seleccionades (taula 52) i posterior anàlisi dels resultats, es va decidir augmentar el nombre de representants de les soques pertanyents al grup filogenètic D. Aquest fet es justifica pel fet que cap dels quatre representants inicials del filogrup D va ser capaç de causar infecció sistèmica en cap dels animals, fins i tot en els grups inoculats amb soques d'elevat nombre de factors de virulència. Per aquest motiu, l'hipòtesi inicial no es va poder validar tot i que la desviació estàndard dels grups va ser inferior a 2,0; mostrant una variabilitat proporcionada del procediment. A causa d'aquests fets i basant-nos en un estudi publicat per Johnson *et al.*, 2012¹⁴⁴, es va introduir quatre soques addicionals del grup filogenètic D amb les mateixes característiques dels representants inicials, que permetin confirmar o revocar les troballes. Per aquest motiu es va procedir a

realitzar una segona inoculació amb 40 animals, i és per aquesta raó que aquest model compte amb 20 soques clíniques inoculades. Com figura en les taules i figures d'aquest apartat:

De les 20 soques d'*E. coli* estudiades, en set d'aquestes (35%) durant les primeres 60 hores d'experiment van morir com a mínim cinc ratolins corresponents a les quatre soques representants del GF B2 independentment del perfil de virulència, les dues soques del GF A amb elevat nombre de FV i una de GF D amb un perfil típic. En cinc (25%) d'aquestes (4 soques B2 i 1 A) van morir més de nou dels 10 ratolins inoculats (80% 10/10 i 20% 9/10) (figura 39).

Figura 39. Mortalitat causada per les soques d'*E. coli* als grups de 10 ratolins inoculats via subcutània.



*T: típic (A i B amb baix nombre de factors de virulència (FV) i B2 i D amb elevat nombre de FV) i NT: no típic (A i B elevat nombre de FV i B2 i D amb baix nombre de FV).

D'aquesta manera 13 de les soques (65%) es poden classificar com no letals, on es troben principalment les que pertanyen als GF A típic, B1 i D; cinc soques (25%) amb una letalitat contundent, corresponents aquelles dels GF B2 i A amb elevat nombre de FV i dues soques (10%) dels GF A amb elevat nombre de FV i D típica, dins del rang de letalitat intermèdia ($p=0.003$); segons els criteris de Landraud, *et al.*, 2011¹⁴³ (taula 53).

Taula 53. Perfil virulent de les soques i relació amb mortalitat.

a. Ordenats de manera descendent per nombre acumulat de factors de virulència.

Soca	ID	Mortalitat			Descripció gens de virulència presents a cada soca***																			
		Letalitat	Percentatge	Hora	fim H	operó pap ACEFG II	foc G	iba	fyu A	chu A	iro N	ire A	lutA	lucD	Operó hly(AD)	hly F	Operó cfb(BN)	vat	sat	pic	Aps MT II-K2	ompT	PAI ₁₂₃₄₅₆₇₈₉	usp
CP	14335-CF7073	Letal	100		fim H	operó pap ACEFG II	foc G	iba	fyu A	chu A	iro N	ire A	lutA	lucD	Operó hly(AD)	hly F	Operó cfb(BN)	vat	sat	pic	Aps MT II-K2	ompT	PAI ₁₂₃₄₅₆₇₈₉	usp
10	14330	Letal	100	36-48	fim H	operó pap ACEFG III	hra	fyu A	chu A	iro N	lutA	lucD	Operó hly(AD)	hly F	conf 1	Aps MT II-K2	iss	cva C	tra T	ibe A	PAI ₁₂₃₄₅₆₇₈₉	usp		
12	14323	Letal	100	36-50	fim H	operó pap ACEFG III	hra	fyu A	chu A	iro N	lutA	lucD	Operó hly(AD)	hly F	conf 1	Aps MT II-K2	iss	cva C	tra T	ibe A	PAI ₁₂₃₄₅₆₇₈₉	usp		
18	143219.d	No letal	0		fim H	fim Av ₁₂₃₄₅₆₇₈₉	operó pap(ACGII)	iba	fyu A	chu A	ire A	lutA	lucD	sat	Aps MT II-K1	tra T	f/c ₁₂₃₄₅	PAI ₁₂₃₄₅₆₇₈₉	usp					
17	14319	No letal	0		fim H	fim Av ₁₂₃₄₅₆₇₈₉	operó pap(ACEF)	iba	fyu A	chu A	lutA	lucD	sat	Aps MT II-K1	tra T	f/c ₁₂₃₄₅	PAI ₁₂₃₄₅₆₇₈₉	usp						
14	14332.d	Letal intermitja	60	36-42	fim H	operó pap ACEFG II	iba	fyu A	chu A	lutA	lucD	sat	Aps MT II	tra T	ompT									
9	14331	Letal	100	36-48	fim H	fyu A	chu A	iro N	hly F	vat	pic	iss			PAI ₁₂₃₄₅₆₇₈₉									
13	14332	No letal	0		fim H	operó pap ACEFG II	fim Av ₁₂₃₄₅₆₇₈₉	iba	fyu A	chu A	lutA	lucD	sat	Aps MT II-K2										
20	143220.d	No letal	0		fim H	operó pap ACG II	afa ES	iba	hra	chu A	lutA	lucD	ast A	ksp MT III										
11	14322	Letal	90	43-50	fim H	fyu A	chu A	vat	Aps MT II-K1	ibe A	PAI ₁₂₃₄₅₆₇₈₉	usp												
4	14324	Letal intermitja	50	36-60	fim H	fim Av ₁₂₃₄₅₆₇₈₉	iba	fyu A	lutA	lucD	pic	Aps MT II-K2												
19	14320	No letal	0		fim H	iba	chu A	ire A	lutA	lucD	ast A	ompT												
15	14327	No letal	0		fim H	operó pap CEEFG I	chu A	lutA	lucD	tra T	ompT													
16	143227.d	No letal	0		fim H	chu A	lutA	lucD	Aps MT II-K1	ibe A	usp													
2	14333	Letal	100	36-48	fyu A	lutA	lucD	Aps MT II-K2	tra T															
8	14325	No letal	0		fim H	hra	lutA	lucD	tra T															
5	14334	No letal	0		fim H	fim Av ₁₂₃₄₅₆₇₈₉	tra T																	
6	14321	No letal	0		fim H	fim Av ₁₂₃₄₅₆₇₈₉	iba																	
7	14328	No letal	0		fim H	hra	ish																	
1	14329	No letal	0		fim H	fim Av ₁₂₃₄₅₆₇₈₉	fyu A																	
3	14326	No letal	0		fim H	tra T																		
CN	14318-K12	No letal	0		fim H	ompT																		

ID: identificació, NP de PAI: nombre d'illes de patogenicitat, GF: grup filogenètic, CN: soca de laboratori K12 (MG 1625), CP: UPEC CF7073
 ** Perfil virulent segons el seu grup filogenètic: típic (A i B amb baix nombre de FV i B2 i D amb elevat nombre de FV) i no típic (A i B elevat nombre de FV i B2 i D amb baix nombre de FV).
 *** Gens de la classificació **ExPEC**: Extraintestinal *Escherichia coli*. Definida com la presència de 32 FV: pap AH o pap C (ensamblatge i subunitat estructural de les fibries FI, sfa/foc (fibries tipus S i F3C), afb/afc (adhesines de la família DC), lutA (aerobactina) i ApsM II. Descripció de cadascun dels gens a l'apartat 1.2.2.2.1.

b. Ordenats per grups filogenètics.

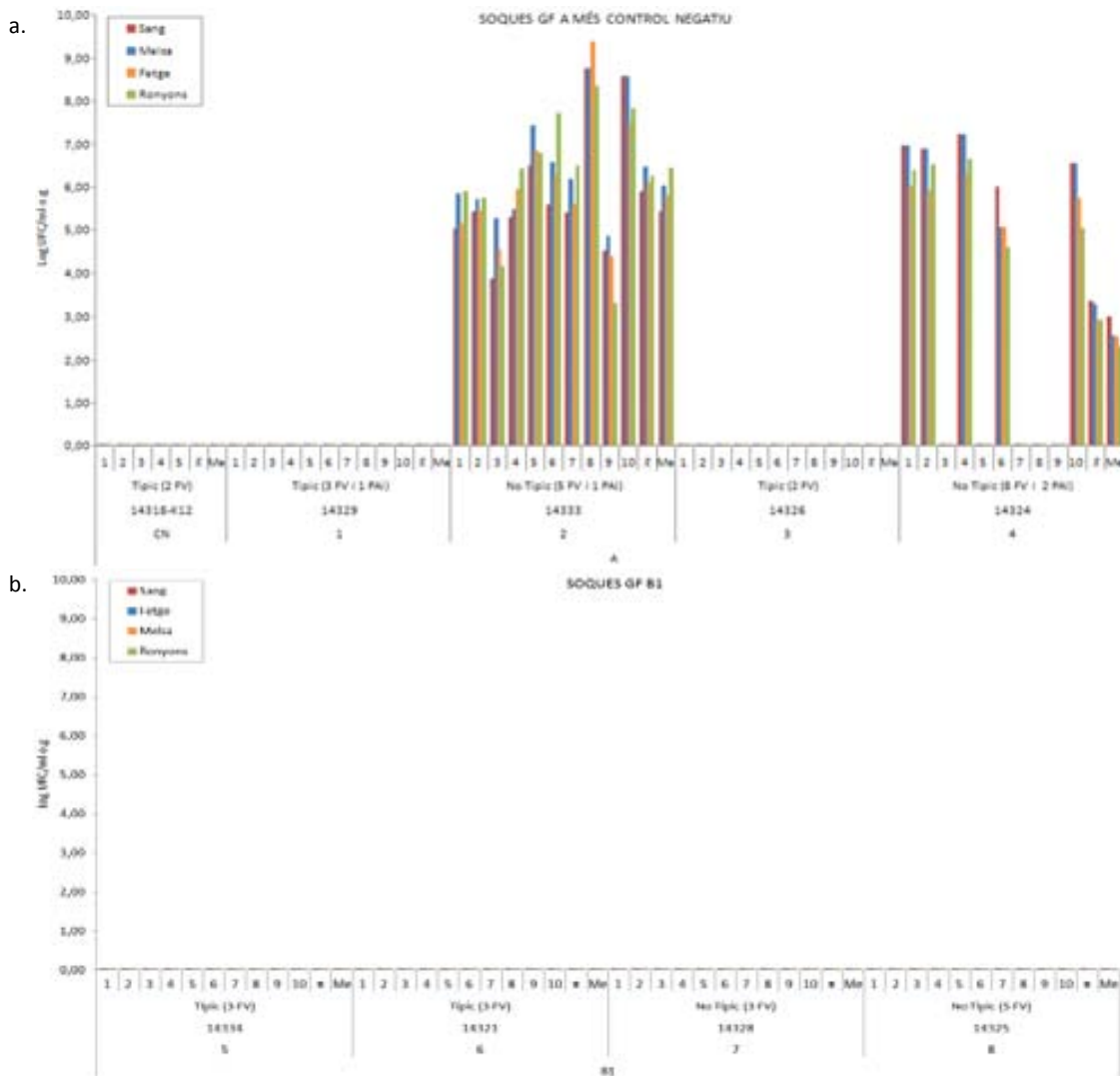
Soca	ID	NP de UPEC**	NP de PAI	GF	perfil de virulència*	Descripció gens de virulència presents a cada soca***																			
CN	14318-K12	2	0	A	Típic	fim H																		ompT	
4	14324	6	2	A	Elevat n. de FV	fim H	fim Av ₁₂₃₄₅₆₇₈₉		iba			lucD	lutA	fyu A											Aps MT II-K2
2	14333	7	1	A	Elevat n. de FV	fim H						lucD	lutA	fyu A											Aps MT II-K2
1	14329	3	1	A	Típic	fim H	fim Av ₁₂₃₄₅₆₇₈₉							fyu B											tra T
3	14326	2	0	A	Típic	fim H																			
8	14325	5	0	B1	Elevat n. de FV	fim H			hra			lucD	lutA												tra T
2	14324	2	0	B1	Típic	fim H	fim Av ₁₂₃₄₅₆₇₈₉																		tra T
6	14321	3	0	B1	Típic	fim H	fim Av ₁₂₃₄₅₆₇₈₉		iba	hra															tra T
7	14328	3	0	B1	Elevat n. de FV	fim H																			tra T
10	14330	18	5	B2	Típic	fim H			hra	iro N	lucD	lutA	fyu A	chu A	Operó hly(AD)	hly F	conf 1								Aps MT II-K2
12	14322	18	0	B2	Típic	fim H			hra	iro N	lucD	lutA	fyu A	chu A	Operó hly(AD)	hly F	conf 1								Aps MT II-K2
9	14331	10	0	B2	Baix n. de FV	fim H			hra	iro N	lucD	lutA	fyu A	chu A	Operó hly(AD)	hly F	conf 1								Aps MT II-K2
11	14322	6	0	B2	Baix n. de FV	fim H			hra	iro N	lucD	lutA	fyu B	chu A	hly F			pic	vat						Aps MT II-K2
CP	14335-CF7073	20	1	B2	Típic	fim H			hra	foc G	iro N	lucD	lutA	fyu A	ire A	chu A	Operó hly(AD)	hly F							Aps MT II-K2
18	143219.d	15	2	D	Típic	fim H	fim Av ₁₂₃₄₅₆₇₈₉		iba			lucD	lutA	fyu A	ire A	chu A	Operó hly(AD)	hly F							ompT
17	14319	14	2	D	Típic	fim H	fim Av ₁₂₃₄₅₆₇₈₉		iba			lucD	lutA	fyu A	ire A	chu A	Operó hly(AD)	hly F							Aps MT II-K1
14	14332.d	11	1	D	Típic	fim H			iba			lucD	lutA	fyu A	chu A										Aps MT II-K1
13	14332	10	1	D	Típic	fim H	fim Av ₁₂₃₄₅₆₇₈₉		iba			lucD	lutA	fyu A	chu A										Aps MT II-K1
20	143220.d	10	0	D	Baix n. de FV	fim H			afa ES	iba	hra		lucD	lutA	chu A										ast A
15	14327	6	0	D	Baix n. de FV	fim H			iba			lucD	lutA	ire A	chu A										ast A
16	143227.d	7	0	D	Baix n. de FV	fim H			iba			lucD	lutA	chu A											tra T
2	14333	7	0	D	Baix n. de FV	fim H						lucD	lutA	chu A											ompT

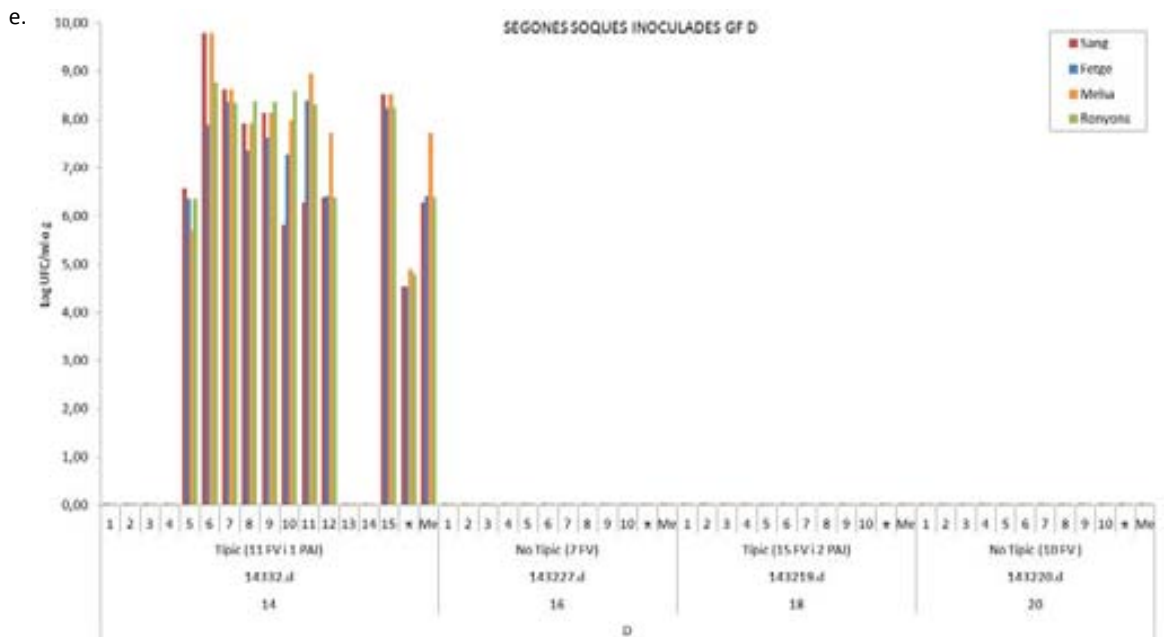
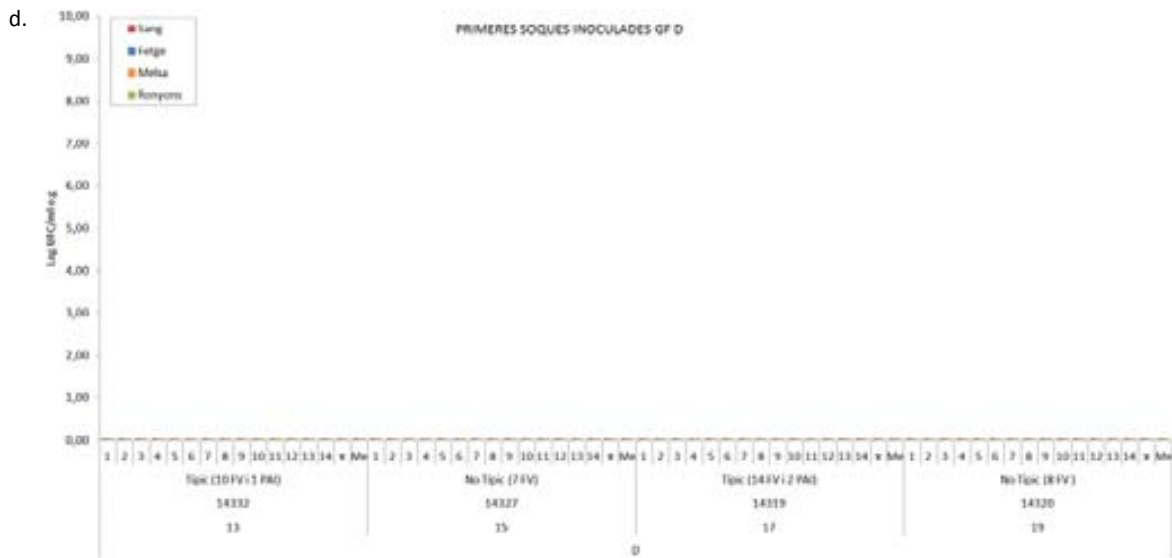
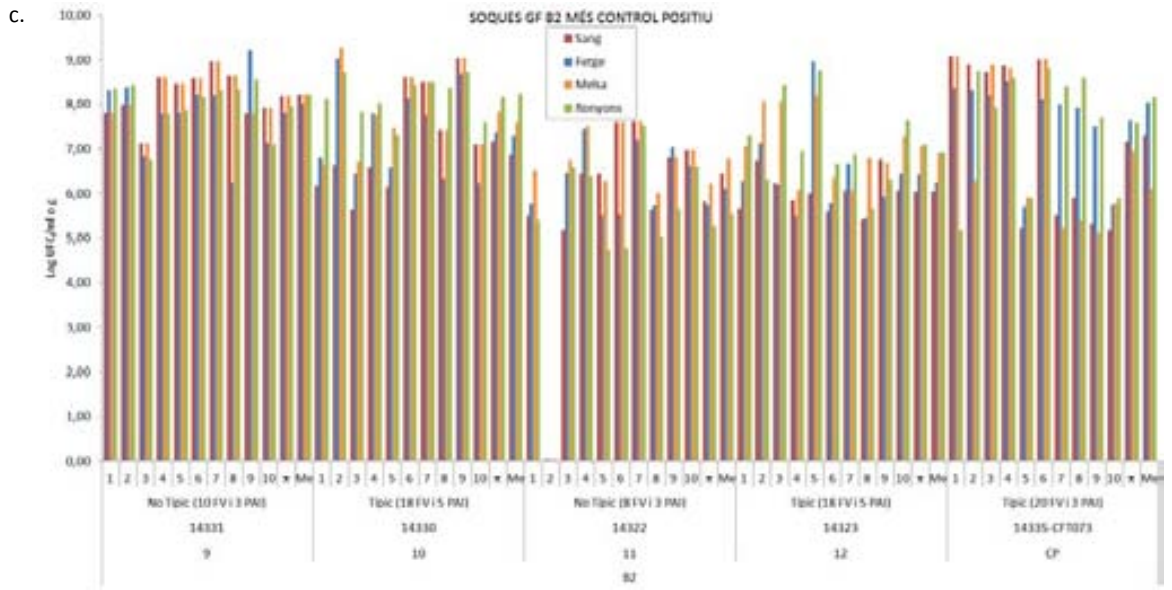
ID: identificació, NP de PAI: nombre d'illes de patogenicitat, GF: grup filogenètic, CN: soca de laboratori K12 (MG 1625), CP: UPEC CF7073
 ** Perfil virulent segons el seu grup filogenètic: típic (A i B amb baix nombre de FV i B2 i D amb elevat nombre de FV) i no típic (A i B elevat nombre de FV i B2 i D amb baix nombre de FV).
 *** Gens de la classificació **ExPEC**: Extraintestinal *Escherichia coli*. Definida com la presència de 32 FV: pap AH o pap C (ensamblatge i subunitat estructural de les fibries FI, sfa/foc (fibries tipus S i F3C), afb/afc (adhesines de la família DC), lutA (aerobactina) i ApsM II. Descripció de cadascun dels gens a l'apartat 1.2.2.2.1.

Per tant es va observar una clara diferència en la letalitat entre les 20 soques inoculades, sent la letalitat és un paràmetre molt clar i senzill d'analitzar en unes soques d'aquestes característiques, això sempre que la majoria de ratolins inoculats tinguin un comportament similar amb unes desviacions estàndards inferior a 2,0.

Quan es representen les recuperacions bacterianes expressades en UFC/ml o g de sang, melsa, fetge i ronyons (figura 40), agrupades per grup filogenètic i incloent els controls de procediment tant negatiu com positiu, es pot observar una bona correlació entre els recomptes entre cadascun dels animals i alhora entre cadascun dels grups d'inoculació durant les diferents repliques experimentals, en com a mínim grups de 5 ratolins per cadascuna de les soques d'*E. coli*; revelant una variació experimental mínimes i òptima amb desviacions estàndards entre 0.0 i 1.5 com a màxim per cada grup de ratolins estudiants amb cada soca específica.

Figura 40. Recuperació bacteriana agrupada per grup filogenètic de totes les mostres processades de cada un dels grups d'inoculació.

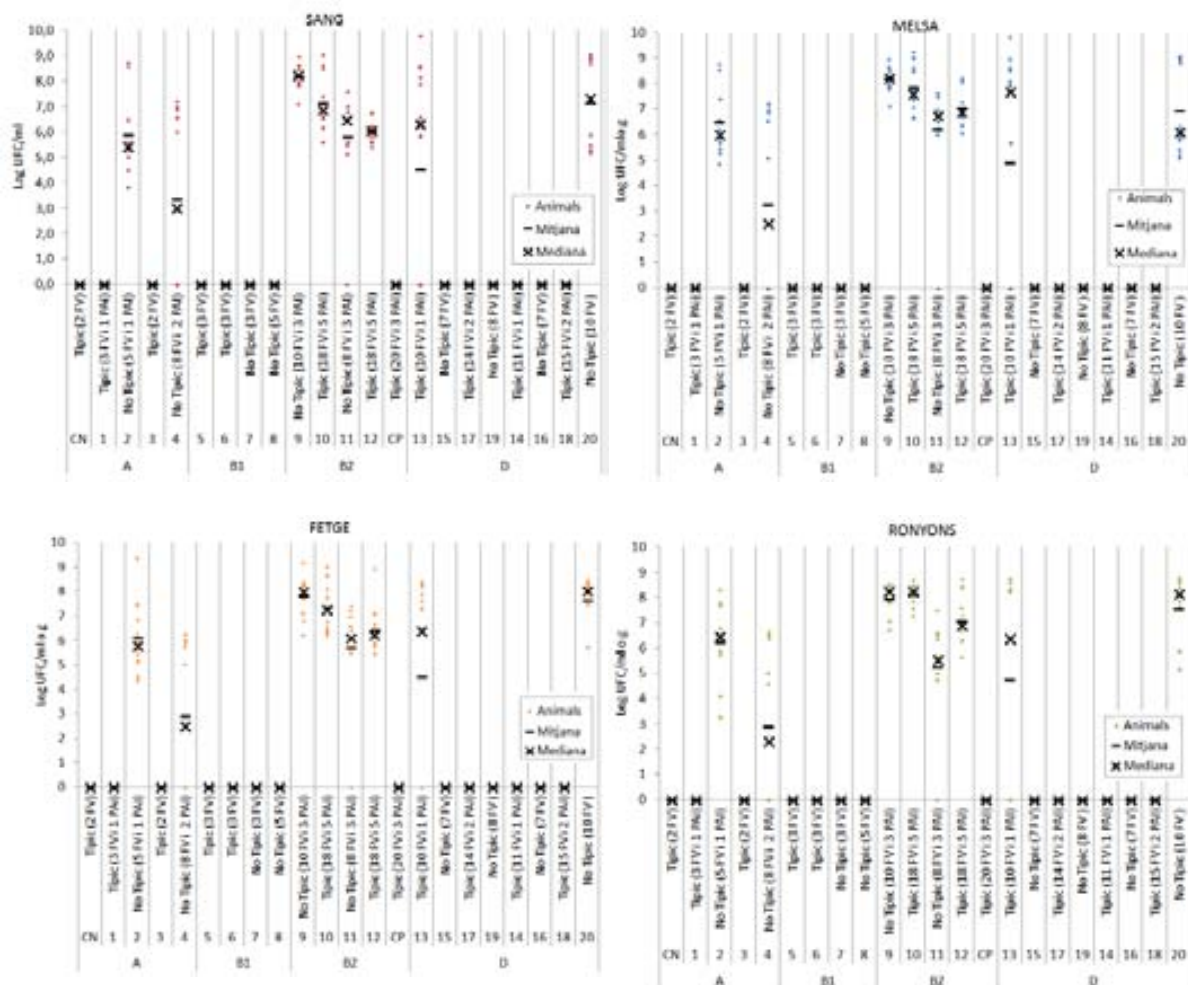




A la figura 40 (d i e), es representen en paral·lel les vuit soques del GF D, corresponents a les primeres i segones soques seleccionades per aquest GF; ja que la primera selecció de soques del GF D no va produir letalitat en cap dels ratolins, encara que es van inocular dues soques amb elevat potencial patògen per la presència de nombrosos factors de virulència (10 FV amb 1 PAI i 14 FV amb 2 PAI), però al repetir l'experiment amb quatre noves soques del GF D, la soca nombre 14 (14332.d) amb un perfil típic de virulència amb 11 FV i 1 PAI si es va aconseguir demostrar la letalitat en nou dels 15 ratolins inoculats durant les tres replicats de l'experiment.

En conjunt les dades representades a la figura 41, demostren que s'ha pogut recuperar bacteris de les mostres processades en els grups d'animals de 8 soques inoculades, incloent el control positiu de procediment, amb una correlació del 100% amb les dades de mortalitat expressades a la figura 39 i taula 53.

Figura 41. Comparació individualitzada dels recomptes bacterians de les mostres processades dels òrgans.



3.2 Model d'infecció urinària ascendent via transuretral

L'avaluació del potencial virulent del sistema urinari dels aïllats es va determinar inoculant les diferents soques escollides (taula 52) a un model murí d'infecció urinària ascendent (IUA) estandarditzat a l'apartat III 5.2.1.2 i IV 2.2. Cada una d'aquestes soques es van inocular via transuretral a la concentració òptima estandarditzada d' $1-3 \times 10^7$ UFC en fase logarítmica i resuspeses en solució de PBS. Es van inocular ratolins CBA/J de 9 setmanes d'edat i el seguiment dels mateixos es va fer al llarg de 7 dies com a màxim per a determinar el seu comportament *in vivo*.

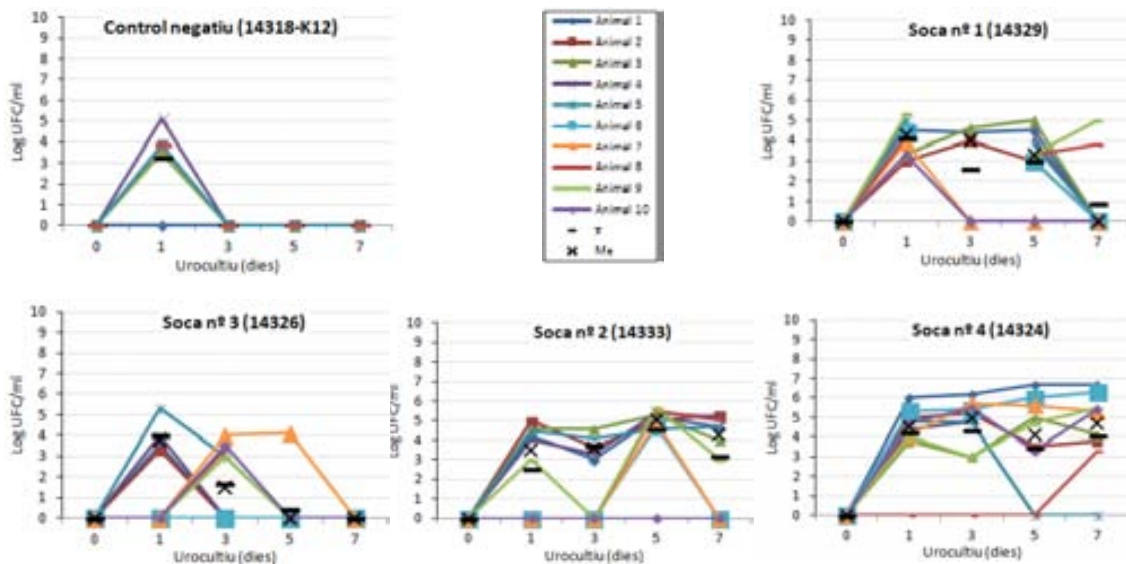
Així, una alíquota de 50 µL de cadascuna de les concentracions bacterianes que contenien 0,05% del colorant CSB, *Chicago Sky Blue* (*Sigma-Aldrich*®) es va introduir per la uretra fins la bufeta. La taca de colorant, que no té efectes tòxics o antibacterians va servir com a indicador per a l'èxit de la inoculació (és a dir, la taca havia de tenyir la bufeta). Per tal d'excloure la possibilitat de reflux vesicoureteral causada pel inòcul; en cadascun dels grups d'inoculació un ratolí addicional al experiments de virulència va actuar com a control de reflux, el qual es va sacrificar immediatament després de la inoculació; ni el colorant, ni els bacteris es van ser detectar en als ronyons. Finalment el model d'IUA es va obtenir mitjançant la inoculació transuretral no obstructiva de 10^7 UFC/50 µl de la soca que es volia provar.

L'anàlisi per grups d'inoculació es va realitzar utilitzant els paràmetres estadístics de mitjana, mediana i desviació estàndard, on aquesta última mostrava una variabilitat proporcionada a l'efecte d'inoculació si era inferior a $2,0^{144}$. Per a confirmar l'especificitat d'efecte, *post-mortem* es van realitzar cultius quantitius de sang i dels homogeneïtzats de bufeta i ronyons, a més de l'anàlisi histològics de bufeta i ronyó. D'aquesta manera es va determinar si els ratolins s'havien de classificar-se com a sans, i per tant una soca sense potencial patògen de les vies urinàries amb cultius estèrils, mentre que els cultius dels ratolins malalts van ser uniformement i clarament positius; per tant es van classificar com a soques potencialment patògenes del sistema urinari a nivell de bufeta (cistitis) o ronyons (pielonefritis). Addicionalment, en tots els aïllats obtingut als diferents cultius es va confirmar l'espècie en cultiu quantitiu en medi cromogènic CPS-ID3 amb la posterior prova d'indol positiva; i proves moleculars per a GF, FV de categoria ExPEC i ERIC PCR; per a confirmar les característiques moleculars i de clonalitat amb la soca originalment inoculada.

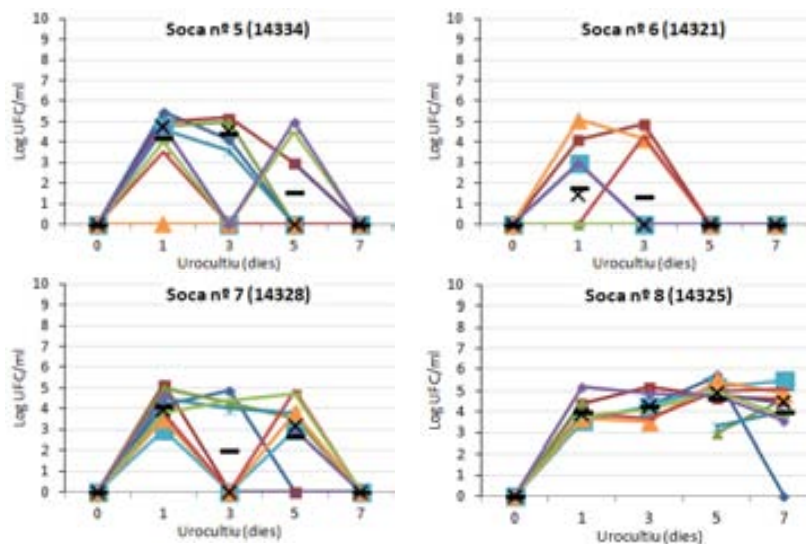
De la mateixa manera que en les proves d'estandardització (apartat IV.2.2), es van fer seguiments de la infecció urinària ascendent (IUA) determinant quantitativament la quantitat d'UFC per ml d'orina cada 24 hores fins la finalització de l'experiment al 7è dia. A la figura 42 es pot visualitzar l'evolució de les IUA causades per cadascuna de les 16 soques d'*E. coli* inoculades, més els corresponents controls negatiu i positiu de procediment; en cadascun del grups de cinc ratolins durant les dos repliques fetes per a cada soca.

Figura 42. Seguiment de la infecció urinària ascendent mitjançant cultiu d'orina durant els set dies de l'experiment, agrupades per grups filogenètics.

a. Soques del GF A més control negatiu.

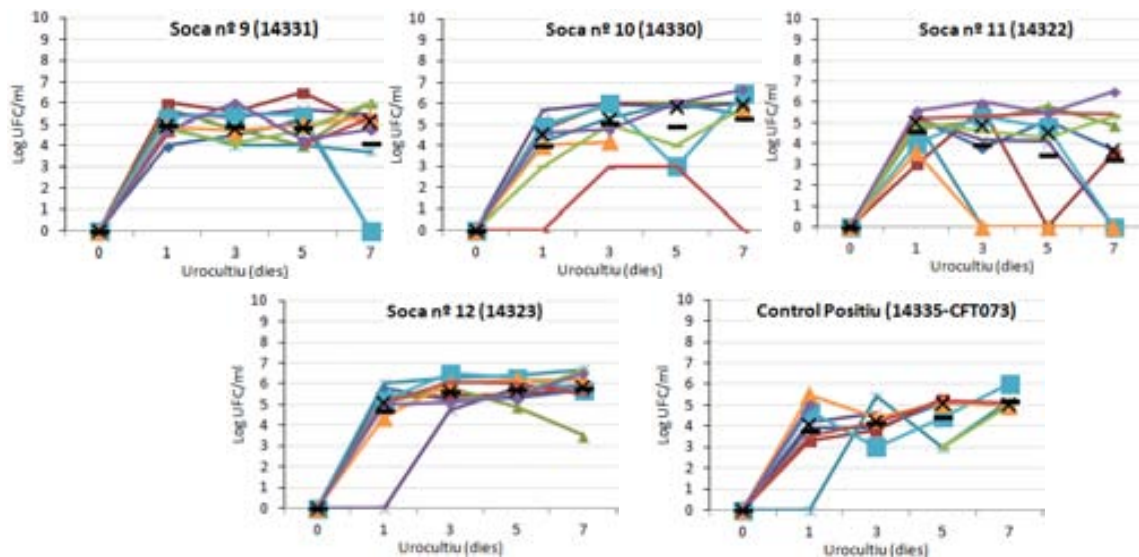


b. Soques del GF B1.

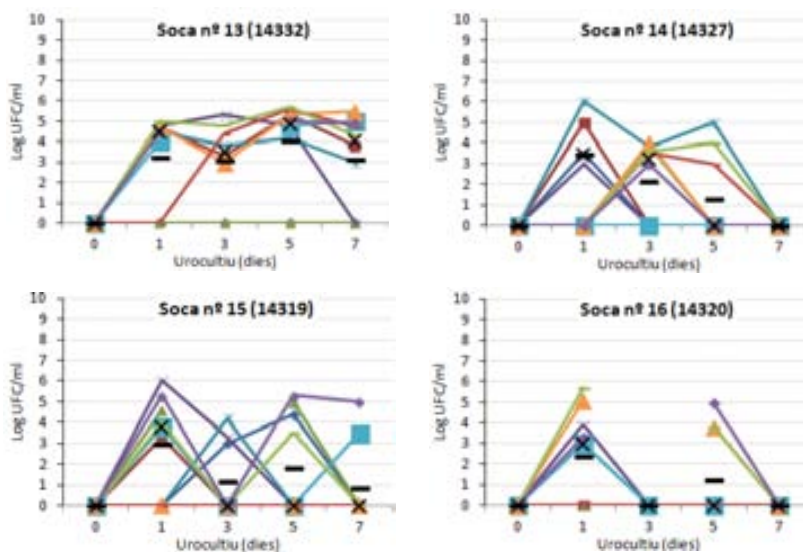


(continuació) **Figura 42.** Seguiment de la infecció urinària ascendent mitjançant cultiu d'orina durant els set dies de l'experiment agrupades per grups filogenètics.

c. Soques del GF B2 més control positiu.



d. Soques del GF D.



A la figura 42 s'observa la negativització total dels cultius d'orina al 7è dia en 6 de les 16 soques inoculades (37.5%) representades en el següent GF: una soca del GF A amb un perfil no virulent; tres soques del GF B, les dues no virulents i una de les classificades amb un perfil virulent per la presència de l'hemaglutinina termostable (*tsh*); i dues soques del GF D que corresponien a les dels perfils no virulents. Alhora en cinc de les 16 soques (37.5%) s'ha mantingut la IUA fins al 7è dia en com a mínim 9 del 10 ratolins, distribuïts de la següent manera: una tant per a les GF A i B1 totes dues amb elevat nombre de FV, tres soques del GF B2 i una del GF D amb perfils típics de virulència. Finalment, quatre

soques (25%) van arribar al 7è dia del experiment amb cultius tant positius com negatius distribuïts de la següent manera: dues soques del GF A i una dels GF B2 i D.

Al llarg dels 7 dies de l'experiment, el diagnòstic compatible amb IUA es va confirmar mitjançant la presència de leucòcits, eritròcits, nitrts, proteïnes i cultiu positiu d'orina amb recomptes ≥ 103 UFC/ml d'orina (figura 42). Dins d'aquests indicadors d'infecció, degut a la limitació de volum d'orina, es va prioritzar la seva determinació de la següent manera: uroanàlisi, determinació de leucòcits, proteïnes, eritròcits i nitrts, sent aquesta última sempre positiva per totes les orines processades. Quant va ser possible addicionalment es van determinar els set restants paràmetres de la tira reactiva d'uroanàlisi (densitat específica, pH, glucosa, cossos cetònics, urobilinogen, bilirubina i hemoglobina). A la figura 43 i taula 54, es mostren les dades obtingudes d'aquest anàlisi en les orines del 7è dia prèvia al sacrifici i dissecció dels animals. A la taula 54 es mostren les dades compilades de diferents paràmetres, com a per exemple el nombre d'animals positius per a cada marcador determinat (leucocitúria, proteïnúria i hematúria) comparat *versus* el total d'animals estudiats per al mateix marcador, la puntuació expressada en nombres del 0 al 1, on un es la màxima puntuació possible i el paràmetres estadístics de desviació estàndard (DE), de mitjana (\bar{x}) i de mediana (Me), aquest dos últims representats a la figura 43.

El uroanàlisi (figura 43) demostra que el 100% de les soques analitzades van ser capaces de produir resposta inflamatòria per la presència d'esterases de granulòcits a les mostres d'orina, per la seva part 15 de les 16 soques (93.8%) van donar positives a la presència de proteïna (albúmina) a excepció d'una soca del GF D, que compte amb un perfil típic de virulència, encara que val la pena precisar que únicament va ser possible processar l'orina d'un ratolí d'un total de 10 ratolins. Nou de les 16 soques van ser positives a la presència de sang, (56.25%) distribuïnt-se entre els GF de la següent manera: una del GF D (25%), dues dels GF A i B1 (50% cadascun) i les quatre del GF B (100%).

Taula 54. Anàlisi de les mostres d'orina processades amb tira reactiva per a la determinació de característiques físico-químiques.

Característiques										Uronanàlisi 7è dia*													
Soca	ID	Epidemiològiques	Filogenètiques				Virulència		Leucocitúria					Proteinúria					Hematúria				
			Serotipus	GF	PAI	FV	ExPEC	Perfil	Positiu	Puntuació	Mitjana	Mediana	DE	Positiu	Puntuació	Mitjana	Mediana	DE	Positiu	Puntuació	Mitjana	Mediana	DE
CN	14318-K12	Soca laboratori	O16:H48-K-	A	0	2	NO (0)	Típic	0/4	0	0,0	0,0	0,0	0/4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1	14329	Cistitis	ONT:H19	A	1	3	NO (0)	Típic	6/6	1,0	1,2	1,0	0,4	1/2	0,5	1,0	1,0	1,4	0/2	0,0	0,0	0,0	0,0
2	14333	Cistitis	O5:H17	A	1	5	SI (2)	Elevat nombre de FV	4/4	1,0	2,0	2,0	1,2	2/3	0,7	1,3	1,0	1,5	2/3	0,7	1,3	1,0	1,5
3	14326	Fecal	O66:H25	A	0	2	NO (0)	Típic	5/5	1,0	1,0	1,0	0,0	5/5	1,0	1,4	1,0	0,9	0/5	0,0	0,0	0,0	0,0
4	14324	Fecal	O86:H2	A	2	8	SI (2)	Elevat nombre de FV	8/8	1,0	2,3	2,5	0,9	5/5	1,0	1,8	1,0	1,1	1/5	0,2	0,4	0,0	0,9
5	14334	Cistitis	ONT:H1	B1	0	3	NO (0)	Típic	3/6	0,5	0,7	0,5	0,8	3/6	0,5	0,8	0,5	1,0	0/6	0,0	0,0	0,0	0,0
6	14321	Cistitis	ONT:H42	B1	0	3	NO (0)	Típic	5/5	1,0	1,2	1,0	0,4	4/5	0,8	1,2	1,0	0,8	2/5	0,4	0,4	0,0	0,5
7	14328	Fecal	O177:H2	B1	0	3	NO (0)	Elevat nombre de FV	4/5	0,8	1,2	1,0	0,8	3/5	0,6	1,2	1,0	1,3	0/4	0,0	0,0	0,0	0,0
8	14325	Fecal	ONT:H21	B1	0	5	NO (1)	Elevat nombre de FV	7/7	1,0	2,0	2,0	1,0	4/6	0,7	1,3	1,0	1,4	3/6	0,5	0,8	0,5	1,0
9	14331	Cistitis	O131:HNT	B2	3	10	NO (0)	Baix nombre de FV	3/3	1,0	2,0	2,0	1,0	3/3	1,0	1,3	1,0	0,6	1/3	0,3	0,3	0,0	0,6
10	14330	Cistitis	ONT:H42	B2	5	18	SI (3)	Típic	5/5	1,0	2,6	3,0	0,9	5/5	1,0	1,6	2,0	0,5	5/5	0,1	2,6	3,0	1,1
11	14322	Fecal	O44:HNT	B2	3	8	NO (2)	Baix nombre de FV	5/5	1,0	2,2	2,0	0,8	3/5	0,6	1,0	1,0	1,2	3/5	0,6	1,6	1,0	1,8
12	14323	Fecal	O177:H-	B2	5	18	SI (3)	Típic	6/6	1,0	2,8	3,0	0,4	6/6	1,0	1,8	2,0	0,8	5/6	0,8	1,6	2,0	1,1
13	14332	Cistitis	ONT:H-	D	1	10	SI (3)	Típic	1/1	1,0	1,0	1,0	-	0/1	0,0	0,0	0,0	0,0	0/1	0,0	0,0	0,0	0,0
15	14327	Cistitis	O77:H18	D	0	7	SI (2)	Baix nombre de FV	4/5	0,8	0,8	1,0	0,4	3/3	1,0	1,7	1,0	1,2	1/5	0,2	0,2	0,0	0,4
17	14319	Fecal	O1:H-	D	2	14	SI (3)	Típic	3/5	0,6	1,0	1,0	1,0	2/3	0,7	1,0	1,0	1,0	0/3	0,0	0,0	0,0	0,0
19	14320	Fecal	O169:H9	D	0	8	NO (1)	Baix nombre de FV	4/5	0,8	0,8	1,0	0,4	2/4	0,5	0,8	0,5	1,0	0/4	0,0	0,0	0,0	0,0
CP	14335-CFT073	Pielonefritis	O6:H1:K2	B2	3	20	SI (4)	Típic	6/6	1,0	2,6	3,0	0,5	6/6	1,0	2,6	3,0	0,5	6/6	1,0	2,3	2,0	0,5

*Positiu: nombre d'animals analitzats amb la característica estudiada positiva al numerador/nombre de animals totals analitzats per a la categoria al denominador, puntuació: valoració numèrica en una escala de 0,0 a 1,0, on la màxima puntuació per la categoria és 1 i DE: desviació estàndard.

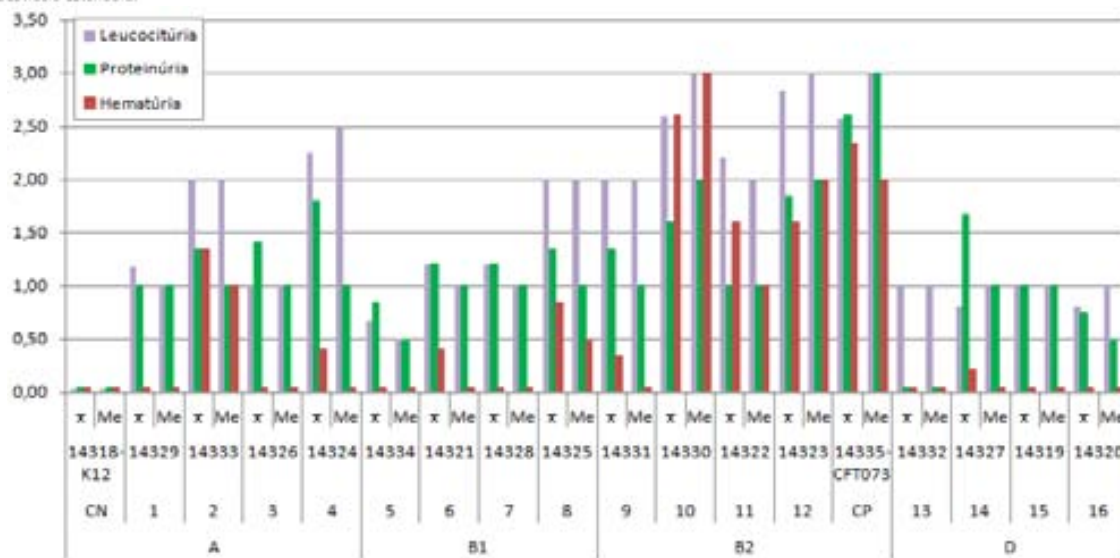
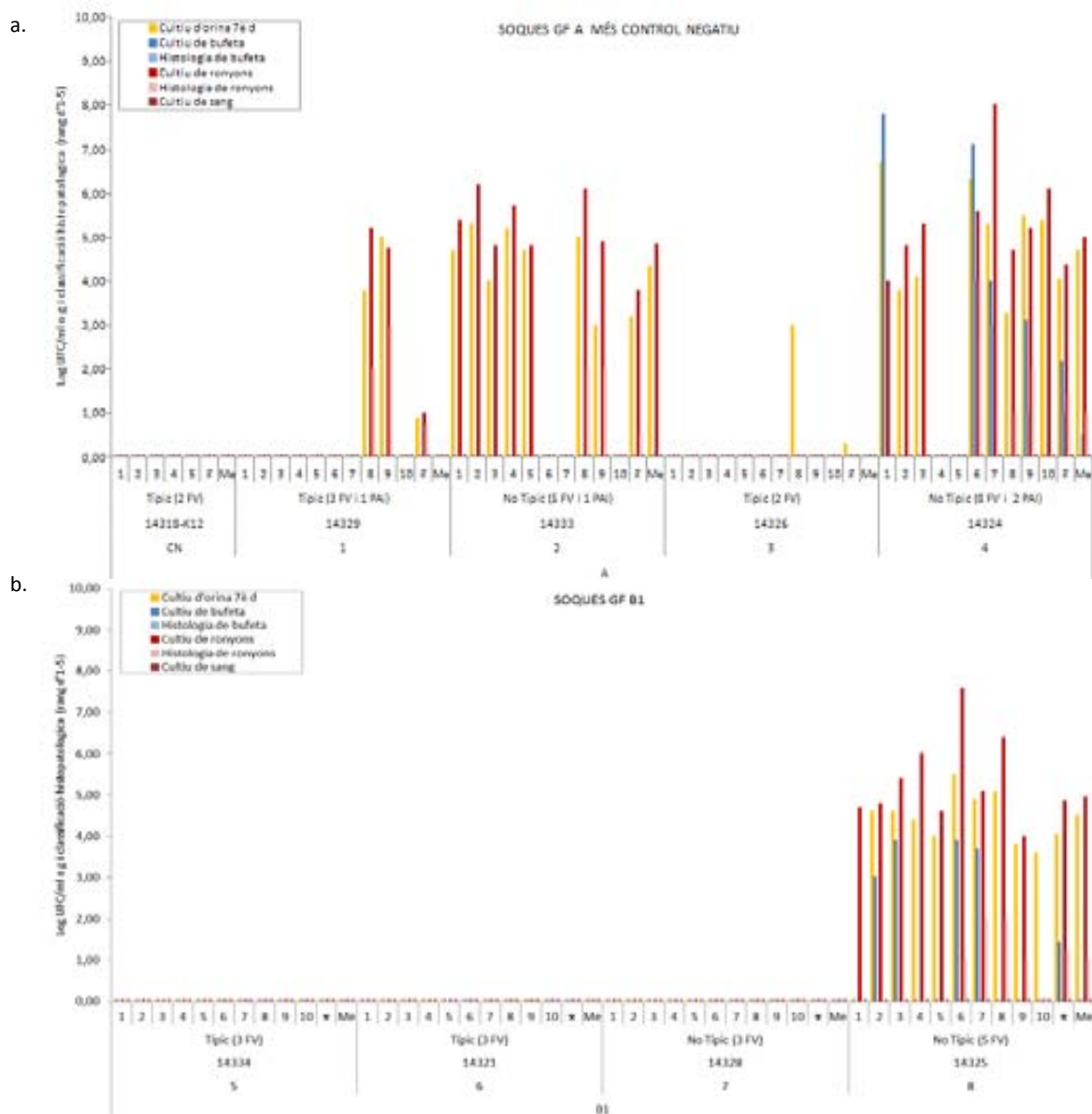
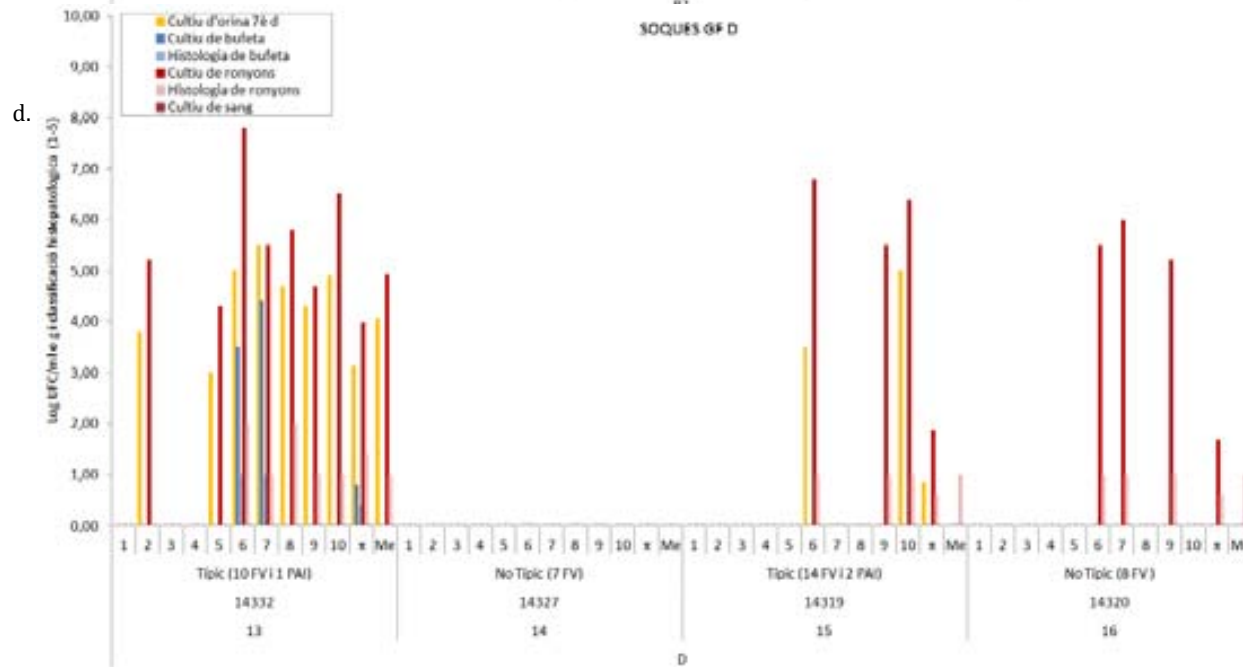
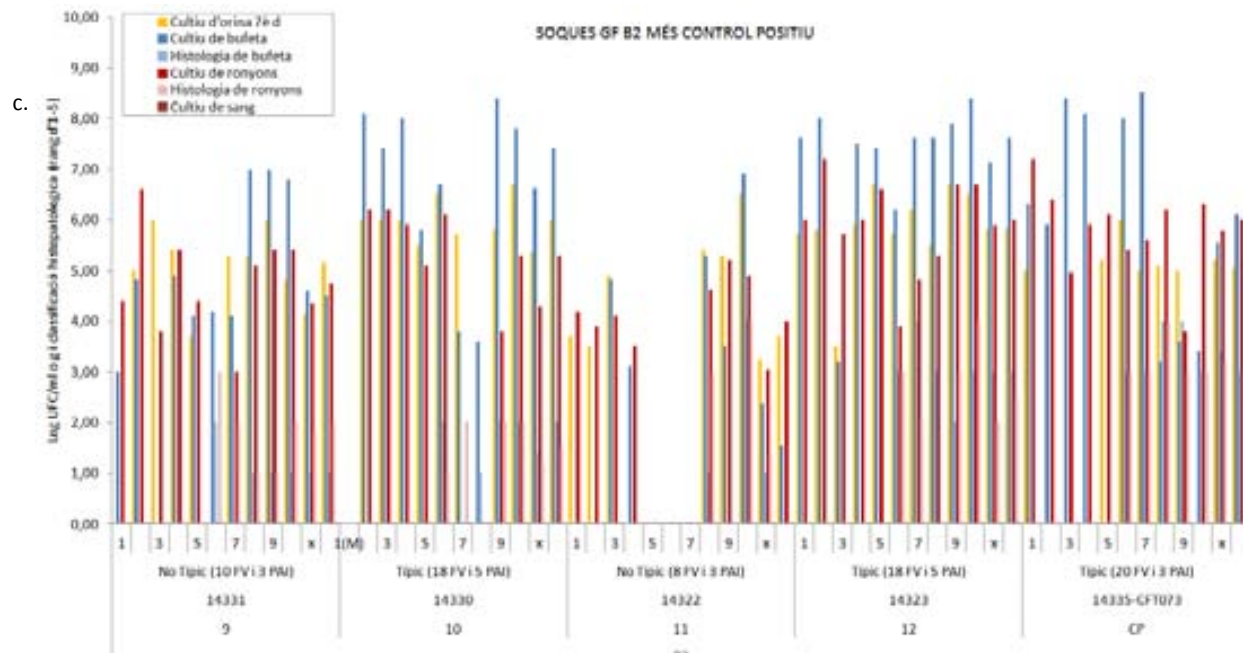


Figura 43. Representació dels paràmetres estadístics de mitjana (\bar{x}) i mediana (Me) per als marcadors de leucocitúria, proteinúria i hematúria en les mostres d'orina durant l'experiment de 7 dies.

A la figura 44, 45 i taula 55 es mostren els resultats del processament microbiològic de les mostres dels 160 ratolins inoculats; d'aquest 67 animals (41,9%) van arribar al final de l'experiment amb cultius positius d'orina, entre els quals destaquen el GF B2 amb 32 (80%) d'orines positives de les 40 analitzades, seguit del GF A amb 18 (45%), 9 (22,5%) i 8 (20,5%) del GF B1 i D, respectivament. El nombre d'animals amb cultius positius de bufeta va ser de 43 (26,9) distribuïts així: 33 (82,5%) del GF B2, 2 (26,9%) del GF D i 4 (10%) per a cadascun dels GF A i B1. Alhora en 72 (45%) ratolins es van recuperar bacteris del ronyó amb predomini del GF B2 amb 33 (82,5%) cultius positius, seguit dels GF A (17 (42,5%), D (13/32,5%) i B1 (9/22,5%). En cap moment es va causar bacterièmia, ja que totes les mostres de sang processades quantitativament van tenir cultius negatius.

Figura 44. Recòmptes bacterians del 7è dia d'experiment de mostres d'orina, de bufeta, de ronyons i de sang; i comparativa amb els resultats histopatològics de bufeta i de ronyons agrupats per grup filogenètic.



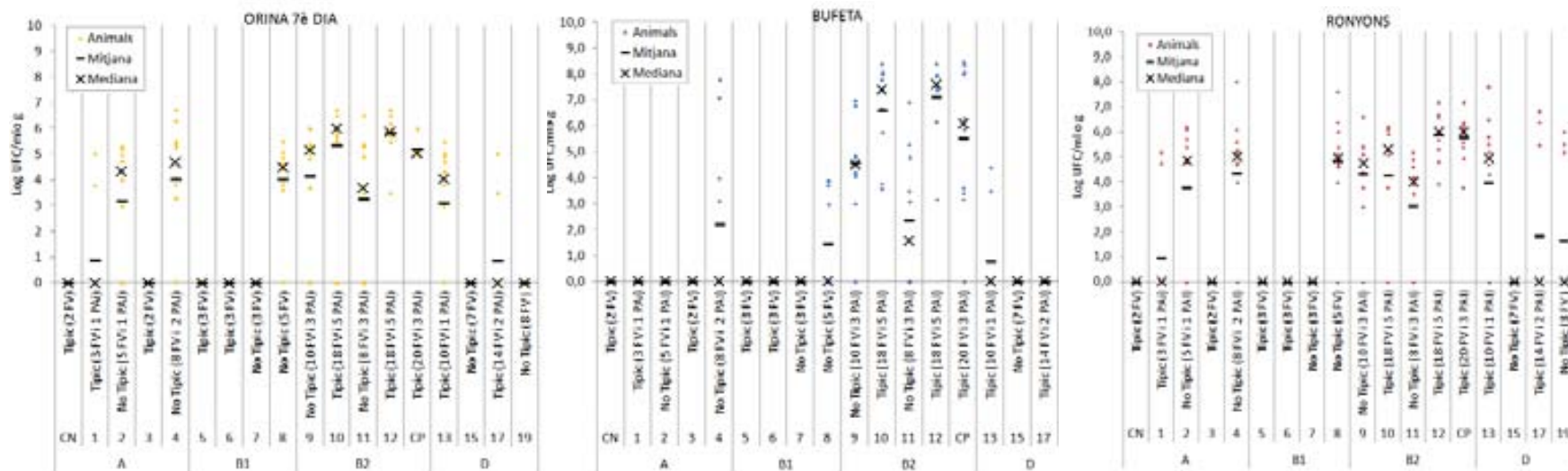


Taula 55. Anàlisi microbiològic de les mostres d'orina, bufeta i ronyons, i comparació amb l'anàlisi histològic de bufeta i ronyons.

Soca	ID	Virulència**			Cultiu microbiològic 7è dia (Log UFC/ml o g)*						Anàlisi histològic 7è dia*			
		GF	FV	Perfil	Orina		Bufeta		Ronyons		Bufeta		Ronyons	
					Cultiu	Puntuació	Cultiu	Puntuació	Cultiu	Puntuació	Lesió***	Puntuació	Lesió***	Puntuació
CN	14318-K12	A	2	Típic	0/5	0,0	0/5	0,0	0/5	0,0	0/5	0,0	0/5	0,0
1	14329	A	3	Típic	2/10	0,2	0/10	0,0	2/10	0,2	0/5	0,0	2/5 (2, 3)	0,4
2	14333	A	5	↑	7/10	0,7	0/10	0,0	7/10	0,7	0/5	0,0	2/5 (2, 1)	0,4
3	14326	A	2	Típic	1/10	0,1	0/10	0,0	0/10	0,0	0/5	0,0	0/5	0,0
4	14324	A	8	↑	8/10	0,8	4/10	0,4	8/10	0,8	(4, 3, 1)	0,6	(4, 1, 2)	0,6
5	14334	B1	3	Típic	0/10	0,0	0/10	0,0	0/10	0,0	0/5	0,0	0/5	0,0
6	14321	B1	3	Típic	0/10	0,0	0/10	0,0	0/10	0,0	0/5	0,0	0/5	0,0
7	14328	B1	3	↑↑	0/10	0,0	0/10	0,0	0/10	0,0	0/5	0,0	0/5	0,0
8	14325	B1	5	↑↑	9/10	0,9	4/10	0,4	9/10	0,9	0/5	0,0	4/5 (1, 2, 2, 1)	0,8
9	14331	B2	10	↓	8/10	0,8	9/10	0,9	9/10	0,9	4/5 (2, 1, 1, 1)	0,8	5/5 (3, 2, 1, 1, 2)	1,0
10	14330	B2	18	Típic	8/9	0,9	9/9	1,0	7/9	0,8	4/5 (2, 1, 2, 2)	0,8	4/5 (1, 2, 2, 2)	0,8
11	14322	B2	8	↓	6/9	0,7	5/10	0,5	7/10	0,7	2/5 (1, 4)	0,4	2/5 (3, 4)	0,4
12	14323	B2	18	Típic	10/10	1,0	10/10	1,0	10/10	1,0	5/5 (3, 4, 3, 2, 3)	1,0	4/5 (3, 2, 3, 4)	0,8
13	14332	D	10	Típic	7/10	0,7	2/10	0,2	7/10	0,7	2/5 (1, 1)	0,4	5/5 (2, 1, 2, 1, 1)	1,0
15	14327	D	7	↓	0/9	0,0	0/10	0,0	0/10	0,0	0/5	0,0	0/5	0,0
17	14319	D	14	Típic	1/10	0,1	0/10	0,0	3/10	0,3	0/5	0,0	3/5 (1, 1, 1)	0,6
19	14320	D	8	↓	0/10	0,0	0/10	0,0	3/10	0,3	0/5	0,0	3/5 (1, 1, 1)	0,6
CP	14335-CFT073	B2	20	Típic	6/6	1,0	9/10	0,9	10/10	1,0	5/5 (3, 4, 4, 3, 3)	1,0	5/5 (3, 3, 4, 3)	1,0

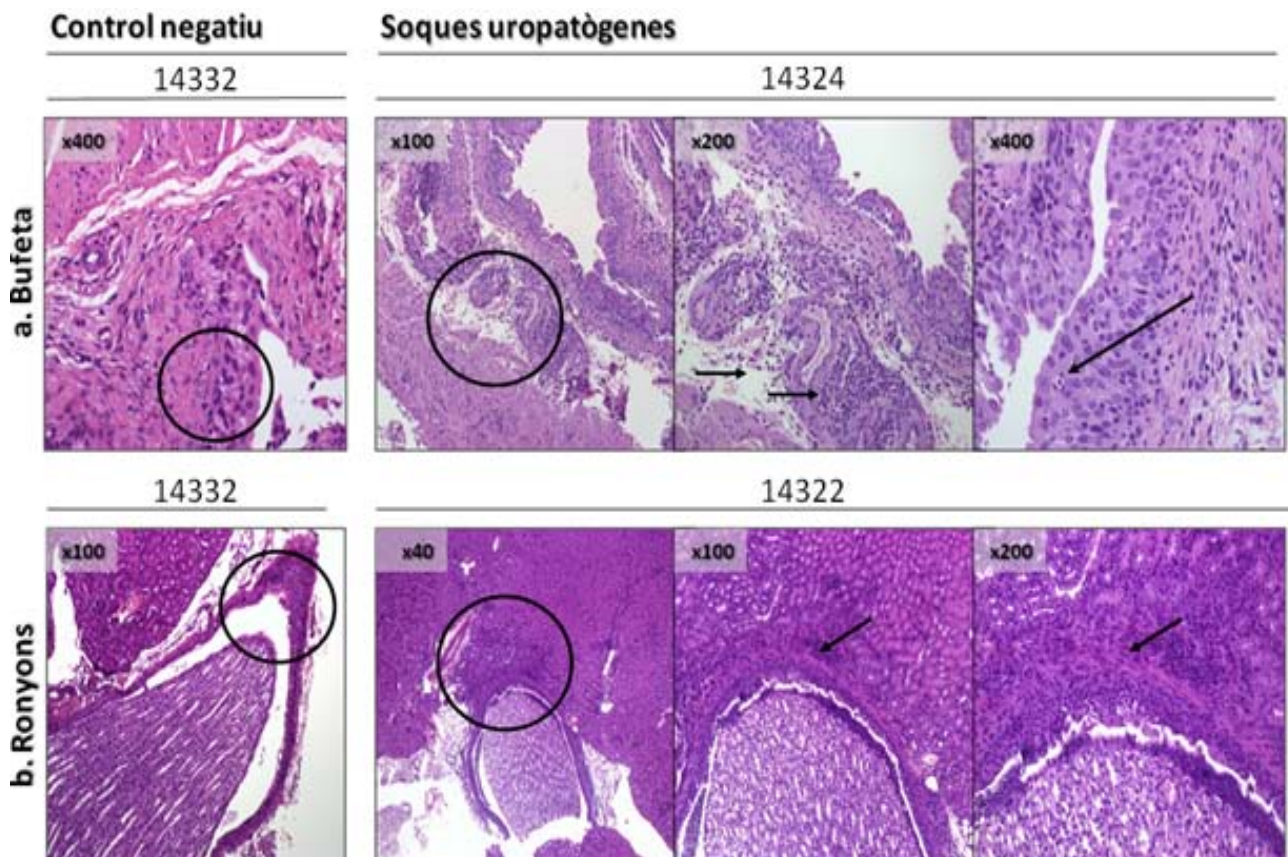
*Cultiu o lesió: nombre d'animals analitzats amb la característica estudiada positiva el numerador/nombre d'animals totals analitzats per a la categoria al denominador.
 puntuació: valoració numèrica en una escala de 0,0 a 1,0; on la màxima puntuació per la categoria és 1, i DE: desviació estàndard.
 ** Perfil: Típic (nombre de factors de virulència (FV) pel grup filogenètic (GF)), ↑: increment en el nombre de FV segons el GF i ↓: disminució del nombre de FV segons el GF
 *** Lesió histopatològica: els nombre que apareixen entre parèntesi representen els diferents graus de lesió segons l'escala de classificació del grau d'inflamació (taula 36)

Figura 45. Recòmptes bacterians d'orina, de bufeta i de ronyons de cadascun dels grups de 10 ratolins inoculats per a cada soca.



Els estudis histològics van demostrar signes d'inflamació en bufetes i ronyons (figures 44, 46 i taula 56); dels 160 animals que es van estudiar, 20 (25%) tenien cistitis i 37 (46.2%) pielonefritis, mentre que en 103 (64,4%) no van revelar canvis histològics en cap dels dos òrgans i per tant s'han puntuat com a 0 corresponent a normal de l'escala de valoració (taula 36). D'aquestes mostres disseccionades i analitzades histològicament (80 bufetes i 80 ronyons) i sense tenir en compte els controls de procediment, que van tenir 100% de correlació entre el resultat microbiològic i l'histològic, la majoria (90%) dels teixits amb cultiu microbiològic positiu per a *E. coli* mostraven correlació total amb els resultats histològics, a excepció d'una única soca (14335) del GF B1 que tenia 2 bufetes d'animals amb cultiu positiu però cap d'elles va revelar alteracions histològiques, encara que les preparació es van reorientar i profunditzar.

Figura 46. Tinció de hematoxilina-eosina de mostres positives i negatives per a cistitis i pielonefritis. **Control negatiu (14332):** a. Bufeta: es veu tant el uroteli preservat (cercle), com la làmina pròpia sense edema amb els seus vasos i una mica de la capa muscular. b. Ronyó: a aquest augment es veu pelvis amb uroteli medul·lar (cercle), i una mica de cortical sense evidència d'infiltrat inflamatori. **Soques uropatògenes:** a. Bufeta (14324): a x100 i x200, es veu com es va eixamplant la làmina pròpia per edema i infiltrat inflamatori perivascular (cercle i fletxes curtes). A x400 s'observen PMN intraepiteliais (fletxa llarga). b. Ronyó (14322): A x40 s'intueix un augment de la cel·lularitat a la zona de coloració més fosca (cercle), el que tradueix és un augment de nuclis basòfils, en aquest cas de cel·lularitat inflamatòria PMN, i a mesura que es baixen els augments, veiem que afecta uroteli i escorça (fletxes).



Taula 56. Proporció de ratolins amb canvis histològics després dels assajos de virulència.

Soca	ID	Característiques							Anàlisi histològic 7è dia*										
		Epidemiològiques	Filogenètiques			Virulència				Bufeta					Ronyons				
			Serotipus	GF	PAI	FV	ExPEC	Perfil	Lesió	Puntuació	Mitjana	Mediana	DE	Lesió	Puntuació	Mitjana	Mediana	DE	
CN	14318-K12	Soca laboratori	O16:H48:K-	A	0	2	NO (0)	Típic	0/5	0,0	0,0	0,0	0,0	0/5	0,0	0,0	0,0	0,0	
1	14329	Cistitis	ONT:H19	A	1	3	NO (0)	Típic	0/5	0,0	0,0	0,0	0,0	2/5	0,4	1,0	0,0	2,1	
2	14333	Cistitis	O5:H17	A	1	5	SI (2)	Elevat nombre de FV	0/5	0,0	0,0	0,0	0,0	2/5	0,4	0,5	0,0	1,0	
3	14326	Fecal	O66:H25	A	0	2	NO (0)	Típic	0/5	0,0	0,0	0,0	0,0	0/5	0,0	0,0	0,0	0,0	
4	14324	Fecal	O86:H2	A	2	8	SI (2)	Elevat nombre de FV	3/5	0,6	1,0	0,5	1,4	3/5	0,6	1,4	1,0	1,7	
5	14334	Cistitis	ONT:H1	B1	0	3	NO (0)	Típic	0/5	0,0	0,0	0,0	0,0	0/5	0,0	0,0	0,0	0,0	
6	14321	Cistitis	ONT:H42	B1	0	3	NO (0)	Típic	0/5	0,0	0,0	0,0	0,0	0/5	0,0	0,0	0,0	0,0	
7	14328	Fecal	O177:H2	B1	0	3	NO (0)	Elevat nombre de FV	0/5	0,0	0,0	0,0	0,0	0/5	0,0	0,0	0,0	0,0	
8	14325	Fecal	ONT:H21	B1	0	5	NO (1)	Elevat nombre de FV	0/5	0,0	0,0	0,0	0,0	4/5	0,8	1,2	1,0	0,8	
9	14331	Cistitis	O131:HNT	B2	3	10	NO (0)	Baix nombre de FV	4/5	0,8	1,0	1,0	0,7	5/5	1,0	1,8	2,0	0,8	
10	14330	Cistitis	ONT:H42	B2	5	18	SI (3)	Típic	4/5	0,8	1,4	2,0	0,9	4/5	0,8	1,3	1,5	1,0	
11	14322	Fecal	O44:HNT	B2	3	8	NO (2)	Baix nombre de FV	2/5	0,4	1,0	0,0	1,7	2/5	0,4	1,4	0,0	1,9	
12	14323	Fecal	O177:H-	B2	5	18	SI (3)	Típic	5/5	1,0	3,0	3,0	0,8	4/5	0,8	2,4	3,0	1,5	
13	14332	Cistitis	ONT:H-	D	1	10	SI (3)	Típic	2/5	0,4	0,4	0,0	0,5	5/5	1,0	1,4	1,0	0,5	
15	14327	Cistitis	O77:H18	D	0	7	SI (2)	Baix nombre de FV	0/5	0,0	0,0	0,0	0,0	0/5	0,0	0,0	0,0	0,0	
17	14319	Fecal	O1:H-	D	2	14	SI (3)	Típic	0/5	0,0	0,0	0,0	0,0	3/5	0,6	0,6	1,0	0,5	
19	14320	Fecal	O169:H9	D	0	8	NO (1)	Baix nombre de FV	0/5	0,0	0,0	0,0	0,0	3/5	0,6	0,6	1,0	0,5	
CP	14335-CFT073	Pielonefritis	O6:H1:K2	B2	3	20	SI (4)	Típic	5/5	1,0	3,4	3,0	0,5	5/5	1,0	3,2	3,0	0,4	

*Lesió: nombre d'animals analitzats amb la característica estudiada positiva al numerador/nombre de animals totals analitzats per a la categoria al denominador, puntuació: valoració numèrica en una escala de 0,0 a 1,0, on la màxima puntuació per la categoria és 1 i DE: desviació estàndard.

V. Discussió

La principal dificultat en l'apreciació de la virulència intrínseca d'un determinat bacterià és sense cap dubte el desconeixement de la interrelació de cada un dels FV en l'acció patògena. De fet, la recerca directa de determinants de virulència es veu òbviament limitada als factors actualment coneguts, i no identifica factors de virulència desconeguts fins ara. La diversitat de factors de virulència coneguts i putatius, i els solapaments dels FV entre diferents patotipus fa difícil atribuir la virulència de soques d'*E. coli* a un únic conjunt de factors.

S'ha demostrat que l'estat de l'hoste pot ser crític per al desenvolupament d'una infecció, independent de la presència o absència de FV o de factors predisponents, i addicionalment altres paràmetres relacionats amb l'inòcul bacterià poden influir en el curs d'una infecció. Per tant, la caracterització de virulenta o no virulenta d'una soca no pot deduir-se de les circumstàncies en què es va aïllar la soca (comensal o patògena), sinó de múltiples factors correlacionats directa o indirectament els uns amb els altres.

L'avaluació de les soques d'*E. coli* involucrades en infeccions extraintestinals segueix sent poc aclaridora, encara que alguns autors apunten al fet que l'aparició d'aquests clons virulents es deu a l'acumulació de FV dins de filogrupos específics. Els grups clonals ExPEC deriven principalment dels grups filogenètics B2 i en menor mesura del D, i expliquen en certa manera la predominança dels grups B2 i D entre els aïllats clínics. Molts dels tradicionals FV extraintestinals reconeguts (*pap*, *sfa/foc*, *hly* i *kps*) estan concentrats en aquests grups.

Es així com dins de l'espècie d'*E. coli*, el GF B2 divergeix clarament en el potencial virulent respecte als altres GF segurament gràcies a la divergència genètica originada per la transferència de gens^{4, 10, 68}; aquesta hipòtesi explicaria la concentració selectiva de gens de virulència en el filogrup B2. També s'ha suggerit que una transferència horitzontal d'aquests mateixos FV cap a soques comensals podria convertir aquelles soques en potencialment patògenes⁹. D'aquesta manera en algunes series publicades, el GF B2 és el filogrup predominant entre les soques fecals (taula 13). Dins d'aquest context es veu clarament reflectida la diversitat d'infeccions extraintestinals en les quals es veu implicat aquest filogrup. La relació observada entre la virulència i la filogènia podria correspondre a la necessitat de determinants de virulència en un fons genètic que és adequat per al sorgiment d'un clon virulent, una expressió de la interdependència de patogenicitat i les activitats metabòliques en els bacteris patògens.

Seguint en aquesta línia, el treball desenvolupat per a l'estudi específic de PAI en la col·lecció de 111 soques d'*E. coli* aïllades simultàniament del tracte intestinal i de l'orina de dones amb infecció urinària no complicada va revelar que les soques aïllades d'orina i en concret les dels GF B2 i D tenen més risc de posseir més nombre de PAI en comparació a les d'origen fecal. De la mateixa manera que es va demostrar que la combinació de PAI aïllades suggereixen que l'adquisició d'aquestes no es produeix de manera aleatòria, sinó d'una manera seqüencial tal i com va descriure prèviament Sabaté *et al.*, 2006¹³⁶.

En relació amb determinació de la virulència intrínseca *in vitro* amb la finalitat de caracteritzar el potencial virulent de les 20 soques inoculades als models experimentals murins es va descriure que els GF B2 i D, tal i com descriu la literatura, presenten una elevada càrrega de FV (Me=14 i 10 FV, respectivament), en comparació a la dels GF A o B1 (Me=4 i 3 FV, respectivament). Destaca l'elevada presència de sistemes quelants de ferro, fimbries P, *ibeA*, *usp* o PAI_{ICFT073} principalment o únicament en els GF B2 i D. Per altra banda, la presència de càpsula es veu limitada als GF A, B2 i D i particularment l'associació del GF A a la càpsula tipus K2, mentre que GF B2 tant a les tipus K1 com a K2, i finalment el GF D presenta càpsules tant de tipus II com III, encara que aquesta última únicament en un aïllat. Pel que fa referència a les α -hemolisines (*hly*) i el factor citotòxic necrosant (CNF) únicament es van detectar en els aïllats del GF B2, mentre que les toxines associades a soques patògenes intestinals d'*E. coli* (IPEC) es van associar als GF: D (*astA* o *sat*), B1 (*tsh*), B2 (*vat*) o A i B2 (*pic*).

Per aclarir aquesta correlació entre el GF i els FV no precisats amb certesa, aquest treball experimental presenta els aspectes tècnics, així com l'evidència que el ratolí és un bon model per a valorar la virulència extraintestinal de soques d'*E. coli*, ja que permet la classificació de nivells de virulència a nivell d'infecció sistèmica en grau de letalitat o d'IU i els seus diferents nivells d'afectació de sistema urinari. Per aquest motiu s'han desenvolupat dos models murins per a avaluar la virulència intrínseca extraintestinal i la capacitat per a causar infecció de les vies urinàries per part de soques d'*E. coli*, sota condicions normalitzades (taula 57). Utilitzant aquests models d'experimentació animal es va determinar la letalitat i capacitat uropatògena d'una sèrie de 20 soques humanes d'*E. coli* aïllades de femta i de cistitis no complicades, inoculades en ratolins CBA/J de 7-9 setmanes d'edat.

Aquest tipus de treballs proporcionen una visió general de la virulència extraintestinal en *E. coli* mitjançant la combinació de dades sobre soques fecals i patògenes en relació amb la virulència extraintestinal o específica de les vies urinàries en models murins estandarditzats; la relació amb la presència o absència de diversos determinants de virulència coneguts; i principalment els GF de l'espècie descrits.

1. Model murí d'infecció sistèmica per inoculació via subcutània

Aquest primer model d'infecció sistèmica s'estandarditza per a valorar la capacitat patògena d'aquelles soques d'*E. coli* que ja han traspassat les barreres primàries de defensa de l'hoste, fet que té un elevat impacte actualment a l'àmbit sanitari en qüestions de morbiditat i mortalitat. Una vegada la soca d'*E. coli* s'allotja dins de l'hoste ha de resistir un elevat nombre d'activitats de defensa secundària de l'hoste, però si és capaç de guanyar satisfactòriament la batalla es disseminarà de manera efectiva per tot el organisme, a través de la sang, i causarà en primera instància quadres de bacterièmia i posteriorment, si no s'apliquen les teràpies antimicrobianes oportunes, s'ocasiona la sèpsia.

El model de septicèmia serveix per a determinar la proporció de ratolins que poden morir durant els set dies d'experimentació, producte d'una infecció generalitzada en termes de letalitat. Es considera un model amb moltes avantatges, tant metodològiques com d'anàlisi de dades, ja que la inoculació és molt senzilla i ràpida; de la mateixa manera que el seguiment dels animals durant el temps d'experimentació. Pel que respecte al processament de mostres, tampoc genera massa complicacions i pel contrari permet obtenir resultats clars i de fàcil interpretació, amb excel·lents nivells de reproductibilitat i molt poca variabilitat entre grups d'inoculació.

Amb aquest model es va poder determinar la letalitat en set (35%) de les soques provades; d'aquestes, cinc van causar letalitat clara (90-100%), dues més van causar letalitat intermèdia (60% i 50%) i les 13 restants no van ser letals per a cap dels ratolins inoculats. Gràcies a aquests resultats es pot classificar una soca amb capacitat o no de causar la mort de l'animal per la seva acció letal.

Després d'aquesta anàlisi es pot considerar que el model d'infecció sistèmica per inoculació via subcutània està estandarditzat amb inòculs de soques d'*E. coli* corresponents a 10^7 UFC per cada 200 μ l de suspensió bacteriana inoculades. De la mateixa manera, es va poder avaluar el potencial virulent i diferents graus de letalitat de

Taula 57. Comparació dels paràmetres tècnics dels dos models animals estandarditzats.

Variable analitzada	Model d'experimentació animal		
	Septicèmia	Infecció urinària ascendent	
Animal utilitzat	Espècie	Ratolí	Ratolí
	Estirp	CBA/J	CBA/J
	Sexe	Femelles	Femelles
	Edat	7 setmanes	9 setmanes
	Pes	17-22 grams	19-24 grams
	n per grup	10 animals	10 animals
Inòcul	Medi de cultiu	LB	LB
	Temps de preparació	2 dies	4 dies
	Vehicle	Ringer 0,9%	PBS (pH 7,4)
	Concentració (UFC)	10 ⁷ UFC	10 ⁷ UFC
	Volum (µl)	200 µl	50 µl
	Solució contrast	No	Si (<i>Chicago Sky Blue</i> 0,05%)
Típus d'inoculació	Via	Subcutània	Transuretral no obstructiva
	Sistema	Manual	Manual
	Instrument	Xeringa d'1 ml amb agulla adaptable de 25G	Catèter casolà adaptat a xeringa de 0,05 ml amb agulla incorporada de 30G
	Lubricació	No	Si (lubricant urològic)
	Anestèsia	No	Si (Inhalatòria amb Isoflurà)
	Neteja de punt d'inoculació en animal	No necessària	Si (1r amb povidona iodada al 10% seguida de PBS estèril)
Seguiment del model	Dificultat de la maniobra d'inoculació	Cap	Elevada (cal perícia de l'investigador)
	Necessitat de control de procediment	Si (únicament de vehicle d'inoculació)	Si (de vehicle d'inoculació i de reflux vesicouretral)
	Recuperació animal postinoculació	No necessària	Si (sota llum vermella fins a recuperar consciència)
	Duració	7 dies	7 dies
	Supervisió individualitzada	Si (cada hora durant les primeres 6h, a les 18h i 24h; posteriorment dues vegades al dia	Si (cada hora durant les primeres 6h, a les 18h i 24h; posteriorment una vegades al dia
	Determinació de pesatge	Cada dia	Inici i final d'experiment
Anàlisi de dades	Aplicació de criteris de punt final	Si (depenent de l'evolució de la infecció)	No
	Mostres biològiques	Sang, fetge, melsa i ronyons	Orina, sang, bufeta i ronyons
	Àrees del coneixement participants	Microbiologia i estadística	Microbiologia, histopatologia i estadística
Interpretació de dades	Fàcil	Difícil (necessita correlació de les diferents anàlisis)	

20 soques clíniques que permeten fer una aproximació a la patogènia d'aquestes soques si arribessin a traspassar les barreres cutànies de l'hoste, sense oblidar que van ser soques aïllades de cistitis no complicades i de les femtes de les mateixes dones.

A la taula 57 es poden visualitzar les diferents variables tècniques involucrades en l'estandardització d'aquest model durant el desenvolupament d'aquest treball, així com algunes apreciacions particulars de la tècnica.

2. Model murí d'infecció urinària ascendent per inoculació via transuretral

Al segon model experimental, per a l'estudi de la infecció urinària es va seleccionar el ratolí per la semblança i l'especificitat d'unió que tenen aquests animals amb l'uroepiteli humà, durant el procés infectiu ascendent de soques UPEC. La majoria de soques d'*E. coli* amb capacitat de causar IU s'adhereixen a les cèl·lules uroepiteliales tant humanes com de ratolí per la unió específica als receptors de glicolípid o de manosa¹⁴⁰. Aquesta especificitat ratolí-humà, no és compartida per altres rosegadors de major grandària com rates, cobaies o conills; que farien més senzills el procés de cateterització uretral si es poguessin utilitzar gràcies a la major grandària en comparació amb el ratolí.

Aquest model de ratolí per a determinar la capacitat d'IUA va ser desenvolupat per a estudiar els mecanismes de virulència de soques UPEC. El model va ser dissenyat específicament per a l'estudi dels esdeveniments en el procés d'IUA que afecten epiteli intravesical (bufeta), renal (ronyons) o hematogen. L'eliminació bacteriana evidenciada en cadascun d'aquests punts concrets, pot ser deguda com a resultat de l'excreció o també com a un signe de fagocitosi; per contra els bacteris no reconeguts pels sistemes de defensa immunològics de l'hoste, reflectirien els bacteris que poden persistir al sistema urinari. Aquests aspectes del model suggereixen la seva utilitat en l'estudi dels esdeveniments patògens després de l'establiment bacterià inicial.

Els resultats suggereixen que el model experimental en ratolí d'IU pot diferenciar entre les soques que són més o menys virulents per al sistema urinari humà. Així, les soques que causen cistitis humanes sovint posseeixen uns determinants virulents com certs tipus de lipopolisacàrid i polisacàrid capsular, proteïnes que permeten resistència a l'efecte bactericida del sèrum, producció d'hemolisines, i adhesió a cèl·lules uroepiteliales.

La complexitat d'aquest model animal es deu a molts factors que influeixen en la variabilitat dels resultats. Aquests factors es poden englobar en efectes d'inòcul o d'inoculació, establiment de la infecció en cada animal o expressió real de factors de virulència.

El primer d'aquests factors de complexitat engloba tots els aspectes relacionats amb l'inòcul, ja que és un dels aspectes més rellevants que poden generar dificultat en la instauració del model. És de vital importància ajustar la concentració òptima de l'inòcul en relació amb la DO i correlacionar-la amb el recompte en placa de cèl·lules viables; per aquest motiu s'ha de prestar especial atenció a la normalització de les DO i els corresponents recomptes en placa fins aconseguir els rangs de DO que permetin una concentració de 10^7 UFC per cada 50 μ l de suspensió bacteriana inoculada. A més, s'ha de precisar que una vegada inoculada aquesta suspensió pot ser ràpidament reduïda durant la primera micció de l'animal. I per tal motiu no es pot preveure si els bacteris detectats després del sacrifici són els que queden després de l'excreció gradual o són els descendents d'uns pocs supervivents i les subseqüents divisions de cèl·lules bacterianes.

Igual que en els éssers humans, l'ascens dels bacteris de la bufeta al ronyó està facilitada pel reflux vesicoureteral (RVU). El grau de RVU i la seva contribució a la propagació de bacteris al ronyó es va avaluar en dos passos: i) els bacteris diluïts en PBS més CSB es van injectar per via transuretral a cada grup d'inoculació i un animal per grup va servir com a control de RVU. Immediatament després del sacrifici, es va observar la tinció de bufeta amb CBS, la possibilitat d'aparició de color blau del CSB en els urèters i el recompte de cèl·lules viables es van realitzar a l'homogeneïtzat de ronyons (figura 28). Aquest RVU podria ser provocat mitjançant l'augment de volum o de pressió durant el procés d'inoculació. Una variable de gravetat en les infeccions renals podria explicar la variació en les recuperacions bacterianes dels ronyons de diferents animals, però no la diferència en la persistència de soques bacterianes en animals individualitzats.

Encara que alguns treballs assenyalen l'efecte que pot tenir la inoculació de volums entre 10-50 μ l de suspensió bacteriana dins de la bufeta en la producció del RVU en aproximadament el 30% de les soques inoculades amb les conseqüents infeccions renals^{138, 139}, la gran majoria d'autors (taula 15) utilitzen volums de 50 μ l, i en menor quantitat volums de 25 μ l o 1 μ l de suspensió bacteriana per cada gram de pes corporal de ratolí inoculat, sense evidències de causar RVU.

De la mateixa manera, l'efecte de l'inòcul també pot dependre de la pressió durant d'instil·lació de la suspensió bacteriana. La majoria d'estudis (taula 15) realitzen una perfusió manual amb xeringa amb un temps d'inoculació de $10 \mu\text{l s}^{-1}$. Tot i així, una minoria d'autors utilitzen un sistema automàtic de bomba de perfusió amb instil·lacions durant 30 segons, assegurant que disminueixen els percentatges de RVU; ja que la pressió exercida durant la inoculació és constant, cosa que no es pot assegurar durant la inoculació manual. Independentment de la utilització d'un o un altre mètode d'instil·lació, sembla ser que és més important el volum d'inòcul i no la manera de perfusió. Tot i així, els resultats presentats en aquest treball experimental no permeten fer comparació entre tot dos sistemes, ja que únicament es va optar per les instil·lacions manuals.

En els nostres experiments i segons el perfil virulent, un 12.5% de les 16 soques inoculades va causar pielonefritis com a resultat secundari de RVU (20 i 70% dels animals inoculats amb dues soques del GF A). Aquesta conclusió es fonamenta en el fet que són dues soques sense gens que codifiquen adhesines, i per tant factors que potenciïn la capacitat virulenta per ascendir des de la bufeta als ronyons. Per a contrarestar aquestes troballes es demostra la falta de capacitat uropatògena a nivell de bufeta i de ronyó en soques de tots els GF a excepció del GF B2. D'aquesta manera, es presenta un model animal vàlid totalment per a valorar la capacitat uropatògena de soques UPEC i els possibles problemes de RVU que es poden observar en la instauració d'IU.

Es consideren soques amb èxit d'IUA aquelles que van demostrar diversos signes coneguts d'IU com per exemple de lesió epitelial (hematúria) o inflamació (leucocitúria); aquesta última confirmada per les anàlisis histopatològiques tant de ronyó com de bufeta, mitjançant l'activació de mecanismes de defensa de l'hoste en el teixit, que es va demostrar per l'acumulació de cèl·lules inflamatòries.

La soca control negatiu de procediment (*E. coli* K-12) aporta un resultat correctament negatiu en tots els casos avaluats, mentre que la soca control positiu de procediment (*E. coli* CFT073) demostra la seva capacitat uropatògena al mantenir-se a l'orina durant els 7 dies de l'experiment i produint cistitis i pielonefritis.

Les soques núm. 1 i 2 (14329 i 14333, respectivament) són dues soques del GF A en les quals hi ha discrepància dels resultats, ja que els animals inoculats no evidencien cistitis, però sí presenten bacteriúries i pielonefritis en el 20-70% dels animals avaluats. Aquests comportaments podrien ser suggestius de casos de RVU, bàsicament perquè la soca núm. 1

no té un perfil virulent característic de potencial uropatogen, i la segona encara que al seu GF posseeix un elevat nombre de FV, cap d'ells li facilitaria l'adhesió a l'uroepiteli; encara que sí s'ha de destacar la presència de tres sistemes de captació de ferro, càpsula de tipus II i un gen de resistència al sèrum com a factors de virulència presents en aquesta última soca.

La soca núm. 3 (14326) del GF A revela leucocitúria i proteïnúria, però aporta tots els resultats negatius tant per als cultiu com per a l'anàlisi histopatològica; s'ha de precisar la presència d'un únic animal dels 10 inoculats amb cistitis però sense bacteriúria.

La soca núm. 4 (14324) del GF A es presenta com una soca amb elevat potencial patogen per a les vies urinàries, ja que presenta cinc FV, i és capaç de causar bacteriúria i pielonefritis en la majoria d'animals; encara que el desenvolupament de cistitis al 7è dia no arriba a la meitat del animals inoculats. Aquest comportament indicaria la multiplicació bacteriana als ronyons, la posterior acumulació dels bacteris a l'orina, i una adhesió dèbil facilitada per l' adhesina no hemaglutinina amb doble funció en la patogènesis de la IU.

Les soques núm. 5, 6 i 7 (14334, 14321 i 14328, respectivament) del GF B1 no van ser capaces de causar infecció en cap dels ratolins avaluats, a causa degut principalment del perfil típic virulent compost bàsicament de fimbries tipus 1, encara que la soca n. 7 (14328) va ser classificada amb un perfil atípic per posseir una toxina d'origen en soques APEC, que es relaciona en major proporció amb infeccions intraabdominals en humans i aus.

La soca núm. 8 (14325) del GF B1 es va catalogada amb un perfil atípic per codificar cinc factors de virulència entre ells fimbries tipus 1, dos sistemes de captura de ferro, un sistema d'evasió del sèrum i una aglutinina resistent a la calor (Hra). Va ser capaç de causar bacteriúria i pielonefritis però cistitis irregulars al 7è dia entre els animals inoculats. De la mateixa manera que la soca núm. 4 (14324) el potencial virulent li permet multiplicar-se als ronyons i acumular-se a la bufeta, però no adherir-se amb propietat a la bufeta per l'absència de fimbries a excepció de Hra.

Les soques núm. 9, 10, 11 i 12 (14331, 14330, 14322 i 14323, respectivament) del GF B2 van revelar un elevat grau de potencial uropatogen, ja que van ser capaces de causar pielonefritis, cistitis, i bacteriúries fins el 7è dia de l'experiment. Aquest comportament es deu a la presència de múltiples FV (més de 8) amb implicacions dins de la patogènesi del

sistema urinari. Així mateix, és remarcable que les soques classificades amb pocs FV núm. 9 i 11, van tenir comportament amb igual o major virulència que les soques núm. 10 i 12 amb perfils típics.

De la mateixa manera que en el model d'infecció sistèmica, les soques del GF D van tenir comportaments inesperats; ja que en una primera mesura les soques núm. 17 i 19 (14319 i 14320, respectivament) a pesar del seu perfil virulent no van ocasionar cistitis, i únicament van ser capaces de causar pielonefritis amb percentatges molt baixos i presència en un únic animal de bacteris en l'orina del 7è dia (núm. 17). A causa del perfil virulent d'aquestes soques, no es creu possible la presència de RVU en als animals amb recomptes microbiològics i histològics positius, encara que no es pot assegurar al 100% aquesta teoria, i per tant serien soques susceptibles de tornar a inocular, però recordant que aquest GF segons els nostres resultats del model d'infecció sistèmica no té un comportament definit com a soques clarament patògenes.

Per la seva banda la soca núm. 13 (14332) del GF D demostra la capacitat uropatògena per causar bacteriúries i pielonefritis en la majoria d'animals, però amb pocs casos de cistitis, fet que podria indicar el mateix comportament de les soques núm. 4 i 8, encara que en aquest cas particular la dotació de FV sí inclou adhesines tipus Pap i Iha.

Finalment la soca núm. 15 (14327) del GF D tal com les soques núm. 3, 5, 6 i 7, no va ser capaç de provocar infecció de vies urinàries a cap nivell tot i la presència de les fimbries Pap que li haurien de facilitar l'adhesió a l'uroepiteli.

Cap de les soques estudiades, ni els controls ni les soques clíniques, van causar disseminació hematògena d'origen renal, ja que els cultius de sang sempre es van mantenir estèrils en la totalitat d'animals inoculats.

Després d'aquesta anàlisi es pot considerar que el model d'infecció urinària ascendent per inoculació manual via transuretral està estandarditzat amb inòculs de soques d'*E. coli* corresponents a 10^7 UFC per cada 50 µl de suspensió bacteriana inoculades amb 0.05% de CSB per a la prevenció de RVU. De la mateixa manera es va poder avaluar el potencial virulent amb diferents graus d'afectació de 16 soques clíniques que permeten fer una aproximació a la patogènia d'aquestes soques dins del sistema urinari humà o van ser aïllades com a agents causants de cistitis no complicada o del tracte digestiu de les dones afectades per les IU.

A la taula 57 es mostren comparativament les diferents variables tècniques involucrades en l'estandardització dels dos models desenvolupats en aquest treball, així com algunes apreciacions particulars de la tècnica.

3. Correlació entre el resultats dels model de septicèmia i d'infecció urinària ascendent

Els resultats del potencial virulent de les soques d'*E. coli* inoculades en els dos models experimentals murins (taula 58) demostra que no es poden extrapolar les dades de letalitat a la capacitat patògena d'una mateixa soca d'actuar en les vies urinàries o viceversa.

Del total de 16 soques inoculades als dos models, únicament aquelles del GF B2 i una del GF A (núm. 4/14324) van produir paral·lelament letalitat en el model de septicèmia i infecció urinària (cistitis i pielonefritis) en el model d'infecció urinària ascendent. Mentre que dues soques més (núm. 8 i 13) la primera del GF B1 i l'altre del GF D (14325 i 14332, respectivament), no van produir infecció als animals inoculats per via subcutània, però sí que ho van fer al fer-lo transuretralment. Per altra banda, la soca del GF A (núm. 2/14333) va presentar una letalitat contundent en la valoració de sèpsia, i al model d'IUA encara que va causar pielonefritis i bacteriúria en el 70% d'animals; pel fet que no tingui capacitat d'adhesió per l'absència de FV conegut i identificats mitjançant PCR per aquest fet, s'assumeix que pot ser una de les soques susceptibles a ser considerades com un dels casos de RVU. Finalment les soques núm. 15,17 i 19 (14327, 14319 i 14320, respectivament) semblen no tenir capacitat ni per via sistèmica ni per via urinària ascendent.

Taula 58. Comparació del potencial patògen de les soques d'*E. coli* en els dos models experimentals murins.

Soques d' <i>E. coli</i>	ID	Nº total de PAI	Nº total de FV*	GF	Perfil de virulència**	Origen	Experiments de virulència <i>in vivo</i> ***	Model experimental murí					
								Sèpticèmia		Infecció urinària ascendent %			
								Letalitat	%	Interpretació	Bacteriúria	Cistitis	Pielonefritis
Control negatiu (CN)	14318-K12	0	2	A	Típic	Soca laboratori	Septicèmia i IUA	No letal	0	No UPEC	0	0	0
1	14329	1	3	A	Típic	Cistitis	Septicèmia i IUA	No letal	0	RVU	20	0	20
2	14333	1	5	A	Elevat nombre de FV	Cistitis	Septicèmia i IUA	Letal	100	RVU?	70	0	70
3	14326	0	2	A	Típic	Fecal	Septicèmia i IUA	No letal	0	No UPEC	0	10	0
4	14324	2	8	A	Elevat nombre de FV	Fecal	Septicèmia i IUA	Letal intermedi	50	UPEC	80	40	80
5	14334	0	3	B1	Típic	Cistitis	Septicèmia i IUA	No letal	0	No UPEC	0	0	0
6	14321	0	3	B1	Típic	Cistitis	Septicèmia i IUA	No letal	0	No UPEC	0	0	0
7	14328	0	3	B1	Elevat nombre de FV	Fecal	Septicèmia i IUA	No letal	0	No UPEC	0	0	0
8	14325	0	5	B1	Elevat nombre de FV	Fecal	Septicèmia i IUA	No letal	0	UPEC	90	40	90
9	14331	3	10	B2	Baix nombre de FV	Cistitis	Septicèmia i IUA	Letal	100	UPEC	80	90	90
10	14330	5	18	B2	Típic	Cistitis	Septicèmia i IUA	Letal	100	UPEC	90	100	80
11	14322	3	8	B2	Baix nombre de FV	Fecal	Septicèmia i IUA	Letal	90	UPEC	70	50	70
12	14323	5	18	B2	Típic	Fecal	Septicèmia i IUA	Letal	100	UPEC	100	100	100
13	14332	1	10	D	Típic	Cistitis	Septicèmia i IUA	No letal	0	UPEC	70	20	70
14	14332.d	1	11	D	Típic	Cistitis	Septicèmia segones soques GF D	Letal intermedi	60	-	-	-	-
15	14327	0	7	D	Baix nombre de FV	Cistitis	Septicèmia i IUA	No letal	0	No UPEC	0	0	0
16	14327.d	0	7	D	Baix nombre de FV	Cistitis	Septicèmia segones soques GF D	No letal	0	-	-	-	-
17	14319	2	14	D	Típic	Fecal	Septicèmia i IUA	No letal	0	No UPEC?	10	0	30
18	14319.d	2	15	D	Típic	Fecal	Septicèmia segones soques GF D	No letal	0	-	-	-	-
19	14320	0	8	D	Baix nombre de FV	Fecal	Septicèmia i IUA	No letal	0	No UPEC?	0	0	30
20	14320.d	0	10	D	Baix nombre de FV	Fecal	Septicèmia segones soques GF D	No letal	0	-	-	-	-
Control positiu (CP)	14335-CFT073	3	20	B2	Típic	Pielonefritis	Septicèmia i IUA	Letal	100	UPEC	100	80	100

ID: identificació, PAI: illes de patogenicitat, GF: grup filogenètic, CN: soca de laboratori K12 (MG 1655), CP: UPEC CFT073, IUA: infecció urinària ascendent, UPEC: *uropathogenicity Escherichia coli*, RVU: reflux vesicoureteral

* Nº total de FV: nombre total de factors de virulència. Calculat com la suma de tots els gens detectats, ajustant les múltiples deteccions de l'operó *pap* (fimbries P), l'operó *hly* (α -hemolisines), l'operó *clb* (colibactina) i *kpsMII* (càpsules del grup

**Perfil virulent: típic (A i B amb baix nombre de FV i B2 i D amb elevat nombre de FV) i no típic (A i B elevat nombre de FV i B2 i D amb baix nombre de FV).

VI. Conclusions

Les principals conclusions que es poden extreure a partir dels resultats obtinguts en la present Tesi Doctoral són les següents:

1. La determinació *in vitro* dels factors de virulència de la col·lecció 111 de soques d'*E. coli* aïllades simultàniament del tracte intestinal i de l'orina de dones amb infecció urinària no complicada confirma l'elevat grau de diversitat d'aquest factors en les soques d'aquesta espècie. Això, va permetre seleccionar un conjunt de 20 soques amb diferents grups filogenètics i diferents perfils de factors de virulència per desenvolupar en els models *in vivo*.
2. La implementació de nous procediments de biologia molecular per a la caracterització de 41 factors de virulència, en lloc dels 16 tradicionalment estudiats en les soques d'*E. coli*, ha permès definir millor el seu perfil potencialment patogènic, i constatar la presència en soques ExPEC de factors de virulència considerats específics de soques enteropatògenes.
3. L'avaluació dels resultats dels experiments realitzats en ambdós models, d'infecció sistèmica i d'infecció urinària ascendent van permetre adaptar l'animal a les condicions òptimes dels assajos, i situar les dosis òptimes d'inoculació en 10^7 UFC d'*E. coli*. Això va conduir a l'establiment de les condicions òptimes per el desenvolupament dels experiments, permeten assumir que el model ha estat assolit i en condicions de ésser utilitzat per a l'estudi de la virulència d'*E. coli*
4. La valoració de 16 soques clíniques i dos controls de procediment en al model de septicèmia van permetre definir el punt límit de mortalitat al llarg set dies, revelant que la soca de control negatiu, i totes les dels GF B1 i D no van expressar capacitat patògena. Les dues soques del GF A amb perfils atípicament alts, respecta al nombre de FV, van causar la mort dels animals; mentre que les quatre soques del GF B2 i el control positiu va ser 100% letals.
5. Els resultats obtinguts dels assajos d'estandardització i virulència del model d'infecció generalitzada són coherents amb els resultats esperats i que es poden constatar en la bibliografia, excepte per el GF D per al qual s'esperava una major letalitat, on d'un total de vuit soques únicament una va arribar a ser letal per al 60% del animals.

6. Els resultats aconseguits als assajos d'estandardització i virulència del model d'infecció urinària ascendent van evidenciar diferent graus d'afectació de les vies urinàries, ja que 11 soques (61%) van causar bacteriúria, 9 (50%) cistitis i 12 (67%) pielonefritis, amb bones correlacions de les dades microbiològiques i histopatològiques, i amb un baix percentatge (12.5%) de reflux vesicoureteral, que s'ajusta als percentatges descrits prèviament per altres autors.
7. L'avaluació del potencial virulent i patògen en els dos models murins, va desvetllar diferent graus d'afectació de un mateix microorganisme en cadascun dels models. Aquestes diferències demostren que no es poden extrapolar les dades d'un a l'altre model.
8. Els resultats obtinguts ratifiquen la importància que tenen les soques d'*E. coli* del filogrup B2 dins de la patologia extraintestinal, gràcies a l'elevat nombre de factors de virulència. Aquesta elevada correlació no es dona en els altres tres grups filogenètics. L'avaluació de soques en aquests models permetrà explicar la relació entre el paper del filogrup, els factors de virulència i la capacitat patògena de les soques.
9. La incorporació d'aquests models experimentals *in vivo* a l'àmbit de la recerca del servei de Microbiologia de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron, permetrà efectuar diferents estudis en relació amb els mecanismes patogènics de microorganismes causants de quadres sèptics o d'infeccions urinàries, que no s'arriben a esbrinar en cap dels models *in vitro* que actualment es disposen.
10. Aquests models també permetran efectuar estudis sobre els antibacterians tant en l'àmbit de la seva activitat com de la farmacocinètica i farmacodinàmica d'aquests medicaments.

VII. Bibliografia

1. Donnenberg MS. Enterobacteriaceae. In: G. L. Mandell JEBaRD, editor. Principles and Practice of Infectious Diseases. United States, Churchill Livingstone: ELSEVIER; 2010. p. 2815.
2. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic Escherichia coli. Nat Rev Microbiol 2004;2(2):123-40.
3. Bidet P, Bonarcorsi S, Bingen E. [Virulence factors and pathophysiology of extraintestinal pathogenic Escherichia coli]. Arch Pediatr 2012;19 Suppl 3:S80-92.
4. Johnson JR, O'Bryan TT, Low DA, et al. Evidence of commonality between canine and human extraintestinal pathogenic Escherichia coli strains that express papG allele III. Infect Immun 2000;68(6):3327-36.
5. Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic Escherichia coli. Exp Mol Pathol 2008;85(1):11-9.
6. Farmer JJI, Boatwright KD, Janda M. *Enterobacteriaceae*: Introduction and identificación. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover MC, editors. Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. Washington: American Society for Microbiology (ASM); 2007. p. 652-55.
7. Clermont O, Bonarcorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the Escherichia coli phylogenetic group. Appl Environ Microbiol 2000;66(10):4555-8.
8. Russo TA, Johnson JR. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to Escherichia coli: focus on an increasingly important endemic problem. Microbes Infect 2003;5(5):449-56.
9. Russo TA, Johnson JR. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of Escherichia coli: ExPEC. J Infect Dis 2000;181(5):1753-4.
10. Picard B, Garcia JS, Gouriou S, et al. The link between phylogeny and virulence in Escherichia coli extraintestinal infection. Infect Immun 1999;67(2):546-53.
11. Harrison. Enfermedades causadas por bacilos entéricos gramnegativos. In: Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo L, Jameson JL, et al., editors. Principios de Medicina Interna de Harrison. Enfermedades Infecciosas. 17a ed. España: Mc Graw Hill; 2009. p. 189-93.
12. Stamm WE. An epidemic of urinary tract infections? N Engl J Med 2001;345(14):1055-7.
13. Johnson JR, Russo TA. Extraintestinal pathogenic Escherichia coli: "the other bad E coli". J Lab Clin Med 2002;139(3):155-62.
14. Russo TA, Johnson JR. Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli. Vaccines for Biodefense and Emerging and Neglected Diseases 2009:939-48.
15. Mensa J, Pigrau C, Horcajada J, Cartón J, Pujol M. Infección Urinaria. In: Aguado JM, Almirante B, Fortún J, editors. IV Protocolos Clínicos SEIMC Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC); 2001.
16. Mittal R, Aggarwal S, Sharma S, Chhibber S, Harjai K. Urinary tract infections caused by Pseudomonas aeruginosa: a minireview. J Infect Public Health 2009;2(3):101-11.
17. Andreu A, Cacho J, Coira A, Lepe J. Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto urinario. In: Cercenado E, Cantón R, editors. Procedimientos en Microbiología Clínica Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC); 2010.
18. Mensa J. Infecciones de las vías urinarias. In: Rozman C, Cardellach F, editors. Medicina Interna. XVII ed. Madrid: Elsevier España, S.L; 2012. p. 861-68.
19. Foxman B. The epidemiology of urinary tract infection. Nat Rev Urol 2010;7(12):653-60.
20. Torres M, Mattera A. Infección urinaria. Temas de Bacteriología y Virología Médica. 3a ed. Montevideo: Universidad de la Republica. Departamento de Bacteriología y Virología. Instituto de Higiene. Oficina del Libro FEFMUR.; 2008. p. 189-96.

21. Sociedad Española de medicina preventiva speh. Estudio de prevalencia de las infecciones nosocomiales en España. EPINE 2011. Informe global de España. 22º Estudio; 2011.
22. Palou J, Pigrau C, Molina I, Ledesma JM, Angulo J. [Etiology and sensitivity of uropathogens identified in uncomplicated lower urinary tract infections in women (ARESC Study): implications on empiric therapy]. *Med Clin (Barc)* 2011;136(1):1-7.
23. Andreu A, Planells I. [Etiology of community-acquired lower urinary infections and antimicrobial resistance of *Escherichia coli*: a national surveillance study]. *Med Clin (Barc)* 2008;130(13):481-6.
24. Vallano A, Rodriguez D, Barcelo ME, et al. [Antimicrobial susceptibility of uropathogens and outcome following antibiotic treatment for urinary tract infections in primary health care]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006;24(7):418-25.
25. Andreu A, Alos JI, Gobernado M, et al. [Etiology and antimicrobial susceptibility among uropathogens causing community-acquired lower urinary tract infections: a nationwide surveillance study]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005;23(1):4-9.
26. Kahlmeter G. An international survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections: the ECO.SENS Project. *J Antimicrob Chemother* 2003;51(1):69-76.
27. Kass EH. Bacteriuria and pyelonephritis of pregnancy. *Arch Intern Med* 1960;105:194-8.
28. Prats G. Infecciones urinarias. *Microbiología Clínica*. Madrid: Editorial Médica Panamericana, S.A.; 2008. p. 243.
29. Sobel J, Kaye D. Urinary Tract Infections. In: Mandell GL, Bennett JE, Douglas R, editors. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 7th ed. United States: Churchill Livingstone ELSEVIER; 2010. p. 957-86.
30. Kunin CM, Evans C, Bartholomew D, Bates DG. The antimicrobial defense mechanism of the female urethra: a reassessment. *J Urol* 2002;168(2):413-9.
31. Prats G. Mecanismos de defensa inespecífica. *Microbiología y Parasitología Médicas*. Madrid: Ed. Panamericana; 2013. p. 59-71.
32. Kau AL, Hunstad DA, Hultgren SJ. Interaction of uropathogenic *Escherichia coli* with host uroepithelium. *Curr Opin Microbiol* 2005;8(1):54-9.
33. Nathan CF. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 1987;79(2):319-26.
34. Kokot F, Dulawa J. Tamm-Horsfall protein updated. *Nephron* 2000;85(2):97-102.
35. Kim KS. Current concepts on the pathogenesis of *Escherichia coli* meningitis: implications for therapy and prevention. *Curr Opin Infect Dis* 2012;25(3):273-8.
36. Hang L, Wullt B, Shen Z, Karpman D, Svanborg C. Cytokine repertoire of epithelial cells lining the human urinary tract. *J Urol* 1998;159(6):2185-92.
37. Ulett GC, Totsika M, Schaale K, et al. Uropathogenic *Escherichia coli* virulence and innate immune responses during urinary tract infection. *Curr Opin Microbiol* 2013.
38. Rozman C. *Fundamentos de la práctica médica*. Medicina Interna. XVII ed. Madrid: Elsevier España, S.L. ; 2012.
39. Harrington RD, Hooton TM. Urinary tract infection risk factors and gender. *J Gen Specif Med* 2000;3(8):27-34.
40. Belanger L, Garenaux A, Harel J, et al. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2011;62(1):1-10.
41. Gobernado M, Jiménez F, Dalet F, et al. La Infección Urinaria. In: Picazo JJ, editor. *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Madrid: SEIMC; 2002.
42. Schito GC, Naber KG, Botto H, et al. The ARES study: an international survey on the antimicrobial resistance of pathogens involved in uncomplicated urinary tract infections. *Int J Antimicrob Agents* 2009;34(5):407-13.

43. Johnson JR, Gajewski A, Lesse AJ, Russo TA. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as a cause of invasive nonurinary infections. *J Clin Microbiol* 2003;41(12):5798-802.
44. Johnson JR, Russo TA. Uropathogenic *Escherichia coli* as agents of diverse non-urinary tract extraintestinal infections. *J Infect Dis* 2002;186(6):859-64.
45. Garau X, Gurguí M, Moreno A, Sitges-Serra A, Blanes M. Peritonitis y otras infecciones intraabdominales. In: Aguado JM, Almirante B, Fortún J, editors. *Protocolos Clínicos SEIMC IX*. Madrid: SEIMC; 2001. p. 3-22.
46. Capdevila JA. *Protocolos Enfermedades Infecciosas*. Madrid: Sociedad Española de Medicina Interna y Elsevier España, S.L; 2009. p. 19-75.
47. Bhimraj A. Acute community-acquired bacterial meningitis in adults: an evidence-based review. *Cleve Clin J Med* 2012;79(6):393-400.
48. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Characterization of an anonymous molecular marker strongly linked to *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis. *J Clin Microbiol* 2004;42(4):1770-2.
49. Watt S, Lanotte P, Mereghetti L, et al. *Escherichia coli* strains from pregnant women and neonates: intraspecies genetic distribution and prevalence of virulence factors. *J Clin Microbiol* 2003;41(5):1929-35.
50. Smith JL, Fratamico PM, Gunther NW. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne Pathog Dis* 2007;4(2):134-63.
51. Fernandez-Viladrich P, Cabellos C, Navas E, Lacasa JM, Gatell JM. Infecciones del sistema nervioso central. In: Aguado JM, Almirante B, Fortún J, editors. *Protocolos Clínicos SEIMC II*. Madrid: SEIMC; 2001. p. 1-22.
52. Laupland KB. Incidence of bloodstream infection: a review of population-based studies. *Clin Microbiol Infect* 2013.
53. Reinhart K, Bauer M, Riedemann NC, Hartog CS. New approaches to sepsis: molecular diagnostics and biomarkers. *Clin Microbiol Rev* 2012;25(4):609-34.
54. Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* 2010;8(1):26-38.
55. Ron EZ. Host specificity of septicemic *Escherichia coli*: human and avian pathogens. *Curr Opin Microbiol* 2006;9(1):28-32.
56. Strober W. Adherent-invasive *E. coli* in Crohn disease: bacterial "agent provocateur". *J Clin Invest* 2011;121(3):841-4.
57. Deng W, de Hoog CL, Yu HB, et al. A comprehensive proteomic analysis of the type III secretome of *Citrobacter rodentium*. *J Biol Chem* 2010;285(9):6790-800.
58. Clements A, Young JC, Constantinou N, Frankel G. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes* 2012;3(2):71-87.
59. Moreno E, Andreu A, Perez T, et al. Relationship between *Escherichia coli* strains causing urinary tract infection in women and the dominant faecal flora of the same hosts. *Epidemiol Infect* 2006;134(5):1015-23.
60. Moreno E, Andreu A, Pigrau C, et al. Relationship between *Escherichia coli* strains causing acute cystitis in women and the fecal *E. coli* population of the host. *J Clin Microbiol* 2008;46(8):2529-34.
61. Johnson JR, Murray AC, Gajewski A, et al. Isolation and molecular characterization of nalidixic acid-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from retail chicken products. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(7):2161-8.
62. Mokady D, Gophna U, Ron EZ. Virulence factors of septicemic *Escherichia coli* strains. *Int J Med Microbiol* 2005;295(6-7):455-62.
63. Nash JH, Villegas A, Kropinski AM, et al. Genome sequence of adherent-invasive *Escherichia coli* and comparative genomic analysis with other *E. coli* pathotypes. *BMC Genomics* 2010;11:667.

64. Mellata M, Dho-Moulin M, Dozois CM, et al. Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. *Infect Immun* 2003;71(1):536-40.
65. Borriello G, Lucibelli MG, De Carlo E, et al. Characterization of enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) and necrotoxicogenic *E. coli* (NTEC) isolated from diarrhoeic Mediterranean water buffalo calves (*Bubalus bubalis*). *Res Vet Sci* 2012;93(1):18-22.
66. Kohler CD, Dobrindt U. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? *Int J Med Microbiol* 2011;301(8):642-7.
67. Hill C. Virulence or niche factors: what's in a name? *J Bacteriol* 2012;194(21):5725-7.
68. Johnson JR, Delavari P, Stell AL, et al. Molecular comparison of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of the same electrophoretic lineages from humans and domestic animals. *J Infect Dis* 2001;183(1):154-9.
69. Spurbeck RR, Dinh PC, Jr., Walk ST, et al. *Escherichia coli* isolates that carry *vat*, *fyuA*, *chuA*, and *yfcV* efficiently colonize the urinary tract. *Infect Immun* 2012;80(12):4115-22.
70. Antao EM, Wieler LH, Ewers C. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Pathog* 2009;1(1):22.
71. Johnson JR, Russo TA. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol* 2005;295(6-7):383-404.
72. Hung CS, Dodson KW, Hultgren SJ. A murine model of urinary tract infection. *Nat Protoc* 2009;4(8):1230-43.
73. Alteri CJ, Mobley HL. *Escherichia coli* physiology and metabolism dictates adaptation to diverse host microenvironments. *Curr Opin Microbiol* 2012;15(1):3-9.
74. Johnson JR, Stell AL, Delavari P. Canine feces as a reservoir of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2001;69(3):1306-14.
75. Johnson JR, Stell AL, Delavari P, et al. Phylogenetic and pathotypic similarities between *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections in dogs and extraintestinal infections in humans. *J Infect Dis* 2001;183(6):897-906.
76. Johnson JR. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev* 1991;4(1):80-128.
77. Rama G, Chhina DK, Chhina RS, Sharma S. Urinary tract infections-microbial virulence determinants and reactive oxygen species. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2005;28(5-6):339-49.
78. Herold S, Paton JC, Srimanote P, Paton AW. Differential effects of short-chain fatty acids and iron on expression of *iha* in Shiga-toxicogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* 2009;155(Pt 11):3554-63.
79. Srinivasan U, Foxman B, Marrs CF. Identification of a gene encoding heat-resistant agglutinin in *Escherichia coli* as a putative virulence factor in urinary tract infection. *J Clin Microbiol* 2003;41(1):285-9.
80. Bertin Y, Martin C, Oswald E, Girardeau JP. Rapid and specific detection of F17-related pilin and adhesin genes in diarrheic and septicemic *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 1996;34(12):2921-8.
81. Jallat C, Darfeuille-Michaud A, Girardeau JP, Rich C, Joly B. Self-transmissible R plasmids encoding CS31A among human *Escherichia coli* strains isolated from diarrheal stools. *Infect Immun* 1994;62(7):2865-73.
82. Girardeau JP, Der Vartanian M, Ollier JL, Contrepolis M. CS31A, a new K88-related fimbrial antigen on bovine enterotoxigenic and septicemic *Escherichia coli* strains. *Infect Immun* 1988;56(8):2180-8.
83. Noinaj N, Buchanan SK, Cornelissen CN. The transferrin-iron import system from pathogenic *Neisseria* species. *Mol Microbiol* 2012;86(2):246-57.

84. Chisti MJ, Tebruegge M, La Vincente S, Graham SM, Duke T. Pneumonia in severely malnourished children in developing countries - mortality risk, aetiology and validity of WHO clinical signs: a systematic review. *Trop Med Int Health* 2009;14(10):1173-89.
85. Mokady D, Gophna U, Ron EZ. Extensive gene diversity in septicemic *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol* 2005;43(1):66-73.
86. Garenaux A, Caza M, Dozois CM. The Ins and Outs of siderophore mediated iron uptake by extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Vet Microbiol* 2011;153(1-2):89-98.
87. Garcia EC, Brumbaugh AR, Mobley HL. Redundancy and specificity of *Escherichia coli* iron acquisition systems during urinary tract infection. *Infect Immun* 2011;79(3):1225-35.
88. Ruiz-Perez F, Wahid R, Faherty CS, et al. Serine protease autotransporters from *Shigella flexneri* and pathogenic *Escherichia coli* target a broad range of leukocyte glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108(31):12881-6.
89. Whitfield C, Roberts IS. Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 1999;31(5):1307-19.
90. Smajs D, Micenikova L, Smarda J, et al. Bacteriocin synthesis in uropathogenic and commensal *Escherichia coli*: colicin E1 is a potential virulence factor. *BMC Microbiol* 2010;10:288.
91. Sannes MR, Kuskowski MA, Owens K, Gajewski A, Johnson JR. Virulence factor profiles and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from veterans with bacteremia and uninfected control subjects. *J Infect Dis* 2004;190(12):2121-8.
92. McCarter JD, Stephens D, Shoemaker K, et al. Substrate specificity of the *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT. *J Bacteriol* 2004;186(17):5919-25.
93. Hejnova J, Dobrindt U, Nemcova R, et al. Characterization of the flexible genome complement of the commensal *Escherichia coli* strain A0 34/86 (O83 : K24 : H31). *Microbiology* 2005;151(Pt 2):385-98.
94. Schmidt H, Hensel M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 2004;17(1):14-56.
95. Ejrnaes K. Bacterial characteristics of importance for recurrent urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. *Dan Med Bull* 2011;58(4):B4187.
96. Gannon VP, D'Souza S, Graham T, et al. Use of the flagellar H7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity in identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol* 1997;35(3):656-62.
97. Kurazono H, Yamamoto S, Nakano M, et al. Characterization of a putative virulence island in the chromosome of uropathogenic *Escherichia coli* possessing a gene encoding a uropathogenic-specific protein. *Microb Pathog* 2000;28(3):183-9.
98. Kudinha T, Johnson JR, Andrew SD, et al. Distribution of phylogenetic groups, sequence type ST131, and virulence-associated traits among *Escherichia coli* isolates from men with pyelonephritis or cystitis and healthy controls. *Clin Microbiol Infect* 2013;19(4):E173-80.
99. Kudinha T, Kong F, Johnson JR, et al. Multiplex PCR-based reverse line blot assay for simultaneous detection of 22 virulence genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 2012;78(4):1198-202.
100. Mora A, Lopez C, Dabhi G, et al. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O1:K1:H7/NM from human and avian origin: detection of clonal groups B2 ST95 and D ST59 with different host distribution. *BMC Microbiol* 2009;9:132.
101. Mabbett AN, Ulett GC, Watts RE, et al. Virulence properties of asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol* 2009;299(1):53-63.
102. Johnson TJ, Wannemuehler Y, Johnson SJ, et al. Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed

- subset representing potential zoonotic pathogens. *Appl Environ Microbiol* 2008;74(22):7043-50.
103. Rodriguez-Siek KE, Giddings CW, Doetkott C, et al. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology* 2005;151(Pt 6):2097-110.
 104. Johnson JR, Kuskowski MA, Gajewski A, et al. Extended virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from patients with cystitis, pyelonephritis, or prostatitis. *J Infect Dis* 2005;191(1):46-50.
 105. Johnson JR, Kaster N, Kuskowski MA, Ling GV. Identification of urovirulence traits in *Escherichia coli* by comparison of urinary and rectal *E. coli* isolates from dogs with urinary tract infection. *J Clin Microbiol* 2003;41(1):337-45.
 106. Bonacorsi S, Clermont O, Houdouin V, et al. Molecular analysis and experimental virulence of French and North American *Escherichia coli* neonatal meningitis isolates: identification of a new virulent clone. *J Infect Dis* 2003;187(12):1895-906.
 107. Bingen-Bidois M, Clermont O, Bonacorsi S, et al. Phylogenetic analysis and prevalence of urosepsis strains of *Escherichia coli* bearing pathogenicity island-like domains. *Infect Immun* 2002;70(6):3216-26.
 108. Johnson JR, Oswald E, O'Bryan TT, Kuskowski MA, Spanjaard L. Phylogenetic distribution of virulence-associated genes among *Escherichia coli* isolates associated with neonatal bacterial meningitis in the Netherlands. *J Infect Dis* 2002;185(6):774-84.
 109. Marrs CF, Zhang L, Tallman P, et al. Variations in 10 putative uropathogen virulence genes among urinary, faecal and peri-urethral *Escherichia coli*. *J Med Microbiol* 2002;51(2):138-42.
 110. Guyer DM, Henderson IR, Nataro JP, Mobley HL. Identification of sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 2000;38(1):53-66.
 111. Davis BM, Waldor MK. Mobile genetic elements and bacterial pathogenesis. In: Craig NI, Craigie R, Gellert M, Lambowitz AM, editors. *Mobile DNA II*. Washington, D.C: American Society for Microbiology Press; 2002. p. 1040-59.
 112. Vejborg RM, Hancock V, Schembri MA, Klemm P. Comparative genomics of *Escherichia coli* strains causing urinary tract infections. *Appl Environ Microbiol* 2011;77(10):3268-78.
 113. Luo C, Hu GQ, Zhu H. Genome reannotation of *Escherichia coli* CFT073 with new insights into virulence. *BMC Genomics* 2009;10:552.
 114. Tourret J, Diard M, Garry L, Matic I, Denamur E. Effects of single and multiple pathogenicity island deletions on uropathogenic *Escherichia coli* strain 536 intrinsic extra-intestinal virulence. *Int J Med Microbiol* 2010;300(7):435-9.
 115. Lloyd AL, Rasko DA, Mobley HL. Defining genomic islands and uropathogen-specific genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2007;189(9):3532-46.
 116. Hacker J. Evolution of genomic islands and evolution of pathogenicity. In: Baquero F, Nombela C, Casell G, Gutiérrez-Fuentes JA, editors. *Evolutionary biology of bacterial and fungal pathogens*. Washington, D.C: American Society for Microbiology; 2008. p. 129-35.
 117. Manson JM, Gilmore MS. Pathogenicity island integrase cross-talk: a potential new tool for virulence modulation. *Mol Microbiol* 2006;61(3):555-9.
 118. Middendorf B, Hochhut B, Leipold K, et al. Instability of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* 536. *J Bacteriol* 2004;186(10):3086-96.
 119. Dobrindt U, Blum-Oehler G, Nagy G, et al. Genetic structure and distribution of four pathogenicity islands (PAI I(536) to PAI IV(536)) of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infect Immun* 2002;70(11):6365-72.
 120. Hacker J, Blum-Oehler G, Janke B, Nagy G, Goebel W. Pathogenicity islands of extraintestinal *Escherichia coli*. In: Kaper JB, Hacker J, editors. *Pathogenicity and other*

- mobile virulence elements. Washington, D.C: American Society for Microbiology; 1999. p. 59-76.
121. DebRoy C, Sidhu MS, Sarker U, et al. Complete sequence of pEC14_114, a highly conserved IncFIB/FIIA plasmid associated with uropathogenic *Escherichia coli* cystitis strains. *Plasmid* 2010;63(1):53-60.
 122. Duriez P, Clermont O, Bonacorsi S, et al. Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology* 2001;147(Pt 6):1671-6.
 123. Zhang L, Foxman B, Marrs C. Both urinary and rectal *Escherichia coli* isolates are dominated by strains of phylogenetic group B2. *J Clin Microbiol* 2002;40(11):3951-5.
 124. Obata-Yasuoka M, Ba-Thein W, Tsukamoto T, Yoshikawa H, Hayashi H. Vaginal *Escherichia coli* share common virulence factor profiles, serotypes and phylogeny with other extraintestinal *E. coli*. *Microbiology* 2002;148(Pt 9):2745-52.
 125. Pitout JD. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: A Combination of Virulence with Antibiotic Resistance. *Front Microbiol* 2012;3:9.
 126. Lagamayo EN. Antimicrobial resistance in major pathogens of hospital-acquired pneumonia in Asian countries. *Am J Infect Control* 2008;36(4 Suppl):S101-8.
 127. Vila J, Simon K, Ruiz J, et al. Are quinolone-resistant uropathogenic *Escherichia coli* less virulent? *J Infect Dis* 2002;186(7):1039-42.
 128. Soto SM, Jimenez 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(2):649-53.
 129. Horcajada JP, Soto S, Gajewski A, 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(6):2962-4.
 130. Cheng CH, Tsau YK, Kuo CY, Su LH, Lin TY. Comparison of extended virulence genotypes for bacteria isolated from pediatric patients with urosepsis, acute pyelonephritis, and acute lobar nephronia. *Pediatr Infect Dis J* 2010;29(8):736-40.
 131. Andersen TE, Khandige S, Madelung M, et al. *Escherichia coli* uropathogenesis in vitro: invasion, cellular escape, and secondary infection analyzed in a human bladder cell infection model. *Infect Immun* 2012;80(5):1858-67.
 132. Lane MC, Mobley HL. Role of P-fimbrial-mediated adherence in pyelonephritis and persistence of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in the mammalian kidney. *Kidney Int* 2007;72(1):19-25.
 133. Johnson JR, Clermont O, Menard M, et al. Experimental mouse lethality of *Escherichia coli* isolates, in relation to accessory traits, phylogenetic group, and ecological source. *J Infect Dis* 2006;194(8):1141-50.
 134. Guinée PAM, Jansen WH, Wadström T, Sellwood R. *Escherichia coli* associated with neonatal diarrhoea in piglets and calves. In: Leew PW, Guinée PAM, editors. *Laboratory diagnosis in neonatal calf and pig diarrhoea: Current topics in veterinary and animal science*. The Hague, Netherlands: Martinus-Nijhoff; 1981. p. 126-62.
 135. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33(9):2233-9.
 136. Sabate M, Moreno E, Perez T, Andreu A, Prats G. Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Clin Microbiol Infect* 2006;12(9):880-6.
 137. Johnson JR, Brown JJ. Defining inoculation conditions for the mouse model of ascending urinary tract infection that avoid immediate vesicoureteral reflux yet produce renal and bladder infection. *J Infect Dis* 1996;173(3):746-9.

138. Johnson JR. Reflux in the mouse model of urinary tract infection. *Infect Immun* 1998;66(12):6063-4.
139. Hopkins WJ, Gendron-Fitzpatrick A, Balish E, Uehling DT. Time course and host responses to *Escherichia coli* urinary tract infection in genetically distinct mouse strains. *Infect Immun* 1998;66(6):2798-802.
140. Hagberg L, Engberg I, Freter R, et al. Ascending, unobstructed urinary tract infection in mice caused by pyelonephritogenic *Escherichia coli* of human origin. *Infect Immun* 1983;40(1):273-83.
141. Hagberg L, Jodal U, Korhonen TK, et al. Adhesion, hemagglutination, and virulence of *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Infect Immun* 1981;31(2):564-70.
142. Hagberg L, Hull R, Hull S, et al. Contribution of adhesion to bacterial persistence in the mouse urinary tract. *Infect Immun* 1983;40(1):265-72.
143. Landraud L, Jaureguy F, Frapy E, et al. Severity of *Escherichia coli* bacteraemia is independent of the intrinsic virulence of the strains assessed in a mouse model. *Clin Microbiol Infect* 2013;19(1):85-90.
144. Johnson JR, Porter SB, Zhanel G, Kuskowski MA, Denamur E. Virulence of *Escherichia coli* clinical isolates in a murine sepsis model in relation to sequence type ST131 status, fluoroquinolone resistance, and virulence genotype. *Infect Immun* 2012;80(4):1554-62.

Annexos

1. MEDIS DE CULTIU

Com a medis de cultiu es van utilitzar medis sòlids, semisòlids i líquids. Per a la seva preparació es va utilitzar aigua ultrapura MQ obtinguda mitjançant l'aparell *Ultra-pure water system Milli-Q_{plus} 185 (Millipore)*.

Un cop preparats tots els medis de cultiu i solucions es van esterilitzar per calor humit a 121 °C durant 15 min en un autoclau S100 (Siemens). En el cas dels medis sòlids, després d' autoclavar-los es van deixar refredar fins a una temperatura aproximada de 50 °C i es van dispensar en volums de 20 ml en plaques de Petri de plàstic estèrils (*Sterilin*) i una vegada solidificats van ser emmagatzemats a 4 °C fins la seva utilització.

1.1 Medi líquid LB (*Luria Bertani*)

És un medi ric utilitzat en la majoria d'assajos per al creixement de bacteris de laboratori. Per a preparar el medi LB es va utilitzar el medi comercial deshidratat de *Sigma-Aldrich*® pesant 20 g per cada litre d'aigua MQ. Per a l'obtenció de LB sòlid es va addicionar de 15 g d'agar bacteriològic europeu (*Pronadisa*) per cada litre de medi preparat.

LB	
LB (<i>Sigma-Aldrich</i> ®)	20 g
Triptona (digerit pancreàtic de caseïna (10g)	
Extracte de llevat (5 g)	
NaCl (5 g)	
Aigua MQ	Fins 1L

1.2 Medi líquid BHI (*Brain-Heart Infusion*)

BHI	
BHI (<i>Difco</i> ™)	37g
Infusió de 200 g de cervells de vedella (7,7g)	
Infusió de 250g de cor de res (9,8 g)	
Peptona (10 g)	
Dextrosa (2 g)	
Clorur de sodi (5 g)	
Fosfat disòdic 85 g)	
Agar (15 g)	
Aigua MQ	Fins 1L

És un medi ric utilitzat per a les ressembres de les tècniques de serotipificació (apartat II 1.2.1.2). per a preparar el medi BHI es va diluir 37 g del medi comercial deshidratat en un litre d'aigua, es dispensa al recipients adients i s'esterilitza.

1.3 Medi semisòlid MIL (*Motility-Indole-Lysine*)

MIL és un medi comercial (*Difco™*) que s'utilitza per a la diferenciació d'enterobacteris basant-se en la motilitat, la descarboxilació i desaminació de la lisina i la producció d'indol. Per a preparar el medi només cal resuspendre 36,5 g del producte dins d'un litre d'aigua MQ, esterilitzar-lo i servir-lo els tubs adients.

MIL	
MIL (<i>Difco™</i>)	36,5 g
Peptona (10 g)	
Digerit pancreàtic de caseïna (10 g)	
Extracte de llevat (3 g)	
L-Lisina HCl (10 g)	
Dextrosa (1 g)	
Citrat d'amoni fèrric (0,5 g)	
Porpra de bromocresol (0,02 g)	
Aigua MQ	Fins 1L

1.4 Medi semisòlid BBL-TOU

BBL TOU	
Extracte de carn (Merck)	5 g
Peptona (Oxoid)	10 g
NaCl (Panreac)	3 g
Fosfat disòdic ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) (Merck)	2 g
Agar bacteriològic europeu (Pronadisa)	5 g
Aigua MQ	Fins 1L

És un medi que s'utilitza per a la conservació de soques a temperatura ambient durant anys. Per a la seva preparació s'utilitzen diferents substàncies les quals es barregen, s'esterilitzen i posteriorment es deixa refredar fins 50 °C i es dispensa en tubs adients de polipropilè estèrils.

1.4 Medi líquid de congelació TSBG (*Tryptic Soy Broth + Glicerol*)

És un medi que s'utilitza per a la conservació de soques a -80 °C durant anys. Per a la seva preparació s'ha de preparar 100 ml de medi TSB (*Tryptic Soy Broth, Difco™*) i s'ha d'afegir 5 ml de glicerol. La solució es barreja, s'esterilitzen i posteriorment es dispensa en tubs adients de polipropilè estèrils.

TSBG	
TSB (<i>Difco™</i>)	3 g
Triptona (17 g)	
Soytone (3 g)	
Glucosa (2,5 g)	
Clorur sòdic (5 g)	
Fosfat dipotàsic d'hidrògen (2,5 g)	
Glicerol	5 ml
Aigua MQ	100 ml
pH 7,3	

1.5 Agar Columbia amb 5% de sang de moltó (Agar sang)

És un medi comercial (*Biomérieux*) d'aïllament primari, molt nutritiu d'ús general per a l'aïllament i el cultiu de microorganismes exigents i no exigents en substàncies clíniques i

Agar Columbia

COS (Biomérieux)
 Digerit pancreàtic de caseïna (12,0 g)
 Digerit pèptic de teixit animal (5,0)
 Extracte de llevat (3,0)
 Extracte de carn bovina (3,0)
 Midó de blat de moro (1,0)
 Clorur sòdic (5,0)
 Agar (13,5)
 Sang de moltó, desfibrinada (5%)
 Aigua MQ (1 L)

pH 7,3

1.6 Agar CPS-ID3

És un medi cromogènic comercial (*Biomerieux*) de nova generació per a l'aïllament, recompte i identificació directa d'*E. coli*, *Proteus* i enterococs en un únic pas usant mostres urinàries. Aquest medi incorpora substrats cromogènics que són atacats per enzims específics de determinades espècies bacterianes com: β -glucoronidasa que permet la identificació d'*E. coli*, β -glucosidasa enzim present en enterococs i el grup KESC (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* i *Citrobacter*). També incorpora triptòfan per a la detecció de l'activitat de triptòfan-desaminasa present en la tribu *Proteae* (*Proteus*, *Providencia* i *Morganella*). D'aquesta manera les colònies d'*E. coli* s'observen de color rosa, els enterococs i el grup KESC presenten colònies blaves o verdoses, *Streptococcus agalactiae* forma colònies de color porpra, *Proteus* sp. se observa de color marró, *Staphylococcus* i els llevats de color blanc. De la mateixa manera *Pseudomonas aeruginosa*, encara que té la particularitat de tenir un pigment que difon al medi, una brillantor metàl·lica i lògicament el seu olor fruital.

no clíniques. La sang de moltó permet detectar les reaccions hemolítiques i aporta el factor X (hem) necessari per al creixement de nombroses espècies patogèniques.

CPS-ID3

CPS-ID3 (*Biomerieux*)
 Peptones (porcí o boví) (17,2 g)
 L. Triptòfan (0,9 g)
 Tampó Hepes (0,4 g)
 Barreja cromogènica (6,87 g)
 Agar (18 g)
 Aigua MQ (1L)

pH 7,3

1.7 Agar Mueller Hinton

És el medi de cultiu sòlid recomanat universalment per a la prova de sensibilitat d'antimicrobians es va comprar el medi comercial (*Biomerieux*) llest para la utilització dispensat en plaques quadrades 120 x 120 de Petri.

Agar Mueller Hinton

Muller Hinton (Biomérieux)	37 g
Infusió de carn (300 g)	
Peptona àcida de caseïna (17,5)	
Midó (1,5 g)	
Agar (15 g)	
Aigua MQ	1 L
pH 7,3	

1.8 Tryptic Soy Agar (TSA)

És un medi deshidrata comercial (*Oxoid*) de propòsit general per al creixement d'una àmplia varietat d'organismes que es va utilitza per a l'aïllament de soques a les proves de serotipificació. Per a l'obtenció de TSA sòlid es va addicionar de 15 g d'agar bacteriològic europeu (*Pronadisa*) per cada litre de medi preparat.

TSA	
TSA (Oxoid)	40 g
Digerit pancreàtic de caseïna (15 g)	
Digerit enzimàtic de soja (5 g)	
Clorur de sodi (5 g)	
Agar (15 g)	
Aigua MQ	1 L
pH 7,3	

2. SUPLEMENTS

2.1 Solució transportadora 6x

Solució transportadora 6x DNA

Tris HCl (10 mM) (pH 7,6)
 EDTA (60 mM)
 Blau de bromofenol (0,03%)
 Cianol de Xileno FF (0,03%)
 Glicerol (60%)

La solució comercial 6X DNA *Loading Dye* (*Thermo Scientific*) bé llesta per a la seva utilització i es suplementa a una concentració 1:6 d'amplificat de PCR

2.2 Chicago Sky Blue 6B (CSB) 0.05%

Aquest colorant comercial (*Sigma-Aldrich*®) es va utilitzar al model animal d'infecció urinària ascendent amb el objectiu de visualitzar tant el reflux ascendent com al descendent de la mostra inoculada via transuretral. La seva formula química és $C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{16}S_4$ que correspon a *Tetrasodium 6,6'-[(3,3'-dimethoxy[1,1'-biphenyl]-4,4'-diyl)bis(azo)]bis[4-amino-5-hydroxynaphthalene-1,3-disulphonate]*.

Per a la seva preparació tan sol cal afegir 0.05 g de CSB en 100 ml de PBS estèril i resuspendre'l. Quan va ser necessari el inòcul bacterià de 2 ml es va suplementar previ a la inoculació amb 25 µl de CBS.

3. SOLUCIONS

3.1 PBS (*Phosphate Buffered Saline*)

El PBS (Sigma) és subministrat en format de tabletetes per la casa comercial per a diluir cada tableta en 200 ml d'aigua MQ amb un pH final de 7.2-7.6. Per als nostre assajos es necessita ajustar a pH final de 7.4. Posteriorment s'esterilitza. Quan va ser necessari la solució es va suplementar amb 10 ml de glicerol per cada 200 ml d'aigua MQ.

PBS	
Tableta comercial	1
Tampó fosfat (0,01 M)	
Clorur de potassi (0,0027 M)	
Clorur de sodi (0,137 M)	
Aigua MQ	200 ml
Ajustar el pH de la solució a 7,4	

3.2 Solució de Ringer (Solució salina 0.9%)

Per a la seva preparació tan sol cal afegir 0.9 g de NaCl (*Panreac*) en 100 ml d'aigua MQ. Mesclar breument i esterilitzar. Quan va ser necessari la solució es va suplementar amb 10 ml de glicerol per cada 200 ml d'aigua MQ. A més, per a les proves de serotipificació es va suplementar amb formaldehid 0.5% i de porpra de genciana (0.005%) o sense colorant depenent del pas.

3.3 Tampó TBE (*Tris_Borate EDTA*)

Es va utilitzar la solució comercial (*Sigma-Aldrich*®) concentrada a 10 X. Aquesta solució es va fer servir en als procediments d'electroforesi convencional (apartat III 3.3.1) diluït a 1 X i 0,5 X.

TBE	
TBE (Sigma-Aldrich®)	
Tris (hidroximetil) aminometano (10-20%)	
Àcid bòric (5,5-10%)	

1. Vídeo: Desenvolupament de models murins d'experimentació animal per a l'avaluació de la virulència i patogenicitat de soques d'*Escherichia coli*

Amb l'objectiu de facilitar l'estandardització, instauració i la transmissibilitat dels dos models d'experimentació animal desenvolupats durant la tesi, es va preparar un vídeo per a fer-lo servir com a eina pedagògica. El material audiovisual que trobareu a continuació ha estat realitzat íntegrament en les instal·lacions de l'estabulari del Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR) amb la col·laboració per a la producció i edició de la unitat de comunicació i imatge del mateix institut i que finalment va comptar amb l'aprovació i vistiplau del Comitè Ètic d'Experimentació Animal (CEEA) del VHIR.

a. Contribucions científiques

Durant el desenvolupament d'aquesta tesi, l'autora va col·laborar en el desenvolupament de dos projectes que van generar publicacions científiques on va participar com a coautora.

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

Aquesta publicació va avaluar la presència de clons epidèmics d'*E. coli* O25b: H4-B2-ST131 productors de β -lactamases d'espectre estès (BLEE) en mostres clíniques de pacients de l'Hospital Vall d'Hebron des d'abril fins a desembre de 2008. Addicionalment, va formar part de la tesi doctoral de la Dra. Alicia Coelho presentada al 2011 i titulada: "Caracterización epidemiológica y genética de cepas d'*Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de CTX-M-15 en el área metropolitana de Barcelona.

J Antimicrob Chemother 2011; 66: 517–526
doi:10.1093/jac/dkq491 Advance Access publication 21 December 2010

Journal of
Antimicrobial
Chemotherapy

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

Alicia Coelho^{1,2†}, Azucena Mora^{3†}, Rosalia Mamani³, Cecilia López³, Juan José González-López^{1,2},
María Nieves Larrosa^{1,2}, J. Natalia Quintero-Zarate^{1,2}, Ghizlane Dahbi³, Alexandra Herrera³,
Jesús E. Blanco³, Miguel Blanco³, María Pilar Alonso⁴, Guillem Prats^{1,2} and Jorge Blanco^{3*}

¹Servei de Microbiologia, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; ²Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ³Laboratorio de Referencia de *E. coli* (LREC), Departamento de Microbiología e Parasitología, Facultad de Veterinaria, Universidade de Santiago de Compostela (USC), Lugo, Spain; ⁴Unidade de Microbiología Clínica, Complejo Hospitalario Xeral-Calde, Lugo, Spain

*Corresponding author. Tel/Fax: +34-982-285936; E-mail: jorge.blanco@usc.es
†These authors made equal contributions to this study.

Received 28 September 2010; returned 22 October 2010; revised 23 November 2010; accepted 25 November 2010

Objectives: The present study was carried out to evaluate the current prevalence of the clonal group O25b:H4-B2-ST131 among extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* (ESBLEC) collected in the Hospital Vall d'Hebron in Barcelona (Spain) with regard to other clonal groups and to characterize their genetic background.

Methods: Ninety-four consecutive non-duplicate ESBLEC isolates collected from May to December 2008 were studied. ESBL enzymes, phylogenetic groups, serotypes, virulence genes, sequence types (STs) and PFGE profiles were determined.

Results: The most prevalent ESBLs were CTX-M-14 (47%), CTX-M-15 (26%) and SHV-12 (19%). Thirty (32%) of the 94 ESBLEC isolates belonged to the clonal group O25b:H4-B2-ST131 of which 19 (63%) carried the bla_{CTX-M-15} gene and eight (27%) the bla_{SHV-12} gene. Moreover, five additional clonal groups (O15/O25a:H1/HNM-D-ST393, O78:HNM-A-ST369, ONT:H21,42/HNM-B1-ST101, O9:H4-A-ST410 and O8:H19-B1-ST162) were detected among 16 isolates producing CTX-M-14 and SHV-12. The 30 ST131 isolates exhibited a significantly higher virulence score (mean number of virulence genes 9.60 versus 5.84) compared with the 64 non-ST131 isolates. In particular, the SHV-12-producing ST131 isolates showed the highest virulence score (range 8–13, mean score 11.75). Results also revealed that the 30 ST131 isolates were distributed in five different groups according to their virulence, XbaI macrorestriction and resistance patterns.

Conclusions: We report for the first time the clonal spread of SHV-12-producing O25b:H4-B2-ST131 isolates characterized by high virulence gene content. Moreover, we describe the distribution of the ST131 isolates within different virulence groups.

Keywords: *E. coli*, ESBLs, β -lactamases

1.2 Role of IncHI2 plasmids harbouring *bla*_{VIM-1}, *bla*_{CTX-M-9}, *aac*(6′)-Ib and *qnrA* genes in the spread of multiresistant *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae* strains in different units at Hospital Vall d’Hebron, Barcelona, Spain

Aquesta publicació va presentar les característiques genètiques d’un brot de soques d’*E. cloacae* i *K. pneumoniae* productores de VIM-1, aïllades en diferents unitats de l’Hospital Vall d’Hebron durant els anys 2009 i 2011.

International Journal of Antimicrobial Agents 39 (2012) 514–517



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

International Journal of Antimicrobial Agents

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijantimicag>



Short communication

Role of IncHI2 plasmids harbouring *bla*_{VIM-1}, *bla*_{CTX-M-9}, *aac*(6′)-Ib and *qnrA* genes in the spread of multiresistant *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae* strains in different units at Hospital Vall d’Hebron, Barcelona, Spain

A. Coelho^{a,b,*}, N. Piedra-Carrasco^{a,b}, R. Bartolomé^{a,b}, J.N. Quintero-Zarate^{a,b}, N. Larrosa^{a,b}, T. Cornejo-Sánchez^a, G. Prats^{a,b}, M.P. Garcillán-Barcia^c, F. de la Cruz^c, J.J. González-Lopéz^{a,b,*}

^a Servicio de Microbiología, Hospital Vall d’Hebron, Barcelona, Spain

^b Departamento de Genética y Microbiología, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

^c Departamento de Biología Molecular e Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBT-IC), Universidad de Cantabria–CSIC–IDICAN, C. Herrera Oria s/n, 39001 Santander, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 22 November 2011
Accepted 22 January 2012

Keywords:
VIM-1
IncHI2 plasmid
Dissemination
Multiresistant

ABSTRACT

Seven *Enterobacter cloacae* isolates and seven *Klebsiella pneumoniae* isolates harbouring a phenotype compatible with the production of a metallo-β-lactamase were recovered between 2009 and 2011 in three Intensive Care Units of Hospital Vall d’Hebron (Barcelona, Spain). The presence of *bla*_{VIM-1}, *bla*_{IMP}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *aac*(6′)-Ib, *qnrA*, *qnrB* and *qnrS* genes was screened by polymerase chain reaction (PCR) and sequencing. Clonal relatedness of the isolates was assessed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and, in the case of *K. pneumoniae* isolates, by multilocus sequence typing (MLST). PCR-based replicon typing, Southern hybridisation, plasmid double-locus sequence typing and MOB relaxase classification methods were used to identify and characterise the plasmids carrying the resistance genes. Transferability of the identified plasmids was tested by conjugation assays. All 14 isolates were found to carry *bla*_{VIM-1}, *bla*_{CTX-M-9} (except one isolate), *aac*(6′)-Ib and *qnrA* genes. Clonality assessment demonstrated that *E. cloacae* isolates were distributed in three clonal clusters, whereas all of the *K. pneumoniae* isolates belonged to one unique clone, identified as sequence type ST252. All studied isolates harboured a large conjugative IncHI2 MOB_{H11} plasmid carrying all of the detected resistance genes. Plasmid DNA analysis showed that all of them belonged to the ST1 IncHI2 plasmid cluster and shared the same relaxase partial sequence. In conclusion, the present study describes the dissemination within a hospital of multiresistant *E. cloacae* and *K. pneumoniae* isolates producing VIM-1. A complex clonal epidemiology of the *E. cloacae* isolates was observed and plasmid DNA analysis strongly supports horizontal exchanges of the same IncHI2 plasmid between different strains and species.

© 2012 Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy. All rights reserved.