

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

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



**Caracterización genómica, estructura poblacional y determinantes de resistencia a antimicrobianos de *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri* y *Escherichia coli* aislados de hombres que mantienen relaciones sexuales con hombres**

TESI DOCTORAL

**Albert Moreno Mingorance**

DIRECTOR

**Dr. Juan José González López**

**Programa de doctorado en Microbiología**

**Departament de Genètica i Microbiologia, Facultat de Biociències**

**Universitat Autònoma de Barcelona**

**Barcelona, marzo 2023**





**Caracterización genómica, estructura poblacional y determinantes de resistencia a antimicrobianos de *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri* y *Escherichia coli* aislados de hombres que mantienen relaciones sexuales con hombres**

Tesis Doctoral presentada por **Albert Moreno Mingorance** para optar al grado de Doctor en Microbiología en el programa de Doctorado de Microbiología del Departamento de Genética y Microbiología de la Facultad de Biociencias de la Universitat Autònoma de Barcelona, bajo la dirección y tutoría del **Dr. Juan José González López**.

Barcelona, marzo 2023.



El Dr. Juan José González López, facultativo adjunto del Serveició de Microbiologia de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron y profesor asociado del Departamento de Genética y Microbiología de la Universitat Autònoma de Barcelona, como director y tutor de la tesis certifica que:

La memoria titulada “Caracterización genómica, estructura poblacional y determinantes de resistencia a antimicrobianos de *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri* y *Escherichia coli* aislados de hombres que mantienen relaciones sexuales con hombres”, presentada por el doctorando Albert Moreno Mingorance, se ha realizado bajo su dirección y tutoría en el Servicio de Microbiología de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron y en el Grupo d'Investigación de l'Institut de Recerca de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron, cumpliendo las condiciones exigidas para ser presentada y defendida como Tesis Doctoral delante del tribunal que corresponda.

Para que así conste, y para los efectos oportunos firman el presente documento Barcelona, 09 de marzo de 2023.

**Dr. Juan José González López**

Director y tutor

**Albert Moreno Mingorance**

Doctorando





# Índice

Índice de figuras.....	I
Índice de Tablas.....	II
Glosario.....	III
Publicaciones.....	V
Comunicaciones.....	VI
Resumen.....	IX
Resum.....	XI
Abstract.....	XIII
<b>Introducción.....</b>	<b>1</b>
1. <i>Shigella</i> .....	3
I. Epidemiología.....	4
II. Estructura poblacional.....	6
III. Patogénesis.....	13
IV. Tratamiento.....	20
2. <i>Escherichia coli</i> .....	22
I. Filogenia y epidemiología de <i>E. coli</i> patogénico extraintestinal.....	23
II. Patogénesis de <i>E. coli</i> patogénico extraintestinal.....	24
3. Resistencia antibiótica.....	30
I. Quinolonas.....	32
II. Macrólidos.....	33
III. $\beta$ -lactámicos.....	34
4. Transferencia de material genético.....	37

I. Plásmidos .....	38
5. Infecciones de transmisión sexual .....	40
I. Hombres que mantienen relaciones sexuales con hombres.....	41
<b>Objetivos .....</b>	<b>45</b>
<b>Resultados .....</b>	<b>50</b>
1. Identificación de los linajes de <i>Shigella</i> circulantes en Barcelona entre hombres que mantienen relaciones sexuales con hombres.....	52
2. Caracterización de los aspectos microbiológicos involucrados en el aumento de <i>Shigella</i> productora de BLEE multirresistente y extremadamente resistente identificadas en Barcelona entre los años 2020 y 2021 .....	55
3. Detección de la transmisión a través de contacto sexual de enterobacteriales productores de BLEE no pertenecientes al género <i>Shigella</i> y que colonizan el tracto intestinal de hombres que mantienen relaciones sexuales con hombres .....	65
<b>Discusión .....</b>	<b>79</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>102</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>107</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1:</b> Mapa sobre ratio de mortalidad por <i>Shigella</i> por cada 100.000 personas en 2016 para todas las edades por países. ....	5
<b>Figura 2:</b> Arbol filogenetico de <i>E. coli</i> . Arbol de máxima verosimilitud de los genes “core” de genomas de referencia de <i>Shigella</i> y <i>E. coli</i> .....	7
<b>Figura 3</b> Evolución de los linajes en <i>S. sonnei</i> . ....	10
<b>Figura 4</b> Filogenia de máxima verosimilitud de aislados <i>S. flexneri</i> de los serotipos 1-5, X e Y .....	11
<b>Figura 5</b> Distribución geográfica y patrón de transmisión de los linajes de <i>Shigella dysenteriae</i> tipo 1. ....	12
<b>Figura 6</b> Ciclo infectivo de <i>Shigella</i> .....	14
<b>Figura 7</b> Comparación de antígenos O de algunas <i>Shigella</i> representativas.....	17
<b>Figura 8</b> Representación gráfica de la doble función de IcsA.....	18
<b>Figura 9</b> Factores de virulencia de <i>E. coli</i> uropatogénico (Tomado de Lüthje y Brauner 2014).....	26
<b>Figura 10</b> Mecanismos de resistencia antimicrobiana.....	31
<b>Figura 11</b> Transferencia de ADN entre células bacterianas. ....	37
<b>Figura 12</b> Análisis filogenético de los aislados de <i>E. coli</i> . ....	72
<b>Figura 13</b> Análisis filogenético de los aislados del ST14 obtenidos en este estudio y obtenidos en París.....	72
<b>Figura 14</b> Análisis filogenético de los aislados del ST131 obtenidos en este estudio y obtenidos en París.....	74

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1</b> Datos sociodemográficos de las 135 personas HSH atendidas en el servicio de Drassanes exprés durante el mes de mayo de 2021. ....	70
<b>Tabla 2</b> Factores de virulencia y bacteriocinas detectados in silico entre los aislados colonizadores obtenidos de HSH. ....	76

## Glosario

ADN: Ácido desoxirribonucleico

BLEE:  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido

CC: Complejo clonal

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CNF1: Factor citotóxico necrotizante 1

EHEC: *E. coli* enterohemorrágico

EIEC: *E. coli* enteroinvasivo

EUCAST: *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

ExPEC: *E. coli* patogénico extraintestinal

FGs: Filogrupos

HSH: Hombres que mantienen relaciones sexuales con hombres

HSM: Hombres que mantienen relaciones sexuales con mujeres

IL: Interleucina

ITS: Infección de transmisión sexual

LMICs: *Low- to middle income countries*

LPS: Lipopolisacárido

MLST: *Multilocus sequence typing*

MSH: Mujeres que mantienen relaciones sexuales con hombres

OMS: Organización Mundial de la Salud OMS

pINV: Plásmido de invasión de *Shigella* y EIEC

PMN: Leucocitos polimorfonucleares

PrEP: Profilaxis preexposición frente al VIH

QRDR: Región determinante de la resistencia a quinolonas

SNP: Polimorfismo de nucleótido único (*Single-nucleotide polymorphism*)

SPATEs: Proteasas de serina autotransportadoras de enterobacterias

ST: Secuenciotipo

T3SS: Sistema de secreción de tipo III

EUA: Estados Unidos de América

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

XDR: Extremadamente resistente

## Publicaciones

### Artículos científicos

1. **Moreno-Mingorance, A.**; Espinal, P.; Rodriguez, V.; Goterris, L.; Fàbrega, A.; Serra-Pladevall, J.; Barberà, M. J.; Alberny, M.; Martín-González, H.; Cornejo-Sánchez, T.; Armas, M.; Mir-Cros, A.; Raventós, A.; Viñado, B.; Pumarola, T.; Larrosa, M. N.; González-López, J. J. Circulation of Multi-Drug-Resistant *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* among Men Who Have Sex with Men in Barcelona, Spain, 2015–2019. *Int J Antimicrob Agents* **2021**, 58 (3), 106378.
2. **Moreno-Mingorance, A.**; Mir-Cros, A.; Goterris, L.; Rodriguez-Garrido, V.; Sulleiro, E.; Barberà, M. J.; Alberny, M.; Hoyos-Mallecot, Y.; Descalzo, V.; Bravo, A.; Roca-Grande, J.; Viñado, B.; Pumarola, T.; Larrosa, M. N.; González-López, J. J. Increasing Trend of Antimicrobial Resistance in *Shigella* Associated with MSM Transmission in Barcelona, 2020–21: Outbreak of XRD *Shigella sonnei* and Dissemination of ESBL-Producing *Shigella flexneri*. *J Antimicrob Chemother* **2023**, dkad031. <https://doi.org/10.1093/jac/dkad031>.
3. Mir-Cros, A.; **Moreno-Mingorance, A.**; Martín-Gómez, M. T.; Abad, R.; Bloise, I.; Campins, M.; González-Praetorius, A.; Gutiérrez, M. N.; Martín-González, H.; Muñoz-Almagro, C.; Orellana, M. Á.; de Pablos, M.; Roca-Grande, J.; Rodrigo, C.; Rodríguez, M. E.; Uriona, S.; Vidal, M. J.; Pumarola, T.; Larrosa, M. N.; González-López, J. J. Pertactin-Deficient *Bordetella pertussis* with Unusual Mechanism of Pertactin Disruption, Spain, 1986–2018. *Emerg Infect Dis* **2022**, 28 (5), 967–976.
4. Salmerón, P.; **Moreno-Mingorance, A.**; Trejo, J.; Amado, R.; Viñado, B.; Cornejo-Sánchez, T.; Alberny, M.; Barbera, M. J.; Arando, M.; Pumarola, T.; Hoyos-Mallecot, Y.; Serra-Pladevall, J.; González-López, J. J. Emergence and Dissemination of Three Mild Outbreaks of *Neisseria gonorrhoeae* with High-Level Resistance to Azithromycin in Barcelona, 2016–18. *J Antimicrob Chemother* **2021**, 76 (4), 930–935.
5. Höfle, U.; Jose Gonzalez-Lopez, J.; Camacho, M. C.; Solà-Ginés, M.; **Moreno-Mingorance, A.**; Manuel Hernández, J.; De La Puente, J.; Pineda-Pampliega, J.; Aguirre, J. I.; Torres-Medina, F.; Ramis, A.; Majó, N.; Blas, J.; Migura-Garcia, L. Foraging at Solid Urban Waste Disposal Sites as Risk Factor for Cephalosporin and Colistin Resistant *Escherichia coli* Carriage in White Storks (*Ciconia ciconia*). *Front Microbiol* **2020**, 11, 1397.

6. Fernández-Huerta, M.; Serra-Pladevall, J.; Esperalba, J.; **Moreno-Mingorance, A.**; Fernández-Naval, C.; Barberá, M.-J.; Aparicio, D.; Pich, O. Q.; Pumarola, T.; Jensen, J. S.; Espasa, M. Single-Locus-Sequence-Based Typing of the MgpB Gene Reveals Transmission Dynamics in *Mycoplasma genitalium*. *J Clin Microbiol* **2020**, *58* (4), e01886-19.
7. Mir-Cros, A.; **Moreno-Mingorance, A.**; Martín-Gómez, M. T.; Codina, G.; Cornejo-Sánchez, T.; Rajadell, M.; Van Esso, D.; Rodrigo, C.; Campins, M.; Jané, M.; Pumarola, T.; Fàbrega, A.; González-López, J. J. Population Dynamics and Antigenic Drift of *Bordetella pertussis* Following Whole Cell Vaccine Replacement, Barcelona, Spain, 1986-2015. *Emerg Microbes Infect* **2019**, *8* (1), 1711–1720.
8. Migura-Garcia, L.; González-López, J. J.; Martínez-Urtaza, J.; Aguirre Sánchez, J. R.; **Moreno-Mingorance, A.**; Perez de Rozas, A.; Höfle, U.; Ramiro, Y.; Gonzalez-Escalona, N. Mcr-Colistin Resistance Genes Mobilized by IncX4, IncHI2, and IncI2 Plasmids in *Escherichia coli* of Pigs and White Stork in Spain. *Front Microbiol* **2019**, *10*, 3072.

## Comunicaciones

### Presentaciones orales

1. **Moreno-Mingorance, A.**; Viñado, B.; Cornejo-Sánchez, T.; Ferrer, M.; Guerrero, C.; Serra, J.; Larrosa, M.N.; Almirante, B.; González-López, J.J.; Fàbrega, A. Primera detección del clon *Escherichia coli* ST410 co-productor de NDM-5 y OXA-181 en España. Comunicación nº 0063 (Oral), XXIII congreso SEIMC.
2. **Moreno-Mingorance, A.**; Fàbrega, A.; Cornejo-Sánchez, T.; Herranz, M.; Rivera, A.; Pérez-Vázquez, M.; López-Contreras, J.; Prim, N.; Miró, E.; González-Juanes, C.; Fernández-Piqueras, E.; Oteo-Iglesias, J.; Montero, M.; Cotura, À.; Ferrer, C.; Almirante, B.; Rodrigo, J.Á.; Horcajada, J.P.; González-López, J.J.; Larrosa, M.N. Persistencia del linaje de *E. coli* ST131 resistente a cefalosporinas en Barcelona y emergencia del linaje epidémico ST1193. Comunicación nº 0173 (Oral), XXIII congreso SEIMC.
3. **Moreno-Mingorance, A.**; Fàbrega, A.; Miró, E.; Herranz, M.; Oteo-Iglesias, J.; Fernández-Piqueras, E.; Almirante, B.; Hoyos, Y.; Rivera, A.; Ferrer, C.; González-Juanes, C.; Viñado, B.; Horcajada, J.P.; Pérez-Vázquez, M.; Montero, M.; Rodrigo, J.Á.; Cotura, À.; López-Contreras, J.; Larrosa, M.N.; González-López, J.J. Diseminación del

linaje emergente *Klebsiella pneumoniae* ST307 multirresistente en tres hospitales del área de Barcelona. Comunicación nº 0171 (Oral), XXIII congreso SEIMC.

4. **Moreno-Mingorance, A.**; Rodríguez-Garrido, V.; Goterris, L.; Hoyos-Mallecot, Y.; Barberà, M.J.; Alberný, M.; Sulleiro, E.; Mir-Cros, A.; Roca-Grande, J.; Cornejo-Sánchez, T.; Viñado, B.; Pumarola, T.; Larrosa, M.N.; González-López, J.J. Emergence of extended-spectrum beta-lactamases producing *Shigella sonnei* among men who have sex with men in Barcelona. Comunicación nº 3705/O0346 (Oral), 32nd ECCMID.
5. **Moreno-Mingorance, A.**; Goterris, L.; Rodríguez-Garrido, V.; Hoyos-Mallecot, Y.; Barberà, M. J.; Alberný, M.; Sulleiro, E.; Cornejo-Sánchez, T.; Mir-Cros, A.; Roca-Grande, J.; Viñado, B.; Pumarola, T.; Larrosa, M.N.; González-López, J.J. Emergència de *Shigella sonnei* i *Shigella flexneri* productores de betalactamasa de espectre estès entre homes que tenen relacions sexuals amb homes durant els anys 2020 i 2021 a Barcelona. (Oral), IX Jornada Científica del Departament de Genètica i de Microbiologia.

### Presentaciones Póster

1. **Moreno-Mingorance, A.**; Fàbrega, A.; Miró, E.; Herranz, M.; Oteo-Iglesias, J.; Fernández-Piqueras, E.; Almirante, B.; Hoyos, Y.; Rivera, A.; Ferrer, C.; González-Juanes, C.; Viñado, B.; Horcajada, J.P.; Pérez-Vázquez, M.; Montero, M.; Rodrigo, J.Á.; Cotura, À.; López-Contreras, J.; Larrosa, M.N.; González-López, J.J. Diseminación del linaje emergente *Klebsiella pneumoniae* ST307 multirresistente en tres hospitales del área de Barcelona. (Póster), VII Jornada Científica del Departament de Genètica i de Microbiologia.
2. **Moreno-Mingorance, A.**; Fàbrega, A.; Miró, E.; Herranz, M.; Oteo-Iglesia, J.; Fernández-Piqueras, E.; Almirante, B.; Hoyos, Y.; Rivera, A.; Rajadell, M.; Ferrer, C.; González-Juanes, C.; Viñado, B.; Horcajada, J. P.; Pérez-Vázquez, M.; Montero, M.; Rodrigo, J.Á.; Pomar, V.; López-Contreras, J.; Larrosa, M.N.; González-López, J.J. Diseminación del linaje emergente *Klebsiella pneumoniae* ST307 multirresistente en tres hospitales del área de Barcelona. (Póster), XXVIII Jornades de la Societat Catalana de Malalties Infeccioses i Microbiologia Clínica
3. **Moreno-Mingorance, A.**; González-López, J.J.; Rajadell, M.; López-Contreras, J.; Viñado, B.; Rivera, A.; Ferrer, C.; Padilla, E.; Rodrigo, J.Á.; Fernández-Piqueras, E.; Rodriguez, M.; Horcajada, J.P.; Pérez-Vázquez, M.; Salas, L.; Pomar, V.; Fàbrega, A.;

Miró, E.; Oteo-Iglesias, J.; Navarro, F.; Almirante, B.; Larrosa, M.N. Aplicación de la secuenciación de nueva generación en la vigilancia de la infección relacionada con la asistencia sanitaria (IRAS) por bacterias multirresistentes. (Póster), XXVIII Jornades de la Societat Catalana de Malalties Infeccioses i Microbiologia Clínica.

4. **Moreno-Mingorance, A.**; Rodríguez-Garrido, V.; Goterris, L.; Hoyos-Mallecot, Y.; Barberà, M.J.; Alberny, M.; Sulleiro, E.; Cornejo-Sánchez, T.; Mir-Cros, A.; Roca-Grande, J.; Viñado, B.; Pumarola, T.; Larrosa, M.N.; González-López, J.J. Emergència de *Shigella sonnei* i *Shigella flexneri* productores de betalactamasa de espectre estès entre homes que tenen relacions sexuals amb homes durant els anys 2020 i 2021 a Barcelona. (Póster), XXX Jornades de la Societat Catalana de Malalties Infeccioses i Microbiologia Clínica.

## Resumen

*Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae* y *Shigella boydii* son los agentes etiológicos de la shigelosis. Esta infección en los países de rentas altas se relaciona con viajes a regiones endémicas, aunque también se ha documentado su adquisición por vía sexual en hombres que mantienen relaciones sexuales con hombres (HSH).

Entre 2015-2019 se identificó que el 55% y el 24,3% de los aislados de *S. flexneri* y *S. sonnei*, respectivamente, obtenidos en el Servicio de Microbiología del Hospital Vall d'Hebron, estuvieron asociados a HSH. Estos aislados mostraban una mayor resistencia a diversas familias de antimicrobianos, como son la azitromicina o el ciprofloxacino, respecto a los aislados obtenidos por otras vías, como son los viajes a zonas endémicas. Los análisis filogenómicos permitieron identificar linajes específicos de *S. flexneri* y *S. sonnei* circulantes entre HSH con una estrecha relación genética, que a su vez eran próximos a los descritos en brotes entre HSH del Reino Unido y Australia.

Posteriormente, durante 2020-2021, observamos un aumento significativo de *Shigella* resistente a cefalosporinas de tercera generación, asociado a la producción de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Este aumento estuvo principalmente vinculado a *S. sonnei* (68%) y en menor medida a *S. flexneri* (14%) procedentes de HSH, que expresaban *bla*<sub>CTX-M-27</sub> y que además también presentaban resistencia al ciprofloxacino, la azitromicina o el cotrimoxazol. El análisis genómico mostró que los aislados de *S. sonnei* productores de BLEE formaban parte de un clúster monofilético, que incluía aislados obtenidos previamente en el Reino Unido y en Australia, sugiriendo una diseminación local e intercontinental. Así mismo describimos por primera vez la transmisión clonal de *S. flexneri* 2a productora de BLEE y resistente a las fluoroquinolonas entre HSH.

La transmisión de enterobacterias multirresistentes no patógenas por vía sexual está escasamente estudiada. Con el fin de confirmar este hecho, estudiamos la

colonización por parte de estos microorganismos en HSH que acudían a realizarse un cribado de ITS en el centro de Enfermedades Transmisibles Vall d'Hebron-Drassanes (Barcelona). Este estudio reveló que un 17,5% de los pacientes HSH eran portadores *Escherichia coli* productor de BLEE, prevalencia superior a la documentada previamente en la población general de Barcelona (4,7%). El análisis genómico de los aislados reveló que las BLEE más detectadas fueron SHV-12 (28,6%), CTX-M-15 (28,6%) y CTX-M-27 (19%). A su vez, se detectaron diversos mecanismos de resistencia a diferentes familias de antimicrobianos como las fluoroquinolonas, los macrólidos, el cotrimoxazol y las tetraciclinas; y diversos determinantes de virulencia asociados a la capacidad de colonización, adherencia, resistencia a suero y producción de toxinas. Por lo que respecta a la epidemiología molecular, los ST más prevalentes fueron el ST14 (28,6%) y el ST131 (19%). La distancia genética entre algunos de estos aislados fue muy estrecha, sugiriendo una transmisión reciente. Adicionalmente, en la comparación genética de nuestros aislados y los obtenidos en un estudio similar llevado a cabo en París, se observó que entre los aislados del ST14, las distancias eran también reducidas en algunos casos, sugiriendo la posible circulación de este linaje entre ambos países en HSH.

Los resultados recogidos en esta tesis demuestran la transmisión de *Shigella* y *E. coli* por vía sexual entre la comunidad HSH de Barcelona. Es de especial relevancia el incremento de la resistencia detectado en *Shigella* spp. en este colectivo y la interconexión con clones de distribución global, hecho que supone un riesgo importante para la salud pública. Estos resultados señalan la importancia de la vigilancia internacional colaborativa de microorganismos multirresistentes con el fin de identificar rápidamente su emergencia, así como la necesidad de implementar medidas que permitan el diagnóstico precoz y el rastreo de contactos para reducir su diseminación.

## Resum

*Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae* i *Shigella boydii* són els agents etiològics de la shigel·losi. Aquesta infecció als països amb rendes altes es relaciona amb viatges a regions endèmiques, encara que també s'ha documentat la seva adquisició per via sexual en homes que mantenen relacions sexuals amb homes (HSH).

Entre 2015-2019 es va identificar que el 55% i el 24,3% dels aïllats de *S. flexneri* i *S. sonnei*, respectivament, obtinguts al Servei de Microbiologia de l'Hospital Vall d'Hebron, van estar associats a HSH. Aquests aïllats mostraven una major resistència a diverses famílies d'antimicrobians, com són l'azitromicina o la ciprofloxacina, respecte als aïllats obtinguts per altres vies, com viatges a zones endèmiques. Addicionalment, les anàlisis filogenòmiques van permetre identificar llinatges específics de *S. flexneri* i *S. sonnei* circulants entre HSH amb una estreta relació genètica, que alhora eren pròxims als descrits en brots entre HSH del Regne Unit i Austràlia.

Posteriorment, durant 2020-2021, observem un augment significatiu de *Shigella* resistent a cefalosporines de tercera generació, associat a la producció de  $\beta$ -lactamases d'espectre estès (BLEE). Aquest augment va estar principalment vinculat a *S. sonnei* (68%) i en menor mesura a *S. flexneri* (14%) procedents de HSH, que expressaven *bla*<sub>CTX-M-27</sub> i que a més també presentaven resistència a la ciprofloxacina, l'azitromicina o el cotrimoxazole. L'anàlisi genòmica va mostrar que els aïllats de *S. sonnei* productors de BLEE formaven part d'un clúster monofilètic, que incloïa aïllats obtinguts prèviament al Regne Unit i a Austràlia, suggerint una disseminació local i intercontinental. Així mateix descrivim per primera vegada la transmissió clonal de *S. flexneri* 2a productora de BLEE i resistent a les fluoroquinolones entre HSH.

La transmissió d'enterobacteris multirresistents no patògens per via sexual està escassament estudiada. Amb la finalitat de confirmar aquest fet, estudiem la colonització per part d'aquests microorganismes en HSH que acudien a realitzar-se

un cribratge de ITS en el centre de Malalties Transmissibles Vall d'Hebron-Drassanes (Barcelona). Aquest estudi va revelar que un 17,5% dels pacients HSH eren portadors de *Escherichia coli* productor de BLEE, prevalença superior a la documentada prèviament en la població general de Barcelona (4,7%). L'anàlisi genòmica dels aïllats va revelar que les BLEE més detectades van ser SHV-12 (28,6%), CTX-M-15 (28,6%) i CTX-M-27 (19%). A més, es van detectar diversos mecanismes de resistència a diferents famílies d'antimicrobians com les fluoroquinolones, els macròlids, el cotrimoxazole i les tetraciclines; i diversos determinants de virulència associats a la capacitat de colonització, adherència, resistència al sèrum i producció de toxines. Pel que respecta a l'epidemiologia molecular, els ST més prevalents van ser el ST14 (28,6%) i el ST131 (19%). La distància genètica entre alguns d'aquests aïllats va ser molt estreta, suggerint una transmissió recent. Addicionalment, en la comparació genètica dels nostres aïllats i els obtinguts en un estudi similar dut a terme a París, es va observar que entre els aïllats del ST14, les distàncies eren també reduïdes en alguns casos, suggerint la possible circulació d'aquest llinatge entre tots dos països en HSH.

Els resultats recollits en aquesta tesi demostren la transmissió de *Shigella* i *E. coli* per via sexual entre la comunitat HSH de Barcelona. És d'especial rellevància l'increment de la resistència detectat en *Shigella* spp. en aquest col·lectiu i la interconnexió amb clons de distribució global, fet que suposa un risc important per a la salut pública. Aquests resultats assenyalen la importància de la vigilància internacional col·laborativa de microorganismes multirresistents amb la finalitat d'identificar ràpidament la seva emergència, així com la necessitat d'implementar mesures que permetin el diagnòstic precoç i el rastreig de contactes per a reduir la seva disseminació.

## Abstract

*Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae* and *Shigella boydii* are the etiologic agents of shigellosis. In high-income countries, this infection is associated with travel to endemic regions, although sexual acquisition in men who have sex with men (MSM) has also been documented.

During 2015-2019, the 55% and 24.3% of *S. flexneri* and *S. sonnei*, respectively, obtained at the Microbiology Department of the Vall d'Hebron Hospital, were associated with MSM. These isolates showed higher resistance rates to various antimicrobials, such as azithromycin or ciprofloxacin, compared to the isolates obtained by other sources, such as travel to endemic areas. The phylogenomic study allowed us to identify specific lineages of *S. flexneri* and *S. sonnei* circulating among MSM with a close genetic relationship, which in turn were close to those described in outbreaks among MSM from the United Kingdom and Australia.

Afterwards, during 2020-2021, a significant resistance increase to third-generation cephalosporins in *Shigella* was observed, which was associated with the production of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL). This increase was mainly found in *S. sonnei* (68%) and *S. flexneri* (14%) from MSM, encoding *bla*<sub>CTX-M-27</sub> and showing resistance to ciprofloxacin, azithromycin and/or cotrimoxazole. Genomic analysis showed that the ESBL-producing *S. sonnei* isolates were part of a monophyletic cluster, which included isolates previously obtained in the United Kingdom and Australia, suggesting a local and an intercontinental spread. We also describe for the first time the clonal transmission of ESBL-producing *S. flexneri* 2a resistant to fluoroquinolones among MSM.

The transmission of nonpathogenic multidrug resistant enterobacteria through sexual contact has been scarcely studied. To confirm this, we studied the colonization by these microorganisms in MSM who attended the Vall d'Hebron-Drassanes Communicable Diseases Center (Barcelona) for a STI screening. This study revealed that 17.5% of MSM were carriers of an ESBL-producing *Escherichia coli*, a higher prevalence than the previously documented in the general population of

Barcelona (4.7%). The genomic analysis of the isolates revealed that the most detected ESBLs were SHV-12 (28.6%), CTX-M-15 (28.6%) and CTX-M-27 (19%). Additionally, other resistance mechanisms to different antimicrobials families, such as fluoroquinolones, macrolides, cotrimoxazole and tetracyclines, were detected. Also, virulence determinants were identified associated with colonization capacity, adherence, serum resistance and toxin production. Regarding molecular epidemiology, the most prevalent STs were ST14 (28.6%) and ST131 (19%). The genetic distance between some of these isolates was very close, suggesting a recent transmission. Additionally, in the genetic comparison of our isolates and those obtained in a similar study carried out in Paris, it was observed a low genetic distance between several isolates belonging to ST14, suggesting the circulation of this lineage between both countries in MSM.

The results included in this thesis demonstrate the sexual transmission of *Shigella* and *E. coli* among the MSM community of Barcelona. Of special relevance is the increase in resistance detected in *Shigella* spp. in this group and the interconnection with clones of global distribution. These results reinforce the importance of collaborative international surveillance of multidrug resistant microorganisms for rapid identification of its emergence as well as the need to implement measures that allow early diagnosis and contact tracing of cases among MSM to reduce its dissemination.

# Introducción



### 1. *Shigella*

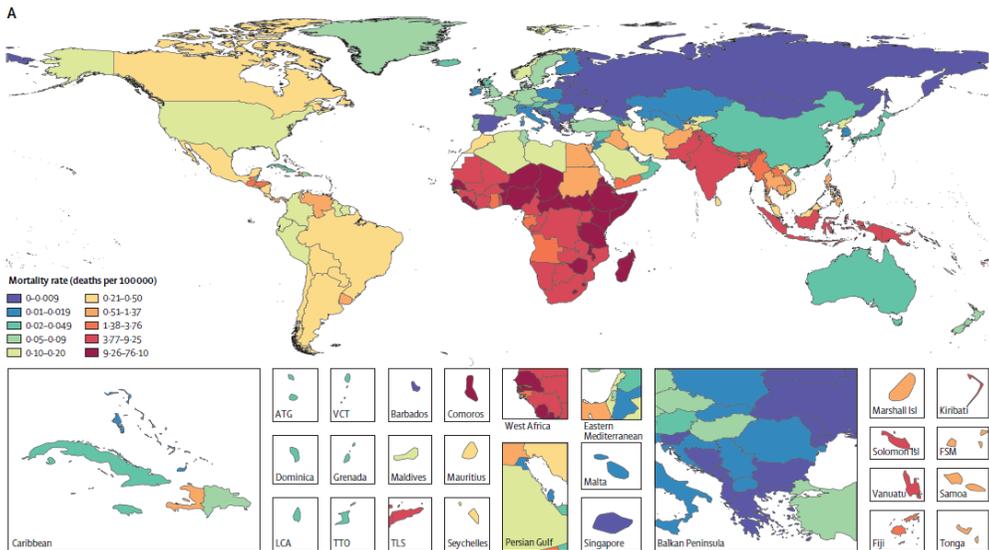
En la Grecia antigua, Hipócrates (460-377 A.C.) utilizó “disentería” para designar la evacuación dolorosa y frecuente de heces sanguinolentas y mucosas. No fue hasta el siglo XIX cuando la amebiasis y la disentería bacilar fueron separadas, describiéndose por primera vez en 1898 por Kiyoshi Shiga la presencia de bacterias en heces procedentes de pacientes con disentería. Estas las denominó *Bacillus dysenteriae* por su similitud con el previamente descrito *Bacillus coli* (*E. coli* en la actualidad). En 1940 se acordó establecer el género *Shigella* para agrupar 4 especies descritas los años anteriores basado en análisis serológicos: *Shigella dysenteriae* (serogrupo A), *Shigella flexneri* (serogrupo B), *Shigella boydii* (serogrupo C) y *Shigella sonnei* (serogrupo D). Estas se subdividen en serotipos basados en el reconocimiento por anticuerpos de las diferentes estructuras del antígeno O, en el caso de *S. dysenteriae* son 15, 14 en *S. flexneri*, 20 en *S. boydii* y finalmente *S. sonnei* solo dispone de un serotipo [1–3].

Basado en estudios genómicos, se ha observado que las cuatro especies del género *Shigella* en realidad forman parte de una única especie junto a *Escherichia coli*, siendo por tanto consideradas un patotipo de esta especie. Sin embargo, se mantiene como un género diferente por razones históricas [2,4]. *Shigella* es el principal agente etiológico de la shigelosis, la cual afecta a humanos y a algunos primates. Esta es una infección gastrointestinal caracterizada por la invasión del epitelio colono-rectal. Su transmisión se produce por vía fecal-oral, ya sea por contacto directo entre personas o indirecto a través de comida o agua contaminada. Asimismo, las moscas también podrían jugar un papel importante en la transmisión del microorganismo, sobre todo en climas tropicales. La dosis infectiva de *Shigella* es baja, se estima alrededor de 10 a 100 bacterias, hecho que la hace altamente transmisible. *E. coli* enteroinvasivo (EIEC) posee muchos de los determinantes de virulencia presentes en *Shigella*, produciendo una patología indistinguible, aunque la dosis infectiva estimada es 1000 veces superior [2,5,6].

En la mayoría de los casos, la shigelosis es una infección autolimitada, que tras entre uno a cuatro días de incubación, puede producir desde una diarrea leve hasta una diarrea mucoide sanguinolenta acompañada de calambres abdominales dolorosos, fiebre y tenesmo (esfuerzo improductivo y doloroso). Los pacientes suelen recuperarse en un periodo de siete a diez días, aunque pueden producirse complicaciones poco frecuentes que incluyen: anomalías metabólicas, sepsis, convulsiones, prolapso rectal, megacolon tóxico, perforación intestinal y síndrome hemolítico-urémico. El rango sintomático depende de la especie causante de la infección, *S. dysenteriae* es la especie más virulenta; y del estado inmune del paciente, siendo las personas con problemas de malnutrición o inmunocomprometidas las más susceptibles a complicaciones [3,5,6].

### I. Epidemiología

La shigelosis es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad infantil. Se estima que en 2016 causó 212.438 muertes globalmente, siendo la segunda causa de muerte por diarrea a nivel mundial en todas las franjas de edad. Aun así, la tasa de mortalidad habría disminuido en un 55,5% desde 1990, año en el cual se registraron 6,45 muertes por 100.000 personas, y 2016 con una estimación de 2,87 muertes por 100.000 personas. En cuanto a distribución geográfica, la cual se puede observar en la **Figura 1**, el mayor número de muertes por 100.000 personas por shigelosis en todas las edades se registró en el este del África sud-Sahariana (3,8 muertes por 100.000), aunque el número total fue superior en el sur de Asia también conocida como Asia meridional o Asia del sur, la cual comprende el subcontinente indio y Afganistán. En cuanto a la mortalidad en menores de 5 años fue muy superior en el este y el oeste del África sud-Sahariana (8,8 y 8 muertes por 100.000, respectivamente) [7].



**Figura 1:** Mapa sobre ratio de mortalidad por *Shigella* por cada 100.000 personas en 2016 para todas las edades por países. ATG=Antigua y Barbuda. VCT= San Vicente y las Granadinas. LCA=Santa Lucia. TTO=Trinidad y Tobago. Isl=Islas. FSM= Estados Federados de Micronesia. TLS= Timor Oriental Tomado de Khalil et al. 2018 [7].

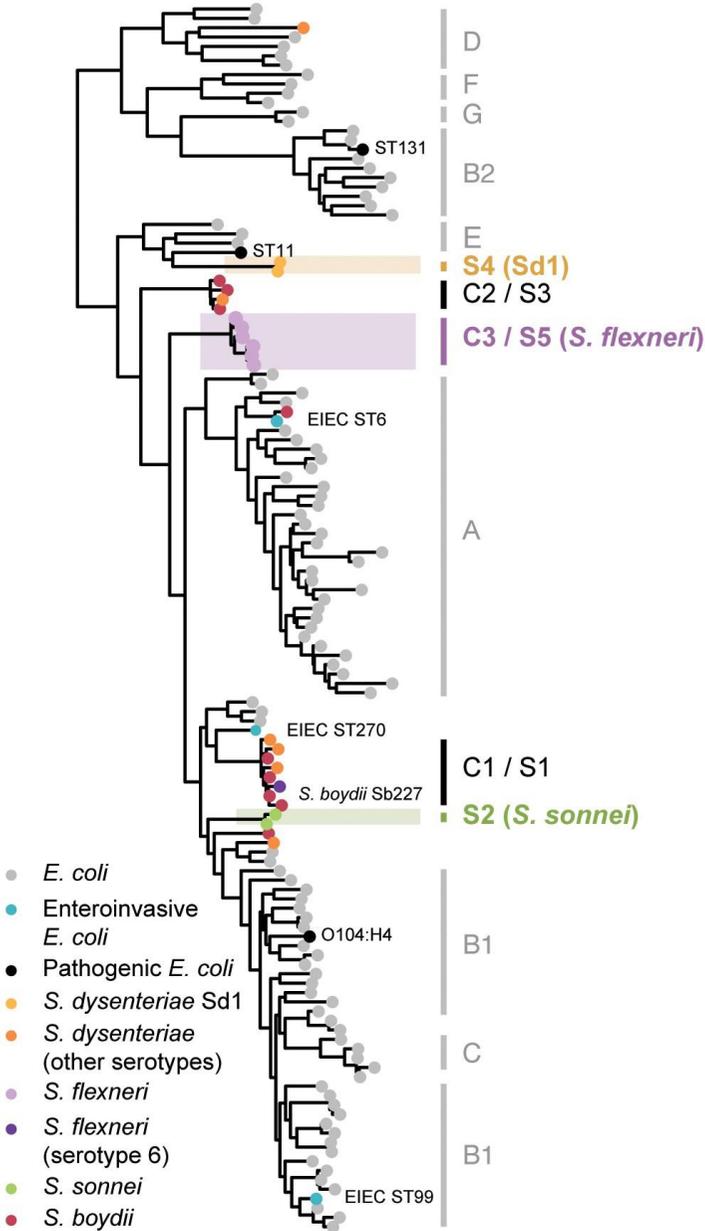
Varios estudios concluyen que las especies de *Shigella* se distribuyen mundialmente con relación al nivel económico del país. *S. flexneri* es la especie más prevalente a nivel global y se detecta principalmente en países de rentas bajas. Por el contrario, *S. sonnei* es más frecuente en países de rentas altas. Recientemente, en países en los que se ha experimentado un crecimiento económico importante como China, se ha detectado una disminución de *S. flexneri* en favor de *S. sonnei*. Las razones por las cuales se produce un incremento de *S. sonnei* contra-intuitivo en países en los que a raíz del crecimiento económico se prevé una mejora del saneamiento del agua están aún por determinar. No obstante, una de las hipótesis es que el aumento de la salubridad del agua ha producido una disminución de *Plesiomonas shigelloides*, el cual comparte antígeno O con *S. sonnei*, lo que podría haber reducido la inmunidad por protección cruzada de la población. Otra posible hipótesis es que *S. sonnei* presente una capacidad más elevada de adquisición y mantenimiento de elementos genéticos móviles en los que se encuentren codificados determinantes de resistencia

a antibióticos, hecho que le otorgaría una ventaja respecto a *S. flexneri*, aunque esta afirmación sigue siendo discutida. No obstante, se prevé que a medida que más países mejoren la calidad del agua, *S. sonnei* incrementará su prevalencia [8–10].

*S. dysenteriae* y *S. boydii* son especies menos prevalentes, se estima que producen en torno a un 10% de los casos de shigelosis. *S. boydii* se detecta principalmente en Bangladesh y el sudeste asiático y *S. dysenteriae* tipo 1 es responsable de brotes epidémicos puntuales que se diseminan rápidamente y muchas veces están asociados con guerras o hambruna como los detectados en Ruanda entre el 1993-1995, en Sierra Leone en el 1999 o los brotes cíclicos que se observan en Bangladesh [8,11].

### II. Estructura poblacional

Los análisis genómicos de las cuatro especies de *Shigella* junto con genomas de *E. coli* han demostrado que el género *Shigella* tiene un origen parafilético, por lo que habría evolucionado diversas veces de forma independiente de *E. coli*. Asimismo, no solo el origen del género *Shigella* es parafilético, tal y como se puede observar en la **Figura 2**, también las especies *S. dysenteriae*, *S. flexneri* y *S. boydii* muestran un origen parafilético respectivamente, siendo *S. sonnei* la única especie que presenta un origen monofilético [12–14]. *S. flexneri* está formada por dos linajes monofiléticos, uno formado por el serotipo 6, el cual junto algunos serotipos de *S. boydii* y *S. dysenteriae* formó parte del clado C1/S1 siguiendo la nomenclatura de Yang et al 2007 y Sahl et al 2015, y por otro lado, el resto de serotipos de *S. flexneri* (1-5, X,Y), que formaron el clado C3/S5 [11,13,15,16].



**Figura 2:** Arbol filogenético de *E. coli*. Arbol de máxima verosimilitud de los genes “core” de genomas de referencia de *Shigella* y *E. coli*. Los filogrupos de *E. coli* están señalados en gris, y los clados de *Shigella* están nombrados con una C la nomenclatura de Yang et al 2007 y con una S la de Sahl et al 2015. Tomado de Hawkey et al. 2020 [13].

La adaptación de las diversas especies de *Shigella*, así como los linajes de EIEC, para la invasión y crecimiento intracelular está asociado a la adquisición de

elementos genéticos móviles por transmisión horizontal, como son islas genómicas y el plásmido de invasión (pINV) que codifican los factores de virulencia necesarios para el desarrollo la infección, así como la inactivación de genes [2,13]. Respecto a esto último, *Shigella*, al igual que otros patógenos humanos estrictos como *Yersinia pestis*, *Mycobacterium leprae* y *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi, en su proceso de adaptación han estado sometidos a procesos de reducción genómica, hecho que ha sucedido de forma convergente en las diferentes especies de *Shigella* como consecuencia de la adaptación a un crecimiento intracelular. Los cromosomas de las especies de *Shigella* tienen de media 4,6 Mbp, siendo sustancialmente más pequeños a los de otros *E. coli*, cuyo tamaño medio es de 4,9 Mbp. El linaje de *Shigella* con un cromosoma más pequeño es el de *S. dysenteriae* tipo 1 con 4,3 Mbp y con un menor número de genes codificantes. Esta reducción, debida a deleciones, mutaciones sin sentido y la participación de secuencias de inserción (IS), han producido entre otros aspectos la inactivación de la síntesis de flagelo y fimbrias, lo que ha contribuido a reducir su inmunogenicidad y favorecer la evasión del sistema inmune. También se han eliminado diversas vías metabólicas presentes en *E. coli* las cuales podrían interferir con la síntesis de factores de virulencia adquiridos o en la adaptación a un crecimiento intracelular con mayor disponibilidad de nutrientes [1,13,17].

### *Shigella sonnei*

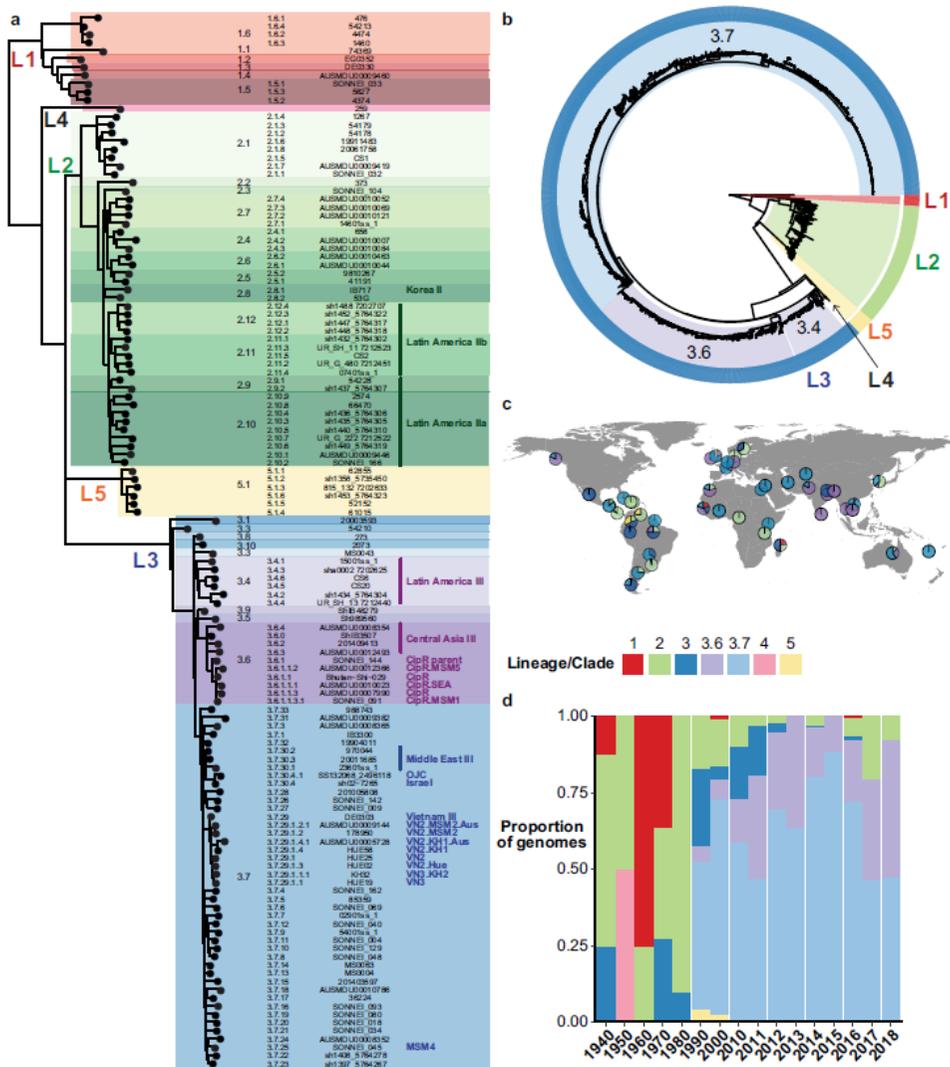
La población de *S. sonnei* tiene un origen monofilético y puede dividirse en cinco grandes linajes. En un estudio de Holt *et al.* 2012 en el cual caracterizaron la filogenia de aislados a nivel mundial, Europa fue la región donde se detectó la mayor variabilidad de linajes detectando la misma proporción de los Linajes I, II y III. Por el contrario, en Asia, África y América del Sur y Central el linaje mayoritario fue el Linaje III, siendo el linaje más exitoso mundialmente en la actualidad. Posteriormente, Hawkey *et al.* 2021 desarrollaron un método de genotipado para facilitar la notificación y comparación de sublinajes circulantes entre países, integrando la nomenclatura de linajes descrita previamente. Para ello, aplicaron una codificación numérica jerárquica formada por

[linaje].[clado].[subclado], en la que linaje son los cinco linajes descritos por Holt *et al.* 2012. Además, a aquellos genotipos de importancia epidemiológica les pusieron un nombre para facilitar su uso, por ejemplo, el genotipo 3.6.1.1.2 se nombró CipR.MSM5 (**Figura 3**). En cuanto a las prevalencias de los clados, los clados 3.6 y 3.7 (pertenecientes al Linaje III) fueron los más detectados entre los genomas estudiados en todos los continentes, a excepción de América del Sud (**Figura 3.c**). Además, desde 1990 también son los más detectados a nivel mundial (**Figura 3.d**) [18,19].

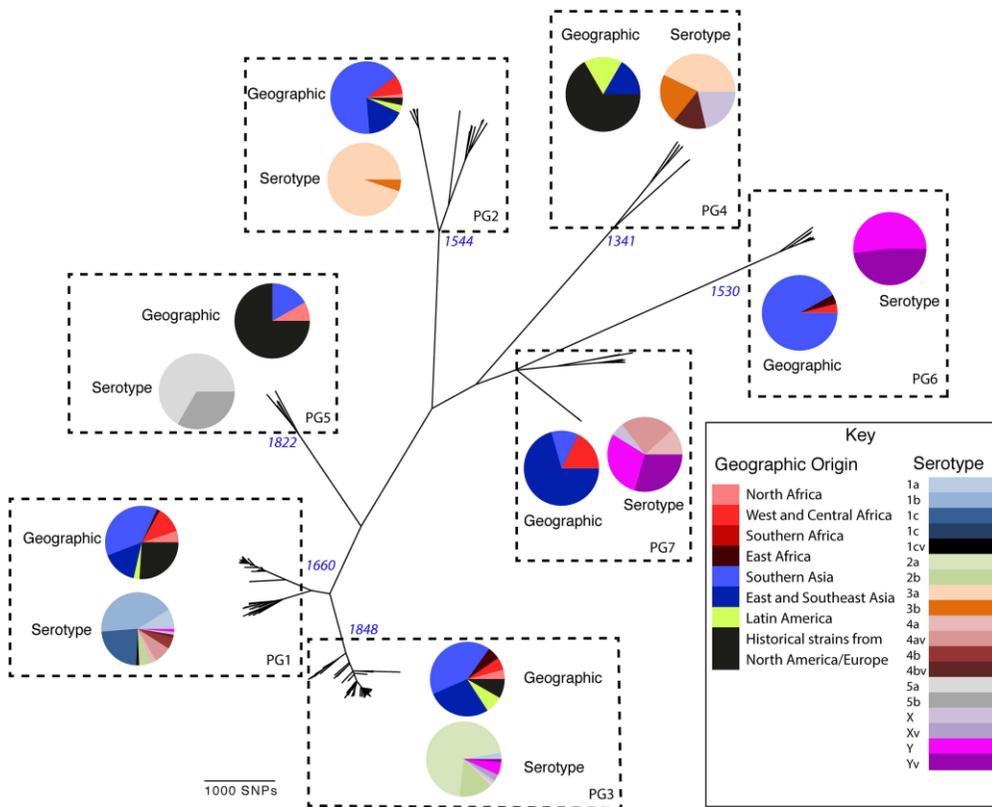
### *Shigella flexneri*

Como se ha comentado anteriormente, *S. flexneri* presenta dos orígenes diferentes, por un lado, los aislados pertenecientes al serotipo 6 que se muestran más cercanos evolutivamente a *S. boydii* de los serotipos 2, 4 y 14 [20], y por otro lado, los serotipos (1-5, X, Y) los cuales tienen un origen monofilético independiente y son los responsables de la mayor parte de casos de shigelosis por *S. flexneri*. Connor *et al.* 2015 realizaron un estudio filogenético de los serotipos 1-5, X, Y y observaron que la población se estructura alrededor de siete filogrupos (FGs) (**Figura 4**). Estos FGs presentan una distancia evolutiva mayor a 1000 SNPs entre sí, y cada uno puede contener aislados pertenecientes a distintos serotipos, debido a que genes que determinan el serotipo se codifican en elementos genéticos móviles. No obstante, se observan ciertas asociaciones mayoritarias entre FGs y serotipos. Así, por ejemplo, el FG 2 se asocia mayoritariamente al serotipo 3a, el FG 3 al serotipo 2a y 2b, el FG 1 con serotipos 1a, 1b, 1c, etc. Al contrario que *S. sonnei*, en *S. flexneri* se observa una coexistencia de diversos FGs en una misma área geográfica. Regiones en las que *S. flexneri* es endémica, detectaron simultáneamente al menos dos FGs o también la coexistencia de sublinajes; siendo el sur de Asia la región que presentó más FGs diferentes. Los FGs 1, 2 y 3 fueron los detectados en más regiones diferentes, mientras que FGs 4, 5, 6 y 7 tuvieron una distribución más limitada [11].

# Introducción



**Figura 3** Evolución de los linajes en *S. sonnei*. a) Filogenia de máxima verosimilitud de un representante de cada genotipo de *S. sonnei* enraizado con un *E. coli*. En la primera columna se muestran los clados, en la segunda columna el genotipo, en la tercera columna el nombre de la cepa utilizada y en la cuarta columna los nombres de aquellos genotipos con importancia epidemiológica. b) Árbol de máxima verosimilitud con *E. coli* como enraizamiento. c) frecuencia de los linajes/clados por región geográfica. d) frecuencias de los linajes/clados por década/año. (Tomado de Hawkey et al. 2021 [18]).



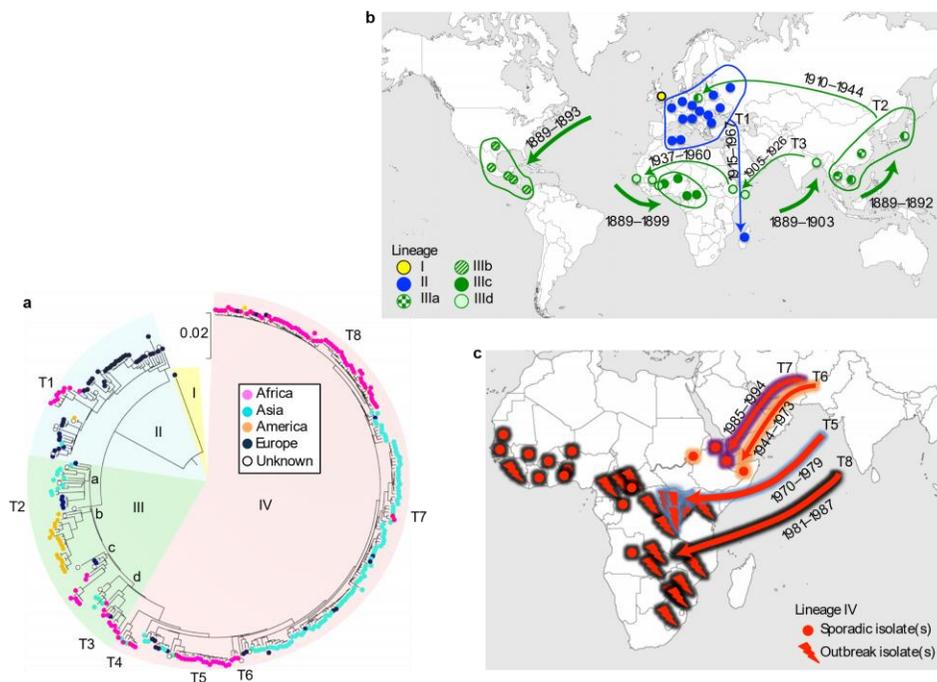
**Figura 4** Filogenia de máxima verosimilitud de aislados *S. flexneri* de los serotipos 1-5, X e Y en el que se detallan los Grupos filogenéticos (PG) desarrollados por Connor et al. 2015 mediante un análisis bayesiano. En los rectángulos discontinuos se presentan los serotipos y distribución geográfica de cada PG en gráficos circulares. Tomado de Connor et al. 2015 [11].

### *Shigella boydii* y *Shigella dysenteriae*

La historia evolutiva y la estructura poblacional de *S. boydii* y *S. dysenteriae* no tipo 1 sigue sin comprenderse claramente en la actualidad. Los genomas de ambas especies están distribuidos en múltiples clados, coincidiendo en el clado C2/S3, en el que se detectan múltiples serotipos de *S. dysenteriae* no tipo 1 y *S. boydii*; y el clado C1/S1, clado en el que se encuentra *S. flexneri* serotipo 6, *S. boydii* y *S. dysenteriae* no tipo 1. Además, genomas de *S. dysenteriae* no tipo 1 formaron parte del filogrupo D de *E. coli* (**Figura 2**) [13]. Un estudio sobre *S. boydii* describió la presencia de 3 clados en la especie, el clado 1 corresponde con el C2/S3 y los clados 2 y 3 junto a otro de *S. dysenteriae* corresponden al C1/S1[21].

## Introducción

En cuanto a la población de *S. dysenteriae* tipo 1, en el análisis filogenómico de Njamkepo *et al.* 2016, identificaron cuatro grandes linajes, los cuales se han ido sucediendo temporalmente (**Figura 5**). Como se comentaba anteriormente, los casos de *S. dysenteriae* tipo 1 están muy asociados a brotes epidémicos, y desde 1990 todos los brotes en África han estado causados por el linaje IV a excepción del brote que tuvo lugar en el norte de República Centroafricana en 2004 causado por el sublinaje IIIc. Además, el análisis geográfico y temporal identificó diversos eventos de transmisión intercontinental (señalizados en la **Figura 5** como T). A excepción de T1 y T2 que los eventos involucraron a Europa y Madagascar en el caso de la T1 y a Polonia y el este de Asia en la T2, el resto de los eventos fueron brotes originados en el sur de Asia afectando principalmente el este de África (**Figura 5 B y C**) [22].



**Figura 5** Distribución geográfica y patrón de transmisión de los linajes de *Shigella dysenteriae* tipo 1. a) Análisis de máxima verosimilitud de los 332 genomas estudiados, mostrando los cuatro linajes: I al IV; los cuatro sublinajes del linaje III: IIIa, IIIb, IIIc y IIId; el círculo muestra el continente de aislamiento; Las transmisiones intercontinentales se muestran del T1 al T8. b) Mapa de la dinámica de

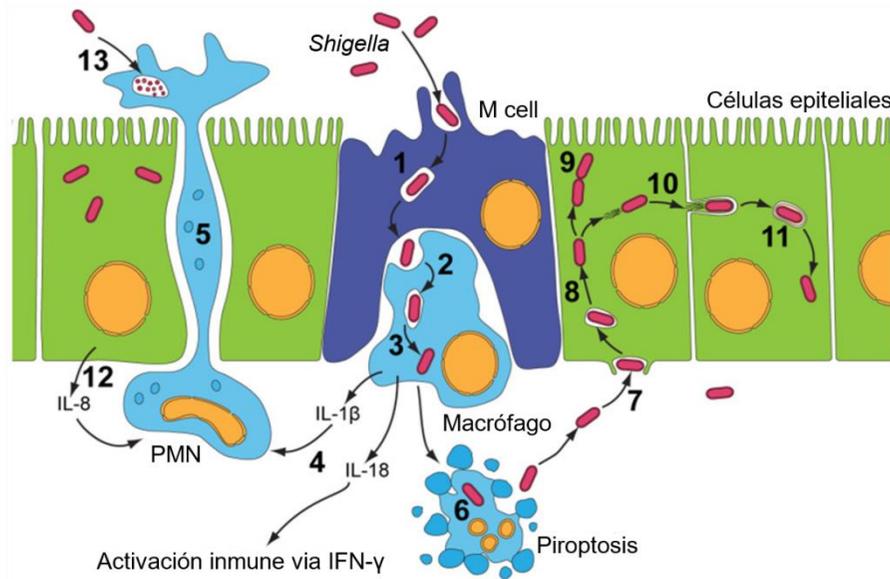
## Introducción

los linajes I, II y III. Se indica la presencia geográfica (círculos), las llegadas inferidas (flechas gruesas) y principales eventos de transmisión a larga distancia (flechas finas). Los rangos de fechas que se muestran para los eventos de transmisión son los valores medianos para el MRCA (tomado de BEAST). c) Mapa de la dinámica del linaje IV. Presencia geográfica (círculos, símbolo de relámpago). La asignación a un evento de transmisión se indicó mediante un halo de color. Tomado de Njamkepo et al. 2016 [22]

### III. Patogénesis

El proceso patogénico más estudiado es el desarrollado por *S. flexneri*, ya que tal y como se ha comentado anteriormente, es la especie más prevalente. *Shigella*, en el proceso de invasión al huésped (**Figura 6**), tras resistir las condiciones fisicoquímicas en su tránsito por el tracto digestivo, debe atravesar la capa mucosa del colon. Este proceso se puede dar por dos vías, a través de las células M (del inglés microfold cell) o por inestabilidades en el epitelio producida por leucocitos polimorfonucleares. Las células M son células especializadas del epitelio intestinal cuya función es tomar muestras de partículas de la luz intestinal y presentarlas al tejido linfóide de la mucosa subyacente. *Shigella* es transportada por estas células a la cara basolateral del epitelio, donde es fagocitada por células presentadoras de antígenos como macrófagos o células dendríticas (**Figura 6**: sección 1 y 2). Rápidamente, la bacteria es capaz de lisar el fagosoma en un proceso mediado por el sistema de secreción tipo III (T3SS) y posteriormente activa un proceso de lisis inflamatoria de muerte celular llamado piroptosis (**Figura 6**: sección 3 y 6). Como consecuencia de este proceso, se secretan citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  y IL-18 y *Shigella* es liberada. Una vez libre en la cara basolateral por cualquiera de los dos procesos, *Shigella* induce su absorción mediante macropinocitosis por parte de las células epiteliales (**Figura 6**: sección 7). Posteriormente utiliza el T3SS para subvertir el citoesqueleto de la célula y escapar de la vacuola. Ya en el citosol, *Shigella* se multiplica y se propaga a células vecinas [1,3,5]. La respuesta inmunitaria innata del huésped a la invasión epitelial produce un reclutamiento masivo de neutrófilos y la efusión de citoquinas inflamatorias, que finalmente, eliminan la infección por *Shigella* del epitelio colónico. No obstante, la erradicación en esta localización se produce a costa de la producción de abscesos

epiteliales y ulceraciones, que pueden permitir una mayor invasión de *Shigella* a través de una barrera epitelial alterada [23].



**Figura 6** Ciclo infeccioso de *Shigella*. La entrada en el epitelio del colon se produce por dos vías: el transporte por las células M y desestabilización de la membrana epitelial. Entrada a través de las células M donde es transportada a la cara basolateral del epitelio (1), donde macrófagos residentes lo someten a endocitosis (2). La inducción de la muerte de macrófagos ocurre después de que *Shigella* escape de la vacuola fagocítica (3 y 6). *Shigella* es captada en la membrana basolateral de las células epiteliales en un proceso de micropinocitosis (7). La lisis de la vacuola macropinocítica permite que *Shigella* acceda al citoplasma epitelial, donde se multiplica rápidamente, escapa a la autofagia y fragmenta el aparato de Golgi (8 y 9). *Shigella* estimula la polimerización de actina que le permite moverse tanto intra como intercelularmente (10 y 11). Por otro lado, cuando se activa Caspasa-1, escinde y activa IL-1 $\beta$  e IL-18, lo que lleva a la liberación de estas citocinas proinflamatorias (4). Estas citocinas, junto IL-8 producidas por las células epiteliales vecinas, median la destrucción de la barrera epitelial (12). IL-8 recluta leucocitos polimorfonucleares (PMN) que viajan desde el epitelio colónico basolateral a la apical, desestabilizando las uniones entre las células epiteliales y permitiendo una mayor invasión de *Shigella* (5). Finalmente, Los leucocitos PMN eventualmente eliminan la infección por *Shigella* del epitelio colónico (13). Tomado de Mattock y Blocker 2017 [3].

### Factores de virulencia

#### Sistema de secreción tipo III (T3SS)

Los T3SS son sistemas utilizados por las bacterias para el transporte de proteínas a células eucariotas huéspedes conocidas como efectores. En el caso de *Shigella*, el T3SS facilita la invasión de las células epiteliales del colon y permite modular la respuesta inflamatoria del huésped en su beneficio. Concretamente, el T3SS es una

## Introducción

estructura con una forma similar a una aguja compuesta de tres partes, entre las que se encuentra, un cuerpo basal con una base multi anillo que permite su anclaje a la membrana interna y externa de la bacteria, la “aguja” y la punta que forma el canal translocador eucariota, formado por IpaB, IpaC e IpaD que crean un poro en la membrana de la célula del huésped [24].

Los genes necesarios para la síntesis del T3SS están codificados en un clúster de genes de 32kb denominado “*Shigella Entry Region*” el cual está a su vez en el plásmido pINV. Esta estructura está formada por tres operones, el operon *ipa* (*invasión plasmid antigens*), que lo forman los genes *ipa* (*ipaBCDA*), *ipgCBA*, *icsB* y *acp*, el operon *mxi* (*membrane expresión of ipa*), que lo forman los *ipgDEF* y los genes *mxi* (*mxiGHIJKLMEDCA*), y el operon *spa* (*surface presentation of ipa*), el cual contiene nueve de los genes *spa* (*spa15*, *spa47*, *spa13*, *spa32*, *spa33*, *spa24*, *spa9*, *spa29* y *spa40*) [24].

La expresión de los operones está regulada por diversos factores con el fin de que se expresen solamente cuando sea necesario y así conservar energía. Uno de los factores que interviene en su expresión es la temperatura, la cual está mediada por el regulador *heat-stable nucleoid-structuring* (H-NS), uno de los principales reguladores en *Escherichia* y uno de los principales componentes de la cromatina bacteriana. Este actúa como represor de los activadores transcripcionales *virF* y *virB* y se desactiva a 37°C. *VirF* es un activador transcripcional primario, que activa los promotores de *virB* e *icsA*. *VirB* es un activador transcripcional secundario del T3SS que activa los promotores de *ipa*, *mxi* y *spa*. Otros factores que afectan a la expresión son: (i) el estrés osmótico que -en condiciones de baja osmolaridad- afecta a la chaperona Hfq de ARN disminuyendo la estabilidad del mRNA de *virB*; (ii) el pH afecta a la expresión de *virF*, viéndose esta atenuada en pH inferiores a 6 y activada a 7.4; (iii) la concentración de oxígeno también tiene un efecto en la regulación, ya que esta aumenta cerca del epitelio del colon. El proceso está mediado por el regulador del metabolismo anaerobio FNR, el cual en presencia de

oxígeno se disocia del promotor de *spa32* y *spa33*, permitiendo así su transcripción [5,24].

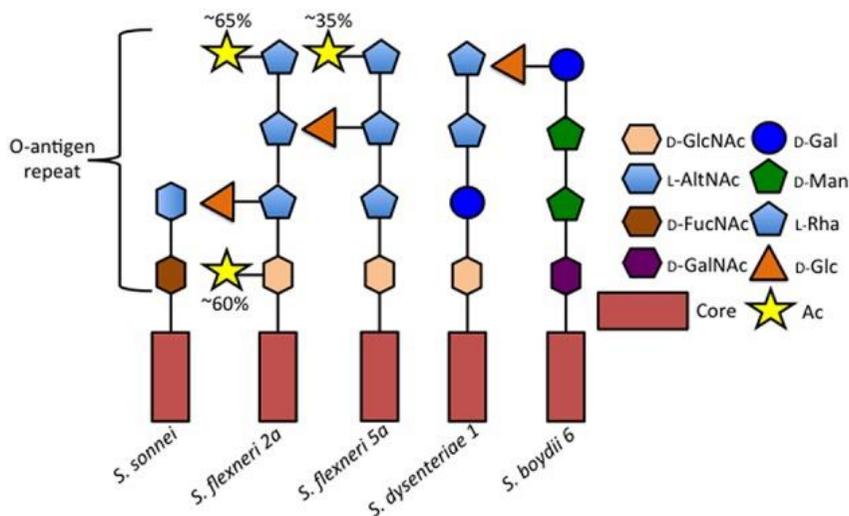
### Efectores

Como se ha comentado anteriormente, los efectores son proteínas producidas por las bacterias, que mediante el T3SS son inyectadas en el citoplasma de las células del huésped. *Shigella* posee alrededor de 25 efectores en el pINV y entre 5 y 7 más codificados en el cromosoma [1]. Debido al tamaño del poro generado por el T3SS (~2–3 nm diámetro), los efectores se transportan en un estado parcialmente desplegado y deben volver a plegarse cuando alcanzan el citoplasma de la célula huésped. Ciertas proteínas chaperonas ayudan a preservar el estado desplegado de los efectores a medida que pasan por el T3SS [24].

Al igual que el T3SS, la expresión de los efectores está contralada para conservar energía y no todos son expresados a la vez. La primera ola de efectores está regulada por *virB*, junto a los genes que forman parte del T3SS, entre los que se encuentran *ospC2*, *ospC3*, *ospC4*, *ospD1*, *opsoD2*, *ospZ* e *iscP* [5,24]. La función de estos efectores está relacionada con la subversión del citoesqueleto de la célula huésped, la mediación en el escape vacuolar y procesos implicados en la invasión del epitelio [5]. Posteriormente, cuando el T3SS entra en contacto con el colesterol y con balsas lipídicas de la membrana celular del huésped, se activa, produciéndose la secreción de IpaB e IpaC y liberando la chaperona IpgC. A su vez, Osp1 también es secretado y disminuye la inhibición del activador transcripcional MixE. MixE e IpgC crean un complejo activado MixE-IpgC que activa la transcripción de efectores de "segunda ola", entre los que se encuentran *ospD3*, *ospE1*, *ospE2*, *ospG*, *ipaH1.4*, *ipaH4.5*, *ipaH7.8*, e *ipaH9.8* [5,24]. Una vez en el epitelio, la segunda ola de efectores facilitan la replicación, asegurando la integridad del nicho citosólico y las condiciones favorables, mediante la amortiguación de la respuesta inflamatoria del huésped, promoviendo la supervivencia de la célula huésped y contrarrestando los procesos antimicrobianos [5].

### Lipopolisacárido y capsula

El lipopolisacárido (LPS) en *Shigella* presenta una gran variabilidad de composiciones, modificaciones y repeticiones del antígeno O, lo que se traduce en la variabilidad de serogrupos, tal y como se puede observar en la **Figura 7** [3,8].



**Figura 7** Comparación de antígenos O de algunas *Shigella* representativas. Representación esquemática de Anderson et al. 2016, del antígeno O de los serotipos *S. sonnei*, *S. flexneri* 2<sup>a</sup>, *S. flexneri* 5a, *S. dysenteriae* 1 y *S. boydii* 6. Abreviaciones: Acetamido-2-deoxy-D-glucose (D-GlcNAc), 2-Acetamido-2-deoxy-L-altruronic acid (L-AltNAc), 2-Acetamido-4-amino-2, 4-dideoxy-D-fucose (D-FucNAc), 2-Acetamido-2-deoxy-D-galacturonic acid (D-GalNAc), D-Galactopyranose (D-Gal), D-Mannose (D-Man), L-Rhamnose (L-Rha), D-Glucose (D-Glc), O-acetyl (Ac). (Tomado de Anderson, Sansonetti, y Marteyn 2016 [8]).

Algunas especies, como *S. flexneri*, presentan la capacidad de reducir la longitud el antígeno O por glucosilación, hecho que mejora la accesibilidad del T3SS a la superficie del epitelio para iniciar la invasión [3]. A diferencia de *S. flexneri*, que es la especie más estudiada, se desconoce si *S. sonnei* posee la capacidad de producir esta longitud bimodal del antígeno O [25].

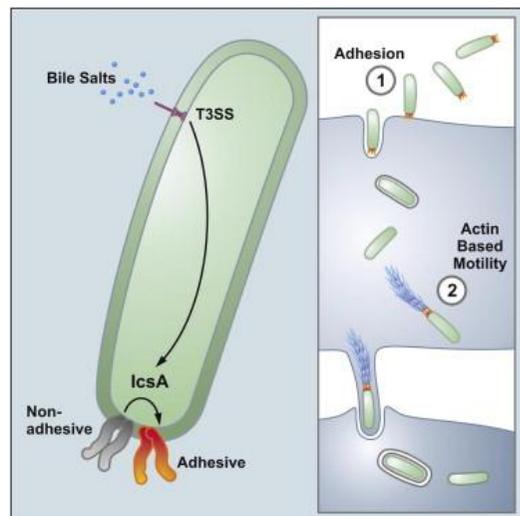
*Shigella* se han considerado clásicamente como bacterias no capsuladas, aunque se ha descubierto que *S. sonnei* presenta una cápsula. Las cápsulas de *E. coli* se han clasificado históricamente basándose en criterios genéticos y bioquímicos, y la detectada en *S. sonnei* formaría parte del Grupo 4 o Cápsulas de antígeno O, por su estructura similar a las cadenas de Antígeno O del LPS. Se ha observado que un

antígeno O largo en *S. flexneri* 2a proporciona resistencia a la actividad bactericida del suero mediada por el complemento, y la cápsula de *S. sonnei* cumple esta misma función. Se desconoce si la expresión de la cápsula está regulada durante la patogénesis, ya que supone una desventaja en el proceso de invasión del epitelio debido a que el T3SS es menos accesible [25].

### Adhesión y movilidad

Como se ha comentado anteriormente, *Shigella* no presenta ninguno de los sistemas de adhesión y movilidad comunes en *E. coli* como son pilli, fimbrias o flagelos, por lo que emplea otras estrategias para adherirse a las células del huésped. En primer lugar, es posible que las interacciones débiles glicano-glicano entre el LPS y el mucus permitan a la bacteria permanecer en contacto con las células epiteliales para favorecer la inserción del T3SS. Adicionalmente, se ha observado que en presencia de sales biliares se induce la secreción de los efectores OspE1 y OspE2, las cuales permanecen anclados a la membrana exterior de *Shigella* e incrementan su adherencia [1,5].

A su vez, se ha observado que el autotransportador IcsA, el cual se encuentra en la membrana externa de forma asimétrica, tal y como se puede observar en la **Figura 8**, presenta una doble función en el proceso de patogénesis, una adhesiva y otra como mediador en proceso de movilidad basada en actinas. En contacto con sales biliares se producen un cambio en IcsA transformándose en una molécula adhesiva al epitelio, aunque se desconoce el mecanismo. Una vez *Shigella* se encuentra en el citosol de la



**Figura 8** Representación gráfica de la doble función de IcsA. A la izquierda proceso de activación de la funcionalidad adhesiva en presencia de sales biliares y a la derecha se muestra el proceso de adhesión (1), seguido de la movilidad (2). (Tomado de Brotcke Zumsteg et al. 2014 [163]).

## Introducción

célula epitelial, IcsA imita a GTPase Cdc42 para mediar la polimerización de actinas. El filamento de actinas resultante proporciona a *Shigella* propulsión para desplazarse por el citosol e inducir protuberancias en la membrana de células vecinas que facilitan la propagación célula-célula. La localización polar de IcsA es importante para impulsar el movimiento unidireccional de la bacteria [5]

Finalmente, se ha detectado en el genoma de *S. sonnei*, *S. boydii* y *S. dysenteriae* un gen intacto que codifica una molécula de adhesión multivalente (MAM) (SS01327) que presenta siete dominios de entrada a células de mamífero. SSO1327 codifica un MAM funcional en *S. sonnei*, que se expresa en la superficie bacteriana y que junto a IcsA son esenciales para el inicio de la translocación de efectores mediada por T3SS [26].

## Toxinas

Las toxinas permiten a los patógenos su difusión en tejidos ya que pueden desestabilizar las células del huésped o quebrantar su integridad [27]. *Shigella* presenta las enterotoxinas 1 y 2 (*Shigella enterotoxin 1* (ShET1) y *Shigella enterotoxin 2* (ShET2) las cuales se ha propuesto que median en la secreción temprana de líquido en el yeyuno, facilitando la infección en el colon. Como consecuencia producen la diarrea acuosa característica que se observa en las primeras etapas de la shigelosis. Aunque el nombre es compartido por sus propiedades similares, no existe homología entre ambas enterotoxinas [1,3].

ShET1 está codificada por los genes *set1A* y *set1B* en una isla genómica de patogenicidad presente solamente en *S. flexneri* del serotipo 2a. Por el contrario, ShET2 está codificada por el gen *ospD3*, comentado anteriormente como uno de los efectores localizados en el plásmido pINV y presente en todos los serogrupos de *Shigella* [1,3].

*Shigella* también presenta proteasas de serina autotransportadoras de enterobacterias (SPATEs) las cuales presentan un motivo de proteasa de serina que les confiere capacidad proteolítica. Entre ellas se encuentran Pic (*protease involved in*

*colonization*) una mucinasa la cual facilita la colonización e invasión degradando la capa de mucus, SepA (*Shigella extracellular enterotoxin*) el cual se ha descrito que produce inflamación y destrucción de tejidos en conejo y SigA (*Shigella IgA-like protease homology*) que degrada alfa-fodrina intracelular alternando el epitelio y contribuyendo al igual que las enterotoxinas señaladas anteriormente a la acumulación de fluidos en el lumen intestinal [1,24].

Finalmente, la toxina Shiga (Stx) es una holotoxina del tipo AB<sub>5</sub>, codificada por el operón *stx* (*stxAB*) que se localiza en los genomas de profagos lambdoides inducibles o en remanentes de profagos defectuosos. Es producida principalmente en *S. dysenteriae* tipo 1 y algunos serotipos de *E. coli* enterohemorrágico (EHEC), aunque también se ha detectado de forma excepcional en *S. dysenteriae* tipo 4, *S. sonnei* y *S. flexneri*. Presenta una subunidad A enzimáticamente activa, la cual está anclada a un anillo pentamérico de subunidades B. La subunidad B tiene tres receptores que principalmente reconocen la globotriaosilceramida o Gb<sub>3</sub>, la cual es expresada por células endoteliales y renales vasculares. Una vez internalizada en la célula huésped, la subunidad A escinde un único residuo de adenina del componente 28S rRNA eucariota, inhibiendo la síntesis de proteínas. La interrupción de la actividad ribosómica de las células del huésped paraliza la síntesis de proteínas y, en consecuencia, poco después se produce la muerte celular. Este hecho hace que sea extremadamente citotóxica para muchos tipos celulares como puede ser leucocitos, linfocitos, células epiteliales, endoteliales y neuronales, y por ello es responsable del desarrollo del síndrome hemolítico urémico y de lesiones vasculares en el colon, los riñones y en el sistema nervioso central [1,24,28].

#### IV. Tratamiento

Aunque la shigelosis suele ser una patología autolimitada, en aquellos pacientes que presenten disentería, se recomienda el uso de antibióticos con el objetivo de reducir el tiempo de diarrea y fiebre, reducir el riesgo de complicaciones y de muerte. También supone un beneficio de salud pública, ya que disminuye el estado de colonización de aproximadamente 4 semanas a 3 días, reduciéndose así la

## Introducción

posibilidad de transmisión. El antibiótico de elección debe estar basado en pruebas fenotípicas debido al amplio perfil de resistencias que pueden observarse. La utilización de antibióticos como ampicilina, cotrimoxazol, tetraciclinas o cloranfenicol no son recomendables debido a los altos niveles de resistencia registrados globalmente. Actualmente, en la mayoría de guías el tratamiento de primera y segunda línea recomendados son el ciprofloxacino u otras quinolonas, azitromicina o cefalosporinas de tercera generación como la ceftriaxona [6,29,30].

Debido al incremento de la resistencia, algunos tratamientos alternativos se han propuesto, como es el caso de los probióticos, terapia con fagos y desarrollo de vacunas.

Los probióticos son bacterias que proporcionan efectos beneficiosos para el huésped y tienen la capacidad de sobrevivir en el tracto gastrointestinal. Los principales géneros descritos como probióticos son: *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococci*, *Weissella*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Bifidobacteria*. Estos organismos disminuyen el crecimiento de otros microorganismos por competición por nutrientes o adherencia al espacio. En diversos estudios realizados se ha observado que los probióticos tienen capacidad de inhibición del crecimiento de *Shigella in vitro*. Pero el uso de probióticos no se recomienda como alternativa a los antibióticos en la diarrea grave y moderada, debido a la falta de conocimiento sobre las especificidades e interacciones de los probióticos y los patógenos [31,32].

La terapia con fagos de la shigelosis fue utilizada por primera vez en 1919 por Felix d'Herelle, quien inyectó un fago anti-disentérico en un paciente con disentería grave obteniendo buenos resultados. Aunque su descubrimiento fue previo a los antibióticos, su uso no se extendió por diversos motivos. Entre ellos, la obtención de resultados confusos e inconsistentes en los ensayos clínicos, problemas en la reproducibilidad, la información limitada sobre el genoma de los fagos y los problemas legales a la hora de poder patentar estos productos. Aun así, recientemente han sido aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) diversos productos para su aplicación como aditivo alimentario. En 2006 se aprobó

el primer producto basado en fagos, el ListShield™ contra *Listeria monocytogenes*. Posteriormente, se aprobaron dos productos más para *Salmonella entérica* y *E. coli* O157:H7. Finalmente, la FDA aprobó el empleo de ShigaShield™, un producto que consiste una suspensión de cinco monofagos bacterianos específicos para *Shigella*. La aprobación de estos productos podría relanzar el interés en la investigación sobre el uso terapéutico de bacteriófagos frente a la shigelosis [33,34].

Finalmente, por lo que respecta a las vacunas, aunque existen diversos candidatos en desarrollo, no existe una vacuna aprobada actualmente. Estos candidatos siguen aproximaciones distintas. Podemos encontrar vacunas basadas en células completas, ya sean vivas atenuadas o muertas, o vacunas conjugadas de polisacárido O purificado, en el que se plantea la posibilidad de contener al menos los principales serotipos causantes de la enfermedad, como son el *S. sonnei*, *S. flexneri* 2a, 3a y 6. También se ha trabajado en el desarrollo de vacunas basadas en antígenos conservados de *Shigella* con el fin de evitar que sea serotipo específico. Para ello se han propuesto el uso de IpaB e IpaD junto con polisacárido O, así como proteínas de membrana como IcsP2, SigA2 [35,36].

## 2. *Escherichia coli*

*Escherichia coli* es un bacilo gramnegativo, anaerobio facultativo perteneciente al orden Enterobacterales, que fue descrito por primera vez por Theodore Escherich en 1885 en microbiota fecal neonatal. Es un comensal habitual de la microbiota intestinal de los vertebrados, aunque también puede causar diversidad de patologías. El intestino es un ambiente principalmente anóxico, por lo que el 90% de la comunidad microbiana está formada por anaerobios estrictos. Por lo general, *E. coli* es el microorganismo aerobio más abundante en el intestino de los mamíferos, constituyendo entre un 0,1-5% de su comunidad microbiana. Además, entre los mamíferos y *E. coli* se establece una relación de mutualismo, ya que *E. coli* produce vitamina K y B12, consume el oxígeno que pueda encontrarse en el intestino y compete con potenciales microorganismos patógenos de este nicho [2,12,37].

Aunque exista esta relación, a esta especie pertenecen algunas variantes patogénicas. Históricamente, estas se han clasificado en patotipos, ya que presentan factores de virulencia y patrones de adhesión característicos, los cuales facilitan el desarrollo de una patología concreta. Su definición puede estar basada por varios criterios como la infección de un órgano o huésped, presencia de genes específicos o por su fenotipo. En este sentido, la patología que producen se puede dividir entre patologías intestinales y extraintestinales. El término *E. coli* diarreico agrupa los patotipos que causan patología intestinal, entre ellos encontramos *E. coli* enterotoxigénico (ETEC), *E. coli* enteroagrativo (EAEC), EIEC y *E. coli* productor de la toxina shiga (STEC) el cual incluye EHEC. Por otro lado, entre las patologías extraintestinales, *E. coli* es la principal causa de infección urinaria, y puede causar gran variedad de infecciones como meningitis, bacteriemia, neumonía, celulitis, etc. El término empleado para estos patotipos es el de *E. coli* patogénico extraintestinal (ExPEC) [2,12].

*E. coli* patogénico extraintestinal (ExPEC) es un patotipo de *E. coli* en el que se agrupan aquellas cepas causantes de infecciones extraintestinales, tanto en humanos como en otros animales. A pesar de su capacidad patógena, ExPEC puede formar parte de la microbiota intestinal de humanos y otros animales y tradicionalmente se ha definido por la combinación de los denominados factores de virulencia que facilitarían no sólo la colonización extraintestinal, sino también la infección extraintestinal. No obstante, algunos autores argumentan que estos factores de virulencia son esenciales también para la colonización intestinal. Es por eso que existe cierta incertidumbre sobre cómo definir o diferenciar *E. coli* comensal y ExPEC, aunque no cabe duda de que presentan factores diferenciales, ya que la mayoría de infecciones extraintestinales están causadas por un número reducido de linajes [12,27,38,39].

### I. Filogenia y epidemiología de *E. coli* patogénico extraintestinal

Actualmente, la estructura poblacional de *E. coli* se distribuye en 8 filogrupos, los cuales se encuentran divididos en dos grandes grupos, uno formado por los

filogrupos B2, G, F y D y otro por el A, B1, C y E (**Figura 2**) [12]. Los filogrupos más representados entre los aislados procedentes de infecciones extraintestinales son el B2 y D [2,27,39]. En estudios basados en *Multilocus sequence typing* (MLST) de aislados extraintestinales ha revelado que la mayoría de ellos pertenecen a un grupo reducido de linajes. Así, en una revisión bibliográfica de estudios epidemiológicos en los que se llevó a cabo una caracterización molecular de aislados de *E. coli* productores de bacteriemia en diversos países entre los que se encuentran Estados Unidos de América (EUA), el Reino Unido, Francia y Corea del Sur, se detectó que entre el 48% y el 66% de los aislados pertenecían a cinco complejos clonales (CC). Los CC 131, 73 y 95, que pertenecen al filogrupo B2, y el CC69, que pertenece al filogrupo D, se identificaron en todos los estudios, mientras que los CC 12 y 14, también del filogrupo B2, presentaron una alta prevalencia en algunos de los estudios [12]. Por otro lado, en una revisión sistemática llevada a cabo por Manges et al, 2019 sobre 173 artículos sobre infecciones extraintestinales en humanos, detectaron que veinte STs representaban el 85% de todos los ST identificados en ExPEC. Por orden de presencia en número de estudios fueron: ST131, ST69, ST10, ST405, ST38, ST95, ST648, ST73, ST410, ST393, ST354, ST12, ST127, ST167, ST58, ST617, ST88, ST23, ST117, y ST1193. Además, el ST131 fue detectado en el 90% de los estudios, mientras que los dos siguientes más prevalentes (ST69 y ST10) fueron detectados en el 50%. La mayor parte de los estudios consultados fueron realizados en 4 continentes, África, Asia, Europa y Norte América. En los cuatro continentes el ST mayoritario siempre fue el ST131, representando alrededor del 20% de los aislados [38].

## II. Patogénesis de *E. coli* patogénico extraintestinal

La infección urinaria es la principal infección causada por ExPEC. La colonización periuretral por la microbiota intestinal o vaginal es el origen más probable de esta infección. Además de la infección sintomática, *E. coli* puede producir bacteriuria asintomática, observándose en hasta un 6% en personas sanas y en un 20% en personas ancianas [27,40,41].

Para poder alcanzar la vejiga urinaria, *E. coli* debe superar diversos obstáculos como son la fuerza mecánica del flujo de la orina a su paso por la uretra, la presencia de sustancias antimicrobianas producidas y secretadas por las células epiteliales que recubren la vejiga y su erradicación por los neutrófilos. Es por ello, que la adherencia estrecha a las células epiteliales de la uretra es el primer paso para establecer una infección. El proceso de patogénesis una vez colonizada la uretra, proseguiría por un ascenso hasta la vejiga, en la cual ExPEC se unirá al epitelio mediante adhesinas para a continuación internalizarse en las células. Dentro del citoplasma de las células epiteliales, ExPEC se multiplicará rápidamente y podrá formar unas masas de biopelículas denominadas comunidades intracelulares bacterianas (IBCs). El huésped en respuesta a este proceso exfolia las células epiteliales superficiales, eliminando de esta manera los IBCs por vía urinaria. Los IBCs que perduren, permitirán a *E. coli* invadir nuevas células epiteliales. Algunas bacterias infectarán células epiteliales de la vejiga inmaduras que quedarán expuestas tras la exfoliación. En estas células, *E. coli* no se multiplica, probablemente inhibido por una red densa de actinas, por lo que permanecerá en estado latente hasta la diferenciación celular, formando los conocidos como reservorios quiescentes intracelulares. Este proceso es la causa por la cual se observan cistitis recurrentes [27,41].

De la vejiga, la bacteria puede ascender por el uréter hasta los riñones y causar pielonefritis. La desestabilización bacteriana del epitelio renal y la inflamación puede favorecer el peor escenario; la entrada en el flujo sanguíneo produciendo una bacteriemia. También se ha observado que ExPEC puede translocarse en el epitelio intestinal y sobrevivir en los ganglios linfáticos mesentéricos desde donde podrá penetrar en el torrente sanguíneo [40]. En neonatos, tras una bacteriemia, se puede producir una meningitis [2].

### *Factores de virulencia*

La virulencia de ExPEC radica en la capacidad de sobrevivir en los tejidos, especialmente en el suero. La variabilidad de genes asociados a virulencia es muy

elevada y muchos de ellos tienen funciones similares. De forma general, todos los ExPEC presentan al menos un sistema de adherencia y un sistema de captación de hierro [42]. A continuación, se presentan algunos de los principales factores de virulencia asociados a la infección extraintestinal.

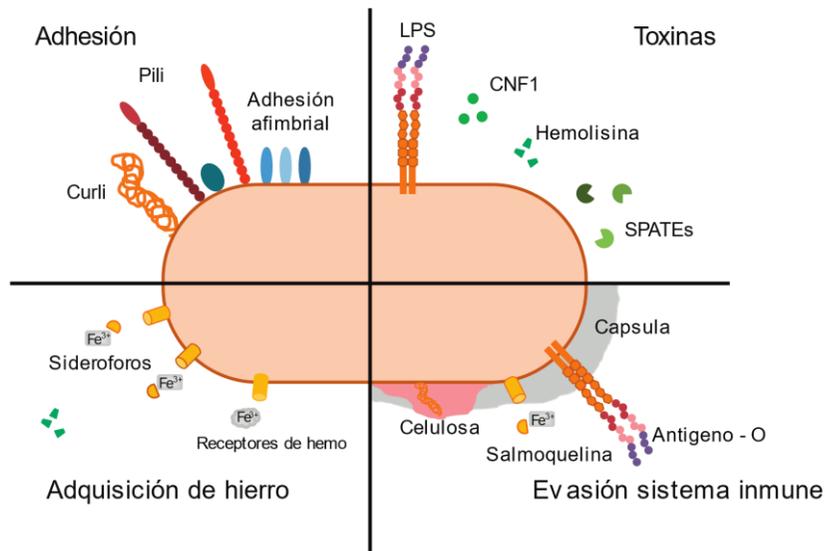


Figura 9 Factores de virulencia de *E. coli* uropatógeno. Tomado de Lüthje y Brauner 2014 [27].

### Adhesión

La adhesión a las células del huésped es muy importante tanto para la colonización como para la infección. Esta puede estar mediada por fimbrias o por adhesinas no fimbriadas. Las fimbrias o pili son estructuras complejas con diversas subunidades codificadas en operones de genes, en los cuales también se encuentra la maquinaria de ensamblado y secreción. Tanto en ExPEC como en *E. coli* comensal se han descrito numerosos operones codificando diversos tipos de fimbrias. Por lo que respecta a las adhesinas no fimbriadas en su mayoría pertenecen al grupo de proteínas autotransportadoras [27].

*E. coli* puede presentar múltiples tipos de fimbrias, hecho que puede incrementar la probabilidad de supervivencia en condiciones ambientales cambiantes. Una de las más identificadas es la fimbria de tipo 1 la cual se ha demostrado ser esencial para la colonización del tracto urinario de ratones y humanos. En la punta de la fimbria

## Introducción

encontramos la proteína adhesiva FimH, la cual se une a proteínas  $\alpha$ -D-manosiladas, como las uroplactinas, que se encuentran en células del lumen de la vejiga y del uréter [27,42,43].

Las fimbrias P se unen mediante la proteína PapG a los glucoesfingolípidos Gal $\alpha$ 1-4Gal presentes en la membrana celular del huésped y a diferencia de las fimbrias de tipo 1 no son inhibidas en presencia de manosa. Las células de los diferentes tejidos pueden presentar diferentes carbohidratos anexos a los glucoesfingolípidos y se ha observado que según el alelo de *papG* que presenten, *E. coli* tienen diferente capacidad para unirse según estos carbohidratos anexos. Las variantes de PapG más relevantes en el proceso de infección urinaria son PapGIII, el cual está principalmente asociado a cistitis en humano y a pielonefritis en perro, y PapGII que está principalmente asociado a pielonefritis y bacteriemia en humano [27,43].

Otro tipo de fimbria son las denominadas “curli” las cuales están formadas por subunidades de la proteína CsgA. Este tipo de fibra amiloides, aparte de participar en la adhesión a las células del huésped reconociendo varias proteínas séricas como la fibronectina, la laminina, el plasminógeno y la proteína activadora del plasminógeno, están implicadas junto con la celulosa en la agregación bacteriana y la formación de biopelículas [27,44].

Las fimbrias F1C y S también son comunes entre los *E. coli* uropatógenos aunque son menos frecuentes que las de tipo 1 y P. La familia S incluye las fimbrias SfaI, SfaII y Foc. Las fimbrias Sfa tienen un papel relevante ya que son producidas por cepas implicadas en procesos de sepsis y meningitis en recién nacidos. Estas interaccionan con glicoproteínas que contienen ácido siálico presente en una gran amplitud de tipos celulares entre los que se encuentra la membrana plasmática de las células de los ganglios del sistema nervioso central[27,42,45].

Las proteínas autotransportadoras son proteínas que presentan diversos dominios de transporte que les permiten, como su nombre indica, su propio transportarse a través de las membranas bacterianas. El dominio pasajero, a diferencia del de transporte,

## Introducción

es muy variable y es el que determina la función de la proteína. Una vez excretada puede permanecer adherida a la superficie celular y actuar como una adhesina o puede ser liberada y actuar como toxina [27].

El antígeno 43 (Ag43) es el autotransportador adhesivo más estudiado. Al igual que en las fimbrias P, diversos alelos de Ag43 se han descrito con diferentes propiedades funcionales. Entre ellas, las principales son el autorreconocimiento que facilita la autoagregación, promoviendo la formación de biopelículas y la adhesión al huésped [27].

### Movilidad

A diferencia de *Shigella*, ExPEC presenta flagelo, el cual está compuesto por un cuerpo basal, un gancho, un motor y un filamento. Este es utilizado por la bacteria para desplazarse hacia nuevos nutrientes o escapar de condiciones adversas. Además, se ha observado que tiene un papel importante en el desplazamiento de la vejiga a los riñones [46].

### Mecanismo de evasión del sistema inmune

La resistencia al suero y la evasión de la acción del complemento es muy importante durante el proceso de infección. Al igual que en *Shigella*, esta resistencia está principalmente mediada por el LPS y por la cápsula. Entre los linajes de ExPEC existe gran variabilidad de antígenos O y diversos grupos capsulares. Cabe destacar que *E. coli* que presenta la cápsula del grupo 2 y el antígeno capsular K1 se ha convertido en el principal causante de sepsis y meningitis neonatal. Este antígeno está formando por un homopolímero lineal de ácido N-acetilneuramínico unido  $\alpha$ -2,8, el cual es el ácido siálico más común en mamíferos. Al expresar este antígeno consigue mimetizarse, jugando así, un papel fundamental en su patogénesis reduciendo su inmunogenicidad y protegiendo la bacteria del sistema inmune del huésped [42,47–49]. Cabe destacar, que el ácido polisialico presente en la capsula de *E. coli* K1 es inmunológicamente idéntico al polisacárido capsular del serogrupo B de *Neisseria meningitidis* [2].

### Toxinas

ExPEC como *Shigella*, utiliza toxinas que le permiten su difusión a tejidos más profundos, el acceso a nutrientes localizados dentro de las células y desactivar efectores inmunes evitando su potencial antibacteriano [27]. No obstante, ExPEC no posee T3SS, es por ello que utiliza sistemas de secreción tipo I y V [46].

La  $\alpha$ -hemolisina es una toxina excretada que está codificada por el gen *hlyA*. Esta presenta actividad citotóxica contra eritrocitos y otras células nucleadas, incluyendo células inmunes, endoteliales y epiteliales. En especial tiene actividad sobre neutrófilos, por lo que podría tener un efecto protector para la bacteria [27].

El factor citotóxico necrotizante 1 (CNF1) está muy relacionado con ExPEC hemolítico, ya que el gen *cnf1* se localiza en una isla de patogenicidad en la que se encuentra siempre en combinación con *hlyA*, aunque este último puede encontrarse de forma independiente. La expresión de CNF1 es ventajosa para ExPEC en la colonización de la vejiga ya que produce una reorganización del citoesqueleto de actina de células uroteliales, promoviendo la internalización bacteriana [27].

El LPS, aparte de su función protectora frente al suero, puede actuar como toxina ya que tiene gran poder inmunogénico. Como está unido a la bacteria es referido como endotoxina [27]. Además, al igual que *Shigella*, ExPEC también presenta SPATEs como Pic, Vat (*vacuolating autotransporter protein*) la cual aglutina grupos hemo y actúa como hemoglobinas y Sat (*secreted autotransporter toxin*) la cual se postula que tiene actividad citotóxica y produce reorganización del citoesqueleto [27,50].

### Sistemas de adquisición de hierro

La disponibilidad de hierro es un factor limitante de crecimiento tanto en la orina como en la sangre. Además, ante una infección el huésped disminuye la expresión de proteínas unidas a hierro como pueden ser la lactoferrina o la transferrina. Es por ello que las bacterias tanto comensales como patogénicas producen sistemas de captación de hierro [27,42].

Una gran proporción del hierro en el huésped se encuentra en el grupo hemo de la hemoglobina de los eritrocitos. Este grupo hemo puede ser absorbido mediante receptores presentes en la superficie de la bacteria, como ChuA y Hma, tras lisis de los eritrocitos mediante la acción de la hemolisina [27].

Los sideróforos son moléculas quelantes de hierro que son secretados por la bacteria y posteriormente captadas por receptores específicos en la membrana externa. Los sistemas de sideróforos descritos en ExPEC son la enterobactina, la salmoquelina, la aerobactina y la yersiniabactina [27].

### 3. Resistencia antibiótica

Los microorganismos debido a su alta plasticidad genética tienen la capacidad de adaptarse a situaciones de estrés o que puedan afectar a su integridad y viabilidad como es la presencia de antibióticos. Las bacterias pueden adquirir resistencia a antimicrobianos a través de modificaciones de proteínas presentes en la pared celular o de la diana terapéutica, la inactivación o degradación antibiótica por parte de enzimas o la presencia de bombas de eflujo (**Figura 10**) [51,52].

Para acceder a la diana terapéutica, los antibióticos deben penetrar a la célula a través de la membrana de la bacteria. La membrana externa que presentan las bacterias gramnegativas actúa como barrera natural contra agentes hidrofílicos, por lo que estos agentes dependen de porinas, proteínas canal que permiten la difusión pasiva, para poder entrar en la célula. La pérdida de expresión de porinas por parte de algunas bacterias se traduce en una disminución de la permeabilidad del organismo, hecho que produce que presente una disminución de la sensibilidad a múltiples antimicrobianos [52].

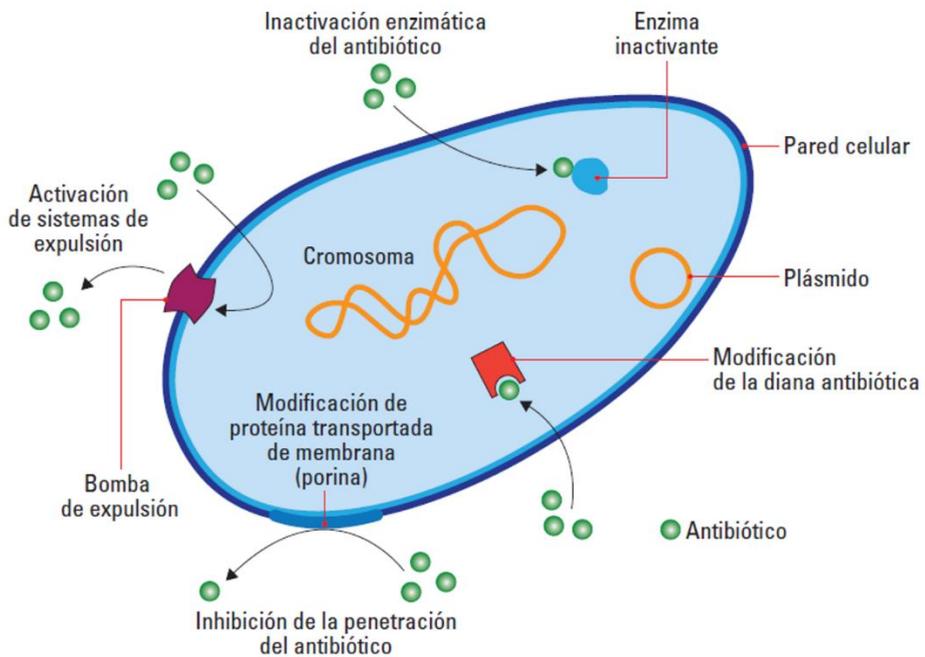


Figura 10 Mecanismos de resistencia antimicrobiana. Tomado de Prats, Pumarola, y Mirelies 2023 ([4])

Otra vía por la que se limita el acceso de los antimicrobianos a la diana terapéutica es mediante bombas de expulsión. Estas bombas son proteínas que expulsan activamente componentes tóxicos para la bacteria, como pueden ser los antibióticos, permitiendo reducir la concentración en el interior celular [51,52].

Una de las vías más extendidas es la inactivación de los antibióticos mediante enzimas. Estas pueden por un lado degradar el antibiótico o por otro lado modificarlos catalizando reacciones de acetilación, fosforilación o adenilación, entre otras. Las modificaciones en regiones clave del antimicrobiano pueden contribuir a reducir la afinidad por la diana y por tanto permitir a la bacteria resistir la actividad antibiótica [51,52].

Finalmente, la diana terapéutica puede modificarse lo que puede conllevar a una reducción o evasión de la afinidad antibiótica. Estas modificaciones pueden ser debidas a mutaciones puntuales o a modificaciones enzimáticas como la metilación. La resistencia también puede deberse a la protección de la diana por parte de

proteínas, o la adquisición de un remplazo para la diana, que puede realizar las mismas funciones celulares sin inhibición del antibiótico [52].

A continuación, se detallan los antibióticos más empleados para el tratamiento de la shigelosis y los principales mecanismos de resistencia que se han identificado hasta el momento.

### I. Quinolonas

Las quinolonas son antimicrobianos que actúan sobre enzimas que participan en el proceso de replicación del ADN bloqueando las topoisomerasas II y IV. Estas enzimas están formadas por dos subunidades codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB* para la topoisomerasa II o ADN girasa y *parC* y *parE* para la topoisomerasa IV. Generalmente la resistencia a las quinolonas es debida a mutaciones en la denominada región determinante de la resistencia a quinolonas (QRDR), que en *Escherichia coli* se detectan principalmente entre el codón 67 y 107 del gen *gyrA* y el 80 y 84 de *parC*. Una mutación puntual puede dar resistencia a quinolonas de primera generación, mientras que, para las fluoroquinolonas como el ciprofloxacino, son necesarias mutaciones en *gyrA* y *parC* [53]. El ciprofloxacino, es un antimicrobiano de primera línea para el tratamiento de la shigelosis [30,54]. Durante los años 2000, se detectaron por primera vez aislados de *Shigella* de todas las especies resistentes a ciprofloxacino que presentaban simultáneamente una triple mutación en los genes que codifican las estructuras diana: *gyrA*-S83L, *gyrA*-D87G/N y *parC*-S80I. Los análisis filogenéticos muestran una marcada evolución convergente en el género. En *S. dysenteriae* tipo 1, el estudio llevado a cabo por Njamkepo *et al.* 2016 sobre la población global de este tipo de *S. dysenteriae*, reveló que la resistencia a ciprofloxacino mediada por la triple mutación en QRDR, solamente habría sido adquirida una vez, en un sublinaje del linaje IV en el que todos los aislados pertenecían al sur de Asia. De un modo similar, en el caso de *S. sonnei*, la resistencia a las fluoroquinolonas es debida a la expansión global posiblemente desde el sur de Asia del sublinaje CipR (3.6.1.1) que pertenece al linaje Central Asia III. Por el contrario, en *S. flexneri*, se han documentado estas

mutaciones en QRDR en varios serotipos (1a, 1c, 2a, 2b, 2av, 4a, 4c y X). El estudio de genomas de aislados obtenidos por el proyecto de *Global Enteric Multicenter Study* (GEMS) en el que se incluían siete naciones en el África subsahariana y el sur de Asia, identificaron hasta tres perfiles de mutaciones diferentes en tres clados de la filogenia. Por lo tanto, demostraría un origen polifilético de la resistencia y una evolución convergente continua de linajes en *S. flexneri*. [22,55–57].

Por lo que respecta a ExPEC, se postula que la resistencia a las fluoroquinolonas debida a mutaciones en QRDR se podría asociar al éxito de algunos linajes pandémicos. En los estudios epidemiológicos de la resistencia a ciprofloxacino, el ST más prevalente es el ST131 que presenta múltiples mutaciones adquiridas secuencialmente, entre las que se encuentran las comentadas anteriormente en *Shigella*, y en menor medida el ST1193 que se postula que adquirió la resistencia en un evento simultáneo de recombinación homóloga con un *E. coli* perteneciente al ST10 [58,59].

Además de la resistencia por mutaciones en QRDR, también se han detectado genes codificados en plásmidos que proporcionan susceptibilidad disminuida a quinolonas como las proteínas tipo Qnr (QnrA, QnrB, QnrC, QnrD, y QnrS) o la acetiltransferasa AAC(6′)-Ib-cr [53]. Las proteínas Qnr se unen a la girasa y la topoisomerasa IV proporcionando protección contra las quinolonas, ya que disminuyen el acceso del antibiótico a la diana. En cuanto a AAC(6′)-Ib-cr, es una enzima bifuncional, aparte de resistencia a quinolonas, proporciona resistencia a aminoglucósidos como amikacina, tobramicina y kanamicina. La resistencia a las quinolonas es debida a la acetilación mediada por el enzima del nitrógeno amino en su anillo de piperazinilo [60].

## II. Macrólidos

Los macrólidos se caracterizan por unirse de forma reversible a la región peptidiltransferasa del 23S ARN ribosomal, hecho que interfiere en la síntesis proteica. Aunque generalmente son considerados bacteriostáticos, a altas concentraciones y bajo inóculo, pueden tener acción bactericida [54]. Clásicamente,

los macrólidos presentan una baja actividad frente a *Enterobacteriaceae* debido a la baja penetración de la membrana de este tipo de bacterias. Sin embargo, la azitromicina presenta una mayor difusión y es utilizada para el tratamiento de las infecciones diarreicas producidas por miembros de la familia *Enterobacteriaceae* [61].

Aunque las guías terapéuticas recomiendan el uso de la azitromicina para el tratamiento de la shigelosis, hasta el momento el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) y el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) no proporcionan puntos de corte clínicos para este antibiótico en enterobacterias. No obstante, recomiendan utilizar el punto de corte epidemiológico para *Shigella*. En los últimos años, se ha documentado un incremento de la resistencia a azitromicina, principalmente debido a la inactivación del antibiótico por la fosfotransferasa MPH(2')-I codificada en el gen *mphA* o por la modificación de la diana por parte de la ARNr metiltransferasa codificada en el gen *ermB*. Ambos genes son generalmente movilizados a través de plásmidos pertenecientes a diversos grupos de incompatibilidad, principalmente el IncFII [62–64].

### III. $\beta$ -lactámicos

Los  $\beta$ -lactámicos comprenden un amplio grupo de antibióticos que se caracterizan por presentar un anillo  $\beta$ -lactámico en su estructura molecular. Estos compuestos impiden la síntesis del peptidoglucano de la pared celular bacteriana inhibiendo la acción de las proteínas fijadoras de penicilina (PBP). Esta acción por si sola produce un efecto bacteriostático, el efecto bactericida radica en la combinación con la activación de un sistema de enzimas líticas (autolisinas) que degradan el peptidoglucano, hecho que al inhibir el proceso de síntesis y estimular la degradación produce la muerte bacteriana [54].

Los  $\beta$ -lactámicos se dividen en diversos subgrupos en función de los radicales unidos al anillo. Entre los más extendidos se encuentran las penicilinas, las cefalosporinas, los monobactámicos y los carbapenémicos [54]. Para el tratamiento

de la shigelosis, las guías terapéuticas recomiendan el uso de las cefalosporinas de tercera generación como la ceftriaxona.

Las  $\beta$ -lactamasas son enzimas con capacidad de hidrolizar el anillo  $\beta$ -lactámico y en consecuencia inactivan el antibiótico. Estas se pueden clasificar según la estructura molecular por el sistema Ambler, el cual las divide en 4 clases, denominadas A, B, C y D. En *E. coli* y *Shigella*, los principales mecanismos de resistencia a las cefalosporinas de tercera generación son la expresión de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) que forman parte de la clase A. Estas enzimas tienen la capacidad de hidrolizar penicilinas y cefalosporinas y son inhibidas por el ácido clavulánico y el tazobactam. Las familias de BLEE identificadas con mayor frecuencia son la TEM, SHV y CTX-M. Esta última, es la más extendida, siendo la CTX-M-15 la BLEE más detectada mundialmente, tanto en enterobacterias como concretamente en *E. coli* y *Shigella*. Concretamente la expansión de CTX-M-15 está principalmente asociada al ST131 de *E. coli* y frecuentemente son adquiridas mediante plásmidos pertenecientes a los grupos de incompatibilidad IncF, IncI1, IncN, IncH1 e IncH2. A la clase A también pertenece la familia de las KPC, que a diferencia de las anteriores presenta capacidad de hidrolizar carbapenémicos, por lo que se le denomina carbapenemasa. Aunque KPC es una de las carbapenemasas más extendidas en enterobacterias, pues a nivel europeo entre 2013 y 2014 en *Klebsiella pneumoniae* fueron las carbapenemasas más detectadas (31,5%), en *E. coli* fue la tercera (7,2%) [65]. En un estudio multicéntrico realizado en 71 hospitales españoles en 2019, la detección de *E. coli* productor de KPC fue puntual con tres aislados productores de KPC-3 (7.7%). En *Shigella*, únicamente se ha detectado un aislado productor de KPC hasta el momento, concretamente un aislado de *S. flexneri* en Senegal [53,66–68].

Las  $\beta$ -lactamasas de clase B también son conocidas como metalo- $\beta$ -lactamasas, por presentar un átomo de zinc en el centro activo. Se caracterizan por tener un amplio espectro de acción, con capacidad de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas, y carbapenémicos. Las familias más extendidas de esta clase son: las NDM, VIM e

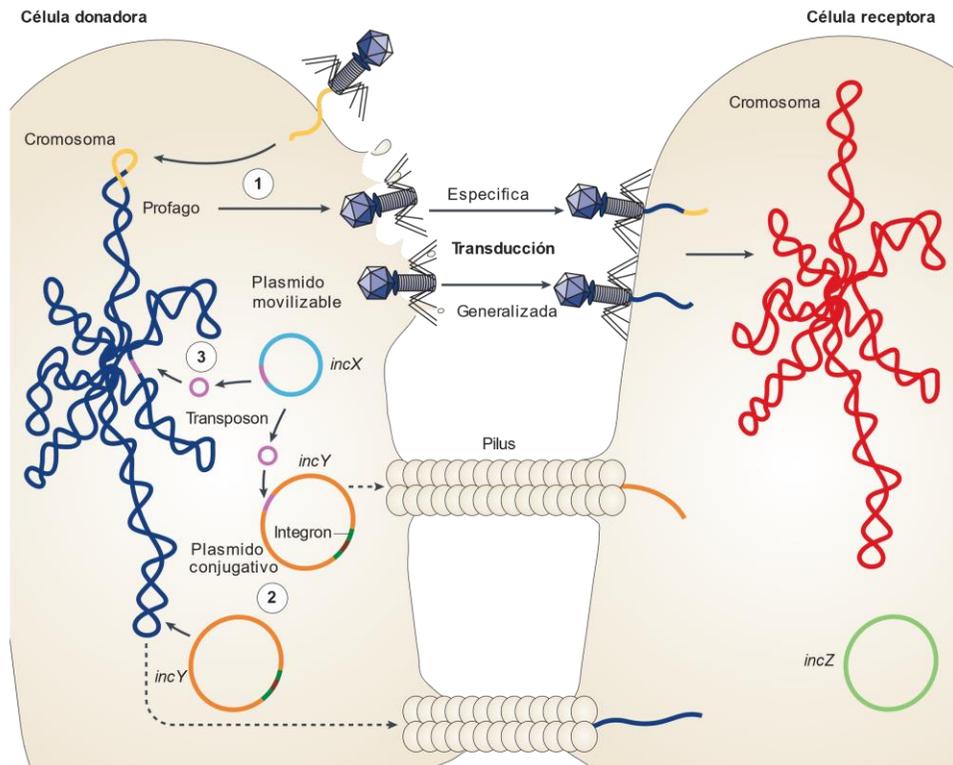
IMP. A nivel europeo entre 2013 y 2014, NDM fue la segunda carbapenemasa más detectada en *E. coli* (10,3%) y VIM no fue detectada. Por lo que respecta a *E. coli*, en el estudio sobre las carbapenemasas en España en 2019, VIM-1 fue la segunda carbapenemasa más detectada (19,2%) y por el contrario NDM fue solamente un aislado (3,8%). En *Shigella* únicamente se han reportado cepas productoras de IMP y VIM en *S. sonnei* y *S. flexneri* en aislados obtenidos de muestras de heces de niños con diarrea de las islas Andaman (India) en los años 2013 y 2014. [65–69].

Las  $\beta$ -lactamasas de clase C o AmpC proporcionan resistencia de alto nivel a cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación. Estas enzimas están presentes de forma natural en el cromosoma de muchos bacilos gramnegativos, entre los que se encuentran *E. coli* y *Shigella*. Cabe matizar que, generalmente el gen ampC no se expresa en *Shigella* spp ni en *E. coli* y solo se observa un fenotipo resistente cuando se producen mutaciones en la región del promotor que inducen una hiperexpresión del gen. Algunas familias de AmpC relevantes por su transmisión mediada por elementos genéticos móviles son las CMY, FOX y DHA, especialmente CMY-2 tanto en *E. coli* como en *Shigella* [67,68,70].

Finalmente, las  $\beta$ -lactamasas de clase D, también conocidas como OXA, son la clase de enzimas más diversa. Las inicialmente descritas únicamente poseían actividad frente a las penicilinas, pero actualmente se han documentado enzimas con actividad frente a las cefalosporinas y los carbapenémicos con un amplio espectro de sensibilidad a los inhibidores [68]. En *Shigella* la resistencia a la ampicilina está muy asociada a la presencia de  $\beta$ -lactamasas de tipo OXA como OXA-1, juntamente con las penicilinasas de clase A como la TEM-1[67]. A nivel europeo entre 2013 y 2014 las carbapenemasas OXA-48-like fueron las más detectadas en *E. coli* (22,2%) y OXA-48 también fue la carbapenemasa más detectada en España en esta especie (73,1%) [66]. Por el contrario, no se ha descrito ningún aislado a nivel mundial de *Shigella* portador de este gen.

#### 4. Transferencia de material genético

En procariontes se conocen tres mecanismos por los cuales el material genético puede ser movilizado horizontalmente entre células: la transformación, la transducción y la conjugación. Mediante este proceso las células pueden adquirir rápidamente características nuevas ( **Figura 11**) [71,72].



**Figura 11** Transferencia de ADN entre células bacterianas. (1) Transducción. ADN genómico de un fago (amarillo) se inserta en el cromosoma bacteriano (Azul marino); este es replicado y ocasionalmente puede empaquetar ADN bacteriano (transducción generalizada) o ADN bacteriano junto al del propio fago (Transducción específica), lisa la célula, y al infectar una célula receptora. (2) Conjugación. Los plásmidos conjugables (Naranja) y ICEs utilizan estructuras proteicas conocidas como pilus para establecer una conexión con una célula receptora y transferir material genético. Los Plásmidos movilizables pueden aprovechar los pilus codificados en otros elementos para transferirse (Azul claro). (3) Transposon (Rosa) se integran en el cromosoma o en plásmidos por recombinación no homóloga. Tomada de Frost et al. 2005 [71]

## Introducción

La transformación es un proceso de transferencia por el cual una célula receptora incorpora ADN extracelular libre. Generalmente, el número de genes que pueden ser transferidos por este proceso es reducido ya que una célula individual incorpora solo uno o unos pocos fragmentos de ADN [71,72].

Los bacteriófagos durante el proceso de empaquetado pueden reemplazar el genoma vírico por un fragmento del genoma del hospedador. Este proceso se conoce como transducción y puede ocasionar la incorporación de cualquier gene, el cual se conoce como transducción generalizada o puede integrarse directamente una región específica en el genoma viral, la llamada transducción específica [71,72].

Finalmente, durante la conjugación, una célula donadora en contacto directo con una célula receptora transfiere el ADN. Para ello es necesario que la célula donadora posea un elemento genético con capacidad de replicarse de forma independiente, como pueden ser plásmidos o elementos integrativos y conjugativos (ICE: *integrative and conjugative element*) y que codifiquen las proteínas necesarias para generar el pilus que servirá de canal para transferir el ADN [71,72].

### I. Plásmidos

Los plásmidos son elementos genéticos que tienen la capacidad de replicarse independientemente del cromosoma y existen en el interior de la célula como ADN libre. Sin embargo, no presentan formas extracelulares y aunque poseen un origen de replicación, los plásmidos requieren de las enzimas codificadas en el cromosoma para su replicación (helicasa, polimerasa, etc.). El uso de la maquinaria de replicación cromosómica limita el rango de huéspedes en el que se puede replicar un plásmido, existiendo plásmidos con rango estrecho de hospedadores y que por tanto solo se mantienen en un taxon bacteriano, y plásmidos con un amplio rango que se han detectado en diversos géneros. Mayoritariamente los plásmidos son de DNA bicatenario y circulares, aunque en algunos casos son lineales [72,73].

Generalmente los plásmidos no codifican genes con funciones esenciales para el hospedador, pero pueden portar genes con actividad de adaptación a nichos como

## Introducción

genes que proporcionan resistencia a antimicrobianos o genes de virulencia, como es el caso del plásmido pINV de *Shigella* comentado anteriormente. Los plásmidos están formados generalmente por un “backbone” que conforma los genes con funciones esenciales para el plásmido y genes accesorios. En los plásmidos de resistencia, estas regiones accesorias suelen estar formadas por uno o más genes de resistencia y elementos móviles asociados como secuencias de inserción (IS), transposones o integrones [24,72,73].

La replicación de los plásmidos se inicia en una región concreta de su estructura, el denominado origen de replicación (ori). Esta es desencadenada generalmente, por la unión de la proteína de iniciación denominada replicasa (Rep), codificada por el gen *rep* en el plásmido. Adicionalmente, la proteína Rep participa en el control del número de copias del plásmido que hay en la célula para evitar comprometer al hospedador. Los plásmidos que utilizan ARN como iniciador expresan de forma constitutiva un ARN antisentido, por lo tanto, es proporcional al número de copias plasmídicas, y se une al ARNm de *rep* para reprimir su transcripción o traducción. Otro mecanismo de control del número de copias de plásmido es el basado en iternones, que regulan de forma negativa Rep y también son directamente proporcional al número de copias de plásmido [72,73].

Los plásmidos pueden clasificarse según el grupo de incompatibilidad al que pertenecen. La compatibilidad plasmídica consiste en la imposibilidad de que dos o más plásmidos puedan coexistir de forma estable en la misma célula. Este fenómeno generalmente se debe a que, al compartir un mismo sistema de iniciación de la replicación, los plásmidos son percibidos como iguales y por lo tanto el mecanismo de control de número de copias condiciona una inestabilidad segregacional en ausencia de presión selectiva. Por lo tanto los grupos de incompatibilidad (Inc), agrupan aquellos plásmidos relacionados que son incompatibles entre sí [73].

## 5. Infecciones de transmisión sexual

Las infecciones de transmisión sexual (ITS) son actualmente un grave problema de salud pública. Estas pueden tener un origen etiológico, clínico y epidemiológico diverso, llegándose a asociar con la transmisión por vía sexual hasta 30 patógenos diferentes entre bacterias, virus y parásitos [74]. Aunque generalmente no son mortales, algunas de las complicaciones de las ITS incluyen la enfermedad inflamatoria pélvica, el embarazo ectópico, la infertilidad, el dolor pélvico crónico, la artropatía seronegativa, una mayor susceptibilidad a la infección por el VIH y enfermedades neurológicas y cardiovasculares. Además, aún existe un gran estigma contra las personas que padecen ITS, y estas afectan de forma desproporcionada a grupos que pueden estar marginados en algunas regiones como por ejemplo hombres que mantienen relaciones sexuales con hombres (HSH), personas que ejercen el trabajo sexual o algunas minorías étnicas. Como consecuencia de actitudes morales condenatorias hacia las ITS, en muchos casos resultan en una falta de voluntad política para priorizar su control [74,75].

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó en 2012 que globalmente existían 357 millones de casos nuevos de las cuatro ITS curables no-virales más prevalentes; la tricomoniasis, causada por el protozoo *Trichomonas vaginalis*, la clamidia, la gonorrea y la sífilis, causadas por las bacterias *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Treponema pallidum* subespecie *pallidum*, respectivamente. En los últimos años se ha descrito un incremento de la incidencia de estos microorganismos, según datos del *Centre d'Estudis Epidemiològics sobre les Infeccions de Transmissió Sexual i Sida de Catalunya* (CEEISCAT) del 2016 al 2021 los casos de clamidia se incrementaron de 24,3 casos por 100.000 habitantes a 140,2 casos y en gonorrea de 8,9 casos en 2012 a 86,2 casos en 2021 [76]. A parte del incremento de la incidencia de estos organismos, existe una gran alarma debido a la emergencia de la resistencia antibiótica por parte de algunos de los organismos causantes de ITS. La azitromicina ha sido uno de los antibióticos más utilizados para el tratamiento de las ITS bacterianas. Cuando se introdujo su uso clínico, se

consideró la panacea para el tratamiento de las ITS bacterianas, principalmente debido a su eficaz penetración en los tejidos, una vida media prolongada, el hecho de que su administración sea oral y que presente actividad contra la mayoría de las ITS bacterianas. No obstante, es probable que su uso masivo, particularmente frente a la *C. trachomatis*, haya inducido o seleccionado organismos resistentes de *N. gonorrhoeae* y *M. genitalium*, y en algunos entornos en *T. pallidum* [75].

### I. Hombres que mantienen relaciones sexuales con hombres

El colectivo de HSH, agrupa aquellas personas de género masculino (hombres) que se identifican como gay o bisexual, junto con aquellos que hayan mantenido o mantengan relaciones sexuales con otros hombres independientemente de cómo se identifiquen. Este colectivo presenta una prevalencia elevada de infecciones de transmisión sexual. Así, en el año 2012 en Inglaterra, el 79% de los casos de sífilis, el 58 % de gonorrea y el 17% de clamidia fueron diagnosticados en HSH [74].

Las relaciones sexuales que mantienen los HSH son diversas. Así, algunos son parejas monógamas, mientras que otros reportan diversas parejas sexuales, tanto regulares como ocasionales [77]. Existen características concretas en el grupo sexualmente más activo de esta población que podrían explicar esta alta prevalencia observada. En primer lugar, algunos individuos del colectivo HSH mantienen prácticas que suponen un mayor riesgo para la adquisición de ITS, como puede ser un mayor número de parejas sexuales recientes o más parejas sexuales concurrentes, o practicar sexo sin preservativo [78]. Aunque actualmente el colectivo de Lesbianas, Gais, Trans\*, Bisexuales, Intersexuales y otras (LGTBI+) presenta una mayor protección legal y más apoyo social, muchas personas siguen padeciendo agresiones LGTBifóbicas [79]. Algunos autores han explorado como factores psicosociales pueden influenciar la práctica de sexo sin protección. Entre estos factores, se encuentra el hecho de haber sufrido homofobia o el estigma interiorizado de estas personas que puede traducirse en depresión, la cual es más prevalente entre HSH que en hombres heterosexuales [80,81]. La depresión moderada y la soledad, junto al consumo excesivo de alcohol y drogas, han sido

asociados a un menor uso del preservativo [80,82–84]. Al contrario, se ha observado que aquellas personas que perciben que poseen suficiente apoyo social para hacer frente a circunstancias difíciles, así como aquellas que presentan más confianza propia para negociar con sus parejas sexuales, tienen significativamente menos probabilidades de participar en sexo sin preservativo [83]. Además, se ha observado en EUA que aquellas regiones en las que existe un estigma estructural e institucional, se asocian con un menor uso de la profilaxis preexposición frente al VIH (PrEP), posiblemente debido a que los profesionales sanitarios muestran una menor disposición a consultar sobre los comportamientos sexuales de los pacientes, hecho que impide detectar aquellas personas que podrían beneficiarse del tratamiento [85]. Por otro lado, algunos HSH seropositivos siguen una estrategia seroadaptativa en la cual practican sexo sin preservativo, lo que se traduce en una mayor exposición a las ITS. Este hecho ha supuesto que algunas epidemias hayan tenido una mayor incidencia en este grupo, como el linfogranuloma venéreo, la hepatitis C o la shigelosis. El contacto sin preservativo de este grupo relativamente cerrado de HSH VIH positivos con HSH seronegativos ha incrementado a consecuencia del uso de la PrEP, por lo que estas infecciones más frecuentes en personas seroadaptativas podrían verse incrementadas entre HSH seronegativos [75,86].

La densidad de la red sexual es un factor importante, el cual proporciona una evaluación de la conectividad general de la red y se define como la proporción de vínculos entre las personas. Aquellas redes sexuales más densas son una indicación de tasas de contacto más altas entre las personas y como se comentaba entre los aspectos individuales, los HSH presentan un mayor número de parejas concurrentes. Este hecho crea más oportunidades de transmisión de ITS, y por lo tanto, mayor riesgo de adquirirlas [87]. Asimismo, la transmisibilidad también aumenta de forma proporcional al número de bucles triangulares presentes en la red. Es por ello que en una red sexual en la cual haya un mayor número de individuos cuyas parejas sexuales sean a su vez parejas sexuales entre sí, existe una mayor probabilidad de

desarrollo epidémico de ITS. Así pues, para el desarrollo de estos bucles triangulares es necesario la presencia de personas que tengan sexo con su mismo género.[78].

En tercer lugar, las relaciones sexuales que suceden durante viajes, facilitan la creación de puentes entre grupos geográficamente distantes y tienen un impacto fundamental como mecanismo de introducción y transmisión de ITS en una red sexual [78]. En el caso de la población HSH, los eventos multitudinarios que se desarrollan en múltiples países podrían tener un gran papel. Estos acontecimientos consisten en celebraciones de varios días de duración y reúnen a un gran número de personas HSH. Se ha observado que, durante este tipo de eventos, hay un mayor uso de drogas, mayor número de parejas sexuales y menor uso del preservativo por parte de los asistentes, comparado con otras fiestas locales [78,86,88]. En Barcelona, se estudió el posible efecto en la incidencia de gonorrea en HSH una semana después de estos eventos entre 2007 y 2016. En ese periodo en Barcelona se celebraron cuatro grandes eventos internacionales cada año, repartidos entre abril y setiembre y de 8 días de media. El evento con mayor afluencia fue el *Pride* con 260.000 participantes anualmente y con un 20% de extranjeros. Considerando el efecto global de todos los eventos agrupados, se detectó un aumento significativo promedio de 1,16 casos de gonorrea en HSH (IC 95%: 0,68, 1,64) atribuibles a las celebraciones [88].

También existen razones de bio-comportamiento, pues se ha demostrado que la transmisión de algunas ITS como el VIH o la sífilis es más eficiente durante el sexo anal [80]. Asimismo, algunos organismos enteropatógenos pueden ser transmitidos por vía sexual a través de contacto directo anal-oral como el anilingus o por contacto indirecto como la manipulación del preservativo, uso de los dedos, juguetes sexuales, *fisting*, etc. Se ha identificado diversos brotes entre HSH producidos por diferentes especies de *Campylobacter* y *Shigella*, así como por *Escherichia coli* O117:H7 productor de toxina Shiga, virus de la hepatitis A, etc [89–100].

## Introducción

El departamento de salud pública de Sant Francisco describió por primera vez un brote venéreo de enteritis producido por *S. flexneri* 2a en 1974. El brote constó de 50 casos de los cuales la mayoría eran hombres jóvenes HSH [101]. Desde entonces la transmisión sexual entre HSH tanto de *S. flexneri* como *S. sonnei* se ha observado en Asia, Australia, Europa, y Norte América. Estudios genómicos realizados han detectado la diseminación intercontinental de sublinajes específicos en este colectivo, entre los que se encuentran sublinajes de *S. flexneri* del serotipo 3a y 2a y sublinajes de *S. sonnei* del clado 3.6 como los genotipos CipR.MSM1 (3.6.1.1.3.1) y CipR.MSM5 (3.6.1.1.2) y del 3.7, el genotipo MSM4 (3.7.25) y el VN2.KH1.Aus (3.7.29.1.4.1) [18,95,102–107]. Además, estos sublinajes generalmente son portadores del plásmido pKSR100, en la que se codifican entre otros, los genes *mphA* y *ermB* que proporcionan resistencia a la azitromicina [102].

# Objetivos



## **1. Identificar y caracterizar los linajes de *Shigella* circulantes en Barcelona entre hombres que mantienen relaciones sexuales con hombres**

En los países de rentas altas la shigelosis afecta principalmente a viajeros que han visitado zonas endémicas o a HSH. En estudios recientes realizados en países de rentas altas, se han descrito linajes específicos circulando mayoritariamente entre la población HSH. Estos linajes además muestran una alta prevalencia de resistencia a algunos antimicrobianos.

En este contexto, este trabajo tiene por objetivo investigar la estructura poblacional de *Shigella flexneri* y *Shigella sonnei* aislados de pacientes HSH basada en la secuenciación de su genoma completo y estudiar su sensibilidad antimicrobiana. Para ello, se ha estudiado una colección de aislados de ambas especies, obtenidos en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitari Vall d'Hebron procedentes de muestras clínicas obtenidas entre los años 2015 y 2019 de pacientes HSH atendidos en Unidades de atención primaria de Barcelona, el Hospital Vall d'Hebron y la Unidad de ITS Drassanes–Vall d'Hebron.

Los objetivos específicos que se derivan son:

- A. Estudiar la sensibilidad fenotípica a los antimicrobianos utilizados para el tratamiento de la shigelosis y comparar las tasas de resistencia obtenidas según la fuente de adquisición.
- B. Identificar los determinantes de resistencia a antibióticos codificados por los aislados de *S. flexneri* y *S. sonnei*.
- C. Determinar la estructura poblacional de los aislados de *S. flexneri* y *S. sonnei* obtenidos de pacientes HSH, estudiando su serotipo, diversidad clonal y la relación genética con los aislados productores de brotes contemporáneos identificados en otros países.

## **2. Investigar los aspectos microbiológicos involucrados en el aumento de *Shigella* productora de BLEE multirresistente y extremadamente resistente identificadas en Barcelona entre los años 2020 y 2021**

Entre los años 2020 y 2021 se ha identificado un incremento significativo de aislados de *Shigella* multirresistentes por adquisición de resistencia a cefalosporinas de tercera generación. Esto es especialmente significativo entre aislados de *S. sonnei* obtenidos de población HSH, tanto en países de nuestro entorno como en Barcelona. Adicionalmente, muchos de estos aislados además muestran co-resistencia a otras familias de antimicrobianos lo que les hace ser categorizados como microorganismos extremadamente resistentes.

Por esta razón, el objetivo de este trabajo es realizar una caracterización microbiológica de los aislados de *S. sonnei* y *S. flexneri* multirresistentes (MDR) y extremadamente resistentes (XDR) detectados en HSH, obtenidos en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitari Vall d'Hebron procedentes de muestras clínicas procesadas entre 2020 y 2021.

Los objetivos específicos que se derivan son:

- A. Analizar la evolución de la sensibilidad a  $\beta$ -lactámicos y otras familias de antimicrobianos entre los aislados de *Shigella*.
- B. Identificar los mecanismos de resistencia implicados en el aumento de resistencia a cefalosporinas de tercera generación en *S. sonnei* y *S. flexneri*.
- C. Estudiar la relación filogenómica de los aislados MDR y XDR con el fin de identificar la existencia de posibles transmisiones clonales locales de los aislados circulantes en Barcelona.
- D. Investigar la existencia e interconexión de transmisiones internacionales de clones XDR y MDR que hayan podido introducirse en nuestro medio.

### **3. Identificar la transmisión a través de contacto sexual de otros enterobacteriales productores de BLEE no pertenecientes al género *Shigella* y que colonizan el tracto intestinal de hombres que mantienen relaciones sexuales con hombres**

Múltiples estudios resaltan que las personas sanas pueden ser un reservorio a nivel intestinal de microorganismos multirresistentes. A diferencia de *Shigella*, en la que está demostrada la transmisión sexual, existen escasos estudios respecto al posible papel que el contacto sexual pueda tener en la transmisión de bacterias multirresistentes que colonizan el tracto intestinal.

Por ello, el objetivo de este estudio es identificar si el contacto sexual puede ser una vía de transmisión de enterobacteriales MDR no enteropatógenos. Para ello pretendemos determinar la prevalencia y caracterizar las enterobacterias productoras de BLEE identificadas entre HSH que acuden a un cribado de ITS (Drassexpres) en el centro de Enfermedades Transmisibles Vall d'Hebron-Drassanes (Barcelona) durante el mes de mayo de 2021.

Los objetivos específicos que se derivan son:

- A. Determinar la prevalencia de enterobacterias productoras de BLEE entre HSH que acuden a un cribado de ITS.
- B. Caracterizar desde un punto de vista genómico las enterobacterias productoras de BLEE incluyendo su relación filogenómica, y los determinantes de resistencia a los principales antimicrobianos utilizados en la práctica clínica y sus factores de patogenicidad.
- C. Investigar la relación genética existente con aislados productores de BLEE identificados en otros estudios internacionales con el fin de identificar la posible diseminación y transmisión de clones de alto riesgo epidemiológico.

# Resultados



## 1. Identificación de los linajes de *Shigella* circulantes en Barcelona entre hombres que mantienen relaciones sexuales con hombres

### Circulation of multi-drug-resistant *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* among men who have sex with men in Barcelona, Spain, 2015–2019

**Albert Moreno-Mingorance**, Paula Espinal, Virginia Rodriguez, Lidia Goterris, Anna Fàbrega, Judit Serra-Pladevall, M. Jesús Barberà, Mireia Alberny, Héctor Martín-González, Thais Cornejo-Sánchez, Mayuli Armas, Alba Mir-Cros, Alex Raventós, Belén Viñado, Tomàs Pumarola, M. Nieves Larrosa, Juan José González-López

*International Journal of Antimicrobial Agents* 2021, 58(3), 106378.

DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2021.106378

2021 Factor de impacto: 15.441 (Q1)

#### Breve resumen

A lo largo de los últimos años, se ha descrito en países de nuestro entorno un incremento de brotes de shigelosis entre HSH. La mayoría de los casos están producidos por *S. flexneri* y *S. sonnei*. En este trabajo se caracterizan las poblaciones de *Shigella* pertenecientes a estas especies obtenidas de HSH con diarrea atendidos en centros sanitarios de la ciudad de Barcelona.

En el servicio de microbiología del Hospital Universitario Vall d'Hebron se obtuvieron entre 2015 y 2019 80 aislados de *S. flexneri* y 107 de *S. sonnei*. De estas, el 55% de *S. flexneri* y el 24,3% de *S. sonnei* se consideró que se obtuvieron de pacientes HSH tras la revisión de las historias clínicas. Los estudios de sensibilidad antimicrobiana revelaron que el 80% de los aislados asociados a HSH eran resistentes a azitromicina, el 65,7% a cotrimoxazol y el 32,8% a ciprofloxacino. La resistencia simultánea a los tres antibióticos solo se detectó en *S. sonnei*, y representando el 65,4% del total de aislados de esta especie. Por lo que respecta a

## Resultados

ceftriaxona, únicamente el 2,8% de los aislados asociados a HSH fueron resistentes a este antimicrobiano.

Por lo que respecta a los determinantes de resistencia detectados, los aislados asociados a HSH y que se mostraron resistentes a la azitromicina eran portadores de los genes *mphA* y/o *ermB*; los resistentes al cotrimoxazol codificaban diversas combinaciones de *dfrA1*, *dfrA17*, *sul1* y *sul2*; los resistentes al ciprofloxacino presentaban mutaciones en la región determinante de resistencia a quinolonas de *gyrA* y *parC*; y aquellos aislados resistentes a la ceftriaxona eran portadoras del gen *bla*<sub>CTX-M-27</sub>.

En cuanto a la estructura poblacional de los aislados de *S. flexneri* asociados a HSH, se observó que estos pertenecían a tres filogrupos diferentes (FG1-FG3) y a siete serotipos (1b, 1c, 2a, 2b, 3a, 5a, e Y). Además, en la representación gráfica de la filogenia los aislados se organizaron en seis clados. El filogrupo más prevalente fue el FG3 al que pertenecían el 40,9% de los aislados e incluía principalmente aislados del serotipo 2a y un aislado del serotipo Y. Por lo que respecta a *S. sonnei*, todos los aislados obtenidos pertenecían al linaje III y se distribuían en cuatro clados. El clado 4 fue el mayoritario, agrupando el 69,2% de los aislados de *S. sonnei* y pertenecían al genotipo CipR.MSM5. Todos los aislados de este clado se caracterizaron por presentar una triple mutación en QRDR y ser portadores de los genes *mphA* y *ermB*.

Finalmente, el análisis filogenético también reveló que la mayoría de los aislados estudiados de ambas especies estaban estrechamente relacionados genéticamente con aislados descritos en otros países. Los genomas representantes del Reino Unido y Australia de sublinajes de *S. flexneri* 2a y 3a asociados a brotes intercontinentales fueron muy próximos genéticamente a los obtenidos en Barcelona. Lo que confirmaría la introducción de estos sublinajes en Barcelona. En cuanto a *S. sonnei*, genomas de estos dos países también fueron próximos genéticamente al clado 4. El genotipo CipR.MSM5 no era el más prevalente en los estudios que había publicados hasta el momento, aunque posteriormente se ha evidenciado una diseminación global. Cabe destacar que los sublinajes más detectados de ambas especies

## Resultados

presentaban resistencia a azitromicina mediada por los genes *mphA* o *ermB* codificados en el plásmido pKSR100, el cual se ha propuesto como posible factor clave en el éxito de la diseminación de estos sublinajes. Por lo tanto, a pesar de la falta actual de un punto de corte de susceptibilidad clínica para la azitromicina en enterobacterias, se espera un alto potencial de fracaso terapéutico si la azitromicina se utiliza como tratamiento empírico contra la shigelosis de adquisición doméstica en hombres.

## 2. Caracterización de los aspectos microbiológicos involucrados en el aumento de *Shigella* productora de BLEE multirresistente y extremadamente resistente identificadas en Barcelona entre los años 2020 y 2021

### **Increasing trend of antimicrobial resistance in *Shigella* associated with MSM transmission in Barcelona, 2020-21: outbreak of XDR *Shigella sonnei* and dissemination of ESBL-producing *Shigella flexneri***

**Albert Moreno-Mingorance**, Alba Mir-Cros, Lidia Goterris, Virginia Rodríguez-Garrido, Elena Sulleiro, M. Jesús Barberà, Mireia Alberny, Yannick Hoyos-Mallecot, Vicente Descalzo, Albert Bravo, Josep Roca-Grande, Belén Viñado, Tomàs Pumarola, M. Nieves Larrosa, Juan José González-López

*Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2023

DOI: 10.1093/jac/dkad031

2021 Factor de impacto 5.758 (Q1)

#### Breve resumen

Recientemente, investigadores de diversos países han comunicado un aumento en la detección de *Shigella sonnei* productora de BLEE asociada a transmisión entre HSH. En el estudio previo realizado por nuestro grupo, únicamente el 2,8% de *Shigella* spp. obtenidas de HSH en Barcelona entre 2015 y 2019 eran productoras de BLEE. Sin embargo, en el periodo comprendido entre 2020 y 2021, evidenciamos un aumento en la prevalencia de la resistencia a cefalosporinas de tercera generación, la cual se situó en un 38%. Es por esta razón, que el principal objetivo de este segundo estudio fue identificar los mecanismos moleculares subyacentes responsables de la resistencia a esta familia de antimicrobianos, así como caracterizar estos aislados con el fin de identificar la existencia de posibles transmisiones locales, y su relación con clones circulantes en otros países.

## Resultados

Entre 2020 y 2021, se aislaron 37 *S. sonnei* y 43 *S. flexneri* en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Vall d'Hebron. De estas, el 59,5% de *S. sonnei* y el 65,1% de *S. flexneri* se consideraron que fueron adquiridas por contacto sexual entre HSH. El análisis de sensibilidad de los aislados reveló que el 49% de *S. sonnei* y el 12% de *S. flexneri* eran productoras de BLEE. Por fuente de adquisición, el 83% de los productores de BLEE fueron obtenidos de HSH. El análisis genómico reveló que todos los aislados de *Shigella* productores de BLEE asociados a HSH codificaban *bla*<sub>CTX-M-27</sub> en un plásmido del tipo pKSR100.

En cuanto a la estructura poblacional, los aislados de *S. sonnei* productores de BLEE asociados a HSH, pertenecieron al genotipo CipR.MSM5 y formaron un clado separado de los aislados no productores de BLEE del mismo genotipo obtenidos entre 2015 y 2021. Estos resultados sugieren una introducción internacional del genotipo CipR.MSM5 productor de CTX-M-27 como origen del brote detectado en Barcelona. Por lo que respecta a *S. flexneri*, todos los aislados productores de BLEE relacionados con HSH pertenecieron al serotipo 2a, los cuales formaron un clado independiente y con una reducida distancia genética. La distancia detectada, junto a la falta de vínculos epidemiológicos entre los pacientes de los cuales se obtuvieron los aislados, sugiere la posible existencia de casos secundarios no detectados. La diseminación internacional de brotes de *Shigella* resistentes cada vez a más familias de antimicrobianos, pone de manifiesto la necesidad de incrementar los esfuerzos en la vigilancia conjunta basada en la secuenciación del genoma completo, con tal de monitorizar y prevenir la expansión de futuros brotes, poniendo especial foco en el colectivo HSH.

## Increasing trend of antimicrobial resistance in *Shigella* associated with MSM transmission in Barcelona, 2020–21: outbreak of XDR *Shigella sonnei* and dissemination of ESBL-producing *Shigella flexneri*

Albert Moreno-Mingorance<sup>1,2</sup>, Alba Mir-Cros<sup>1,3</sup>, Lidia Goterris<sup>1,4</sup>, Virginia Rodriguez-Garrido<sup>1,4</sup>, Elena Sulleiro<sup>1,2,3,4</sup>, M. Jesús Barberà<sup>5</sup>, Mireia Alberny<sup>6</sup>, Yannick Hoyos-Mallecot<sup>1,4</sup>, Vicente Descalzo<sup>5</sup>, Albert Bravo<sup>4</sup>, Josep Roca-Grande<sup>1,2,3</sup>, Belén Viñado<sup>1,4</sup>, Tomàs Pumarola<sup>1,2,3,4</sup>, M. Nieves Larrosa<sup>1,2,3,4</sup>† and Juan José González-López<sup>1,2,3,4</sup>†

<sup>1</sup>Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Vall d'Hebron Hospital Universitari, Vall d'Hebron Barcelona Hospital Campus, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Department of Genetics and Microbiology, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain; <sup>3</sup>CIBER de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; <sup>4</sup>Department of Clinical Microbiology, Vall d'Hebron Hospital Universitari, Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain; <sup>5</sup>Drassanes-Vall d'Hebron Sexually Transmitted Infections Unit, Vall d'Hebron Hospital Universitari, Barcelona, Spain; <sup>6</sup>Primary Health-Care Division, Catalan Institute of Health, Barcelona, Spain

\*Corresponding author: E-mail: juanjo.gonzalez@vallhebron.cat

†These senior authors contributed equally to this article.

Received 6 September 2022; accepted 23 January 2023

**Background:** Several countries have recently reported the detection of ESBL-producing *Shigella sonnei* associated with transmission among MSM. In a previous study by our group, 2.8% of *Shigella* spp. obtained from MSM in Barcelona between 2015 and 2019 were ESBL producers.

**Objectives:** To describe and characterize the emerging ESBL-producing *Shigella* spp. associated with sexual transmission among MSM detected from 2020 to 2021 in Barcelona, elucidating their connectivity with contemporaneous ESBL-producing *Shigella* spp. from other countries.

**Results:** From 2020 to 2021, we identified that among MSM, 68% of *S. sonnei* were XDR harbouring *bla*<sub>CTX-M-27</sub> and 14% of *Shigella flexneri* were MDR harbouring *bla*<sub>CTX-M-27</sub>. WGS analysis showed that the ESBL-producing *S. sonnei* were part of a monophyletic cluster, which included isolates responsible for the prolonged outbreak occurring in the UK. Our data also reveal the first emergence and clonal dissemination of ESBL-producing and fluoroquinolone-resistant *S. flexneri* 2a among MSM.

**Conclusions:** We report an increasing trend of antimicrobial resistance in *Shigella* spp. among MSM in Barcelona since 2021, mainly as a consequence of the dissemination of XDR ESBL-producing *S. sonnei*, previously reported in the UK. These results highlight the importance of international collaborative surveillance of MDR/XDR *S. sonnei* and *S. flexneri* for rapid identification of their emergence and the prevention of the transmission of these pathogens.

### Introduction

In high-income countries, shigellosis is mainly found in travellers returning from high-risk regions and as a sexually transmitted infection (STI) in MSM. Outbreaks of *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* among MSM have been reported worldwide.<sup>1–6</sup> According to international guidelines, the antibiotic therapy recommended for shigellosis includes ciprofloxacin, azithromycin, trimethoprim/sulfamethoxazole (co-trimoxazole) or ceftriaxone

as a first/second-line treatments.<sup>7,8</sup> During the last decade, an increase in the number of cases of shigellosis in MSM, especially by isolates resistant to oral treatments, has been documented. Recently, the emergence of ESBL-producing *S. sonnei* has been reported in several countries.<sup>1,9–11</sup> In a rapid risk assessment released in February 2022, the ECDC raised the level of risk of shigellosis due to MDR *S. sonnei* for MSM to moderate, based on the high probability of infection but the low impact of such infection.<sup>10</sup>

© The Author(s) 2023. Published by Oxford University Press on behalf of British Society for Antimicrobial Chemotherapy.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact [journals.permissions@oup.com](mailto:journals.permissions@oup.com)

In a previous study conducted by our group, we showed that among MSM-associated *Shigella* spp. collected in Barcelona from 2015 to 2019 only 2.8% were ESBL producers as they carried *bla*<sub>CTX-M-27</sub>.<sup>12</sup> The aim of this study was to describe and characterize the emerging ESBL-producing *Shigella* isolates associated with sexual transmission among MSM detected from 2020 to 2021 in Barcelona, elucidating their connectivity with contemporaneous ESBL-producing *Shigella* spp. from other countries.

## Methods

### Study population and bacterial isolates

From January 2020 to December 2021, 37 *S. sonnei* and 43 *S. flexneri* were obtained from stool cultures of patients with diarrhoeal disease who attended primary healthcare units in Barcelona and different departments of the Vall d'Hebron Hospital, including the Sexually Transmitted Infections Unit, the Tropical Medicine and International Health Unit, and other medical departments. Duplicate isolates from the same individual were excluded. Patients' medical records were reviewed to collect their sociodemographic characteristics and to identify if pathogen acquisition was related to a sexually transmitted infection among MSM or to other sources.

### Antibiotic susceptibility testing (AST)

AST using selected antimicrobials was performed by disc diffusion or the gradient diffusion method (Etest™, bioMérieux). MICs were interpreted according to the EUCAST clinical breakpoints, except for azithromycin for which epidemiological cut-off values were used (<https://eucast.org/>). MDR isolates were defined as those with resistance to  $\geq 3$  antibiotic categories and XDR as those with susceptibility to only one or two categories of antibiotics.<sup>13</sup>

### WGS and bioinformatic analysis

WGS was performed in all MSM-associated *S. flexneri* and *S. sonnei* as well as all ESBL-producing *Shigella* obtained, regardless of the route of acquisition. Short-read sequencing for each isolate was performed by Nextera DNA Flex and MiSeq (Illumina) according to the manufacturer's instructions. Trimmomatic (v0.38), Unicycler (v0.4.7) and SPAdes (v3.14.1) were used to perform raw-read trimming and *de novo* genome assembly. Shigatyper (v1.0.5), Mykrobe (v0.9.0) and Resistance Gene Identifier (RGI, v4.2.2) were used for *in silico* *S. flexneri* serotyping, *S. sonnei* genotyping and for the identification of acquired antimicrobial resistance genes and point mutations associated with antimicrobial resistance, respectively.

The presence of the plasmid p183660 (accession no. KX008967), which has previously been identified as simultaneously encoding antimicrobial resistance determinants to third-generation cephalosporins (3GCs) (*bla*<sub>CTX-M-27</sub>), macrolides (*mph*(A) and *erm*(B)), sulphonamides (*sul1*), trimethoprim (*dhfrA17*) and aminoglycosides (*aadA5*) in *Shigella* was investigated by mapping the trimmed reads to the plasmid as reference with Snippy (v4.3.6).<sup>14,15</sup>

Based on the results from the short-read sequencing, representative MSM *Shigella* isolates encoding *bla*<sub>CTX-M-27</sub> and showing different resistance phenotypes were sequenced to characterize *bla*<sub>CTX-M-27</sub>-harbouring plasmids by long-read sequencing using MinION technology (Oxford Nanopore Technologies). After DNA extraction using DNeasy PowerSoil Pro Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), libraries were prepared using Native Barcoding Kit 96 v14 and sequenced on R10.4.1 flow cell (Oxford Nanopore Technologies). Basecalling was carried out with Guppy (v6.3.8) in standard mode. After trimming with Fillong (v0.2.1), a hybrid assembly with short reads was performed with Unicycler (v0.4.8) and SPAdes (v3.14.1). Plasmids encoding *bla*<sub>CTX-M-27</sub> were compared with the plasmids

pKSR100 (accession no. LN624486), p183660 and p893916 (accession no. MW396858), which have previously been identified to encode antimicrobial resistance determinants in MSM-associated *Shigella* isolates using BLAST Ring Image Generator (BRIG) and Mauve.<sup>14,15</sup>

Maximum-likelihood phylogeny was carried out with Snippy (v4.3.6) with *S. flexneri* 2a strain 2457T (AE014073) and *S. sonnei* 53G (NC\_016822) as the reference strains, removing recombination events with Gubbins (v2.3.4). Finally, the single-nucleotide polymorphism (SNP)-based phylogenetic tree was constructed after 1000 bootstrap replicates with the IQ-Tree (v1.6.10) and tree annotation with relevant metadata was performed with the interactive tree of life (iTOL) (<http://itol.embl.de>). The genome of representative *Shigella* spp. isolates previously studied by our group and obtained from MSM from Barcelona in the period 2015–19 as well as the genome of international isolates obtained in previous studies were included to add context (Table S1, available as [Supplementary data](#) at JAC Online).

### Data analysis

Categorical variables were compared using the chi-squared test ( $\chi^2$  test) or Fisher's exact test when appropriate.

### Sequence data deposition

Reads used for this study were deposited in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) under the BioProject number PRJNA864648.

### Ethics

The study was approved by the Ethics Committee of the Vall d'Hebron Hospital, reference number PR(AG)456/2020. The study was conducted in accordance with the principles laid out in the Declaration of Helsinki and in accordance with the principles of Good Clinical Practice.

## Results

### Bacterial isolates and antimicrobial resistance

From 2020 to 2021, 37 *S. sonnei* and 43 *S. flexneri* were obtained from 80 patients in the Clinical Microbiology Department of the Vall d'Hebron Hospital. Of these, 59.5% of *S. sonnei* (22/37) and 65.1% of *S. flexneri* (28/43) were considered to have been acquired through sexual contact among MSM ( $n=50$ , median age 36.2 years, range 20–63) with no history of recent travel to low- or middle-income countries.

AST showed that 29% of *Shigella* spp. were ESBL producers. By species, 49% of *S. sonnei* (18/37) and 12% of *S. flexneri* (5/43) produced this resistance mechanism. By years, 33% of *S. sonnei* (5/15) were ESBL producers in 2020, and 59% in 2021 (13/22). Regarding *S. flexneri*, no ESBL producers were identified in 2020; however, 23% of the isolates obtained in 2021 (5/22) possessed this resistance mechanism. According to the source of acquisition, 83% (19/23) of ESBL-producing *Shigella* could be identified as acquired among MSM. The susceptibility to the remaining first-/second-line antimicrobials is shown in Table 1. MDR was found in 95% and 14% of MSM-associated *S. sonnei* and *S. flexneri*, respectively, while XDR was only detected among *S. sonnei* as 68% were co-resistant to azithromycin, ciprofloxacin, co-trimoxazole and cephalosporins (Table 1).

Antimicrobial resistance gene content analysis revealed that among the ESBL-producing *Shigella* isolates, 87% (20/23)

**Table 1.** Antimicrobial resistance rates of *S. sonnei* and *S. flexneri* isolates obtained in this study from 2020 to 2021, classified according to the source of acquisition

	<i>S. sonnei</i>			<i>S. flexneri</i>		
	MSM (N=22) n (%)	Non-MSM/Unk (N=15) n (%)	Total (N=37) n (%)	MSM (N=28) n (%)	Non-MSM/Unk (N=15) n (%)	Total (N=43) n (%)
Antimicrobial agent						
Ceftriaxone	15 (68)	3 (20)	18 (49)	4 (14)	1 (7)	5 (12)
Cefixime	15 (68)	3 (20)	18 (49)	4 (14)	1 (7)	5 (12)
Ertapenem	0	0	0	0	0	0
Ciprofloxacin	<b>21 (95)</b>	4 (27)	25 (68)	11 (39)	5 (33)	16 (37)
Co-trimoxazole	<b>22 (100)</b>	9 (60)	31 (84)	10 (36)	6 (40)	16 (37)
Azithromycin	<b>21(95)</b>	1 (7)	22 (59)	17(61)	5 (33)	22 (51)
MIC 16–48 mg/L	0	2 (13)	2 (5)	3 (11)	1 (7)	4 (9)
MIC ≥ 64 mg/L	21 (95)	1 (7)	22 (59)	14 (50)	4 (27)	18 (42)
MDR	<b>21 (95)</b>	3 (20)	24 (65)	5 (18)	1 (6)	6 (14)
XDR	<b>15 (68)</b>	1 (7)	16 (43)	0	0	0

Unk, unknown. *P* values <0.05 were considered statistically significant at the 95% CI level. Significance found between acquisition groups within the same species, indicated by bold type.

encoded *bla*<sub>CTX-M-27</sub> and 13% (3/23) *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. All (19/19) MSM-ESBL-producing isolates encoded *bla*<sub>CTX-M-27</sub>, while among the non-MSM/unknown origin isolates, 25% (1/4) harboured *bla*<sub>CTX-M-27</sub> and 75% (3/4) *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. Interestingly, three MSM-associated *S. sonnei* encoded *bla*<sub>CTX-M-27</sub> despite being susceptible to all the β-lactams tested and not showing evidence of ESBL production (i.e. synergy between amoxicillin/clavulanate and 3GCs). The genomic analysis of these isolates showed a disruption of the –35 (TTGAAA) and –10 (TACAAT) promoter regions of *bla*<sub>CTX-M-27</sub> due to the inversion of an IS26 element located upstream (Figure 1, pSH280). Azithromycin-resistant isolates encoded *mph*(A) and/or *erm*(B), the co-trimoxazole resistant showed different combinations of the *dfrA1*, *dfrA17*, *sul1* and *sul2* genes and the ciprofloxacin-resistant isolates presented triple mutations in the QRDRs of the *gyrA* (S83L and D87G/N) and *parC* (S80I) genes. Other single mutations in QRDRs as well as plasmid-mediated quinolone resistance mediated by the *Qnr* family were also detected (Table S1).

**Genomic analysis of *bla*<sub>CTX-M-27</sub>-encoding plasmids**

Plasmid alignment of the trimmed short reads revealed that all MSM-associated *S. sonnei* encoding *bla*<sub>CTX-M-27</sub> showed 95% coverage of p183660, while the MSM-associated *S. flexneri* encoding *bla*<sub>CTX-M-27</sub> exhibited a coverage of between 79% and 89%. Consequently, two MSM-associated *S. sonnei* (SH212 and SH280) and two *S. flexneri* (SH242 and SH282) encoding *bla*<sub>CTX-M-27</sub> and showing different resistance phenotype were selected for long-read sequencing to perform a detailed genomic analysis of *bla*<sub>CTX-M-27</sub>-harbouring plasmids and to compare them with previously identified *Shigella* MSM-associated plasmids pKSR100, p183660 and p893916.

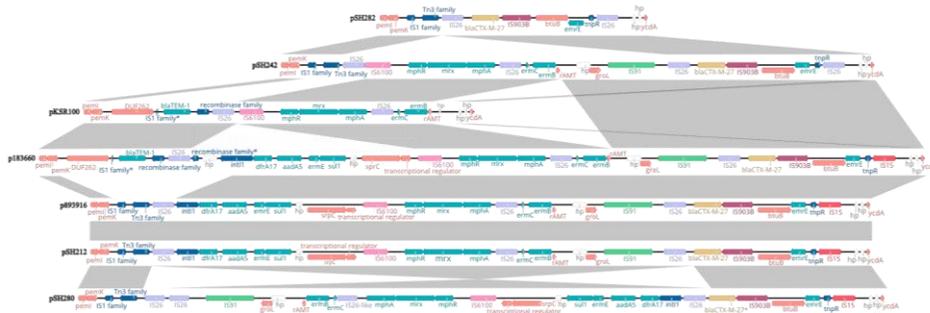
The *bla*<sub>CTX-M-27</sub>-encoding plasmid from the *S. sonnei* isolates (pSH212 and pSH280) showed a high identity and coverage with plasmid pKSR100 (identity 98.11%; coverage 90%) described in a

non-ESBL producer *S. flexneri* 3a from the UK, with p183660 (identity >99.97%; coverage 92%) previously identified from a CTX-M-27-producing *S. sonnei* isolate in the UK in 2015 and with plasmid p893916 (identity >99.98%; coverage 100%) described in a CTX-M-27-producing CipR.MSM5 genotype *S. sonnei* from the UK in 2020. On the other hand, the *bla*<sub>CTX-M-27</sub>-encoding plasmid from the *S. flexneri* isolates (pSH242 and pSH282) also showed high identity with pKSR100, p183660 and p893916, but lower coverage than that found within the *S. sonnei* isolates (identity >97.9%; coverage 83%–90%; identity >99.9%; coverage 76%–86% and identity >99.89%; coverage 82%–93%, respectively).<sup>14,15</sup> The p183660 backbone was conserved in all plasmids, showing structural differences mainly due to deletions and genomic reorganizations of mobile genetic elements containing different combinations of antimicrobial resistance determinants. Specifically, pSH242 and pSHS282 from *S. flexneri* did not harbour the pKSR100 integron containing sulphonamide, trimethoprim and aminoglycoside resistance genes (*sul1*, *dfrA17* and *aadA5*), and additionally pSHS282 did not carry the genomic region containing the macrolide resistance determinants *mph*(A) and *erm*(B). Interestingly, *bla*<sub>CTX-M-27</sub> in *S. sonnei* was flanked by IS26 and IS15 while in *S. flexneri* it was flanked by two IS26 (Figure 1 and Figure S1).

**Genotyping, serotyping and genomic epidemiology of *Shigella* spp.**

Genotyping of XDR ESBL-producing *S. sonnei* isolates according to the Hawkey’s classification showed that 100% (15/15) of MSM-associated isolates belonged to the CipR.MSM5 genotype (genotype number 3.6.1.1.2) [Figure 2(a)].<sup>16</sup> The three non-MSM/unknown origin ESBL-producing *S. sonnei* belonged to genotypes CipR.MSM5, MSM4 (genotype number 3.7.25) and Central Asia III (genotype number 3.6), respectively [Figure 2(a)]. It was of note that the non-MSM-associated *S. sonnei* belonging to genotype

Increased AMR in MSM-associated *Shigella* spp., Barcelona



**Figure 1.** Structural organization of the region encoding antibiotic resistance determinants of *bla*<sub>CTX-M-27</sub>-harbouring plasmids of *S. sonnei* and *S. flexneri* from this study compared with MSM-associated *Shigella* plasmids pKSRI100, p183660 and p893916. pSH282 and pSH242, respectively; pSH212 and pSH280 are plasmids of *S. sonnei* SH212 and SH280, respectively. Light grey shading denotes shared regions of identity. DUF denotes domain-containing proteins. \* denotes partial features. This figure appears in colour in the online version of JAC and in black and white in the print version of JAC.

CipR.MSM5 was obtained from a female in the context of an intra-familial transmission event involving an MSM positive for *S. sonnei* (SNP distance=1) (Figure 2). Regarding the MSM-associated non-ESBL-producing *S. sonnei* isolates, 86% (6/7) belonged to the genotype CipR.MSM5 and 14% (1/7) to the CipR.parent (genotype number 3.6.1).

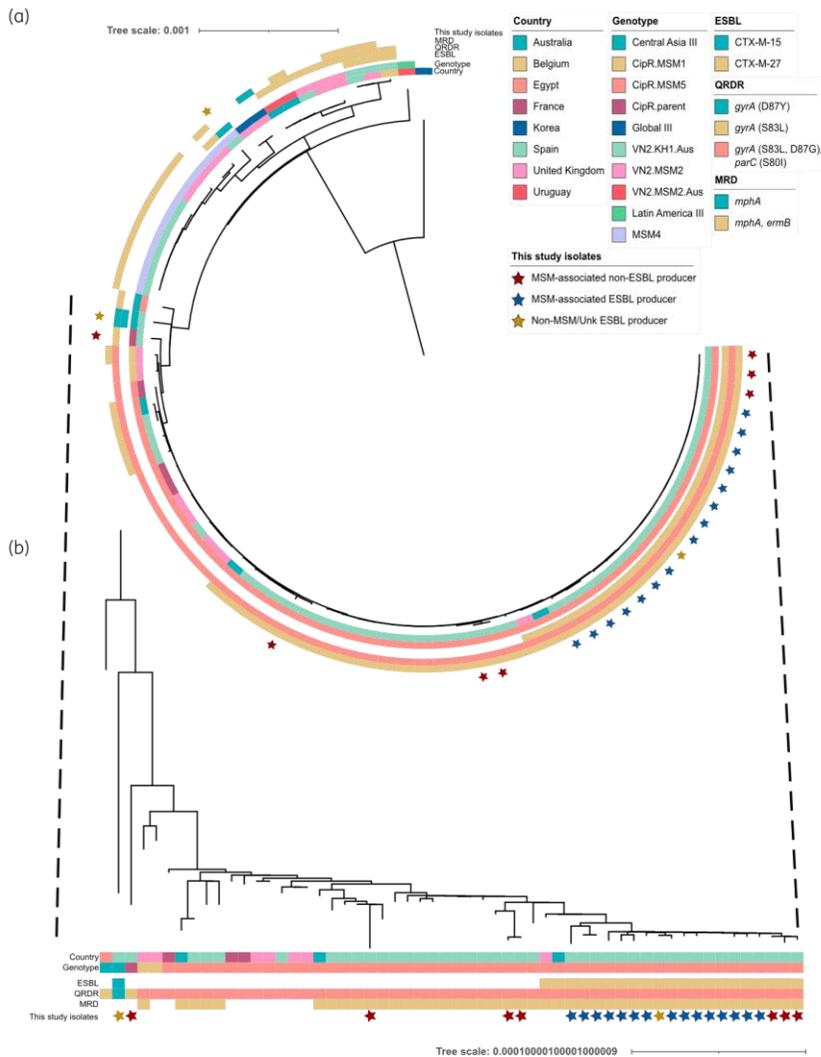
The phylogeny of the *S. sonnei* isolates belonging to the 3.6 clade showed that all the XDR ESBL-producing CipR.MSM5 isolates obtained in this study nested together and were genetically closer to the representative XDR CipR.MSM5 isolates obtained in the UK (SRR11206407) and Australia (SRR12132003) (range 6–11 SNPs) than to the non-ESBL-producing CipR.MSM5 *S. sonnei* isolates obtained in Barcelona between 2015 and 2019 (range 12–42 SNPs) [Figure 2(b)].<sup>1,15</sup> On the contrary, the non-ESBL-producing CipR.MSM5 isolates obtained between 2020 and 2021 were genetically closer to the CipR.MSM5 isolates obtained in Barcelona in the period 2015–19. Finally, the three isolates encoding *bla*<sub>CTX-M-27</sub> but not showing an ESBL phenotype also belonged to CipR.MSM5 and were clustered together (range 1–3 SNPs) [Figure 2(b)].

The *in silico* serotyping of MSM-associated *S. flexneri* showed that 46% (13/28) belonged to the 2a serotype, 27% (8/28) to 3a, 21% (6/28) to 1b and 4% (1/28) to 1c. All the ESBL-producing *S. flexneri* isolates (5/5) belonged to the 2a serotype. The four MSM-associated ESBL-producing *S. flexneri* isolates formed a closely related independent cluster within the phylogeny (range 0–15 SNPs) and no epidemiological link was identified among the patients from whom these isolates were obtained. The remaining non-MSM-associated ESBL-producing isolates showed a higher genetic distance from them (range 200–204 SNPs) (Figure 3). The four MSM-associated ESBL-producing isolates possessing a triple mutation in the QRDR [*gyrA* (S83L and D87N) and *parC* (S80I)] were genetically close to the non-ESBL-producing fluoroquinolone-resistant *S. flexneri* identified in Barcelona in the 2015–19 and 2020–21 periods, in Australia in 2016 (SRR7885970) and in the UK in 2020 (SRR12175226) (Figure 3).<sup>17,18</sup>

**Discussion**

We describe an increase and dissemination of XDR ESBL-producing *S. sonnei* and MDR ESBL-producing *S. flexneri* among MSM in Barcelona during 2020–21. Specifically, 68% of *S. sonnei* and 14% of *S. flexneri* acquired by MSM were ESBL producers and simultaneously resistant to ciprofloxacin, azithromycin and/or co-trimoxazole. These findings differ from the data previously obtained by our group in 2015–19, in which only 3.8% of *S. sonnei* and 2.3% of *S. flexneri* acquired among MSM were ESBL producers.<sup>12</sup>

ESBL-producing *S. sonnei* among MSM has been detected in several countries. Australia reported a prolonged outbreak of ESBL-producing *S. sonnei* belonging to the VN2.KH1.Aus genotype (genotype number 3.7.29.1.4.1) from 2019 to 2020, mainly associated with males.



**Figure 2.** Phylogenomic analysis of *S. sonnei* isolates. (a) Maximum-likelihood tree of the ESBL-producing *S. sonnei* and MSM-associated *S. sonnei* isolates collected in Barcelona in this study from 2020 to 2021 ( $n=25$ ), as well as the MSM-associated *S. sonnei* isolates previously identified in the 2015–19 period in Barcelona ( $n=26$ ) and the selected international representative *S. sonnei* isolates ( $n=27$ ). The tree was rooted with *S. sonnei* 53G. (b) Phylogeny of the *S. sonnei* isolates belonging to the 3.6 clade based on the Hawkey *et al.* classification. Isolate metadata and molecular characteristics are colour coded, as detailed in the key. MRD, macrolide resistance determinant. This figure appears in colour in the online version of *JAC* and in black and white in the print version of *JAC*.

# Resultados

Increased AMR in MSM-associated *Shigella* spp., Barcelona



**Figure 3.** Phylogenomic analysis of *S. flexneri* isolates. Maximum-likelihood tree of the ESBL-producing *S. flexneri* and MSM-associated *S. flexneri* isolates collected in Barcelona in this study from 2020 to 2021 ( $n = 29$ ), as well as the MSM-associated *S. flexneri* isolates previously identified in the 2015–19 period in Barcelona ( $n = 44$ ) and the selected international representative *S. flexneri* isolates ( $n = 31$ ). The tree was rooted with *S. flexneri* 2a strain 2457T. Isolate metadata and molecular characteristics are colour coded, as detailed in the key. MRD: macrolide resistance determinant. This figure appears in colour in the online version of JAC and in black and white in the print version of JAC.

in December 2020 in Barcelona; however, in June 2021 a re-appearance and rapid outbreak expansion was detected. The *S. sonnei* phylogeny revealed that all the outbreak-related XDR CipR.MSM5 isolates from Barcelona were part of the same monophyletic cluster in which the representative XDR CipR.MSM5 isolates from the UK and Australia were also found. This fact reinforces the international transmission hypothesis by which

this clone has been introduced in our country, replacing the non-ESBL-producing CipR.MSM5 clone, which previously circulated in our area, and originating a local outbreak in Barcelona. The successful dissemination of this clone among different countries may be the consequence of the interconnected international sexual networks among MSM after the relaxation on the COVID-19 epidemic measures in the summer of 2020.<sup>11,12,20</sup>

On the other hand, the genomic analysis of *bla*<sub>CTX-M-27</sub>-encoding plasmids in this study showed a high similarity of these mobile genetic elements with previous plasmids encoding resistance to macrolides, co-trimoxazole, aminoglycosides and/or  $\beta$ -lactams in MSM-associated *Shigella* (pKSR100, p183660 and p893916). The pKSR100 plasmid, which among others encodes macrolide resistant determinants, was proposed to have had a role in driving the epidemics of azithromycin-resistant *S. sonnei* and *S. flexneri* among MSM.<sup>21</sup> Thus, the combination of pKSR100-type plasmids that have acquired *bla*<sub>CTX-M-27</sub> with a successfully disseminated genotype of *S. sonnei* could have facilitated the expansion and increase of XDR ESBL-producing *Shigella* among MSM during the last 2 years. Additionally, the location of several resistance genes within the same plasmid could also be an element that may contribute to its co-selection and dissemination, especially in contexts of high antibiotic pressure such as MSM receiving treatment for other STIs such as *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infection, as has previously been documented in the UK.<sup>11</sup>

Unlike *S. sonnei*, no MSM-associated outbreaks of ESBL-producing *S. flexneri* have previously been reported. In our study, we identified four MSM-associated CTX-M-27-producing *S. flexneri* 2a isolates. As no epidemiological link was detected among the patients from whom these isolates were obtained and they showed a close genetic distance, the existence of secondary non-detected cases could be considered. *bla*<sub>CTX-M-27</sub> in *S. flexneri* isolates was found in a pKSR100-related plasmid and showed a high identity with plasmids harbouring *bla*<sub>CTX-M-27</sub> in *S. sonnei*. Consequently, the hypothesis of the acquisition by *S. flexneri* of pKSR100-type encoding the *bla*<sub>CTX-M-27</sub> plasmid circulating among *S. sonnei* would be plausible. For this to occur, several genomic reorganizations involving the loss of several antimicrobial resistance genes should have happened. Another possible scenario could have been the acquisition of a genomic fragment containing *bla*<sub>CTX-M-27</sub> by a circulating pKSR100-type plasmid in *S. flexneri* mediated by the IS26 elements flanking this structure. These hypotheses have yet to be confirmed. In any case, it is necessary to continue monitoring the evolution of ESBL production in *S. flexneri* isolates in MSM in our environment, as well as their possible emergence or dissemination in other countries.

In this study we identified a significant increase of quinolone resistance in *S. flexneri* in MSM compared with what we observed in the 2015–19 period (4.5% versus 38%) as a consequence of the introduction of fluoroquinolone-resistant *S. flexneri* 2a ( $P < 0.05$ ).<sup>12</sup> Although the MSM-associated ESBL-producing *S. flexneri* detected in Barcelona should not be considered XDR, as simultaneous resistance to co-trimoxazole and azithromycin has not yet been found, these results should warn of the possibility that *S. flexneri* could also acquire additional resistance determinants, thereby following the same antibiotic resistance evolution as the MSM-related *S. sonnei*. This could be a plausible phenomenon that might happen by horizontal gene acquisition of such resistance determinants in a population with high antimicrobial exposure.

One limitation of this study is that due to the retrospective design of the research, some demographic and epidemiological data are missing. Specifically, data regarding sexual contacts or information about travel to non-low- or -middle-income

countries by the cases included was not collected, and consequently, it was not possible to establish epidemiological links between the patients and/or identify possible transmission chains.

In summary, in this work we report an increasing trend of antimicrobial resistance in *Shigella* spp. among MSM in Barcelona since 2021, mainly as a consequence of the emergence of an outbreak of XDR ESBL-producing *S. sonnei* belonging to the CipR.MSM5 genotype. Our data demonstrate a close genetic link with the XDR ESBL-producing *S. sonnei* isolates responsible for the prolonged outbreak detected in the UK also in 2021, confirming its successful international dissemination coinciding with the increase in social interactions after the COVID-19 lockdown. Additionally, to our knowledge, we have detected the first clonal dissemination of MDR ESBL-producing *S. flexneri* among MSM, which also represents a significant health threat. These results reinforce the importance of collaborative international surveillance of MDR/XDR *Shigella* spp. for rapid identification of its emergence as well as the need to implement measures that allow early diagnosis and contact tracing of cases of shigellosis among MSM to reduce its dissemination.

## Acknowledgements

We would like to thank the technical staff of the Clinical Microbiology Laboratory of Hospital Vall d'Hebron for their contribution to the study.

## Funding

This work was partially supported by the 'Ministerio de Economía y Competitividad', 'Instituto de Salud Carlos III', and co-financed by the European Regional Development Fund (ERDF) 'A Way to Achieve Europe' (Spanish Network for Research in Infectious Diseases, grant number RD16/0016/0003) and by the Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBER de Enfermedades Infecciosas, grant no. CB21/13/00054). A.M.M. is supported by a grant from the 'Fondo de Investigación Sanitaria' (Contratos Predoctorales de Formación en Investigación, grant number FI19/00315).

## Transparency declarations

All authors declare that they have no conflicts of interest to disclose.

## Supplementary data

Figure S1 and Table S1 are available as [Supplementary data](#) at JAC Online.

## References

- 1 Ingle DJ, Andersson P, Valcanis M, *et al.* Prolonged outbreak of multidrug-resistant *Shigella sonnei* harboring *bla*<sub>CTX-M-27</sub> in Victoria, Australia. *Antimicrob Agents Chemother* 2020; **64**: e01518-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.01518-20>
- 2 Baker KS, Dallman TJ, Field N *et al.* Genomic epidemiology of *Shigella* in the United Kingdom shows transmission of pathogen sublineages and determinants of antimicrobial resistance. *Sci Rep* 2018; **8**: 7389. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25764-3>
- 3 Tsai C-S, Lin K-Y, Liou B-H *et al.* Changing epidemiology of shigellosis in Taiwan, 2010–2019: an emerging threat to HIV-infected patients and

Increased AMR in MSM-associated *Shigella* spp., Barcelona

- men who have sex with men. *Emerg Microbes Infect* 2022; **11**: 498–506. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2031309>
- 4** Fischer N, Maex M, Mattheus W et al. Genomic epidemiology of persistently circulating MDR *Shigella sonnei* strains associated with men who have sex with men (MSM) in Belgium (2013–19). *J Antimicrob Chemother* 2021; **77**: 89–97. <https://doi.org/10.1093/jac/dkab377>
- 5** Campbell D, Bowen A, Bhatnagar A et al. Identification and characterization of *Shigella* with decreased susceptibility to azithromycin in the United States, 2005 to 2014. *J Glob Antimicrob Resist* 2020; **21**: 417–9. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.12.005>
- 6** Wilmer A, Romney MG, Gustafson R et al. *Shigella flexneri* serotype 1 infections in men who have sex with men in Vancouver, Canada. *HIV Med* 2015; **16**: 168–75. <https://doi.org/10.1111/hiv.12191>
- 7** Williams PCM, Berkley JA. Guidelines for the treatment of dysentery (shigellosis): a systematic review of the evidence. *Paediatr Int Child Health* 2018; **38**: S50–65. <https://doi.org/10.1080/20469047.2017.1409454>
- 8** Shane AL, Mody RK, Crump JA et al. 2017 Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Infectious Diarrhea. *Clin Infect Dis* 2017; **65**: e45–80. <https://doi.org/10.1093/cid/cix669>
- 9** Campos-Madueno EI, Bernasconi OJ, Moser AI et al. Rapid increase of CTX-M-producing *Shigella sonnei* isolates in Switzerland due to spread of common plasmids and international clones. *Antimicrob Agents Chemother* 2020; **64**: e01057–20. <https://doi.org/10.1128/AAC.01057-20>
- 10** ECDC. Rapid Risk Assessment: Increase in Extensively-drug Resistant *Shigella sonnei* Infections in Men Who have Sex With Men in the EU/EEA and the UK. 2022. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/rapid-risk-assessment-increase-extensively-drug-resistant-shigella-sonnei>.
- 11** Charles H, Prochazka M, Thorley K et al. Outbreak of sexually transmitted, extensively drug-resistant *Shigella sonnei* in the UK, 2021–22: a descriptive epidemiological study. *Lancet Infect Dis* 2022; **22**: 1503–10. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00370-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00370-X)
- 12** Moreno-Mingorance A, Espinal P, Rodríguez V et al. Circulation of multi-drug-resistant *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* among men who have sex with men in Barcelona, Spain, 2015–2019. *Int J Antimicrob Agents* 2021; **58**: 106378. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2021.106378>
- 13** Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012; **18**: 268–81. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- 14** Mook P, McCormick J, Bains M et al. ESBL-producing and macrolide-resistant *Shigella sonnei* infections among men who have sex with men, England, 2015. *Emerg Infect Dis* 2016; **22**: 1948–52. <https://doi.org/10.3201/eid2211.160653>
- 15** Locke RK, Greig DR, Jenkins C et al. Acquisition and loss of CTX-M plasmids in *Shigella* species associated with MSM transmission in the UK. *Microb Genom* 2021; **7**: 000644. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000644>
- 16** Hawkey J, Paranagama K, Baker KS et al. Global population structure and genotyping framework for genomic surveillance of the major dysentery pathogen, *Shigella sonnei*. *Nat Commun* 2021; **12**: 2684. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22700-4>
- 17** Ingle DJ, Easton M, Valcanis M et al. Co-circulation of multidrug-resistant *Shigella* among men who have sex with men in Australia. *Clin Infect Dis* 2019; **69**: 1535–44. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz005>
- 18** Dallman TJ, Charles H, Prochazka M et al. Emergence of novel strains of *Shigella flexneri* associated with sexual transmission in adult men in England, 2019–2020. *J Med Microbiol* 2021; **70**: 001437. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001437>
- 19** Gaudreau C, Bernaquez I, Pilon PA et al. Clinical and genomic investigation of an international ceftriaxone- and azithromycin-resistant *Shigella sonnei* cluster among men who have sex with men, Montréal, Canada 2017–2019. *Microbiol Spectr* 2022; **10**: e02337–21. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02337-21>
- 20** Andrés C, Piñana M, Borrás-Bermejo B et al. A year living with SARS-CoV-2: an epidemiological overview of viral lineage circulation by whole-genome sequencing in Barcelona city (Catalonia, Spain). *Emerg Microbes Infect* 2022; **11**: 172–81. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.2011617>
- 21** Baker KS, Dallman TJ, Field N et al. Horizontal antimicrobial resistance transfer drives epidemics of multiple *Shigella* species. *Nat Commun* 2016; **9**: 1462. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03949-8>

### **3. Detección de la transmisión a través de contacto sexual de enterobacteriales productores de BLEE no pertenecientes al género *Shigella* y que colonizan el tracto intestinal de hombres que mantienen relaciones sexuales con hombres**

**Elevada prevalencia de colonización intestinal por *Escherichia coli* productor de  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido entre hombres que mantienen relaciones sexuales con otros hombres.**

#### Trabajo no publicado

##### Breve resumen

La transmisión de enteropatógenos como *Shigella* por vía sexual está ampliamente descrita. Sin embargo, hasta el momento, existe escasa evidencia del papel que el contacto sexual puede tener en la transmisión de bacterias multirresistentes, como por ejemplo sería el caso de *Escherichia coli* productor de BLEE entre HSH.

Con el fin de identificar si, como se ha observado para *Shigella*, existe una transmisión clonal de enterobacteriales productores de BLEE entre HSH, durante el mes de mayo de 2021 se estudió la colonización por parte de estos microorganismos en HSH que acudían a realizarse un cribado de ITS en el centro de Enfermedades Transmisibles Vall d'Hebron-Drassanes (Barcelona). En total se estudiaron un total de 120 muestras de frotis rectales provenientes de sendos pacientes, identificándose un 17,5% de portadores de *E. coli* productor de BLEE (n=21). No se identificó una relación estadísticamente significativa entre la edad, el número de parejas sexuales, la práctica de sexo anal, o haber sido diagnosticado de sífilis o VIH y estar colonizado por *E. coli* productor de BLEE. No obstante, cabe destacar que, entre los colonizados, respecto a los no colonizados, presentaron una tendencia a ser individuos de mayor edad (p=0.08), un número más elevado de parejas sexuales (p=0.09) y a estar diagnosticado por VIH previamente (0.06).

## Resultados

El análisis de los genomas de los aislados obtenidos reveló que las BLEE detectadas fueron SHV-12 (28,6%), CTX-M-15 (28,6%), CTX-M-27 (19%), CTX-M-14 (9,5%), CTX-M-1 (9,5%) y CTX-M-65 (4,8%). Otros mecanismos de resistencia detectados a otras familias de antimicrobianos fueron mutaciones en QRDR y los genes *mphA*, *dfrA*, *sul* y *tet*. Por lo que respecta a la epidemiología molecular de los aislados, el ST más prevalente fue el ST14 (28,6%), seguido del ST131 (19%). Además, los aislados presentaban diversos determinantes de virulencia asociados a la capacidad de colonización, adherencia, resistencia a suero y toxinas, como son fimbrias del tipo 1 y P, la cápsula del grupo 2, SPATEs y múltiples sistemas de adquisición de hierro.

Finalmente, el estudio de la distancia genética entre los aislados pertenecientes a los ST más prevalentes (ST14 y ST131) de este estudio reveló que los aislados del S14 y los del ST131 presentaban una distancia genética de entre 8-107 SNPs y 1-40 SNPs, respectivamente. Además, tres aislados de Barcelona formaron un clúster muy próximo genéticamente (distancia genética de 1 SNP entre aislados) hecho que junto a la proximidad de aislamiento en el tiempo podría indicar una transmisión reciente.

Adicionalmente, al comparar la distancia genética de nuestros aislados con la de los obtenidos en un estudio previo de similares características en HSH en París, se observó que entre los aislados del ST14 de ambas ciudades la distancia era reducida (rango de SNPS 8-101), intercalándose incluso en algunos casos los aislados de ambos grupos en la filogenia. Este hecho sugiere la posible circulación de aislados de este ST entre ambos países en este colectivo. Por su lado, los aislados del ST131 fueron distantes entre ambas ciudades.

**Elevada prevalencia de colonización intestinal por *Escherichia coli* productor de  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido entre hombres que mantienen relaciones sexuales con otros hombres.**

**II. Introducción**

El aumento de la resistencia a antimicrobianos se ha convertido en un grave problema de salud pública. En 2017, la Organización Mundial de la Salud llevó a cabo una priorización de microorganismos para los cuales era urgente el desarrollo de nuevas terapias debido a las escasas opciones de tratamiento que presentan las infecciones que producen. Entre los que destacan con una prioridad crítica, la más alta de la priorización, se encuentran las enterobacterias productoras de carbapenemasa y las resistentes a cefalosporinas de tercera generación [108].

La transmisión sexual por vía anal-oral de organismos ha sido confirmada para diversos patógenos como *Shigella*, *Campylobacter* o el virus de la Hepatitis A [94,95,99]. Recientemente, se ha reportado una mayor prevalencia en la colonización intestinal de enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido (BLEE) entre hombres que mantienen relaciones sexuales con hombres (HSH) a los que se le realizaba un cribado de infecciones de transmisión sexual (ITS) en Ámsterdam y París, postulándose la transmisión sexual como una de las vías de adquisición [109,110].

Por esta razón, el objetivo de este trabajo es el estudio de la prevalencia de enterobacterias productoras de BLEE en HSH a los que se les realiza un cribado de ITS en el centro de Enfermedades Transmisibles Vall d'Hebron-Drassanes (Barcelona) y llevar a cabo una caracterización genómica de los aislados obtenidos, a fin de conocer la relación genética entre los mismos, su resistoma y su viruloma.

**III. Metodología**

***Población de estudio y aislados bacteriano***

Se estudiaron un total de 120 frotis rectales de HSH sin clínica gastrointestinal que se sometieron a un cribado de ITS (Drassanes Expres) en el centro de Enfermedades

## Resultados

Transmisibles Vall d'Hebron-Drassanes (Barcelona) durante el mes de mayo de 2021. La detección de enterobacterias MDR se realizó mediante la siembra del escobillón en medios de cultivo cromogénicos BBL™ CHROMagar ESBL (Biplate) (BD) para la detección de BLEEs. Las colonias obtenidas se identificaron mediante MALDI-TOF (VITEK MS, BioMérieux). El estudio de sensibilidad antibiótica a ceftriaxona, ciprofloxacino, cotrimoxazol y azitromicina, se llevó a cabo por el método de discodifusión y de difusión en gradiente (E-test bioMérieux) siguiendo las recomendaciones y los criterios de interpretación establecidos por EUCAST [111].

### *Secuenciación del genoma completo*

La extracción del ADN genómico y la preparación de las librerías para la secuenciación de los genomas de los aislados se realizó mediante DNeasy UltraClean Microbial Kit (Qiagen) e Illumina DNA Prep en MiSeq (Illumina), respectivamente. Uno de los aislados que codificaba *bla*<sub>CTX-M-27</sub> (*E. coli* DE008) se secuenció mediante la tecnología MinION (Oxford Nanopore Technologies) para poder obtener lecturas largas y así caracterizar el plásmido que albergaba este determinante de resistencia. Para ello, tras la extracción de ADN con el kit DNeasy PowerSoil Pro (Qiagen, Hilden, Alemania), las librerías se prepararon con el kit Native Barcoding 96 V14 y se secuenciaron en una flowcell R10.4.1 (Oxford Nanopore Technologies).

### *Análisis bioinformático*

Las lecturas fueron filtradas con Trimmomatic (v0.38) [112] y posteriormente ensambladas *de novo* con el *pipeline* Unicycler (v0.4.8) [113]. Los ensamblados resultantes se utilizaron para la búsqueda de determinantes de resistencia con “Resistance gene identifier” (RGI v4.2.2) y los grupos de incompatibilidad plasmídica con Plasmidfinder y pMLST [114,115]. Para la determinación del secuenciotipo de *E. coli* se empleó la herramienta mlst (v2.16.2) [116] y la determinación del alelo del gen *fimH* con FimTyper (v1.1) [117].

## Resultados

La búsqueda de genes de virulencia se llevó a cabo mediante VFAnalyzer y VirulenceFinder [118,119]. Las regiones capsulares fueron inspeccionadas manualmente en los ensamblados anotados con Bakta (v1.2.1) [120].

Para determinar la distancia genética entre los aislados, se llevó a cabo un análisis de polimorfismos con la herramienta Snippy (v4.3.6) [121]. Para ello, se utilizó un genoma de referencia *E. coli* RUT3575 (NZ\_CP048010) para el análisis de toda la especie, *E. coli* EC958 (NZ\_HG941718) para el ST131 y *E. coli* AVS0096 (NZ\_CP076344) para el ST14. Las regiones recombinantes fueron detectadas y eliminadas con Gubbins (v2.3.4) [122] y una vez eliminadas del alineamiento se realizó un análisis filogenético de máxima verosimilitud con IQtree (v1.6.10), con 1000 *bootstraps* [123,124]. Una vez obtenido el árbol, este fue anotado con ITOL [125,126].

El *basecalling* de las lecturas largas se llevó a cabo con Guppy (v6.3.8) en modo estándar [127], el filtrado de las secuencias con Filtrlong (v0.2.1) [128] y se realizó un ensamblaje híbrido junto a las lecturas cortas con Unicycler (v0.4.8) [113]. Los plásmidos codificantes de *bla*<sub>CTX-M-27</sub> se compararon usando BLAST Ring Image Generador (BRIG) y Mauve con los plásmidos codificantes de *bla*<sub>CTX-M-27</sub>: el plásmido pSH212 de *S. sonnei* asociada a HSH en Barcelona y pHP030, plásmido obtenido en Japon de ST131 (NZ\_LC520285) [129].

### *Análisis estadístico*

Las comparaciones se llevaron a cabo mediante la prueba de Pearson  $\chi^2$  o test exacto de Fisher para los datos categóricos y la prueba-U de Mann–Whitney para los datos continuos. Se consideró que existían diferencias significativas en aquellos casos que el resultado de la prueba fue inferior a 0,05.

## IV. Resultados

### *Prevalencia detectada, aislados bacterianos y resistencia antibiótica*

De los 120 usuarios HSH atendidos por el servicio Drassanes Express e incluidos en este estudio, se obtuvo una prevalencia del 17,5% (21/120) de colonización

## Resultados

intestinal por *Escherichia coli* productor de BLEE, siendo esta especie bacteriana la única enterobacteria resistente a cefalosporinas de tercera generación detectada en todos los pacientes. La prevalencia detectada fue mayor en aquellos usuarios positivos al VIH, la cual fue de un 33% (5/15) comparada con la detectada entre los que reportaron ser negativos que fue del 15,2% (16/105).

La mediana de edad de los usuarios colonizados fue de 39 años, la mayoría en los últimos tres meses habían tenido entre 1-5 parejas sexuales (43%), habían practicado sexo anal receptivo (86%) y eran negativos al VIH (76%) y a la sífilis (62%) (**Tabla 1**). Aunque no se detectaron diferencias significativas entre los usuarios colonizados y no colonizados, la mediana de edad entre los colonizados fue superior ( $p=0,08$ ), el número de usuarios VIH positivos también fue superior ( $p=0,06$ ) y presentaron una tendencia hacia un mayor número de parejas sexuales ( $p=0,09$ ) (**Tabla 1**).

Por lo que respecta a la resistencia a otros antibióticos de los aislados productores de BLEE, el 33% (7/21) presentó resistencia a ciprofloxacino y el 52% (11/21) a cotrimoxazol. Se detectó en el 24% (5/21) de los aislados una CIM de azitromicina superior a 16 mg/L. La resistencia simultánea a cefalosporinas de tercera generación, ciprofloxacino y cotrimoxazol fue detectada en el 24% (5/21) de los aislados.

El análisis de los determinantes de resistencia reveló que las BLEE identificadas fueron  $bla_{CTX-M-15}$  (28,6%),  $bla_{SHV-12}$  (28,6%),  $bla_{CTX-M-27}$  (19%),

*Tabla 1* Datos sociodemográficos de las 135 personas HSH atendidas en el servicio de Drassanes exprés durante el mes de mayo de 2021.

	Positivo a EBLEE (n=21) n(%)	Negativo EBLEE (n=114) n(%)	p-valor
<b>Edad</b>	39 (30-44)	32 (28-40,5)	0,082
<b>Número de parejas sexuales &lt;3 meses</b>			
1-5	9 (43)	76 (67)	0,093
6-10	6 (29)	21 (18)	
11-20	2 (10)	9 (8)	
>20	4 (19)	8 (7)	
<b>Sexo anal receptivo &lt;3 meses</b>			
No	3 (14)	16 (14)	1
Si	18 (86)	98 (86)	
<b>Diagnóstico previo de VIH</b>			
No	16 (76)	104 (91)	0,058
Sí	5 (24)	10 (9)	
<b>Diagnóstico previo de sífilis</b>			
No	13 (62)	84 (74)	0,296
Sí	8 (38)	30 (26)	

## Resultados

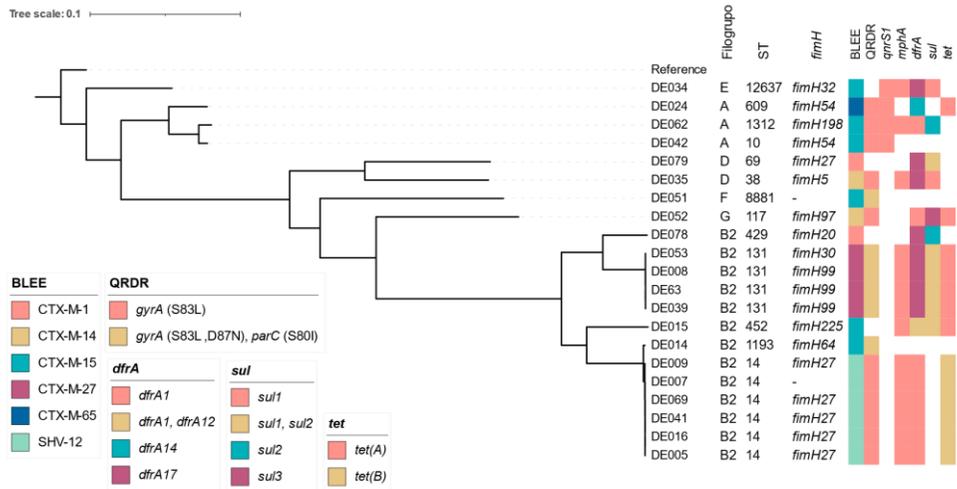
*bla*<sub>CTX-M-14</sub> (9,5%), *bla*<sub>CTX-M-1</sub> (9,5%) y *bla*<sub>CTX-M-65</sub> (4,8%) (**Figura 12**). Aquellos aislados con una CIM de ciprofloxacino superior a 12 mg/L presentaron triple mutación en QRDR en *gyrA* (S83L y D87N) y *parC* (S80I) (29%) y los obtenidos con una MIC entre 0.38-0.75 mg/L se detectó una mutación en *gyrA* junto a la presencia del gen *qnrS1* (14%). El gen *mphA* fue detectado en los aislados con una CIM superior a 8 mg/L de azitromicina (67%). Aquellos resistentes a cotrimoxazol presentaron diferentes combinaciones de *dfrA1*, *dfrA12*, *dfrA14*, *dfrA17*, *sul1*, *sul2* y *sul3* (52%); mientras que los aislados que codificaban solamente *dfrA1* o *dfrA14* presentaron sensibilidad a exposición incrementa (19%). Finalmente, el 62% presentaron determinantes de resistencia a tetraciclina (*tetA* o *tetB*).

### *Serotipo y epidemiología genómica de los aislados*

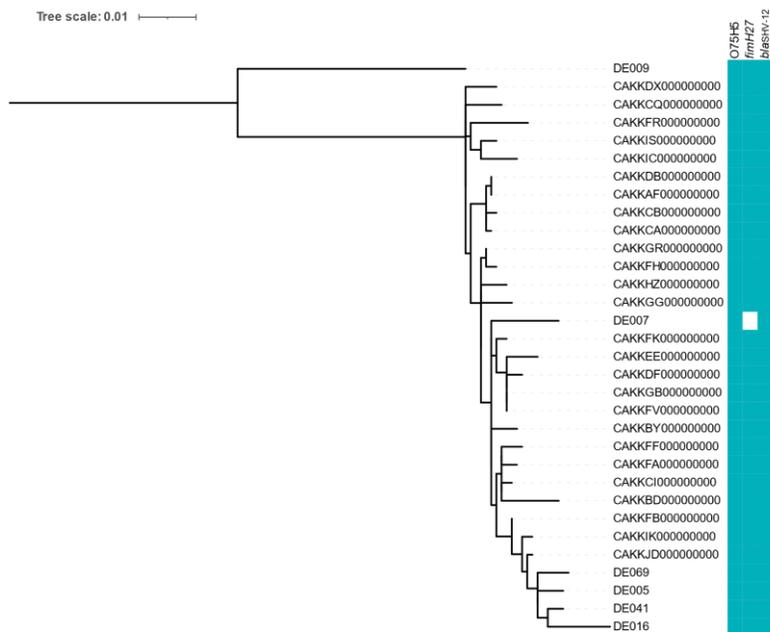
Se identificaron un total de seis filogrupos, siendo el B2 el mayoritario (61,9%), seguido del A (14,3%), el D (9,5%), el E (4,8%), el F (4,8%) y el G (4,8%). En cuanto a la identificación de la epidemiología molecular mediante MLST, se detectaron un total de 13 STs diferentes, siendo el ST14 (28,6%) y el ST131 (19%) los únicos que agruparon más de un aislado (**Figura 12**).

Los aislados del ST14 presentaron mayoritariamente *fimH27* (5/6), todos fueron portadores de *bla*<sub>SHV-12</sub>, *bla*<sub>TEM-1</sub>, una mutación en la QRDR de *gyrA* (S83L), *mphA*, *dfrA1* y *tetB* (**Figura 12**). El análisis de la proximidad genética de estos aislados mediante SNPs reveló que los aislados presentaron un rango de SNPs de 8-107, siendo el DE009 el más alejado. Cuatro de los aislados formaron un clúster con un rango de SNPs de 8-19 (**Figura 13**). Comparando los aislados de este mismo ST obtenidos de HSH en París presentaron una distancia genética reducida (rango de SNPs de 0-107) y uno de los aislados se distribuyó entre los obtenidos en Francia (**Figura 13**) [110].

## Resultados



**Figura 12** Análisis filogenético de los aislados de *E. coli*. Árbol de máxima verosimilitud de los 21 aislados obtenidos de cribados de ITS entre HSH. Como genoma de referencia se utilizó NZ\_CP048010. A la izquierda del árbol se detalla el filigrupo, el ST, el alelo de *fimH* y determinantes de resistencia detectados.



**Figura 13** Análisis filogenético de los aislados del ST14 obtenidos en este estudio y obtenidos en París por Surgers et al. 2022. NZ\_CP076344 (ST1193) fue utilizado como genoma de referencia para el mapeo de las lecturas. Este fue excluido de la representación gráfica. A la derecha se muestra el antígeno O y H, el alelo de *fimH* y la BLEE detectada.

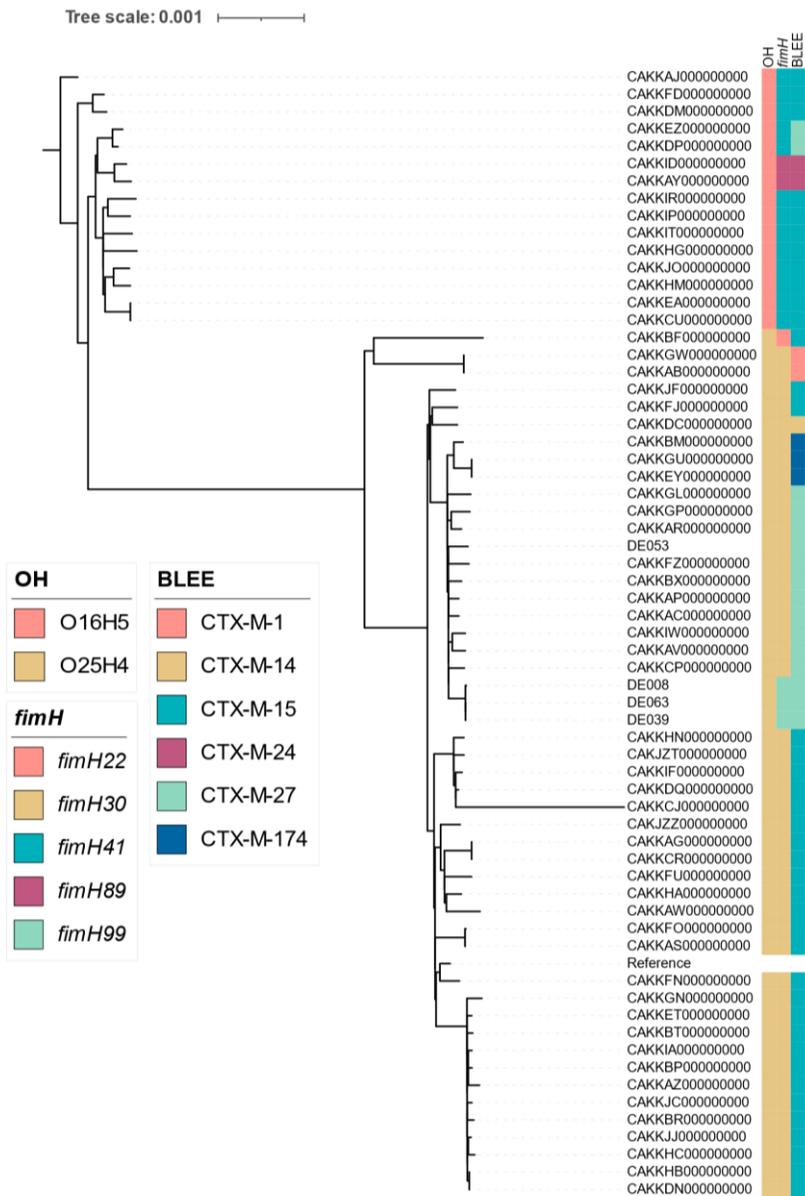
## Resultados

En cuanto al ST131, el 75% (3/4) de los aislados codificaban *fimH99* y el 25% (1/4) *fimH30*. Respecto a los determinantes de resistencia de este ST, todos los aislados fueron portadores de *bla*<sub>CTX-M-27</sub>, una triple mutación en QRDR en *gyrA* (S83L y D87N) y *parC* (S80I), *mphA*, *dfrA17*, *sul1*, *sul2* y *tetA* (**Figura 12**). El análisis filogenético de los aislados de este ST mostró una distancia genética reducida (rango de SNPs 1-40). Además, los aislados *fimH99* formaron un clúster con una distancia de 1 SNP entre sí. En cambio, el aislado *fimH30* respecto a los anteriores presentó una distancia mínima de 39 SNPs. Comparando estos con los obtenidos en París, a diferencia del ST14, en este caso mostraron una mayor variabilidad (rango de SNPs 0-624) (

**Figura 14**). Cabe destacar que ninguno de aislados franceses presentaba el alelo *fimH99* [110].

Por lo que respecta a los grupos de incompatibilidad detectados, el IncF fue el mayoritario, presente en el 92% de los aislados en alguna de sus variantes alélicas. A su vez, el 75% fue portador de algún plásmido del tipo Col. Otros grupos de incompatibilidad detectados fueron el IncB/O/K/Z, IncI, IncR, IncQ, IncY e IncX. Los resultados del pMLST de los ST mayoritarios revelaron que los aislados del ST14 mayoritariamente (83,8%) presentaron la fórmula F29:A-:B10, excepto un aislado que presentó F10/29:A-:B10. Los aislados del ST131 presentaron todos F1:A2/6:B20.

## Resultados



**Figura 14** Análisis filogenético de los aislados del ST131 obtenidos en este estudio y obtenidos en París por Surgers et al. 2022. NZ\_HG941718 (ST131) fue utilizado como genoma de referencia para el mapeo de las lecturas. A la derecha se muestra el antígeno O y H, el alelo de *fimH* y la BLEE detectada.

## Resultados

El análisis del plásmido pDE008.CTX-M-27 codificante de *bla*<sub>CTX-M-27</sub> del aislado seleccionado como representante del ST131 (DE008) mostró que el gen codificante de esta  $\beta$ -lactamasa estaba localizado en un plásmido IncF con una fórmula FAB F1:A2/6:B20. La estructura de este plásmido se comparó con la del plásmido pSH212 identificado en *S. sonnei* productora de CTX-M-27 (pSH212) en HSH en Barcelona en un estudio previo realizado por nuestro grupo. El plásmido pDE008.CTX-M-27 únicamente compartía los elementos genéticos móviles en los que se localizaban diversos determinantes de resistencia como *aadA5*, *bla*<sub>CTX-M-27</sub>, *dfrA17*, *mphA* y *sul1* con el pSH212 (99,88 de identidad, 64% de cobertura). Además, este plásmido presentó un 100% de identidad y 99,97% de cobertura con el plásmido pHP030 (NZ\_LC520285) codificante *bla*<sub>CTX-M-27</sub> y descrito en un aislado del ST131 obtenido en un adulto sano de Japón en 2016.

En cuanto a la caracterización del perfil de virulencia de los aislados productores de BLEE, se detectó que el 76% (16/21) poseían los genes codificadores de la fimbria de tipo I (*fimACDEFGHI*). Además, el 52,4% (11/21) de los aislados presentaron los genes *papHCDJKEFG* codificantes de la fimbria P. No se detectaron otras fimbrias asociadas a ExPEC como F1C o S. Finalmente, se detectaron genes involucrados en la codificación de autotransportadores de adhesión y relacionados con la formación de biopelículas, siendo el *ag43*, *upaG* y *ehab* los más prevalentes (47,6%, 90,5% y 85,7% respectivamente) (**Tabla 2**).

La búsqueda de genes capsulares reveló la presencia de los genes de la región 1 de la cápsula (*kpsFEDUCS*) en el 81% (17/21) de los aislados, los cuales son responsables de la exportación y translocación del polisacárido capsular, y el 71,4% (15/21) presentó la región 3 (*kpsMT*), responsable del transporte. Ambas regiones estuvieron presentes en todos los aislados del filogrupos B2, F y uno de los aislados del filogrupos D. En cuanto a la región 2, dos aislados del B2 (ST1193 y ST429) presentaron los genes *neuDBACE* responsables de la síntesis del polisacárido capsular tipo K1, representando el 9,5% (2/21) de los aislados estudiados. Finalmente, el 52,4% (11/21) presentaron *kfiABCD*, genes codificantes de la cápsula

## Resultados

de tipo K5, y estos fueron del filogrupo B2 (ST14 y ST131) y del filogrupo F (ST8881).

*Tabla 2 Factores de virulencia y bacteriocinas detectados in silico entre los aislados colonizadores obtenidos de HSH.*

<b>Adhesion</b>	Total (n=21)	B2 (n=13)	ST131 (n=4)	ST14 (n=6)	A (3)	Otros (n=5)
<i>fimACDEFGI</i>	16 (76)	11 (84,6)	4 (100)	5 (83,3)	3 (100)	3 (60)
<i>fimH</i>	19 (90,5)	12 (92,3)	4(100)	5 (83,3)	3 (100)	4 (80)
<i>fimB</i>	13 (61,9)	7 (53,8)	0	5 (83,3)	3 (100)	3 (60)
<i>papA_F43</i>	12 (57,1)	11 (84,6)	4 (100)	6 (100)	0	1 (33,3)
<i>papHC DJKEF</i>	11 (52,4)	9 (69,2)	3 (75)	6 (100)	0	2 (40)
<i>papGII</i>	10 (47,6)	9 (69,2)	3 (75)	6 (100)	0	1 (33,3)
<i>papGIII</i>	1 (4,8)	0	0	0	0	1 (33,3)
<i>papB</i>	8 (38,1)	6 (46,2)	3 (75)	3 (50)	0	2 (40)
<i>papI</i>	8 (38,1)	6 (46,2)	0	6 (100)	0	2 (40)
<i>papX</i>	10 (47,6)	8 (61,5)	3 (75)	5 (83,3)	0	2 (40)
<i>csgABCDEF</i>	20 (95,2)	13 (100)	4 (100)	6 (100)	2 (66,7)	5 (100)
<i>focACDFHI</i>	0	0	0	0	0	0
<i>sfaABCDEF GHS</i>	0	0	0	0	0	0
<i>agn43</i>	10 (47,6)	7 (53,8)	4(100)	1 (16,7)	1 (33,3)	2 (40)
<i>cah</i>	7 (33,3)	4 (30,8)	4 (100)	0	1 (33,3)	2 (40)
<i>upaG</i>	19 (90,5)	13 (100)	4 (100)	6 (100)	1 (33,3)	5 (100)
<i>upaH</i>	1 (4,8)	1 (7,7)	0	1 (16,7)	0	0
<i>ehaA</i>	2 (9,5)	0	0	0	0	2 (40)
<i>ehab</i>	18 (85,7)	10 (76,9)	1 (25)	6 (100)	3 (100)	5 (100)
<b>Invasion</b>						
<i>kpsFEDUCS</i>	16 (76,2)	13 (100)	4 (100)	6 (100)	0	3 (60)
<i>kpsTM</i>	15 (71,4)	13 (100)	4 (100)	6 (100)	0	2 (40)
<i>neuDBACE</i>	2 (9,5)	2 (15,4)	0	0	0	0
<i>kfiABCD</i>	11 (52,4)	10 (76,9)	4 (100)	6 (100)	0	1 (33,3)
<i>kpsMIII</i>	1 (4,8)	0	0	0	1 (33,3)	0
<i>iss</i>	9 (42,9)	6 (46,2)	6 (100)	0	2 (66,7)	3 (60)
<i>ibeA</i>	2 (9,5)	2 (15,4)	0	0	0	0
<i>tia</i>	11 (52,4)	9 (69,2)	3 (75)	6 (100)	0	2 (40)
<i>ompT</i>	16 (76,2)	13 (100)	4 (100)	6(100)	1 (33,3)	2 (40)
<b>Toxinas</b>						
<i>pic</i>	2 (9,5)	0	0	0	1 (33,3)	1 (20)
<i>sat</i>	15 (71,4)	12 (92,3)	4 (100)	6 (100)	1 (33,3)	2 (40)

## Resultados

<i>vat</i>	7 (33,3)	7 (53,8)	0	5 (83,3)	0	0
<i>tsh</i>	12 (57,1)	12 (92,3)	4 (100)	6 (100)	0	0
<i>hlyABCD</i>	0	0	0	0	0	0
<i>cdtABC</i>	0	0	0	0	0	0
<i>cnfI</i>	0	0	0	0	0	0
<i>senB</i>	14 (66,7)	12 (92,3)	4 (100)	6 (100)	1 (33,3)	1 (20)
<i>clyA</i>	19 (90,5)	13 (100)	4 (100)	6 (100)	1 (33,3)	5 (100)
<i>hlyE</i>	7 (33,3)	0	0	0	3 (100)	4 (80)
<i>hlyF</i>	1 (4,8)	0	0	0	0	1 (20)
<b>Adquisición de hierro</b>						
<i>chuASTUWXY</i>	18 (85,7)	13 (100)	4 (100)	6 (100)	0	5 (100)
<i>sitABCD</i>	18 (85,7)	13 (100)	4 (100)	6 (100)	1 (33,3)	4 (80)
<i>ireA</i>	8 (38,1)	7 (53,8)	0	6 (100)	1 (33,3)	0
<i>iucABCD/iutA</i>	16 (76,2)	12 (76,2)	4 (100)	6 (100)	1 (33,3)	3 (60)
<i>iroBCDEN</i>	1 (4,8)	0	0	0	0	1 (20)
<i>fyuA/irp12/ybtAEPQSTUX</i>	17 (81)	13 (100)	4 (100)	6 (100)	0	4 (80)
<b>Colicín/otros</b>						
<i>usp</i>	13 (61,9)	13 (100)	4 (100)	6 (100)	0	0
<i>cia</i>	1 (4,8)	0	0	0	0	1 (20)
<i>cib</i>	1 (4,8)	1 (7,7)	0	0	0	0
<i>cea</i>	3 (14,3)	1 (7,7)	0	0	0	2 (40)
<i>colE2</i>	1 (4,8)	1 (7,7)	0	0	0	0
<i>cma</i>	1 (4,8)	0	0	0	0	1 (20)
<i>traJ</i>	8 (38)	7 (53,8)	0	6 (100)	0	1 (20)
<i>traT</i>	17 (81)	11 (84,6)	4 (100)	6 (100)	1 (33,3)	5 (100)

Por lo que respecta a otros genes relacionados con la invasión, cabe destacar que *iss* estuvo presente en todos los aislados del ST131, *ibeA* solamente fue detectado en dos aislados del filogrupo B2 (ST429 y ST452) y *tia* fue detectado en el 52,4% de los aislados, estando presente en todos los aislados del ST14 y en el 75% de los pertenecientes al ST131.

Ninguno de los aislados presentó la toxina de distensión citoletal, el factor 1 citotóxico necrotizante o la alfa-hemolisina. Sin embargo, el 90,5% (19/21) presentaron el gen de la citolisina A (*clyA*), detectándose en todos los filogrupos

## Resultados

excepto en dos aislados del filogrupo A; el 33,3% (7/21) el gen de la hemolisina E aviar (*hlyE*) en los filogrupos A, D, E y F; y un aislado del filogrupo G (ST117) presentó la hemolisina F (*hlyF*). La proteasa de serina autotransportadora de enterobacterias (SPATE) más detectada fue *sat* (71,4%; 15/21), seguido de *tsh* (57,1%; 12/21) y *vat* (33,3%; 7/21), los cuales fueron detectadas principalmente en aislados del filogrupo B2.

Se detectaron diversos mecanismos de captación de hierro. El 71,4% (15/21) de los aislados presentaron de forma simultánea los cuatro mecanismos (mecanismo Chu, transporte de hierro/manganeso, aerobactinas y yersiniobactina), la mayoría del filogrupo B2 (80%; 12/15). Finalmente, el 71,4% (15/21) de los aislados presentaron algún tipo de colicina, siendo la *usp* la más detectada y únicamente observada en los pertenecientes al grupo B2.

# Discusión



## **1. Identificación de los linajes de *Shigella* circulantes en Barcelona entre hombres que mantienen relaciones sexuales con hombres**

Desde la primera descripción de la transmisión sexual de *Shigella* entre HSH en los años 70, son diversos los países en los cuales se han documentado casos, entre los que se encuentran Australia, Bélgica, Canadá, Francia, los Países Bajos, el Reino Unido, Taiwán y EUA [95,102–107]. En Barcelona, entre 1988 y 2012, se llevó a cabo un estudio sobre shigelosis en el que se observó un aumento significativo de hombres que padecían esta patología, documentándose por primera vez en 2012 diversos casos de infección por *S. flexneri* en pacientes HSH [130]. Sin embargo, la información sobre la sensibilidad a antimicrobianos y la posible transmisión por vía sexual de *Shigella* en Barcelona hasta el momento es limitada. Este estudio pretende aportar luz sobre la situación actual de la shigelosis entre HSH de Barcelona en el contexto de incremento de casos que a lo largo de los últimos años se han comunicado en otros países de nuestro entorno.

Los datos de nuestro trabajo han revelado que entre 2015 y 2019, el 55% de las *S. flexneri* y el 24,3% de las *S. sonnei* obtenidas de pacientes diagnosticados de shigelosis en el laboratorio del Hospital Universitario Vall d’Hebron se identificaron en HSH que no habían viajado a recientemente a zonas endémicas de shigelosis. Especialmente, resultó preocupante los altos niveles de resistencia a antimicrobianos utilizados como primera y segunda línea para tratar esta patología como son la azitromicina (80%), el ciprofloxacino (32,8%) y el cotrimoxazol (65,7%). Además, cabe destacar el alto porcentaje de aislados de *S. sonnei* detectados simultáneamente resistentes a estos tres antibióticos (65,4%).

Al comparar los valores de sensibilidad de las cepas obtenidas de HSH con los obtenidos en cepas adquiridas por otras vías (viajeros u otras) en nuestro estudio, se observaron diferencias significativas. La más notable fue la relativa a la sensibilidad a la azitromicina, para la que se identificó que el 72,7% de aislados de *S. flexneri* y el 92,3% de *S. sonnei* obtenidos de HSH fueron resistentes, mientras que en los

## Discusión

aislados obtenidos de viajeros y otras vías/desconocido fueron del 16% y del 28,8%, respectivamente. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por un estudio realizado en el estado de Victoria (Australia) entre enero de 2016 y marzo de 2018, en el que se detectó que el 80% de *S. flexneri* y el 90% de *S. sonnei* de HSH eran resistentes a la azitromicina mientras que en el grupo de viajeros y otros/desconocido era del 17,4% y 52%, respectivamente [95]. La azitromicina, además de ser uno de los tratamientos frente a la shigelosis recomendado en las principales guías de práctica clínica [29,30], también ha sido ampliamente utilizado para tratar diversas ITS [75]. Dado que la incidencia de las ITS es más elevada entre los HSH que en otros colectivos [74], sería razonable pensar que la presión selectiva ejercida por el mayor uso de este antimicrobiano para tratar estas infecciones, puede haber jugado un papel esencial en la adquisición y selección de genes que confieren resistencia a la azitromicina, así como en la diseminación de las cepas resistentes entre diversos países [95]. Este efecto también ha sido observado en otras ITS como las producidas por *Neisseria gonorrhoeae* y especialmente por *Mycoplasma genitalium* [86]. En este sentido, la dosis empleada para el tratamiento de *Chlamydia trachomatis* se ha observado que resulta subóptima para la erradicación de *M. genitalium*, es por ello que se argumenta que su uso favorecería la selección de organismos resistentes [75,131].

La adquisición de resistencia a la azitromicina en *Shigella* spp. mediada por la presencia de los genes *mphA* y *ermB* codificados en el plásmido pKSR100, está fuertemente vinculada a linajes asociados con HSH de distribución mundial [95,102,132]. Los análisis filogenómicos de los linajes resistentes a la azitromicina detectados en Barcelona revelaron que estos mayoritariamente estaban estrechamente relacionados con los descritos previamente en otros países, sugiriendo su diseminación internacional. En *S. flexneri*, los aislados del clado 2 (36,4%), los cuales fueron mayoritariamente del serotipo 2a (94,1%) y simultáneamente resistentes a la azitromicina y el cotrimoxazol (81,2%), mostraron una alta proximidad genética con los aislados detectados en los principales clados identificados en el Reino Unido y Australia. En el Reino Unido entre 2012 y 2014 se

## Discusión

describió un aumento de *S. flexneri* 2a asociado a HSH. Al caracterizar estos aislados se identificó un clado al que denominaron “MSM major clade” el cual presentaba resistencia a la azitromicina mediada por la presencia de los genes *mpha* y *ermB* codificados en el plásmido pKSR100 [102]. Posteriormente, en Australia entre 2016 y 2018 y en los Países Bajos entre 2016 y 2017, detectaron clados de aislados relacionados con HSH que mostraban una elevada relación genética con los aislados pertenecientes al “MSM major clade” y también eran portadores del plásmido pKSR100, con lo que los autores sugerían una diseminación internacional de *S. flexneri* 2a [95,103]. Asimismo, en cuanto a los aislados de *S. flexneri* del clado 6 (34,1%), todos ellos menos uno, del serotipo 3a y mayoritariamente resistentes a la azitromicina (80%), fueron próximos genéticamente a los representantes de un brote intercontinental de aislados de este mismo serotipo detectado por primera vez en el Reino Unido en 2009 asociado a HSH. En este brote, aunque no todos los aislados fueron resistentes a la azitromicina, se identificaron tres sublinajes (A, B y C) de aislados resistentes a este antimicrobiano y portadores del plásmido pKSR100. Desde su descripción, aislados genéticamente relacionados con los de este brote se han detectado en Francia, Canadá, Australia y los Países Bajos [103,132,133]. En el caso de *S. sonnei*, el clado 4 (69,2%), formado únicamente por aislados del genotipo CipR.MSM5, simultáneamente resistentes a la azitromicina, el ciprofloxacino y el cotrimoxazol, y portadores del plásmido pKSR100 (94,4%), presentaron una distancia genética próxima con representantes del clúster 7 del Reino Unido (2008-2016) y el BAPS1 de Australia (2016-2018). Sin embargo, y a diferencia de lo observado en nuestro estudio, estos clados no fueron los más frecuentes en estos trabajos. [95,102]. Posteriormente, en un estudio llevado a cabo en 2021 en el que se incluyeron cepas de *S. sonnei* de diversos orígenes obtenidas entre 2016 y 2019 en Australia, el Reino Unido y los EUA, se evidencia como el genotipo CipR.MSM5 incrementó progresivamente su prevalencia hasta convertirse en el genotipo mayoritario entre los aislados resistentes a ciprofloxacino y azitromicina en los tres países [18]. Todos estos brotes tienen en común su asociación con el plásmido pKSR100, hipotetizándose que la adquisición

## Discusión

de este plásmido puede haber tenido un papel fundamental en el éxito de la diseminación de los sublinajes que lo poseen. Teniendo en cuenta la alta prevalencia de *Shigella* spp. que posee *mphA* o *ermB* presentes en el plásmido pKSR100 (70% en este estudio), el alto nivel de resistencia a la azitromicina (CMI > 64 mg/L) identificado en la mayoría de los aislados que mostraron resistencia a este antibiótico (87,5% en este caso), y a pesar de que actualmente no existe un punto de corte clínico para la azitromicina en *Shigella* spp., cabría esperar un alto potencial de fracaso terapéutico al utilizar la azitromicina como tratamiento empírico frente a la shigelosis no asociada a viajes en HSH. Esta observación se ha descrito previamente en los Países Bajos, donde en 2012 se describió el primer caso de fallo terapéutico en un paciente HSH con VIH y bacteriemia por *S. flexneri* tratado con azitromicina [134].

Al contrario de lo observado para la azitromicina, la resistencia al ciprofloxacino presentó diferencias significativas entre *S. flexneri* y *S. sonnei* independientemente de cuál fuera su origen, siendo el 6,3% y el 45,8% del total de los aislados identificados en este estudio resistentes a estos antibióticos, respectivamente. Además, cabe señalar que *S. sonnei* mostraba tasas de resistencia al ciprofloxacino significativamente más altas cuando su adquisición se asociaba a HSH respecto a cuando lo era a viajes u otras vías (80,8%, 32,6% y 36,8%, respectivamente). Contrariamente, en el estudio llevado a cabo en Australia entre 2016 y 2018, los niveles de resistencia al ciprofloxacino identificados en aislados obtenidos de HSH fueron menores que los identificados en nuestro trabajo, detectando tan solo un 3% de resistencia en *S. flexneri* y un 8,1% en *S. sonnei*. El mecanismo de resistencia al ciprofloxacino que con mayor frecuencia se ha detectado en *Shigella* son mutaciones en la región QRDR de los genes *gyrA* y *parC*. Al ser mutaciones de genes de codificación cromosómica, estas solo son transmitidas de forma vertical. Una vez se han adquirido, tienden a mantenerse en la descendencia y, por tanto, a asociarse a linajes concretos, a diferencia de lo que ocurre con los genes *mphA* y *ermB* señalados anteriormente. Estos, al estar codificados en plásmidos, pueden ser transmitidos horizontalmente entre distintos linajes y en consecuencia tienen mayor

capacidad de diseminación [56,102]. En este sentido, en un estudio filogenético sobre la aparición y evolución de la resistencia al ciprofloxacino en *S. sonnei* en el que se incluyeron genomas del sur y sudeste de Asia, Australia y Europa, situó el sur de Asia como posible reservorio y origen de la expansión clonal del linaje de *S. sonnei* resistente al ciprofloxacino. Este linaje se denominó Central Asia III (3.6 en la nomenclatura de Hawkey *et al.* 2021)[18,56]. Así, los aislados de *S. sonnei* del genotipo CipR.MSM5 (clado 4), forma parte de este linaje Central Asia III y como se ha comentado anteriormente, fue el más detectado entre los aislados *S. sonnei* asociados a HSH en Barcelona entre 2015 y 2019 (69,2%). La constatación del incremento de la prevalencia de este genotipo en Australia, el Reino Unido y EUA durante el mismo periodo que nuestro estudio, demuestra la alta capacidad de diseminación que presentan estos microorganismos y el posible papel que la interconexión entre las redes sexuales de HSH puede tener en su transmisión. Además, queda de manifiesto el éxito de la diseminación de linajes multirresistentes, en este caso no solo resistente a la azitromicina, sino también al ciprofloxacino.

Por lo que respecta al cotrimoxazol, en este estudio hemos identificado tasas de resistencia elevadas para este antibiótico (71,5% globalmente) sin diferencias significativas entre especies ni grupos, aunque fue ligeramente mayor en *S. sonnei* respecto *S. flexneri* (86,9% y 50,6% respectivamente). En Australia documentaron la sensibilidad al trimetoprim y al sulfatiazol, los cuales presentaron una resistencia global elevada, del 88,8% y 78,3% respectivamente. Entre los aislados de nuestro estudio, la resistencia fue debida a la presencia de genes del tipo *dfrA* y *sul*. Cabe destacar que, en el caso de los serotipos 2a (clado 2) y 1c (clado 3) de *S. flexneri* y del genotipo CipR.MSM5 (clado 4) de *S. sonnei*, la resistencia fue debida a la presencia de *dfrA17* y *sulI*, los cuales se encontraban codificados en un integrón presente en el plásmido pKSR100. No obstante, aunque las tasas de resistencia a este antibiótico son elevadas para todos los grupos, algunas guías siguen recomendándolo para el tratamiento de la shigelosis [6,29,30].

## Discusión

Finalmente, aunque *Shigella* spp. fueron en gran parte susceptibles a las cefalosporinas de tercera generación, en este estudio se detectó una *S. sonnei* en 2018 y una *S. flexneri* en 2016 productoras de CTX-M-27 en pacientes HSH. Ambas fueron resistentes a la azitromicina y el cotrimoxazol y mostraron una susceptibilidad reducida al ciprofloxacino (MIC 0.19 mg/L). Cabe destacar que desde 2015, se han descrito brotes de *S. sonnei* que codifican este tipo de BLEE en el Reino Unido y Australia relacionados con HSH, así como en nuestro entorno, discutiéndose los resultados en el siguiente trabajo llevado a cabo en el contexto de esta tesis doctoral [135,136].

En resumen, se ha constatado la circulación en nuestro entorno de los principales sublinajes productores de shigelosis en HSH a nivel mundial, con altos porcentajes de resistencia a los principales tratamientos utilizados para hacer frente a esta infección. Estos resultados refuerzan el hecho de que comportamientos sexuales específicos en HSH, como la alta interconexión de las redes sexuales posiblemente influenciada por macroeventos festivos, deben jugar un papel importante en la rápida propagación geográfica de estos microorganismos.

## 2. Caracterización de los aspectos microbiológicos involucrados en el aumento de *Shigella* productora de BLEE multirresistente y extremadamente resistente identificadas en Barcelona entre los años 2020 y 2021

Como se ha señalado anteriormente, en el estudio realizado en el periodo 2015-2019, la prevalencia de *Shigella* productora de BLEE entre HSH fue baja (2,8%). Por el contrario, entre 2020 y 2021 se observó un incremento significativo de la detección de aislados productores de BLEE (38%), especialmente entre HSH en *S. sonnei* a partir de junio de 2021 (68%). Además, resultó alarmante la prevalencia en la población HSH de aislados simultáneamente resistentes a las cefalosporinas de tercera generación, el ciprofloxacino, la azitromicina y/o el cotrimoxazol en *S. sonnei* (68%) y *S. flexneri* (14%).

Aunque en Barcelona entre 2015-2019 la resistencia global a las cefalosporinas de tercera generación fue baja (4,8%), en otros países se había ya descrito un aumento de las tasas de resistencia. Este es el caso de la provincia de Jiangsu en China, que entre 2013 y 2015 describieron tasas de resistencia a las cefalosporinas de tercera generación en *S. flexneri* del 34,4% y en 2015 del 64,3% en *S. sonnei*. Las BLEEs más prevalentes fueron la CTX-M-14 y la CTX-M-55 en ambas especies [137,138]. En Irán, de forma muy similar, en un estudio realizado en la ciudad de Arak entre 2015-2016, el 66,6% de las *S. sonnei* identificadas en adultos fueron productoras de BLEE y el 33,3% de las *S. flexneri* [139]. Ya, en el entorno europeo, en Suiza se alertó de un incremento en la prevalencia de *S. sonnei* productora de BLEE pasando de un 3,8% en 2016 a un 37% en 2019. Las principales BLEE detectadas fueron CTX-M-15 y CTX-M-3 [140]. En ninguno de estos estudios se identificó una relación con un brote o con población HSH [137–140].

Paralelamente, se han descrito diversos brotes de *S. sonnei* productora de CTX-M-27 entre el colectivo HSH. El primero del que se tiene constancia tuvo lugar en el Reino Unido en el año 2015, en el cual se detectaron nueve casos de *S. sonnei* productora de CTX-M-27, con una distancia de SNPs menor a cinco. Siete de los

## Discusión

nueve pacientes se identificaron como HSH. También describieron el plásmido en el que se encontraba codificada el gen *bla*<sub>CTX-M-27</sub>, el p183660. Este plásmido mostraba un 95% de identidad con el previamente señalado pKSR100, y en él se detectaron los siguientes genes de resistencia: *mphA*, *ermB*, *bla*<sub>TEM-1</sub>, *dfrA1*, *dfrA17*, *sul1*, *aadA5* y *bla*<sub>CTX-M-27</sub> [136]. Aunque los genotipos de *S. sonnei* responsables de los brotes han ido variando, la resistencia a las cefalosporinas de tercera generación en la población HSH ha estado relacionada con la adquisición de plásmidos similares al pKSR100 portadores de *bla*<sub>CTX-M-27</sub> [104,105,135,136,141,142]. En el caso de los aislados de *Shigella* productores de BLEE obtenidos de pacientes HSH en los dos periodos de estudio realizados en Barcelona, todos ellos eran también portadores de *bla*<sub>CTX-M-27</sub>, independientemente de la especie, el serotipo o el genotipo al que pertenecieran con lo que se constata la misma asociación entre la circulación de *Shigella* spp. productora de CTX-M-27 y el colectivo HSH detectada en los brotes descritos en otros países.

El análisis de los plásmidos portadores de *bla*<sub>CTX-M-27</sub> obtenidos de los aislados de *S. sonnei* y *S. flexneri* reveló una alta similitud con los plásmidos previamente descritos asociados a HSH del tipo pKSR100 portadores de *bla*<sub>CTX-M-27</sub> (p183660 y p893916), especialmente en el “backbone” del plásmido. Las diferencias entre los diferentes plásmidos se debieron a la adquisición, delección o reorganización de elementos genéticos móviles portadores de los determinantes de resistencia. Así, del mismo modo que la adquisición de plásmidos del tipo pKSR100 codificantes de resistencia a macrólidos podrían haber tenido un papel en la expansión y diseminación de los sublinajes de *Shigella* entre HSH [102], este tipo de plásmidos podrían continuar modulando la población de *Shigella* en HSH tras la adquisición de otros determinantes de resistencia como serían las BLEE, especialmente en aquellos casos en los que estos presentan diversos mecanismos de resistencia que podrían verse sometidos a procesos de co-selección.

El estudio genético de los aislados de *S. flexneri* de HSH obtenidos entre 2020 y 2021 reveló que su población era similar a la que circulaba en el periodo 2015-2019,

## Discusión

manteniéndose incluso la misma proporción de serotipos. Además, el análisis filogenético mostró que los aislados se agruparon con los pertenecientes al mismo serotipo obtenidos durante el periodo anterior, mostrando una estrecha relación genética. No obstante, los cuatro aislados de *S. flexneri* 2a productores de BLEE obtenidos de HSH durante este periodo de tiempo, formaron un clúster independiente al de los aislados no productores de BLEE. Estos fueron obtenidos entre julio y noviembre de 2021, hecho que sumado a la reducida distancia genética existente entre ellos y que no se detectó vínculo epidemiológico entre los pacientes de los que fueron obtenidos, sugiere la posible existencia de transmisión indirecta a través de casos secundarios no identificados. A diferencia de *S. sonnei*, hasta el momento en el que este trabajo fue llevado a cabo, no se habían descrito brotes de *S. flexneri* productores de BLEE entre HSH. No obstante, en enero del 2023, se reportó la emergencia de dos clústeres de *S. flexneri* 2a productores de BLEE asociados a HSH en el Reino Unido desde septiembre 2021. El clúster 1 formado por aislados de ocho pacientes presentó un fenotipo XDR, siendo simultáneamente resistente a las cefalosporinas de tercera generación, las fluoroquinolonas, los macrólidos, los aminoglucósidos, el trimetoprim, las sulfamidas y las tetraciclinas; y el clúster 2 formado por aislados de dieciocho casos que presentó un fenotipo MDR al ser susceptible a las sulfamidas y los aminoglucósidos. Cabe destacar que un paciente cuyo aislado perteneció al clúster 2, reportó haber viajado y mantenido relaciones sexuales en España la semana anterior a la aparición de los síntomas [143]. Con el fin de conocer la distancia genética entre los aislados de las dos regiones, se realizó una comparación genética, siguiendo la metodología del estudio, entre los aislados *S. flexneri* 2a productores de CTX-M-27 detectados en nuestro estudio y representantes de los dos clústeres reportados en el Reino Unido. Este reveló que los genomas del clúster 1 y el clúster 2 comparados con los obtenidos en Barcelona presentaban un rango de SNPs de 159-163 y 2-23 respectivamente. La distancia genética tan próxima detectada entre los aislados MDR del clúster 2 y los obtenidos en Barcelona sugeriría la diseminación internacional del brote producido por este sublinaje de *S. flexneri* 2a MDR, con un posible vínculo epidemiológico con los

## Discusión

casos circulantes en nuestro medio. Con estos resultados, queda patente la necesidad de seguir monitorizando la evolución de las poblaciones de *S. flexneri*, tanto en Barcelona como en otras regiones, con el objetivo de evaluar cómo sigue desarrollándose su diseminación.

A diferencia de lo observado en el anterior periodo de estudio, en el que el clado mayoritario del serotipo 2a fue el clado 2, entre 2020 y 2021 predominaron las cepas pertenecientes al clado 1. Los aislados pertenecientes a este clado se caracterizan por ser resistentes a las fluoroquinolonas y además contiene los aislados productores de BLEE identificados. Así, como consecuencia de este hecho, se produjo un aumento significativo de la resistencia al ciprofloxacino en *S. flexneri* durante 2020-2021 respecto 2015-2019 (4,5 vs. 38%). Estos resultados, parecen apuntar que *S. flexneri* podría seguir la trayectoria de adquisición de resistencia de *S. sonnei* tras el incremento de la prevalencia de sublinajes resistentes a las fluoroquinolonas, la emergencia de los primeros brotes por *S. flexneri* productora de BLEE y en especial a la descripción de aislados *S. flexneri* XDR en el Reino Unido [143].

Tras el primer y el segundo estudio, queda patente que los brotes producidos por diferentes serotipos y sublinajes de *S. flexneri*, una vez introducidos en la red sexual y producirse una gran diseminación internacional, son capaces de circular de forma contemporánea sin producir un completo desplazamiento entre ellos, ya que doce y nueve años después de la primera descripción de los brotes producidos por serotipos 3a y 2a, respectivamente, se siguen detectando aislados próximos genéticamente. Este evento es similar al descrito en zonas endémicas, en las cuales se ha observado que la introducción de linajes y sublinajes nuevos o la adquisición de resistencia, no desplaza por completo los circulantes previamente en la región [11].

Por otro lado, los genotipos de *S. sonnei* detectados entre HSH se han ido sucediendo con una dinámica de brotes prolongados, detectándose sublinajes cada vez más resistentes. Este hecho pudimos observarlo en la comparación internacional en el periodo 2015-2019 en la que pudimos observar que los genotipos más detectados internacionalmente hasta el momento, como son el MSM4, VN2.MSM2,

CipR.MSM1 y VN2.MSM2.Aus, fueron detectados de forma esporádica o no fueron detectados entre 2015 y 2019 en Barcelona [102,135]. Durante el periodo 2020-2021 asistimos a un completo desplazamiento de los genotipos previamente existentes por parte del genotipo CipR.MSM5. Adicionalmente, este genotipo estuvo principalmente asociado a la producción de CTX-M-27 a diferencia del anterior periodo, lo que evidencia una vez más la alta capacidad de adaptación y de adquisición de determinantes de resistencia que posee. Los resultados filogenéticos reflejan que todos los aislados productores de BLEE se agruparon en un clúster junto a aquellos aislados seleccionados como representantes internacionales, mostrando una estrecha similitud genética entre sí, y considerablemente más distantes de los aislados no productores de BLEE pertenecientes al genotipo detectados en Barcelona en los periodos 2015-2019 y el periodo 2020-2021. Este hecho señala que podría tratarse de una introducción y posterior diseminación de este clon entre la población de Barcelona, y no una adquisición del determinante de resistencia por parte de la población de *S. sonnei* que hasta el momento estaba circulando en nuestro entorno.

Uno de los brotes de *S. sonnei* productor de BLEE más importantes documentados tuvo lugar entre 2019 y 2020 en Australia. En ese caso el evento fue debido a la expansión del genotipo VN2.KH1.Aus (3.7.29.1.4.1) productor de CTX-M-27, resistente a la azitromicina y el cotrimoxazol y principalmente asociado a hombres [135]. A este mismo genotipo pertenecieron los aislados productores de BLEE obtenidos de HSH detectados en Canadá entre 2017-2019, en Bélgica entre 2018-2019 y el único aislado detectado en el periodo 2015-2019 en Barcelona [104,105]. Al mismo tiempo, previo a la pandemia de COVID-19, se detectaron casos esporádicos de *S. sonnei* CipR.MSM5 productor de BLEE tanto en Australia como en el Reino Unido [135,141]. Más adelante, entre septiembre de 2021 y febrero de 2022, se reportó en el Reino Unido un brote entre HSH de cepas productoras de BLEE pertenecientes también al genotipo CipR.MSM5 [141]. La principal diferencia entre los brotes producidos por los genotipos VN2.KH1.Aus y CipR.MSM5 es el hecho que los aislados de este último, además de presentar

## Discusión

resistencia frente a la azitromicina, el cotrimoxazol y las cefalosporinas de tercera generación mediada por genes codificados en variantes del plásmido pKSR100, también mostraba resistencia a las fluoroquinolonas debido a la presencia de la triple mutación en las regiones QRDR de *gyrA* y *parc*, por lo que se le consideró XDR. La emergencia del este brote en el Reino Unido fue alertada por la agencia de salud pública de este país y además condujo al ECDC a investigar la diseminación de este genotipo entre los países miembros de la Unión Europea. Diversos países, entre los que se encontraban Alemania, Austria, Bélgica, Dinamarca, Francia, Irlanda, Italia, Noruega y España, informaron de la detección de aislados con un fenotipo de resistencia similar o genéticamente cercanos a los aislados detectados en el Reino Unido [141,144]. Paralelamente, en nuestro medio, tres de los dieciséis aislados CipR.MSM5 productor de BLEE fueron detectados de forma esporádica en diciembre de 2020, pero es a partir de junio de 2021 cuando asistimos a la reaparición y rápida expansión de los mismos. Este hecho constata la transmisión internacional del genotipo CipR.MSM5 productor de CTX-M-27 y co-resistente al ciprofloxacino, la azitromicina y el cotrimoxazol entre HSH. La rápida expansión de ciertos linajes y la aparición continua de brotes de *Shigella* resistentes a antimicrobianos, remarca la necesidad de una vigilancia colaborativa nacional e internacional basada en los estudios de genoma completo, en especial de aquellos aislados de *Shigella* spp. MDR/XDR, para una rápida identificación de su diseminación.

La adquisición y diseminación de la resistencia a las cefalosporinas de tercera generación podría deberse a factores similares a los que con anterioridad se postularon para la azitromicina. La ceftriaxona es un antibiótico utilizado actualmente para el tratamiento de la infección por *N. gonorrhoeae*, ya sea en monoterapia o en tratamiento dual con la azitromicina [75]. Además, tal como se observó en el periodo 2015-2019, la resistencia de *S. sonnei* en HSH al ciprofloxacino, la azitromicina y el cotrimoxazol fue muy elevada, siendo las cefalosporinas de tercera generación la única opción terapéutica disponible, según las recomendaciones hechas por las guías de antibioterapia [29,30]. En

consecuencia, la presión selectiva ejercida por estos tratamientos en una población con alta prevalencia de ITS [74], podría haber tenido un papel importante en la selección y diseminación de BLEEs entre *Shigella* spp. Otros factores que habrían favorecido dicha expansión son la adquisición de una variante del pKSR100 portador de *bla*<sub>CTX-M-27</sub> y otros determinantes de resistencia, por parte de un genotipo altamente exitoso, como ha demostrado ser el CipR.MSM5, junto con una alta interconectividad de las redes sexual a nivel internacional en los HSH [141].

El incremento de la resistencia en *Shigella* a lo largo de los últimos años en el colectivo de HSH, remarca la necesidad de una optimización del uso de tratamientos antimicrobianos en el control de ITS, a fin de reducir la exposición innecesaria a estos antibióticos y el aumento de la presión selectiva que favorece la adquisición de resistencia y la diseminación de cepas resistentes. Además, como sugiere Charles *et al.* 2022 se necesita más promoción para la prevención de la shigelosis de transmisión sexual, a modo de ejemplo, la página del Canal Salut de la Generalitat de Catalunya dedicada a la shigelosis no recoge la transmisión sexual como una de las vías de transmisión [145], e incrementar los esfuerzos para que el personal sanitario integre la recopilación de antecedentes de salud sexual entre los hombres adultos que presentan diarrea aguda o disentería [141]. En el Reino Unido, en la guía sobre salud sexual en HSH realizada en 2016, junto a otras patologías entéricas, se encuentra la shigelosis. En ella se establecen una serie de recomendaciones para prevenir la transmisión por vía sexual, como es el uso del preservativo o guantes, una correcta higiene antes y después del acto sexual, evitar compartir juguetes sexuales o en caso de infección, la abstinencia hasta una semana después del cese de los síntomas [90,146]. Además, no hay que olvidar recomendaciones para evitar la transmisión por otras vías. En este sentido en 2021 identificamos la transmisión en un núcleo familiar y fuera de la red sexual de *S. sonnei* perteneciente al genotipo CipR.MSM5 y productor de BLEE por parte de un HSH a un familiar conviviente, el cual requirió hospitalización. En otros estudios también se han identificado transmisiones secundarias similares fuera de la red sexual a personas inmunocomprometidas y además se ha identificado un brote entre personas sin

## Discusión

hogar [141,147]. Este hecho pone de manifiesto el incremento del riesgo para la salud pública que conlleva la emergencia y diseminación de *Shigella* XDR y MDR, no solo para la población de HSH, sino también para otros colectivos especialmente vulnerables.

### **3. Detección de la transmisión a través de contacto sexual de enterobacteriales productores de BLEE no pertenecientes al género *Shigella* y que colonizan el tracto intestinal de hombres que mantienen relaciones sexuales con hombres**

La diseminación de bacterias multirresistentes (BMR) capaces de causar patología en el ser humano, así como aquellas que actúan como reservorio de determinantes de resistencia, son un grave problema global. El Grupo de Coordinación Interinstitucional de las Naciones Unidas sobre Resistencia a los Antimicrobianos (IACG, por sus siglas en inglés) alertó en 2019 de que, según las predicciones, las BMR podrían causar 10 millones de defunciones globales anuales en 2050. En la lista elaborada por la OMS sobre la prioridad para el desarrollo de nuevos tratamientos, las enterobacterias como *E. coli* o *K. pneumoniae* resistente a los carbapenémicos o a las cefalosporinas de tercera generación, son considerados como prioridad crítica, situándose entre aquellos que presentan una prioridad más alta [108,148,149].

En nuestro estudio identificamos que la prevalencia de colonización intestinal por enterobacterias productoras de BLEE obtenida en HSH asintomáticos fue del 17,5% y la única especie detectada fue *E. coli*. Resultó especialmente elevada la prevalencia del 33% detectada entre aquellos usuarios positivos al VIH comparada con la de aquellos que reportaron ser negativos (15,2%). Si se compara la prevalencia obtenida con un estudio realizado en Barcelona sobre la colonización intestinal de *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEE en pacientes sanos entre 2014 y 2015, si bien no se detectó colonización por *K. pneumoniae* BLEE, la de *E. coli* fue muy inferior a la identificada en nuestro estudio, un 4,7% [150]. Por lo que respecta a la prevalencia de la colonización de enterobacterias BLEE en otros estudios realizados en HSH sanos, en un estudio llevado a cabo en Ámsterdam en 2018 se identificó que 16,3% era portador de una bacteria productora de BLEE, siendo el 94% de los casos positivos a *E. coli* [109]. En otro estudio muy similar llevado a cabo en París entre 2018 y 2019, se identificó una prevalencia entre HSH

## Discusión

usuarios de PrEP de 16,3%, HSH VIH negativos no usuarios de PrEP del 9,7%, HSH VIH positivos de un 12,2%, hombres que mantienen relaciones sexuales con mujeres (HSM) del 10% y mujeres que mantienen relaciones sexuales con hombres (MSH) de 6,9% [110]. Las prevalencias obtenidas en estos estudios en HSH fueron muy similares a las obtenidas en el nuestro, excepto la de HSH VIH positivos. En ambas publicaciones se argumenta que las prevalencias obtenidas fueron superiores a las obtenidas en la población general en sus regiones, por lo que es de esperar que esta población presente algún factor diferencial que le predisponga a la colonización.

En nuestro trabajo hemos observado que los individuos colonizados presentaron una tendencia a tener un mayor número de parejas sexuales, aunque estos resultados no fueron estadísticamente significativos. Por el contrario, tanto en el estudio previo llevado a cabo en Ámsterdam como el de París, coinciden en señalar una asociación entre la colonización por enterobacterias productoras de BLEE y un mayor número de parejas sexuales [109,110]. Sin embargo, en el estudio llevado a cabo en Ámsterdam se matiza este argumento, señalando que detectan una asociación entre el número de parejas y las prácticas sexuales llevadas a cabo por estos individuos que puedan comportar un mayor riesgo de transmisión anal-oral o anal-anal (*p. ej.*: compartir juguetes sexuales, anilingus o “*fisting*”), por lo que es difícil determinar cuál de los dos factores es el que podría contribuir a un mayor riesgo de colonización [109]. En nuestro caso, la encuesta realizada a los individuos incluidos en el estudio no se recogía datos sobre prácticas sexuales concretas por lo que no pudimos identificar si existía algún factor de riesgo que pudiera contribuir a la colonización.

Otro factor que podría contribuir a la mayor colonización por enterobacterias productoras de BLEE podría ser un uso más elevado de antibióticos entre la población HSH para el tratamiento de ITS, tal y como se ha señalado anteriormente en la selección de resistencia en *Shigella*. En el estudio realizado en Ámsterdam se detectaron diferencias significativas en el uso de antibióticos, presentando un uso mayor aquellos usuarios colonizados por enterobacterias productoras de BLEE

## Discusión

respecto a los no colonizados. Por lo que respecta al de París, observaron una exposición significativamente más alta a antibióticos entre los grupos que comprenden población HSH respecto a los de MSH y HSM. Ambos estudios establecen que, aunque puede ser una explicación plausible, los análisis estadísticos que llevan a cabo, apuntan a que el riesgo de colonización por enterobacterias productora de BLEE no puede ser simplemente justificado por un mayor uso de antibióticos en este colectivo [109,110]. En nuestro caso, la encuesta realizada no recogía información relativa al consumo de antimicrobianos previos, por lo que no se pudo valorar este si esto pudiera suponer un factor de riesgo.

CTX-M-15 y SHV-12 fueron las BLEEs más prevalentes de nuestro estudio, identificadas en un 28,6% en ambos casos, seguido de CTX-M-27 en un 19%. En el estudio de población general llevado a cabo en Barcelona entre 2014-2015, se identificó una prevalencia de un 31% para CTX-M-15 y un 8% para SHV-12 y CTX-M-27 en ambos casos. En el realizado en París, identificaron en HSH un 57%, 17% y 16%; y en HSM y MSH un 60% un 0% y un 18,3% respectivamente. Así pues, la prevalencia de SHV-12 en población HSH de ambos estudios resultó ser muy superior a la población general de Barcelona y en HSM y MSH de París. Aunque las CTX-M son las BLEE más extendidas, especialmente CTX-M-15, dentro de las de tipo SHV, SHV-12 es una de las BLEE más detectadas. Su presencia ha sido notificada en numerosos estudios, entre las que se ha detectado en múltiples especies (p. ej. *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella enterica*) obtenidas tanto de de cepas productoras de infección en humanas como en cepas colonizantes; en animales de compañía, ganado y salvajes; y en cepas de muestras ambientales recogidas en ríos o el mar. Además, esta se ha detectado en múltiples plásmidos de grupos de incompatibilidad muy diversos como IncF, IncI, IncK, IncL/M, IncN, IncX e IncA/C y junto a otras  $\beta$ -lactamasa de las familias CTX-M, TEM, KPC, VIM o NDM. Por lo que, aunque las enzimas SHV no son mayoritarias actualmente, estas contribuyen a la resistencia a los  $\beta$ -lactámicos de una manera no despreciable y su diseminación puede resultar problemática [150–156].

## Discusión

La mayoría de los aislados de *E. coli* colonizadores de HSH identificados en nuestro trabajo pertenecían al filogrupo B2 (54%). En el estudio previo llevado a cabo en nuestro medio, en el que investigaban las características de las enterobacterias productoras de BLEE colonizantes de la población general sana, el filogrupo mayoritariamente observado también fue el B2, aunque en un porcentaje menor, un 31% [150]. En el estudio realizado en HSH en París, obtuvieron unos resultados muy similares, en el caso del conjunto de HSH, el filogrupo B2 representó un 54%. En cambio, entre los MSH o HSM, el B2 también fue el filogrupo mayoritario, pero en un porcentaje inferior, un 37,8%, más similar al obtenido en la población general en Barcelona [110]. En cuanto a los factores involucrados en la infección extraintestinal, varios de estos factores fueron detectados entre los aislados de nuestro estudio productores de BLEE colonizantes, especialmente, como era de esperar, el número de genes fue mayor entre los aislados pertenecientes al filogrupo B2, como los genes que codifican la fimbria P, SPATEs como *tsh* y *sat*, múltiples sistemas de adquisición de hierro y capsula del grupo 2, en especial K1 y K5. Este hecho es destacable, el colectivo HSH no solamente presenta una prevalencia mayor de *E. coli* productoras de BLEE, sino que aquellos aislados detectados entre HSH, un porcentaje mayor pertenecen al filogrupo B2, el cual presenta un mayor potencial para poder producir infecciones extraintestinales.

Por lo que respecta a la epidemiología molecular de los aislados identificados en nuestro estudio, los ST de *E. coli* representados por más de un aislado fueron el ST14 (29%) y el ST131 (19%). En París, los aislados obtenidos de HSH también pertenecieron principalmente a estos dos ST, aunque el ST131 en una proporción más elevada, con un 21,6%, y ST14 algo menor, con un 16,2%. Además, el ST14 no fue observado ni en los usuarios MSH ni HSM de París, por lo que los autores argumentan la existencia de una circulación en la red sexual de HSH de este ST asociado a SHV-12 [110]. A esta circulación también apuntarían los resultados genéticos obtenidos entre los aislados de nuestro estudio y explicaría las diferencias detectadas entre población general y HSH en las prevalencias de BLEEs. Además, esto vendría apoyado por el hecho que la comparación genómica entre los aislados

de París y Barcelona de este ST muestra una distancia genética próxima entre algunos de ellos, lo que además sugeriría, una posible diseminación internacional de ST14 asociada a SHV-12 transmitido de forma sexual entre HSH. Este podría haberse expandido internacionalmente de forma similar a lo acontecido con los brotes de expansión intercontinental descritos en *Shigella* [105,132].

Por lo que respecta al ST131 de *E. coli*, al ser el ST más extendido, se ha subdividido en diversos sublinajes basándose en el alelo del gen *fimH*, mutaciones en la región QRDR y la BLEE que presenta. El sublinaje más extendido globalmente es el ST131-C2-H30-Rx el cual es portador del alelo *fimH30*, mutaciones en QRDR (*gyrA*-S83L/D87N; *parC*-S80I/E84V) y de *bla*<sub>CTX-M-15</sub> [153,157]. Ninguno de los aislados obtenidos en nuestro estudio presentó este perfil. El segundo sublinaje más detectado globalmente es el C1-M27, que presenta el alelo *fimH30*, las mutaciones en QRDR y *bla*<sub>CTX-M-27</sub>. Este sublinaje con estas características lo detectamos únicamente en uno de los aislados de nuestro estudio. Asimismo, a este sublinaje también pertenecieron algunos aislados obtenidos en el estudio llevado a cabo en París, sin embargo, ninguno de ellos presentó una distancia cercana al aislado que detectamos en nuestro estudio. En cuanto al alelo *fimH99*, no fue detectado entre los aislados de París y se ha reportado con muy baja frecuencia en la bibliografía, aunque, ha sido detectado en estudios de infección urinaria y bacteriemia en Dinamarca, Corea del sur y el Reino Unido [110,153,158–160]. No obstante, en la comparación genómica entre los aislados *E. coli* del ST131 de nuestro estudio y los obtenidos en París, se observa que aislados que codificaban *fimH99* de nuestro estudio formaron un clúster independiente dentro del clado formado por los aislados del C1-M27. Sin embargo, la distancia genética detectada fue elevada con los aislados de este ST con otros alelos del *fimH* obtenidos en París. Respecto al contenido plasmídico de los aislados, el perfil detectado en ST131, el F1:A2:B20, está muy relacionado con la diseminación del clon C1-M27 [129,161]. El plásmido obtenido del aislado representante del ST131-*fimH99* secuenciado mediante “*long-read sequencing*” (DE008) presentó una identidad elevada con un plásmido descrito en Japón codificante de *bla*<sub>CTX-M-27</sub> obtenido de un aislado del 2016 que pertenecía al

## Discusión

sublinaje C1-M27 [129]. Este hecho, sumado distancia genética con este sublinaje, sugiere que los aislados *fimH99* detectados en este estudio habrían derivado del C1-M27. Debido a la distancia genética que presentan y a que el tiempo de estudio de colonización fue de un mes, se desconoce si la detección de ST131-*fimH99* es consecuencia de un brote puntual o una circulación extendida. Por ello, sería necesario realizar un estudio más extenso para observar si los ST detectados en este estudio como más frecuentes, son los más diseminados entre el colectivo HSH.

Como se exponía en el estudio anterior, entre 2020-2021 se observó un incremento significativo en el aislamiento de *Shigella* productora de CTX-M-27. La secuenciación del plásmido reveló que el gen *bla*<sub>CTX-M-27</sub> se encontraba codificado en un plásmido IncF con una alta identidad con plásmidos variantes del pKSR100, los cuales han sido anteriormente descritos entre los linajes asociados a HSH codificando: *mphA*, *ermB*, *bla*<sub>TEM-1</sub>, *dfrA1*, *dfrA17*, *sul1*, *aadA5* y *bla*<sub>CTX-M-27</sub> [142]. Como entre los aislados de *E. coli* productores de BLEE obtenidos en este estudio, se detectaron aislados portadores de *bla*<sub>CTX-M-27</sub>, se valoró la posibilidad de que estos aislados pudieran ser un reservorio del plásmido pKSR100. Para confirmar esta hipótesis, se realizó una comparación entre el plásmido descrito en Barcelona de *S. sonnei* productora de CTX-M-27 (pSH212) y el plásmido de un aislado de *E. coli* de este estudio seleccionado como representante (DE008). La comparación reveló que ambos plásmidos presentaban diferencias en el “backbone”, aunque también se observó que estos compartían elementos genéticos móviles en los que se localizaban diversos determinantes de resistencia como *aadA5*, *bla*<sub>CTX-M-27</sub>, *dfrA17*, *mphA* y *sul1*. Este hecho descartaría en este caso una posible transmisión horizontal del plásmido completo entre *Shigella* y *E. coli*, aunque no la posibilidad de una hipotética transmisión horizontal de los elementos genéticos móviles en los que se encuentra este determinante de resistencia.

Dada la diversidad genética que presentan los aislados obtenidos de HSH, esta sugiere la posible circulación de *E. coli* productor de BLEE en redes sexuales, especialmente del ST14. Este hecho podría explicar la mayor prevalencia detectada

## Discusión

entre HSH. Además, resulta muy destacable el número genes vinculados con fenotipos más virulentos detectados entre los aislados estudiados, por lo que estos individuos podrían representar un reservorio para la transmisión de este microorganismo a la población general, tanto de mecanismos de resistencia como factores de virulencia, que podrían ser transmitidos de forma horizontal con otros organismos o estos mismos causar infección. Aunque existen indicios, se desconoce si existen actividades sexuales concretas que comporten un mayor riesgo de adquirir y transmitir enterobacterias productoras de BLEE en este colectivo. Por ello, se requieren más estudios para comprender las vías de transmisión sexual que estén asociadas con una mayor colonización y de esta forma, tomar medidas efectivas para prevenir la diseminación.

# Conclusiones



### Identificación de los linajes de *Shigella* circulantes en Barcelona entre hombres que mantienen relaciones sexuales con hombres

- Este estudio ha permitido identificar la circulación y transmisión de *S. flexneri* y *S. sonnei* entre HSH en Barcelona entre los años 2015 y 2019.
- Los casos de shigelosis estuvieron principalmente causados por linajes de *S. sonnei* y *S. flexneri* previamente descritos en este colectivo en otros países por lo que la interconexión entre las redes sexuales de HSH podría haber jugado un importante papel en su diseminación.
- Se ha evidenciado una alta tasa de resistencia a la azitromicina (80%) en *S. flexneri* y *S. sonnei* asociadas a HSH como consecuencia de la adquisición del plásmido pKSR100 en el que se encontraban codificados los genes *mphA* y *ermB*. Este hecho señala el elevado riesgo de fracaso terapéutico al utilizar los macrólidos como tratamiento empírico para la shigelosis adquirida por transmisión sexual en HSH.
- En pacientes HSH, la resistencia a ciprofloxacino fue significativamente más alta en *S. sonnei* que en *S. flexneri* (4,5% vs. 80,8%), siendo en ambos casos mediada por la adquisición de mutaciones en la región QRDR. La tasa detectada en *S. sonnei* fue debida a la amplia diseminación de aislados pertenecientes al genotipo CipR.MSM5.

### Caracterización de los aspectos microbiológicos involucrados en el aumento de *Shigella* productora de BLEE multirresistente y extremadamente resistente identificadas en Barcelona entre los años 2020 y 2021

- Durante los años 2020 y 2021 se detectó un incremento significativo de *Shigella* productora de BLEE respecto a lo identificado durante el periodo previo comprendido entre 2015 y 2019 (4,8% vs 38%). Este incremento se debió a la emergencia y diseminación de *S. sonnei* XDR productora de CTX-M-27 del genotipo CipR.MSM5 entre el colectivo de HSH.
- Los estudios filogenómicos han señalado que el origen más probable de la expansión de CipR.MSM5 productor de CTX-M-27 en nuestro medio ha sido la

## Conclusiones

introducción de clones circulantes en otros países, descartando la adquisición de *bla*<sub>CTX-M-27</sub> por parte de los clones de este genotipo circulantes previamente en Barcelona.

- Se detectó por primera vez la diseminación entre HSH de *S. flexneri* 2a productores de CTX-M-27. La distancia genética y temporal entre los casos y la falta de conexiones epidemiológicas hace sospechar de la existencia de casos no detectados.
- Los plásmidos en el cual se encontraba codificada *bla*<sub>CTX-M-27</sub> en los aislados identificados en HSH son una variantes del plásmido pKSR100. Estos plásmidos, en el que además se encuentran codificados determinantes de resistencia a los macrólidos y al cotrimoxazol, podrían jugar un papel clave en el éxito de diseminación de linajes entre HSH.
- La evolución de la resistencia en *Shigella* circulante entre HSH, evidencia la necesidad de establecer medidas para frenar la diseminación intercontinental de linajes capaces de producir infecciones difíciles de tratar con las opciones terapéuticas disponibles actualmente.

### Detección de la transmisión a través de contacto sexual de enterobacteriales productores de BLEE no pertenecientes al género *Shigella* y que colonizan el tracto intestinal de hombres que mantienen relaciones sexuales con hombres

- En nuestro entorno, hemos detectado una prevalencia de colonización intestinal por *E. coli* productor de BLEE superior entre HSH respecto al de la población general (17,5% vs 4,7%).
- La mayoría de los aislados codificaban a su vez mecanismos de resistencia a otras familias de antimicrobianos entre los que se incluyen los macrólidos y las tetraciclinas, lo que podría constituir un importante reservorio de mecanismos de resistencia y potencialmente transmisibles a microorganismos productores de ITS u otras patologías.
- Entre los aislados de *E. coli* productores de CTX-M-27 no se detectó la presencia del plásmido pKSR100, descartándose *a priori* su implicación en la movilización

## Conclusiones

de *bla*<sub>CTX-M-27</sub> entre esta especie y *Shigella* spp, así como en la adquisición de resistencia a las cefalosporinas de tercera generación.

- La estrecha relación clonal observada, en especial entre los aislados del ST131, evidencian la existencia de una posible transmisión directa de *E. coli* productor de BLEE entre HSH. La transmisión sexual de estos organismos podría explicar la mayor prevalencia detectada entre el colectivo HSH.
- Los aislados del ST14 detectados en Barcelona y París obtenidos de HSH, presentaron una distancia próxima genéticamente, hecho que pone de manifiesto la posible diseminación internacional de un clon ST14 productor de SHV-12 a través del contacto sexual.

# Bibliografía



## Bibliografía

- [1] Belotserkovsky I, Sansonetti PJ. Shigella and Enteroinvasive Escherichia Coli. In: Frankel G, Ron EZ, editors. *Escherichia coli, a Versatile Pathogen*, vol. 416, Cham: Springer International Publishing; 2018, p. 1–26. [https://doi.org/10.1007/82\\_2018\\_104](https://doi.org/10.1007/82_2018_104).
- [2] Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, editors. *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. Ninth edition. Philadelphia, PA: Elsevier; 2020.
- [3] Mattock E, Blocker AJ. How Do the Virulence Factors of Shigella Work Together to Cause Disease? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2017;7.
- [4] Prats G, Pumarola T, Mirelies B. *Microbiología y Parasitología Médicas*. 2ª edición. Madrid - España: Editorial Médica Panamericana; 2023.
- [5] Schnupf P, Sansonetti PJ. Shigella Pathogenesis: New Insights through Advanced Methodologies. *Microbiol Spectr* 2019;7. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.BAI-0023-2019>.
- [6] World Health Organization. *Guidelines for the control of shigellosis, including epidemics due to Shigella dysenteriae type 1*. World Health Organization; 2005.
- [7] Khalil IA, Troeger C, Blacker BF, Rao PC, Brown A, Atherly DE, et al. Morbidity and mortality due to shigella and enterotoxigenic Escherichia coli diarrhoea: the Global Burden of Disease Study 1990–2016. *Lancet Infect Dis* 2018;18:1229–40. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30475-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30475-4).
- [8] Anderson M, Sansonetti PJ, Marteyn BS. Shigella Diversity and Changing Landscape: Insights for the Twenty-First Century. *Front Cell Infect Microbiol* 2016;6:45. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00045>.
- [9] Chung The H, Bodhidatta L, Pham DT, Mason CJ, Ha Thanh T, Voong Vinh P, et al. Evolutionary histories and antimicrobial resistance in Shigella flexneri and Shigella sonnei in Southeast Asia. *Commun Biol* 2021;4:353. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01905-9>.
- [10] Thompson CN, Duy PT, Baker S. The Rising Dominance of Shigella sonnei: An Intercontinental Shift in the Etiology of Bacillary Dysentery. *PLoS Negl Trop Dis* 2015;9:e0003708. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003708>.
- [11] Connor TR, Barker CR, Baker KS, Weill F-X, Talukder KA, Smith AM, et al. Species-wide whole genome sequencing reveals historical global spread and recent local persistence in Shigella flexneri. *ELife* 2015;4:e07335. <https://doi.org/10.7554/eLife.07335>.
- [12] Denamur E, Clermont O, Bonacorsi S, Gordon D. The population genetics of pathogenic Escherichia coli. *Nat Rev Microbiol* 2021;19:37–54. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0416-x>.
- [13] Hawkey J, Monk JM, Billman-Jacobe H, Palsson B, Holt KE. Impact of insertion sequences on convergent evolution of Shigella species. *PLoS Genet* 2020;16:e1008931. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008931>.
- [14] Seferbekova Z, Zabelkin A, Yakovleva Y, Afasizhev R, Dranenko NO, Alexeev N, et al. High Rates of Genome Rearrangements and Pathogenicity

- of *Shigella* spp. *Front Microbiol* 2021;12:628622. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.628622>.
- [15] Sahl JW, Morris CR, Emberger J, Fraser CM, Ochieng JB, Juma J, et al. Defining the Phylogenomics of *Shigella* Species: a Pathway to Diagnostics. *J Clin Microbiol* 2015;53:951–60. <https://doi.org/10.1128/JCM.03527-14>.
- [16] Yang J, Nie H, Chen L, Zhang X, Yang F, Xu X, et al. Revisiting the Molecular Evolutionary History of *Shigella* spp. *J Mol Evol* 2007;64:71–9. <https://doi.org/10.1007/s00239-006-0052-8>.
- [17] The HC, Thanh DP, Holt KE, Thomson NR, Baker S. The genomic signatures of *Shigella* evolution, adaptation and geographical spread. *Nat Rev Microbiol* 2016;14:235–50. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.10>.
- [18] Hawkey J, Paranagama K, Baker KS, Bengtsson RJ, Weill F-X, Thomson NR, et al. Global population structure and genotyping framework for genomic surveillance of the major dysentery pathogen, *Shigella sonnei*. *Nat Commun* 2021;12:2684. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22700-4>.
- [19] Holt KE, Baker S, Weill F-X, Holmes EC, Kitchen A, Yu J, et al. *Shigella sonnei* genome sequencing and phylogenetic analysis indicate recent global dissemination from Europe. *Nat Genet* 2012;44:1056–9. <https://doi.org/10.1038/ng.2369>.
- [20] Mai S-NT, Bodhidatta L, Turner P, Wangchuk S, Ha Thanh T, Voong Vinh P, et al. The evolutionary history of *Shigella flexneri* serotype 6 in Asia. *Microbial Genomics* 2021;7. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000736>.
- [21] Sikorski MJ, Hazen TH, Vyas G, Michalski JM, Rasko DA. Genome Sequences of Four *Shigella boydii* Strains Representative of the Major *S. boydii* Clades. *Microbiology Resource Announcements* 2020;9:e00881-20. <https://doi.org/10.1128/MRA.00881-20>.
- [22] Njamkepo E, Fawal N, Tran-Dien A, Hawkey J, Strockbine N, Jenkins C, et al. Global phylogeography and evolutionary history of *Shigella dysenteriae* type 1. *Nat Microbiol* 2016;1:16027. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.27>.
- [23] Kotloff KL, Riddle MS, Platts-Mills JA, Pavlinac P, Zaidi AKM. Shigellosis. *The Lancet* 2018;391:801–12. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)33296-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)33296-8).
- [24] Bliven KA, Lampel KA. *Shigella*: Virulence Factors and Pathogenicity. In: Gurtler JB, Doyle MP, Kornacki JL, editors. *Foodborne Pathogens: Virulence Factors and Host Susceptibility*, Cham: Springer International Publishing; 2017, p. 169–208. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-56836-2\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-56836-2_7).
- [25] Caboni M, Pédrón T, Rossi O, Goulding D, Pickard D, Citiulo F, et al. An O Antigen Capsule Modulates Bacterial Pathogenesis in *Shigella sonnei*. *PLoS Pathog* 2015;11:e1004749. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004749>.
- [26] Mahmoud RY, Stones DH, Li W, Emara M, El-domany RA, Wang D, et al. The Multivalent Adhesion Molecule SSO1327 plays a key role in *Shigella sonnei* pathogenesis. *Molecular Microbiology* 2016;99:658–73. <https://doi.org/10.1111/mmi.13255>.

- [27] Lüthje P, Brauner A. Virulence Factors of Uropathogenic *E. coli* and Their Interaction with the Host. *Advances in Microbial Physiology*, vol. 65, Elsevier; 2014, p. 337–72. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2014.08.006>.
- [28] Tóth I, Sváb D, Bálint B, Brown-Jaque M, Maróti G. Comparative analysis of the Shiga toxin converting bacteriophage first detected in *Shigella sonnei*. *Infection, Genetics and Evolution* 2016;37:150–7. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.11.022>.
- [29] Shane AL, Mody RK, Crump JA, Tarr PI, Steiner TS, Kotloff K, et al. 2017 Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Infectious Diarrhea. *Clinical Infectious Diseases* 2017;65:e45–80. <https://doi.org/10.1093/cid/cix669>.
- [30] Williams PCM, Berkley JA. Guidelines for the treatment of dysentery (shigellosis): a systematic review of the evidence. *Paediatr Int Child Health* 2018;38:S50–65. <https://doi.org/10.1080/20469047.2017.1409454>.
- [31] Mathipa MG, Thantsha MS. Probiotic engineering: towards development of robust probiotic strains with enhanced functional properties and for targeted control of enteric pathogens. *Gut Pathog* 2017;9:28. <https://doi.org/10.1186/s13099-017-0178-9>.
- [32] Shad AA, Shad WA. *Shigella sonnei*: virulence and antibiotic resistance. *Arch Microbiol* 2020;1–14. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02034-3>.
- [33] Adams, Michael A. FDA GRAS Notice No. GRN 000672. United States of America: Food and Drug Administration; 2017.
- [34] Tang S-S, Biswas SK, Tan WS, Saha AK, Leo B-F. Efficacy and potential of phage therapy against multidrug resistant *Shigella* spp. *PeerJ* 2019;7:e6225. <https://doi.org/10.7717/peerj.6225>.
- [35] Barry EM, Pasetti MF, Sztein MB, Fasano A, Kotloff KL, Levine MM. Progress and pitfalls in *Shigella* vaccine research. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013;10:245–55. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.12>.
- [36] Martin P, Alaimo C. The Ongoing Journey of a *Shigella* Bioconjugate Vaccine. *Vaccines* (Basel) 2022;10:212. <https://doi.org/10.3390/vaccines10020212>.
- [37] Blount ZD. The unexhausted potential of *E. coli*. *Elife* 2015;4. <https://doi.org/10.7554/eLife.05826>.
- [38] Manges AR, Geum HM, Guo A, Edens TJ, Fibke CD, Pitout JDD. Global Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) Lineages. *Clin Microbiol Reviews* 2019;32:e00135-18, /cmr/32/3/CMR.00135-18.atom. <https://doi.org/10.1128/CMR.00135-18>.
- [39] Riley LW. Distinguishing Pathovars from Nonpathovars: *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr* 2020;8. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.AME-0014-2020>.
- [40] Desvaux M, Dalmasso G, Beyrouthy R, Barnich N, Delmas J, Bonnet R. Pathogenicity Factors of Genomic Islands in Intestinal and Extraintestinal *Escherichia coli*. *Front Microbiol* 2020;11:2065. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02065>.

## Bibliografía

- [41] McLellan LK, Hunstad DA. Urinary Tract Infection: Pathogenesis and Outlook. *Trends in Molecular Medicine* 2016;22:946–57. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.09.003>.
- [42] Biran D, Ron EZ. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. In: Frankel G, Ron EZ, editors. *Escherichia coli, a Versatile Pathogen*, Cham: Springer International Publishing; 2018, p. 149–61. [https://doi.org/10.1007/82\\_2018\\_108](https://doi.org/10.1007/82_2018_108).
- [43] Andreu A. Patogenia de las infecciones del tracto urinario. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005;23:15–21.
- [44] Luna-Pineda VM, Moreno-Fierros L, Cázares-Domínguez V, Ilhuicatz-Alvarado D, Ochoa SA, Cruz-Córdova A, et al. Curli of Uropathogenic *Escherichia coli* Enhance Urinary Tract Colonization as a Fitness Factor. *Front Microbiol* 2019;10:2063. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02063>.
- [45] Varki A. Sialic acids in human health and disease. *Trends Mol Med* 2008;14:351–60. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2008.06.002>.
- [46] Asadi Karam MR, Habibi M, Bouzari S. Urinary tract infection: Pathogenicity, antibiotic resistance and development of effective vaccines against Uropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Immunology* 2019;108:56–67. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.02.007>.
- [47] Deszo EL, Steenbergen SM, Freedberg DI, Vimr ER. *Escherichia coli* K1 polysialic acid O-acetyltransferase gene, neuO, and the mechanism of capsule form variation involving a mobile contingency locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:5564–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407428102>.
- [48] Vimr E, Lichtensteiger C. To sialylate, or not to sialylate: that is the question. *Trends in Microbiology* 2002;10:254–7. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(02\)02361-2](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(02)02361-2).
- [49] Whitfield C. Biosynthesis and Assembly of Capsular Polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu Rev Biochem* 2006;75:39–68. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142545>.
- [50] Sora VM, Meroni G, Martino PA, Soggiu A, Bonizzi L, Zecconi A. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: Virulence Factors and Antibiotic Resistance. *Pathogens* 2021;10:1355. <https://doi.org/10.3390/pathogens10111355>.
- [51] Dantas G, Sommer MOA. How to Fight Back Against Antibiotic Resistance. *American Scientist* 2017. <https://www.americanscientist.org/article/how-to-fight-back-against-antibiotic-resistance> (accessed June 20, 2022).
- [52] Khan A, Miller WR, Arias CA. Mechanisms of antimicrobial resistance among hospital-associated pathogens. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 2018;16:269–87. <https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1456919>.
- [53] Poirel L, Madec J-Y, Lupo A, Schink A-K, Kieffer N, Nordmann P, et al. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr* 2018;6. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017>.
- [54] Calvo J, Martínez-Martínez L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009;27:44–52. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.001>.

- [55] Bengtsson RJ, Simpkin AJ, Pulford CV, Low R, Rasko DA, Rigden DJ, et al. Pathogenomic analyses of *Shigella* isolates inform factors limiting shigellosis prevention and control across LMICs. *Nat Microbiol* 2022;7:251–61. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-01054-z>.
- [56] Chung The H, Rabaa MA, Pham Thanh D, De Lappe N, Cormican M, Valcanis M, et al. South Asia as a Reservoir for the Global Spread of Ciprofloxacin-Resistant *Shigella sonnei*: A Cross-Sectional Study. *PLoS Med* 2016;13:e1002055. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002055>.
- [57] Chung The H, Baker S. Out of Asia: the independent rise and global spread of fluoroquinolone-resistant *Shigella*. *Microb Genom* 2018;4:e000171. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000171>.
- [58] Cummins EA, Snaith AE, McNally A, Hall RJ. The role of potentiating mutations in the evolution of pandemic *Escherichia coli* clones. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2021. <https://doi.org/10.1007/s10096-021-04359-3>.
- [59] Pitout JDD, Peirano G, Chen L, DeVinney R, Matsumura Y. *Escherichia coli* ST1193: Following in the Footsteps of *E. coli* ST131. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2022;66:e00511-22. <https://doi.org/10.1128/aac.00511-22>.
- [60] Yanat B, Rodríguez-Martínez J-M, Touati A. Plasmid-mediated quinolone resistance in *Enterobacteriaceae*: a systematic review with a focus on Mediterranean countries. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2017;36:421–35. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2847-x>.
- [61] Gomes C, Ruiz-Roldán L, Mateu J, Ochoa TJ, Ruiz J. Azithromycin resistance levels and mechanisms in *Escherichia coli*. *Sci Rep* 2019;9:6089. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42423-3>.
- [62] Campbell D, Bowen A, Bhatnagar A, McCullough A, Grass J, Chen J, et al. Identification and characterization of *Shigella* with decreased susceptibility to azithromycin in the United States, 2005 to 2014. *J Glob Antimicrob Resist* 2020;21:417–9. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.12.005>.
- [63] Darton TC, Tuyen HT, The HC, Newton PN, Dance DAB, Phetsouvanh R, et al. Azithromycin Resistance in *Shigella* spp. in Southeast Asia. *Antimicrob Agents Chemother* 2018;62:e01748-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01748-17>.
- [64] Muthuirulandi Sethuvel DP, Anandan S, Murugan D, Asokan K, Vasudevan K, Jacob JJ, et al. Hybrid genome assembly of *Shigella sonnei* reveals the novel finding of chromosomal integration of an IncFII plasmid carrying a *mphA* gene. *Access Microbiol* 2020;3:000189. <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000189>.
- [65] Grundmann H, Glasner C, Albiger B, Aanensen DM, Tomlinson CT, Andrasević AT, et al. Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (EuSCAPE): a prospective, multinational study. *Lancet Infect Dis* 2017;17:153–63. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30257-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30257-2).

- [66] Cañada-García JE, Moure Z, Sola-Campoy PJ, Delgado-Valverde M, Cano ME, Gijón D, et al. CARB-ES-19 Multicenter Study of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* From All Spanish Provinces Reveals Interregional Spread of High-Risk Clones Such as ST307/OXA-48 and ST512/KPC-3. *Front Microbiol* 2022;13:918362. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.918362>.
- [67] Ranjbar R, Farahani A. Shigella: Antibiotic-Resistance Mechanisms And New Horizons For Treatment. *Infect Drug Resist* 2019;12:3137–67. <https://doi.org/10.2147/IDR.S219755>.
- [68] Tooke CL, Hinchliffe P, Bragginton EC, Colenso CK, Hirvonen VHA, Takebayashi Y, et al.  $\beta$ -Lactamases and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *J Mol Biol* 2019;431:3472–500. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002>.
- [69] Thamizhmani R, Rhagavan R, Sugunan AP, Vijayachari P. VIM- and IMP-type metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Shigella* spp. in childhood diarrhea from Andaman Islands. *Infectious Diseases* 2015;47:749–50. <https://doi.org/10.3109/23744235.2015.1022874>.
- [70] Pietsch M, Irrgang A, Roschanski N, Brenner Michael G, Hamprecht A, Rieber H, et al. Whole genome analyses of CMY-2-producing *Escherichia coli* isolates from humans, animals and food in Germany. *BMC Genomics* 2018;19:601. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4976-3>.
- [71] Frost LS, Leplae R, Summers AO, Toussaint A. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol* 2005;3:722–32. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1235>.
- [72] Madigan MT, Martinko JM, Bender KS, Buckley DH, Stahl DA. Brock Biología de los Microorganismos 14ª Edición. Science Reviews; 2015.
- [73] Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev* 2018;31:e00088-17. <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>.
- [74] Hughes G, Field N. The epidemiology of sexually transmitted infections in the UK: impact of behavior, services and interventions. *Future Microbiology* 2015;10:35–51. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.110>.
- [75] Unemo M, Bradshaw CS, Hocking JS, de Vries HJC, Francis SC, Mabey D, et al. Sexually transmitted infections: challenges ahead. *Lancet Infect Dis* 2017;17:e235–79. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30310-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30310-9).
- [76] Centre d'Estudis Epidemiològics sobre les Infeccions de Transmissió Sexual i Sida de Catalunya – CEEISCAT. Vigilància epidemiològica de les Infeccions de Transmissió Sexual a Catalunya - Informe 2021. 2021.
- [77] Public Health England. Promoting the health and wellbeing of gay, bisexual and other men who have sex with men: initial findings. London, United Kingdom: 2014.
- [78] Spicknall IH, Gift TL, Bernstein KT, Aral SO. Sexual networks and infection transmission networks among men who have sex with men as causes of disparity and targets of prevention. *Sex Transm Infect* 2017;93:307–8. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2016-052676>.

## Bibliografia

- [79] Aljama P, Vicente-Cruz E, Carrer C, Carrasco A, Rosselló M, Monllor B, et al. Estat de l'LGTTBI-fòbia a Catalunya 2021. Barcelona: Observatori contra l'homofòbia; 2022.
- [80] Mayer KH. Old pathogen, new challenges: a narrative review of the multi-level drivers of syphilis increasing in American men who have sex with men. *Sex Transm Dis* 2018;45:S38–41. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0000000000000815>.
- [81] Mills TC, Paul J, Stall R, Pollack L, Canchola J, Chang YJ, et al. Distress and Depression in Men Who Have Sex With Men: The Urban Men's Health Study. *AJP* 2004;161:278–85. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.161.2.278>.
- [82] Babowitch JD, Mitzel LD, Venable PA, Sweeney SM. Depressive Symptoms and Condomless Sex Among Men Who Have Sex with Men Living with HIV: A Curvilinear Association. *Arch Sex Behav* 2018;47:2035–40. <https://doi.org/10.1007/s10508-017-1105-3>.
- [83] Shuper PA, MacLachlan DJ, Joharchi N, Guimond TH, Maxwell J, Adam BD. HIV Risk and Protective Factors in the Context of Alcohol and Substance Use During Pride. *AIDS Behav* 2018;22:2797–806. <https://doi.org/10.1007/s10461-018-2117-2>.
- [84] Su X, Zhou AN, Li J, Shi L, Huan X, Yan H, et al. Depression, loneliness, and sexual risk-taking among HIV-negative/unknown men who have sex with men in China. *Arch Sex Behav* 2018;47:1959–68. <https://doi.org/10.1007/s10508-017-1061-y>.
- [85] Skinner A, Stein MD, Dean LT, Oldenburg CE, Mimiaga MJ, Chan PA, et al. Same-Sex Marriage Laws, Provider-Patient Communication, and PrEP Awareness and Use Among Gay, Bisexual, and Other Men Who have Sex with Men in the United States. *AIDS Behav* 2022. <https://doi.org/10.1007/s10461-022-03923-y>.
- [86] Kirkcaldy RD, Weston E, Segurado AC, Hughes G. Epidemiology of gonorrhoea: a global perspective. *Sex Health* 2019;16:401–11. <https://doi.org/10.1071/SH19061>.
- [87] Doherty IA, Padian NS, Marlow C, Aral SO. Determinants and consequences of sexual networks as they affect the spread of sexually transmitted infections. *J Infect Dis* 2005;191 Suppl 1:S42-54. <https://doi.org/10.1086/425277>.
- [88] Leyva-Moral JM, Feijoo-Cid M, Moríña D, Caylà JA, Arando M, Vall M, et al. Gay Circuit Parties in Barcelona and Their Impact on Gonorrhoea Incidence. *Arch Sex Behav* 2018;47:2027–34. <https://doi.org/10.1007/s10508-018-1220-9>.
- [89] Baker KS, Dallman TJ, Thomson NR, Jenkins C. An outbreak of a rare Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* serotype (O117:H7) among men who have sex with men. *Microb Genom* 2018;4. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000181>.
- [90] Clutterbuck D, Asboe D, Barber T, Emerson C, Field N, Gibson S, et al. 2016 United Kingdom national guideline on the sexual health care of men

- who have sex with men. *Int J STD AIDS* 2018;956462417746897. <https://doi.org/10.1177/0956462417746897>.
- [91] Gaudreau C, Helferty M, Sylvestre J-L, Allard R, Pilon PA, Poisson M, et al. *Campylobacter coli* Outbreak in Men Who Have Sex with Men, Quebec, Canada, 2010–2011. *Emerg Infect Dis* 2013;19:764–7. <https://doi.org/10.3201/eid1905.121344>.
- [92] Gaudreau C, Rodrigues-Coutlée S, Pilon PA, Coutlée F, Bekal S. Long-Lasting Outbreak of Erythromycin- and Ciprofloxacin-Resistant *Campylobacter jejuni* Subspecies *jejuni* From 2003 to 2013 in Men Who Have Sex With Men, Quebec, Canada. *Clinical Infectious Diseases* 2015;61:1549–52. <https://doi.org/10.1093/cid/civ570>.
- [93] Gaudreau C, Pilon PA, Sylvestre J-L, Boucher F, Bekal S. Multidrug-Resistant *Campylobacter coli* in Men Who Have Sex with Men, Quebec, Canada, 2015. *Emerg Infect Dis* 2016;22:1661–3. <https://doi.org/10.3201/eid2209.151695>.
- [94] Greninger AL, Addetia A, Starr K, Cybulski RJ, Stewart MK, Salipante SJ, et al. International Spread of Multidrug-Resistant *Campylobacter coli* in Men Who Have Sex With Men in Washington State and Québec, 2015–2018. *Clin Infect Dis* 2019;71:1896–904. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz1060>.
- [95] Ingle DJ, Easton M, Valcanis M, Seemann T, Kwong JC, Stephens N, et al. Co-circulation of Multidrug-resistant *Shigella* Among Men Who Have Sex With Men in Australia. *Clin Infect Dis* 2019;69:1535–44. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz005>.
- [96] Marchand-Sénécal X, Bekal S, Pilon PA, Sylvestre J-L, Gaudreau C. *Campylobacter fetus* Cluster Among Men Who Have Sex With Men, Montreal, Quebec, Canada, 2014–2016. *Clinical Infectious Diseases* 2017;65:1751–3. <https://doi.org/10.1093/cid/cix610>.
- [97] McNeil CJ, Kirkcaldy RD, Workowski K. Enteric Infections in Men Who Have Sex With Men. *Clinical Infectious Diseases* 2022;74:S169–78. <https://doi.org/10.1093/cid/ciac061>.
- [98] Mitchell HD, Whitlock G, Zdravkov J, Olsson J, Silalang P, Bardsley M, et al. Prevalence and risk factors of bacterial enteric pathogens in men who have sex with men: A cross-sectional study at the UK’s largest sexual health service. *Journal of Infection* 2022;0. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2022.10.033>.
- [99] Rodríguez-Tajes S, Perpiñán E, Caballol B, Lens S, Mariño Z, Costa J, et al. Hepatitis A outbreak in Barcelona among men who have sex with men (MSM), January-June 2017: A hospital perspective. *Liver International* 2018;38:588–93. <https://doi.org/10.1111/liv.13606>.
- [100] Ruscher C, Werber D, Thoullass J, Zimmermann R, Eckardt M, Winter C, et al. Dating apps and websites as tools to reach anonymous sexual contacts during an outbreak of hepatitis A among men who have sex with men, Berlin, 2017. *Euro Surveill* 2019;24:1800460. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.21.1800460>.

- [101] Dritz SK, Back AF. Shigella enteritis venereally transmitted. *N Engl J Med* 1974;291:1194.
- [102] Baker KS, Dallman TJ, Field N, Childs T, Mitchell H, Day M, et al. Horizontal antimicrobial resistance transfer drives epidemics of multiple *Shigella* species. *Nat Commun* 2018;9:1462. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03949-8>.
- [103] van den Beld MJC, Reubsaet FAG, Pijnacker R, Harpal A, Kuiling S, Heerkens EM, et al. A Multifactorial Approach for Surveillance of *Shigella* spp. and Entero-Invasive *Escherichia coli* Is Important for Detecting (Inter)national Clusters. *Front Microbiol* 2020;11:564103. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.564103>.
- [104] Fischer N, Maex M, Mattheus W, Van den Bossche A, Van Cauteren D, Laisnez V, et al. Genomic epidemiology of persistently circulating MDR *Shigella sonnei* strains associated with men who have sex with men (MSM) in Belgium (2013–19). *J Antimicrob Chemother* 2021:dkab377. <https://doi.org/10.1093/jac/dkab377>.
- [105] Gaudreau C, Bernaquez I, Pilon PA, Goyette A, Yared N, Bekal S. Clinical and Genomic Investigation of an International Ceftriaxone- and Azithromycin-Resistant *Shigella sonnei* Cluster among Men Who Have Sex with Men, Montréal, Canada 2017–2019. *Microbiol Spectr* 2022;10:e02337-21. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02337-21>.
- [106] Murray K, Reddy V, Kornblum JS, Waechter H, Chicaiza LF, Rubinstein I, et al. Increasing Antibiotic Resistance in *Shigella* spp. from Infected New York City Residents, New York, USA. *Emerg Infect Dis* 2017;23:332–5. <https://doi.org/10.3201/eid2302.161203>.
- [107] Tsai C-S, Lin K-Y, Liou B-H, Chiou C-S, Lin Y-C, Lee Y-T, et al. Changing epidemiology of shigellosis in Taiwan, 2010–2019: an emerging threat to HIV-infected patients and men who have sex with men. *Emerg Microbes Infect* 2022;11:498–506. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2031309>.
- [108] World Health Organization. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. Geneva: World Health Organization; 2017.
- [109] van Bilsen WPH, van Dulm E, Matser A, Linde I, van Duijnhoven YTHP, Prins JM, et al. High carriage of ESBL-producing Enterobacteriaceae associated with sexual activity among men who have sex with men. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2021;57:106276. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2021.106276>.
- [110] Surgers L, Chiarabini T, Royer G, Rougier H, Mercier-Darty M, Decré D, et al. Evidence of sexual transmission of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacterales: a cross-sectional and prospective study. *Clinical Infectious Diseases* 2022:ciac218. <https://doi.org/10.1093/cid/ciac218>.
- [111] The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 11.0. 2021.

- [112] Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 2014;30:2114–20. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.
- [113] Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLOS Computational Biology* 2017;13:e1005595. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>.
- [114] Alcock BP, Raphenya AR, Lau TTY, Tsang KK, Bouchard M, Edalatmand A, et al. CARD 2020: antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Research* 2020;48:D517–25. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz935>.
- [115] Carattoli A, Hasman H. PlasmidFinder and In Silico pMLST: Identification and Typing of Plasmid Replicons in Whole-Genome Sequencing (WGS). *Methods Mol Biol* 2020;2075:285–94. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9877-7\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9877-7_20).
- [116] Seemann T. mlst 2023.
- [117] Roer L, Tchesnokova V, Allesøe R, Muradova M, Chattopadhyay S, Ahrenfeldt J, et al. Development of a Web Tool for Escherichia coli Subtyping Based on fimH Alleles. *J Clin Microbiol* 2017;55:2538–43. <https://doi.org/10.1128/JCM.00737-17>.
- [118] Liu B, Zheng D, Jin Q, Chen L, Yang J. VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic Acids Res* 2019;47:D687–92. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1080>.
- [119] Malberg Tetzschner AM, Johnson JR, Johnston BD, Lund O, Scheutz F. In Silico Genotyping of Escherichia coli Isolates for Extraintestinal Virulence Genes by Use of Whole-Genome Sequencing Data. *J Clin Microbiol* 2020;58:e01269-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.01269-20>.
- [120] Schwengers O, Jelonek L, Dieckmann MA, Beyvers S, Blom J, Goesmann A. Bakta: rapid and standardized annotation of bacterial genomes via alignment-free sequence identification. *Microbial Genomics* 2021;7:000685. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000685>.
- [121] Seemann T. Snippy 2023.
- [122] Croucher NJ, Page AJ, Connor TR, Delaney AJ, Keane JA, Bentley SD, et al. Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins. *Nucleic Acids Research* 2015;43:e15. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1196>.
- [123] Kalyaanamoorthy S, Minh BQ, Wong TKF, von Haeseler A, Jermini LS. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat Methods* 2017;14:587–9. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>.
- [124] Minh BQ, Schmidt HA, Chernomor O, Schrempf D, Woodhams MD, von Haeseler A, et al. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Molecular Biology and Evolution* 2020;37:1530–4. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>.

- [125] Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Research* 2019;47:W256–9. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz239>.
- [126] Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research* 2021;49:W293–6. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>.
- [127] Wick RR, Judd LM, Holt KE. Performance of neural network basecalling tools for Oxford Nanopore sequencing. *Genome Biology* 2019;20:129. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1727-y>.
- [128] Wick R. Filtlong 2023.
- [129] Matsuo N, Nonogaki R, Hayashi M, Wachino J, Suzuki M, Arakawa Y, et al. Characterization of blaCTX-M-27/F1:A2:B20 Plasmids Harbored by Escherichia coli Sequence Type 131 Sublineage C1/H30R Isolates Spreading among Elderly Japanese in Nonacute-Care Settings. *Antimicrob Agents Chemother* 2020;64:e00202-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.00202-20>.
- [130] Culqui DR, García-de-Olalla-Rizo P, Alva-Chavez KP, Lafuente S, Rius C, de Simón M, et al. Análisis del patrón epidemiológico de la shigelosis en Barcelona entre 1988 y 2012: ¿es una infección de transmisión sexual emergente? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2015;33:379–84. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.09.013>.
- [131] Raj Js, Rawre J, Dhawan N, Khanna N, Dhawan B. *Mycoplasma genitalium*: A new superbug. *Indian J Sex Transm Dis* 2022;43:1. [https://doi.org/10.4103/ijstd.ijstd\\_103\\_20](https://doi.org/10.4103/ijstd.ijstd_103_20).
- [132] Baker KS, Dallman TJ, Ashton PM, Day M, Hughes G, Crook PD, et al. Intercontinental dissemination of azithromycin-resistant shigellosis through sexual transmission: a cross-sectional study. *The Lancet Infectious Diseases* 2015;15:913–21. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00002-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00002-X).
- [133] Dallman TJ, Charles H, Prochazka M, Sinka K, Hughes G, Godbole G, et al. Emergence of novel strains of Shigella flexneri associated with sexual transmission in adult men in England, 2019–2020. *J Med Microbiol* 2021;70. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001437>.
- [134] Hassing R-J, Melles DC, Goessens WHF, Rijnders BJA. Case of Shigella flexneri infection with treatment failure due to azithromycin resistance in an HIV-positive patient. *Infection* 2014;42:789–90. <https://doi.org/10.1007/s15010-014-0594-4>.
- [135] Ingle DJ, Andersson P, Valcanis M, Barnden J, Silva AG da, Horan KA, et al. Prolonged Outbreak of Multidrug-Resistant Shigella sonnei Harboring blaCTX-M-27 in Victoria, Australia. *Antimicrob Agents Chemother* 2020;64. <https://doi.org/10.1128/AAC.01518-20>.
- [136] Mook P, McCormick J, Bains M, Cowley LA, Chattaway MA, Jenkins C, et al. ESBL-Producing and Macrolide-Resistant Shigella sonnei Infections among Men Who Have Sex with Men, England, 2015. *Emerg Infect Dis* 2016;22:1948–52. <https://doi.org/10.3201/eid2211.160653>.
- [137] Liu G, Qian H, Tang B, Chen Y, Kang H, Jiang F, et al. Prevalence and characterisation of third-generation cephalosporin-resistant Shigella flexneri

- isolates from Jiangsu Province, China, 2013–2015. *J Glob Antimicrob Resist* 2018;15:283–7. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.08.012>.
- [138] Qian H, Liu G, Chen Y, Ma P, Kong X, Zhou L, et al. Increasing clinical resistance rate of *Shigella sonnei* to cefotaxime in Jiangsu Province, China, between 2012 and 2015. *Annals of Translational Medicine* 2018;6:207–207. <https://doi.org/10.21037/atm.2018.05.43>.
- [139] Farajzadeh Sheikh A, Moradi Bandbal M, Saki M. Emergence of multidrug-resistant *Shigella* species harboring extended-spectrum beta-lactamase genes in pediatric patients with diarrhea from southwest of Iran. *Mol Biol Rep* 2020;47:7097–106. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05776-x>.
- [140] Campos-Madueno EI, Bernasconi OJ, Moser AI, Keller PM, Luzzaro F, Maffioli C, et al. Rapid Increase of CTX-M-Producing *Shigella sonnei* Isolates in Switzerland Due to Spread of Common Plasmids and International Clones. *Antimicrob Agents Chemother* 2020;64:e01057-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.01057-20>.
- [141] Charles H, Prochazka M, Thorley K, Crewdson A, Greig DR, Jenkins C, et al. Outbreak of sexually transmitted, extensively drug-resistant *Shigella sonnei* in the UK, 2021–22: a descriptive epidemiological study. *Lancet Infect Dis* 2022;22:1503–10. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00370-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00370-X).
- [142] Locke RK, Greig DR, Jenkins C, Dallman TJ, Cowley LAY 2021. Acquisition and loss of CTX-M plasmids in *Shigella* species associated with MSM transmission in the UK. *Microb Genom* 2021;7:000644. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000644>.
- [143] Thorley K, Charles H, Greig DR, Prochazka M, Mason LCE, Baker KS, et al. Emergence of extensively drug-resistant and multidrug-resistant *Shigella flexneri* serotype 2a associated with sexual transmission among gay, bisexual, and other men who have sex with men, in England: a descriptive epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases* 2023;0. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00807-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00807-6).
- [144] European Centre for Disease Prevention and Control. Increase in extensively-drug resistant *Shigella sonnei* infections in men who have sex with men in the EU/EEA and the UK. 2022.
- [145] Canal Salut, Generalitat de Catalunya. Shigel·losi. Canal Salut 2021. <http://canalsalut.gencat.cat/ca/salut-a-z/s/shigellosi/> (accessed March 5, 2023).
- [146] Bardsley M, Jenkins C, Mitchell HD, Mikhail AFW, Baker KS, Foster K, et al. Persistent transmission of shigellosis in England is associated with a recently emerged multi-drug resistant strain of *Shigella sonnei*. *Journal of Clinical Microbiology* 2020. <https://doi.org/10.1128/JCM.01692-19>.
- [147] Tansarli GS, Long DR, Waalkes A, Bourassa LA, Libby SJ, Penewit K, et al. Genomic reconstruction and directed interventions in a multidrug-resistant *Shigellosis* outbreak in Seattle, WA, USA: a genomic surveillance study. *Lancet Infect Dis* 2023;S1473-3099(22)00879-9. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00879-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00879-9).

- [148] Bassetti M, Poulakou G, Ruppe E, Bouza E, Van Hal SJ, Brink A. Antimicrobial resistance in the next 30 years, humankind, bugs and drugs: a visionary approach. *Intensive Care Med* 2017;43:1464–75. <https://doi.org/10.1007/s00134-017-4878-x>.
- [149] Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance. No Time to Wait: Securing the future from drug-resistant infections. 2019.
- [150] Rodríguez-Navarro J, Miró E, Brown-Jaque M, Hurtado JC, Moreno A, Muniesa M, et al. Comparison of Commensal and Clinical Isolates for Diversity of Plasmids in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2020;64. <https://doi.org/10.1128/AAC.02064-19>.
- [151] Alcalá L, Alonso CA, Simón C, González-Esteban C, Orós J, Rezusta A, et al. Wild Birds, Frequent Carriers of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL) Producing *Escherichia coli* of CTX-M and SHV-12 Types. *Microb Ecol* 2016;72:861–9. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0718-0>.
- [152] Egea P, López-Cerero L, Torres E, Gómez-Sánchez M del C, Serrano L, Navarro Sánchez-Ortiz MD, et al. Increased raw poultry meat colonization by extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in the south of Spain. *International Journal of Food Microbiology* 2012;159:69–73. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.002>.
- [153] Flament-Simon S-C, García V, Duprilot M, Mayer N, Alonso MP, García-Meniño I, et al. High Prevalence of ST131 Subclades C2-H30Rx and C1-M27 Among Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Causing Human Extraintestinal Infections in Patients From Two Hospitals of Spain and France During 2015. *Front Cell Infect Microbiol* 2020;10:125. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00125>.
- [154] Liakopoulos A, Mevius D, Ceccarelli D. A Review of SHV Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous. *Front Microbiol* 2016;7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01374>.
- [155] Liu J, Lin L, Jia Z, Chen J, Zhao Z, Zhao Y, et al. Antibacterial potential of *Forsythia suspensa* polysaccharide against resistant *Enterobacter cloacae* with SHV-12 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL). *J Cell Mol Med* 2020;24:8763–71. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15510>.
- [156] Liu L-H, Wang N-Y, Wu AY-J, Lin C-C, Lee C-M, Liu C-P. *Citrobacter freundii* bacteremia: Risk factors of mortality and prevalence of resistance genes. *J Microbiol Immunol Infect* 2018;51:565–72. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2016.08.016>.
- [157] Ben Zakour NL, Alsheikh-Hussain AS, Ashcroft MM, Khanh Nhu NT, Roberts LW, Stanton-Cook M, et al. Sequential Acquisition of Virulence and Fluoroquinolone Resistance Has Shaped the Evolution of *Escherichia coli* ST131. *MBio* 2016;7:e00347-16, [/mbio/7/2/e00347-16.atom](https://doi.org/10.1128/mBio.00347-16). <https://doi.org/10.1128/mBio.00347-16>.
- [158] Gladstone RA, McNally A, Pöntinen AK, Tonkin-Hill G, Lees JA, Skytén K, et al. Emergence and dissemination of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* causing bloodstream infections in Norway in 2002–17: a nationwide,

## Bibliografía

- longitudinal, microbial population genomic study. *The Lancet Microbe* 2021;2:e331–41. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00031-8](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00031-8).
- [159] Kim B, Kim J-H, Lee Y. Virulence Factors Associated With *Escherichia coli* Bacteremia and Urinary Tract Infection. *Ann Lab Med* 2022;42:203–12. <https://doi.org/10.3343/alm.2022.42.2.203>.
- [160] Roer L, Hansen F, Thomsen MCF, Knudsen JD, Hansen DS, Wang M, et al. WGS-based surveillance of third-generation cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from bloodstream infections in Denmark. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2017;72:1922–9. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx092>.
- [161] Ghosh H, Dojjad S, Falgenhauer L, Fritzenwanker M, Imirzalioglu C, Chakraborty T. blaCTX-M-27–Encoding *Escherichia coli* Sequence Type 131 Lineage C1-M27 Clone in Clinical Isolates, Germany. *Emerg Infect Dis* 2017;23:1754–6. <https://doi.org/10.3201/eid2310.170938>.