

Análisis genómico y filogenético de cepas de *Neisseria meningitidis* y *Escherichia coli* productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) aisladas de muestras de cribados de ITS

Albert Moreno Mingorance
Bioinformática y Bioestadística

Paloma María Pizarro Tobías
Juan José González López

24/12/2021



Esta obra está sujeta a una licencia de
Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada
[3.0 España de Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es/)

FICHA DEL TRABAJO FINAL

Título del trabajo:	Análisis genómico y filogenético de cepas de <i>Neisseria meningitidis</i> y <i>Escherichia coli</i> productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) aisladas de muestras de cribados de ITS
Nombre del autor:	<i>Albert Moreno Mingorance</i>
Nombre de la consultora:	<i>Paloma María Pizarro Tobías</i>
Nombre del tutor externo:	<i>Juan José González López</i>
Fecha de entrega (mm/aaaa):	11/2021
Titulación:	<i>Bioinformática y Bioestadística</i>
Área del Trabajo Final:	4
Idioma del trabajo:	Castellano
Número de créditos:	15
Palabras clave	<i>Escherichia coli</i> , BLEE, <i>Neisseria meningitidis</i> , HSH
<p>Resumen del Trabajo (máximo 250 palabras): <i>Con la finalidad, contexto de aplicación, metodología, resultados y conclusiones del trabajo.</i></p>	
<p>Introducción: Entre los factores asociados a la adquisición de enterobacterias productoras de betalactamasa de espectro extendido (BLEE) y meningococo en países de nuestro entorno se encuentran la práctica de determinadas conductas sexuales. Para determinar si existen linajes propios transmitidos por vía sexual, se estudiaron mediante WGS aislados de <i>N. meningitidis</i> y <i>E. coli</i> provenientes de muestras de ITS, para identificar el serogrupo, el resistoma, el contenido plasmídico, la epidemiología genómica y la filogenia.</p> <p>Resultados: La mayor parte de los aislados de meningococo obtenidos presentaban mutaciones en el <i>cassette</i> capsular o el locus nulo. Entre los aislados capsulados el serogrupo predominante fue el B. La diversidad genética fue elevada entre los aislados, sin el predominio de ningún linaje. Por lo que respecta a los <i>E. coli</i> productores de BLEE, el filogrupo B2 fue el mayoritario. Los secuenciotipos más frecuentes fueron el ST14 y el ST131. Por lo que respecta a la BLEE más detectada fue el CTX-M-15, aunque cabe destacar la alta frecuencia de CTX-M-27 y SHV-12.</p> <p>Conclusiones: Se ha descartado la diseminación de linajes específicos de meningococo por vía sexual en nuestro medio, aunque cabe destacar la detección de linajes</p>	

hipervirulentos considerados de alto riesgo epidemiológico, como son el CC11, el CC213 y el CC32. Los aislados de *E. coli* pertenecían mayoritariamente al filogrupo B2, responsable principalmente de infecciones extraintestinales. La distancia genética entre los aislados de los ST mayoritarios (ST14 y ST131) podría deberse a una reciente transmisión, por lo que posiblemente haya transmisión sexual de este microorganismo.

Abstract (in English, 250 words or less):

Introduction: The sexual transmission is one of the acquisition routes of extended spectrum β -lactamase (ESBL) producing enterobacteria or meningococci in our area. The aim of this study is to determine the existence of particular lineages transmitted by sexual contact of *N. meningitidis* and ESBL-producing *E. coli*. To do so, isolates of this species from sexual transmitted infections screening were whole genome sequenced to identify their serogroup, resistome, plasmidome, genomic epidemiology and phylogeny.

Results: Among the capsulated meningococci the most frequent was the B serogroup, yet most of the obtained isolated presented mutations on the capsule cassette or the capsule null locus. There was not a predominating lineage due to a high genetic diversity between the isolates. Regarding the *E. coli* isolates, the B2 phylo-group was the most detected. The sequence-types most frequently obtained were the ST14 and ST131. Concerning the ESBL analyzed, CTX-M-15 was the most frequent, although CTX-M-27 and SHV-12 presented a high prevalence.

Conclusions: The expansion of specific meningococci lineages by sexual route has been discarded in our area. Nevertheless, it is worth to point the detection of high-risk and hypervirulent clones, the CC11, CC213 and CC32. The *E. coli* isolates were mainly from the B2 phylo-group, the most related with extra-intestinal infection. The genetic distance detected in the most frequent sequence-types (ST14 and ST131) may be due to a recent transmission, which would confirm the sexual transmission of this organism.

Índice

1	Resumen	1
2	Introducción	2
2.1	Contexto y justificación del Trabajo	2
2.1.1	Temática escogida:	2
2.1.2	Problemática a resolver:	5
2.2	Objetivos del Trabajo	5
2.3	Enfoque y método seguido	6
2.4	Planificación del Trabajo	7
2.4.1	Tareas	7
2.4.2	Cronograma	7
2.4.3	Hitos	7
3	Resultados y Discusión.....	7
3.1	Resultados <i>Nesseria meningitidis</i>	7
3.1.1	Tipado capsular	8
3.1.2	MLST	9
3.1.3	Reactivad vacunal	9
3.1.4	Relación genética entre aislados	9
3.2	Discusión <i>Nesseria meningitidis</i>	12
3.3	Resultados <i>Escherichia coli</i>	14
3.3.1	Filogrupo, MLST y tipado.....	14
3.3.2	Genes de resistencia antimicrobianos	14
3.3.3	Genes de virulencia	15
3.3.4	Plásmidos.....	15
3.3.5	Relación genética entre aislados	16
3.4	Discusión <i>Escherichia coli</i>	19
4	Conclusiones	20
4.1	Líneas de futuro	21
4.2	Seguimiento de la planificación	21
5	Glosario	22
6	Bibliografía	22

Lista de figuras

- Figura 1:** Cronograma de trabajo. 7
- Figura 2.** **A:** Proporción del estado de la capsula en el grupo de aislados de estudio. **B:** Serogrupo de aquellos aislados que presentan el cassette capsular intarcto. **C:** Serogrupo de aquellos aislados que presentan el cassette capsular mutado. **NG:** No agrupable. 8
- Figura 3:** Análisis filogenético de los aislados de *N. meningitidis*. Árbol de maximum likelihood de los 50 aislados recogidos en este estudio con el genoma NZ_LR134526 como referencia.. El género del portador asintomático, como características del aislados se pueden observar a la derecha de la filogenia 10
- Figura 4:** Minimum spannig tree realizado con el cgMLST de PubMLST y visualizado con GrapeTree de los aislados de hombres del estudio y los aislados del estudio de HSH realizado por Neri et al, 2021. En el círculo se representa el país de origen de la muestra. Los colores representan los serogrupos capsulares predichos, sin tener en cuenta las posibles mutaciones. La distancia entre los aislados se representa de forma logarítmica..... 11
- Figura 5:** Minimum spannig tree realizado con el cgMLST de PubMLST y visualizado con GrapeTree GrapeTree de los aislados de hombres del estudio y los aislados del estudio de HSH realizado por Neri et al, 2021. En el círculo se representa el país de origen de la muestra **A:** coloreado por ST. **B:** coloreado por CC. La distancia entre los aislados se representa de forma logarítmica..... 12
- Figura 6:** Minimum spannig tree realizado con el wgMLST de Enterobase y visualizado con GrapeTree de los aislados del estudio. Se encuentra coloreado por MLST. La distancia entre los aislados se representa de forma logarítmica. 16
- Figura 7:** Análisis filogenético de los aislados de *E. coli*. Árbol de maximum likelihood de los 24 aislados recogidos en este estudio con el genoma NZ_CP048010 como referencia. El género del portador asintomático, como características de los aislados se pueden observar a la derecha de la filogenia. 17
- Figura 8:** Minimum spannig tree realizado con el wgMLST de Enterobase y visualizado con GrapeTree de los aislados del HC50 69350. Se encuentra coloreado por país de origen de la muestra. La distancia entre los aislados se representa de forma logarítmica..... 18
- Figura 9:** Minimum spannig tree realizado con el wgMLST de Enterobase y visualizado con GrapeTree GrapeTree de los aislados del HC20 7 seleccionados por proximidad a los genomas de estudio. Se encuentra coloreado por país de origen de la muestra. La distancia entre los aislados se representa de forma logarítmica. 18

1 Resumen

Antecedentes: Entre los factores asociados a la adquisición de enterobacterias productoras de β -lactamasa de espectro extendido (BLEE) y meningococo en países de nuestro entorno se encuentra la práctica de determinadas conductas sexuales. Así, se ha documentado una prevalencia mayor de estos microorganismos entre hombres que mantienen relaciones sexuales con otros hombres (HSH). En el mismo sentido, por ejemplo, se ha documentado un aumento de las shigelosis producidas por cepas resistentes a β -lactámicos y brotes de infección de meningococica invasiva.

Hipótesis: Entre la población HSH existen linajes propios transmitidos por vía sexual diferentes a los observados en el ámbito hospitalario para *N. meningitidis* y *E. coli* productor de BLEE. Además, algunas enterobacterias comensales son reservorio de plásmidos como el pKSR100, importante en la diseminación de *Shigella* entre el colectivo HSH.

Objetivo: I) Determinar, mediante WGS, las características microbiológicas de cepas de *E. coli* BLEE y *N. meningitidis* (serogrupo, mecanismos de resistencia a antimicrobianos, epidemiología genómica, filogenia y la relación con clones previamente descritos en nuestro entorno) y II) determinar la presencia del plásmido pKSR100 en la microbiota intestinal de HSH.

Métodos: Se estudiaron aislados de *N. meningitidis* y *E. coli* provenientes de muestras faríngeas y rectales respectivamente obtenidas en el servicio de Drassanes Expres y disponibles en la colección del Servicio de Microbiología del Hospital Vall d'Hebron. Se secuenciaron los genomas completos de los aislados para identificar el serogrupo, el resistoma, el contenido plasmídico, la epidemiología genómica y la filogenia.

Resultados: La mayor parte de los aislados de meningococo obtenidos presentaban mutaciones en el *cassette* capsular o el locus nulo. Entre los aislados capsulados el serogrupo predominante fue el B. La diversidad genética fue elevada entre los aislados, sin el predominio de ningún linaje. Por lo que respecta a *E. coli*, el filogrupo B2 fue el mayoritario. Los secuenciotipos más frecuentes fueron el ST14 y el ST131. Por lo que respecta a la BLEE más detectada fue el CTX-M-15, aunque cabe destacar la alta frecuencia de CTX-M-27 y SHV-12.

Conclusiones: Se ha descartado la diseminación de linajes específicos de meningococo por vía sexual en nuestro medio, aunque cabe destacar la detección de linajes hipervirulentos considerados de alto riesgo epidemiológico, como son el CC11, el C213 y CC32. Los aislados de *E. coli* productores de BLEE pertenecían mayoritariamente al filogrupo B2, responsable principalmente de infecciones extraintestinales. La distancia genética entre los aislados de los ST mayoritarios podría deberse a una reciente transmisión, por lo que es posible que haya transmisión sexual de este microorganismo.

2 Introducción

2.1 Contexto y justificación del Trabajo

2.1.1 **Temática escogida:**

La emergencia y diseminación de bacterias multirresistentes (BMR) con capacidad de actuar como reservorio o de producir enfermedad en humanos es un grave problema global que se ha ido incrementando en las últimas décadas. Aunque no se realiza una vigilancia internacional sistemática, en un informe del 2019 el Grupo de Coordinación Interinstitucional de las Naciones Unidas sobre Resistencia a los Antimicrobianos (IACG, por sus siglas en inglés) alerta que las BMR podrían causar 10 millones de defunciones anuales en 2050. Además, hay que sumarle la repercusión en términos de morbilidad, y también, a nivel hospitalario, en el consumo de recursos derivados de su diagnóstico y tratamiento (1–5).

Recientemente ha tomado relevancia la transmisión por vía sexual de algunas bacterias como es el caso de *Shigella* y *Neisseria meningitidis* debido entre otras causas al incremento de la resistencia a antimicrobianos, al incremento de casos y brotes entre HSH (6–9).

Las enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) residen principalmente en el tracto gastrointestinal y son resistentes a cefalosporinas de tercera generación. Estos microorganismos pueden transmitirse a través del contacto fecal-oral directo o indirecto, y algunos pueden ser altamente transmisibles (10). Las evidencias indican que se está produciendo un incremento importante de infecciones por algunas enterobacterias, como es el caso de *Shigella*, asociadas a prácticas sexuales y con resistencia a un gran número de antibióticos. Los determinantes de resistencia que codifican se encuentran localizados mayoritariamente en un mismo plásmido conjugable ampliamente descrito el pKSR100 (7,8,11). Otra enterobacteria con una posible transmisión sexual es *Escherichia coli*. Recientemente, van Bilsen *et al.*, 2021 ha reportado una prevalencia mayor de enterobacterias BLEE, principalmente de *E. coli*, en población HSH respecto a la población general (12,13).

Escherichia coli patogénico extraintestinal (ExPEC) es un patotipo dentro de *E. coli* que pueden causar infección urinaria, bacteriemia, infección de próstata y otras localizaciones no intestinales, causando un número importante de infecciones tanto asociadas a la asistencia sanitaria como de adquisición comunitaria. El método más común para la identificación de los linajes en *E. coli* es el *Multilocus sequence typing* (MLST), este consiste en el tipado por secuenciación de 7 genes conservados de la especie que permite su diferenciación por la combinación de alelos. La mayoría de las

infecciones están causadas por un pequeño número de linajes, siendo el más prevalente el ST131 (14).

El método de Clermont de phylo-typing es otro método de clasificación más general que consiste en una PCR para asignar filogrupos de *E. coli*. En la actualidad es posible obtenerlo mediante la WGS. Debido a los factores de virulencia adquiridos codificados en plásmidos o en islas de patogenicidad, los filogrupos principalmente asociados a ExPEC son el B2 y el D(15,16).

Muchas veces ExPEC se encuentra asociado a resistencias a varias familias de antibióticos entre ellos, los β -lactámicos debido a la producción de BLEE. Las BLEE son enzimas que pueden hidrolizar oxymino- β -lactámicos como cefotaxima o ceftazidima (cefalosporinas de tercera generación) y son inhibidas por ácido clavulánico. Las familias más detectadas son TEM, SHV y CTX-M. Esta última es el tipo de BLEE más detectada en la actualidad debido al dominio global de CTX-M-15, muy asociado al éxito del linaje ST131. Otras CTX-M emergentes son la CTX-M-14 y la CTX-M-27 (17,18).

Las fluoroquinolonas es otra familia de antibióticos utilizada ampliamente en humanos y animales. Generalmente la resistencia se produce a consecuencia de mutaciones puntuales en las dianas del fármaco, concretamente en la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR), como en la DNA girasa (*gyrA*) y la topoisomerasa IV (*parC*). También hay otros genes transmitidos por plásmidos como las proteínas Qnr-like que previene la unión de la quinolona al DNA o la AAC(6')-Ib-cr acetiltransferasa que modifica algunas fluoroquinolonas (19).

Los macrólidos no se han utilizado tradicionalmente para tratar infecciones producidas por enterobacterias debido a la pobre penetración a través de la membrana bacteriana. Sin embargo, la azitromicina es una excepción y se utiliza para tratar entre otras infecciones diarreicas o infecciones de transmisión sexual (ITS). Aunque existen diversos mecanismos de resistencia como bombas de expulsión o mutaciones cromosómicas en la subunidad ribosomal del 23S, el principal mecanismo descrito en enterobacterias es la presencia de enzimas inactivantes codificado por el gen *mphA* (20).

Las sulfamidas y el trimetoprim son agentes bacteriostáticos que en combinación (cotrimoxazol) resulta en una acción sinérgica bactericida en aquellos organismos susceptibles. La resistencia a estos antimicrobianos se debe principalmente a la adquisición y expresión de genes del tipo *sul* que insensibilizan contra sulfamidas y *dfr* para trimetoprim (19).

Muchos de estos determinantes de resistencia son compartidos entre bacterias mediante plásmidos. Los plásmidos son unidades de DNA extracromosomal con capacidad de replicarse a sí mismos y de transferirse de forma horizontal. Estos pueden clasificarse por los grupos de incompatibilidad (*Inc typing*) que caracteriza la capacidad

de los plásmidos de coexistir en la misma bacteria, o dicho de otra forma, dos plásmidos serán del mismo grupo de incompatibilidad si no son capaces de coexistir sin una presión selectiva. Esto se debe a que dichos plásmidos comparten el mismo mecanismo de replicación y el tipo de replicón determina el *Inc group* (21).

Neisseria meningitidis es un comensal habitual de la superficie mucosa de la orofaringe humana, observándose con mayor frecuencia entre la población adolescente y adulta joven. Esta población es mayoritariamente portadora asintomática del microorganismo y puede transmitirlo a través las secreciones respiratorias o la saliva a individuos susceptibles durante un contacto estrecho o contacto oro-genital. Es el responsable de la enfermedad meningocócica invasiva (EMI), así como de infecciones uretrales y rectales. Estas últimas son indistinguibles de una infección por *Neisseria gonorrhoeae* (22). Los serogrupos capsulares A, B, C, W, X y Y son los responsables de más del 90% de los casos de EMI observados a nivel mundial (6,23–25). Esta enfermedad se puede prevenir mediante el uso de dos tipos de vacunas actualmente disponibles. El primer tipo de vacunas está compuesto por elementos de la superficie capsular de la bacteria, y protege de la infección por todas las bacterias pertenecientes a los tipos capsular o serogrupos A, C, Y y W. Este tipo de vacunas no es posible usarla frente a meningococo B, debido a su composición capsular. Por este motivo, se han desarrollado recientemente vacunas que están compuestas por elementos subcapsulares. La primera vacuna recombinante de proteínas de membrana frente al serogrupo B fue Bexsero®, MenB-4C, la cual es una vacuna monovalente multicomponente que contiene cuatro antígenos principales de la membrana externa. Posteriormente se autorizó el uso de Trumenba®, MenB-FHbp la cual es una vacuna monovalente multicomponente que contiene dos variantes del mismo antígeno de membrana externa. Ambas vacunas no están incluidas en el calendario vacunal sistemático español(26,27).

Al igual que en *E. coli*, para *N. meningitidis* también existe un esquema de MLST para clasificar los aislados. Para designar diversos ST que tienen una relación genética próxima, se utilizan los complejos clonales (CC). En estudios de portadores en la población general en diversos países europeos se ha detectado principalmente el CC23, CC41/44, CC198 y el CC53 (25,28,29)

Desde principios de los años dos mil, se ha incrementado el número de brotes de EMI entre HSH en diversas partes del mundo como Estados Unidos de América, Canadá, Alemania, Francia, Italia y Australia. La mayoría de estos brotes son causados por meningococo del serogrupo C pertenecientes al CC11. Además algunas cepas de este mismo CC han adquirido factores de patogenicidad de gonococo que les facilita la colonización uretral, hecho que ha producido la detección de brotes de infección uretral producidos por este complejo (22).

2.1.2 Problemática a resolver:

Como se ha comentado anteriormente el aumento de la resistencia a antibióticos es un problema muy grave al que nos enfrentamos actualmente. La emergencia de linajes multiresistentes de *Shigella* transmitidas por vía sexual en nuestro entorno complica seriamente su tratamiento. En estudios sobre el plásmido pKSR100, se ha observado que se han sucedido múltiples eventos de transmisión horizontal (11), hecho que cabría esperar que pudiera también producirse entre *Shigella* y *E. coli* debido a que comparten el mismo nicho ecológico y a la proximidad genética entre ellos (13). Por esta misma razón, podría esperarse que *E. coli* se transmitiera de forma similar y haya linajes multiresistentes asociados a HSH. Es por ello que se pretende determinar y caracterizar la existencia de linajes asociados a transmisión por vía sexual y observar la presencia del plásmido pKSR100, en una colección de genomas de *E. coli* BLEE aislados de muestras rectales procedentes de cribado de infección de transmisión sexual (ITS), obtenidos por secuenciación de genomas completos (WGS).

De un modo similar, en las últimas décadas se han reportado brotes de *Neisseria meningitidis* en HSH en Europa y USA asociados a un linaje hipervirulento en concreto que ha adquirido genes de *Neisseria gonorrhoeae* por transmisión horizontal (22,24,30). Es por ello que se pretende caracterizar los genomas procedentes de una colección de cepas de *Neisseria meningitidis* aislados de muestras faríngeas procedentes de cribado de ITS y determinar si existe una diseminación de un clon mayoritario, la existencia de posibles brotes y si pertenecen a linajes hipervirulentos descritos anteriormente.

2.2 Objetivos del Trabajo

Caracterizar, mediante WGS, aislados de *E. coli* productor de BLEE y *N. meningitidis* obtenidos de muestras rectales y faríngeas procedentes de cribado de ITS, con el fin de determinar la posible existencia de linajes predominantes entre población HSH.

Para ello se llevarán a cabo los siguientes objetivos específicos:

- Conocer las características microbiológicas de los aislados mediante una búsqueda de determinantes relacionados con la resistencia a antibióticos y virulencia, un serotipado *in silico* y la predicción de la reactividad vacunal en *N. meningitidis*.
- Determinar la distancia genética entre los aislados obtenidos mediante el análisis de polimorfismos y estudios filogenéticos, así como mediante el uso de genomas procedentes de otras bacterias depositados en bases de datos públicas con el fin de realizar una comparación genómica con linajes descritos anteriormente.
 - Identificar la presencia del plásmido pKSR100 en los aislados de *E. coli* mediante el mapeado de las lecturas con un plásmido de referencia.

2.3 Enfoque y método seguido

Se estudiaron aislados procedentes de muestras de cribados de ITS recogidos durante mayo de 2021 en el servicio de Drassanes Expres y disponibles en la colección del Servicio de Microbiología del Hospital Vall d'Hebron. Concretamente se incluyeron 50 aislados de *N. meningitidis* obtenidos de muestras orofaríngeas, de los cuales 37 se obtuvieron de HSH y 15 de mujeres que habían tenido relaciones sexuales con hombres (MSH); y por lo que se refiere a *E. coli*, se obtuvieron 24 aislados procedentes de muestras rectales, 18 de los cuales en HSH y 3 en MSH (solo se toma muestras rectales de aquellas mujeres que argumentaron haber mantenido sexo anal; 45 vs 120 HSH).

Los datos crudos obtenidos por WGS se filtraron mediante la herramienta trimmomatic (31), con el fin de depurar y eliminar aquellas secuencias que tengan una calidad baja. Las lecturas filtradas se ensamblaron de *novo* con el pipeline *Unicycler* (32). Este pipeline utiliza el programa *Spades* para el ensamblado y añade pasos de depuración del *assembly* con *Pilon*. La clasificación de MLST se realizó con el paquete *mlst* (33). La herramienta de búsqueda de determinantes de resistencia y virulencia dependió del microorganismo. En el caso de *E. coli* se utilizó *Resistance Gene Identifier* (RGI) (34) para la búsqueda de los genes de resistencia, la base de datos *Virulence factor database* (VFDB) (35) y se detectó los grupos de incompatibilidad plasmídicos mediante *PlasmidFinder* (36). Además, las secuencias se colgaron en la base de datos *Enterobase* (37). Para *N. meningitidis*, ambos determinantes se analizaron mediante la base de datos PubMLST (38). Esta base de datos proporciona el índice MenDeVAR (*Meningococcal Deduced Vaccine Antígeno Reactivity*) (39), índice que a partir de la secuencia de los antígenos vacunales proporciona información basada en la evidencia sobre la presencia y posible reactividad cruzada de las diferentes variantes antigénicas incluidas en las vacunas meningocócicas recombinante de proteínas de membrana frente al serogrupo B.

El análisis filogenético de los aislados se llevó a cabo de la siguiente manera. En primer lugar, las lecturas se mapearon contra un genoma de referencia NZ_CP048010 para el caso de *E. coli* y NZ_LR134526 para el caso de *N. meningitidis* y posteriormente se buscaron los polimorfismos detectados. Este proceso se llevó a cabo mediante el *pipeline Snippy* (40). Posteriormente se utilizó *Gubbins* (41) para detectar y eliminar aquellas posiciones que fueron susceptibles de ser consecuencia de un evento de recombinación. Finalmente, se realizó un análisis de *maximum likelihood* mediante *IQ-tree* (42) para obtener un árbol filogenético.

El plásmido pKSR100 se identificó mediante el mapeado de las lecturas filtradas de los aislados de *E. coli* utilizando el plásmido como referencia (NZ_LN624486) con *Snippy*. Aquellos que presentaron una cobertura mayor al 90% se consideró que presentan el plásmido.

2.4 Planificación del Trabajo

2.4.1 Tareas

- Filtrar de los datos crudos para eliminar aquellos de baja calidad.
- Ensamblar los datos filtrados para obtener un ensamblado *de novo*.
- Genotipar y caracterizar los mecanismos de resistencia y virulencia.
- Identificar la presencia del plásmido pKSR100.
- Buscar cepas en la bibliografía y bases de datos que puedan tener una relación genética con las del estudio.
- Buscar polimorfismos entre las cepas del estudio y aquellas detectadas en la bibliografía.
- Visualizar el árbol y añadir la metadata de los determinantes estudiados.
- Comparar los resultados obtenidos con aquello descrito previamente en la bibliografía.
- Redactar de la memoria.

2.4.2 Cronograma

A continuación, se adjunta la propuesta de calendario previsto.

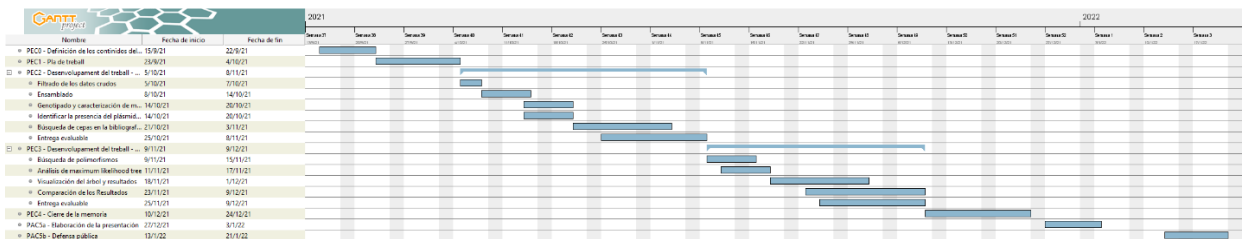


Figura 1: Cronograma de trabajo.

2.4.3 Hitos

- Detectar la presencia de linajes de *N. meningitidis* vinculados con los brotes detectados entre HSH.
- Encontrar un linaje mayoritario de *E. coli* entre las muestras estudiadas y que no esté relacionado con los linajes hospitalarios.
- Identificar el plásmido pKSR100 entre los aislados de *E. coli*.

3 Resultados y Discusión

3.1 Resultados *Nesseria meningitidis*

Se obtuvo el ensamblado de 51 aislados de *N. meningitidis* mediante el pipeline *Unicycler* y se depositaron en la base de datos de *Neisseria* en PubMLST para su caracterización. Después de comprobar los resultados se observó que uno de los aislados era *Neisseria gonorrhoeae*, por lo que este se eliminó de los siguientes análisis.

3.1.1 Tipado capsular

La capsula es un factor de virulencia muy importante relacionado con la capacidad de evadir el sistema inmune. De entre los aislados estudiados, un 32% presentaron el *cassette* capsular completo (Fig. 2A) y estos mayoritariamente pertenecían al serogrupo B (Fig. 2B). En cuanto a los otros aislados, el 18% presentaban la ausencia del *cassette* capsular presentando el locus de capsula nula (*cnl*: capsule null locus) y el 50% presentaban al menos una mutación en algún gen del *cassette* provocando algún cambio en la pauta de lectura. Se desconoce que implicación pueden tener estas mutaciones respecto a la producción de la cápsula, por lo que podrían producir una especie de pseudocapsula o no presentar (Fig. 2A). De entre estos el 36% poseían una pseudocapsula tipo B y el 36% poseían una tipo Z (Fig. 2C).

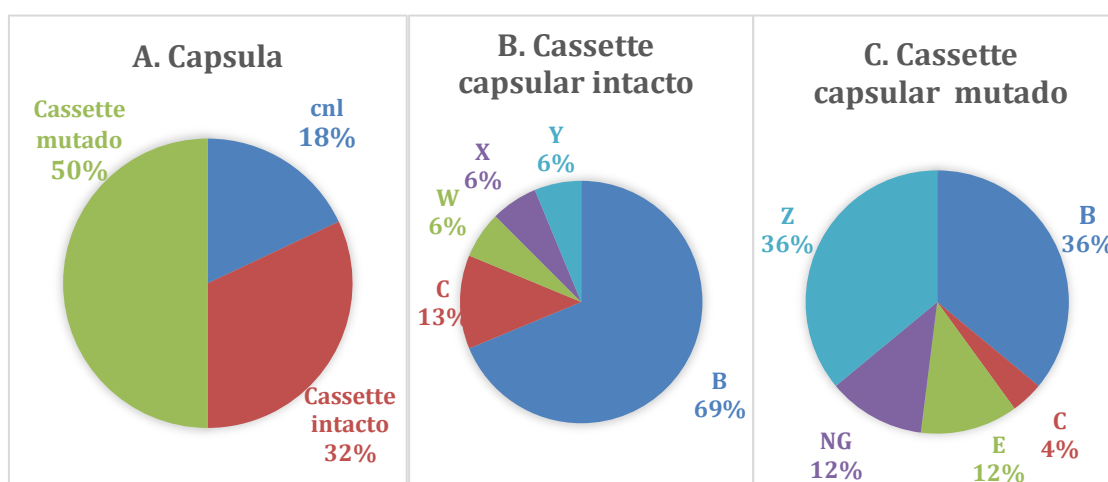


Figura 2. A: Proporción del estado de la capsula en el grupo de aislados de estudio. B: Serogrupo de aquellos aislados que presentan el cassette capsular intacto. C: Serogrupo de aquellos aislados que presentan el cassette capsular mutado. NG: No agrupable.

En cuanto al estado capsular por género, en mujeres el 42% fueron *cnl*, el 35% tenían el *cassette* mutado y el 21% intacto. Por el contrario, en hombres el estado mayoritario fue el de *cassette* mutado (56%) seguido del porcentaje de intacto fue de 36% y finalmente el de *cnl*, porcentaje mucho menor, representó el 8%. La frecuencia de los tipos capsulares para *cassette* mutado e intacto fue muy similar, excepto que serogrupo E solo fue detectado en hombres. Sin embargo, la frecuencia fue baja, por lo que es posible que no se haya detectado en mujeres debido a que el número de muestras fue menor.

3.1.2 MLST

Los aislados de la colección pertenecen a secuenciotipos (ST) muy variados, ninguno superando más de dos aislados. Aquellos que encontramos con al menos dos aislados son: ST11, ST213, ST3882, ST6119, ST10866 y ST12943. Además, para 6 de los aislados no se obtuvo un ST por falta de asignar número a algún gen.

Se observó que la mayor parte de los ST no pertenecían a un complejo clonal definido (54%). Por lo que respecta a los designados, solo dos agrupaban hasta 3 aislados, el CC32 y el CC41/44.

3.1.3 Reactivad vacunal

Mediante el índice MenDeVAR se predijo la reactividad vacunal de los aislados de estudio. Respecto a la vacuna MenB-4C para la mayor parte de los aislados (78%), no se disponen de suficientes datos empíricos como para establecer la reactividad de los alelos que presentan estos aislados, con lo que el índice MenDeVAR no puede predecir su reactividad. En cuanto al resto, el 12% presentó una coincidencia exacta, esto significa que las cepas presentaban alguno de las variantes antigénicas presentes en la vacuna, el 6% presentaron reactividad cruzada, indicando que los aislados poseen algún antígeno con reactividad cruzada con los incluidos en la vacuna MenB-4C y el 4% no presentó reactividad.

Por otro lado, para la vacuna MenB-FHbp el 48% presentaron datos insuficientes, solo un 4% presentaron una coincidencia exacta de las variantes vacunales y el 48% presentó reactividad cruzada.

3.1.4 Relación genética entre aislados

3.1.4.1 Filogenia

El análisis de SNPs detectó 441 posiciones polimórficas una vez eliminadas aquellas posiciones susceptibles de formar parte de un evento de recombinación. En la Figura 3 se puede observar el *maximum likelihood tree* basado en los SNPs detectados. No se observó ningún linaje perteneciente solamente a hombres, exceptuando de algún pequeño clúster, como los aislados del serogrupo E y el formado por los aislados DE064, DE072 y DE054 o por el contrario el del CC41/44 formado por mujeres.

Por lo que respecta los serogrupos, podemos ver que el serogrupo E y Z forman clústers entre los aislados del mismo serogrupo, en cambio el serogrupo B, C, *cnl* y no agrupable (NG) se distribuyen por toda la filogenia.

Observando la disposición de los aislados en el árbol, podemos ver que los aislados del CC32 clusterizan con varios ST no determinados, por lo que seguramente aunque no esté asignado deberían pertenecer al complejo clonal. Algo similar se puede observar entre los aislados del serogrupo Z, muy cercanos filogenéticamente, pero de ST diferentes.

En cuanto a la reactividad vacunal, se puede observar como hay muchos datos insuficientes y los conocidos se distribuyen aleatoriamente entre los clústers a

excepción de la reactividad exacta contra MenB-4C en los aislados del ST12943, dos de los tres aislados del CC41/44 y los aislados del ST1572 y ST15990.

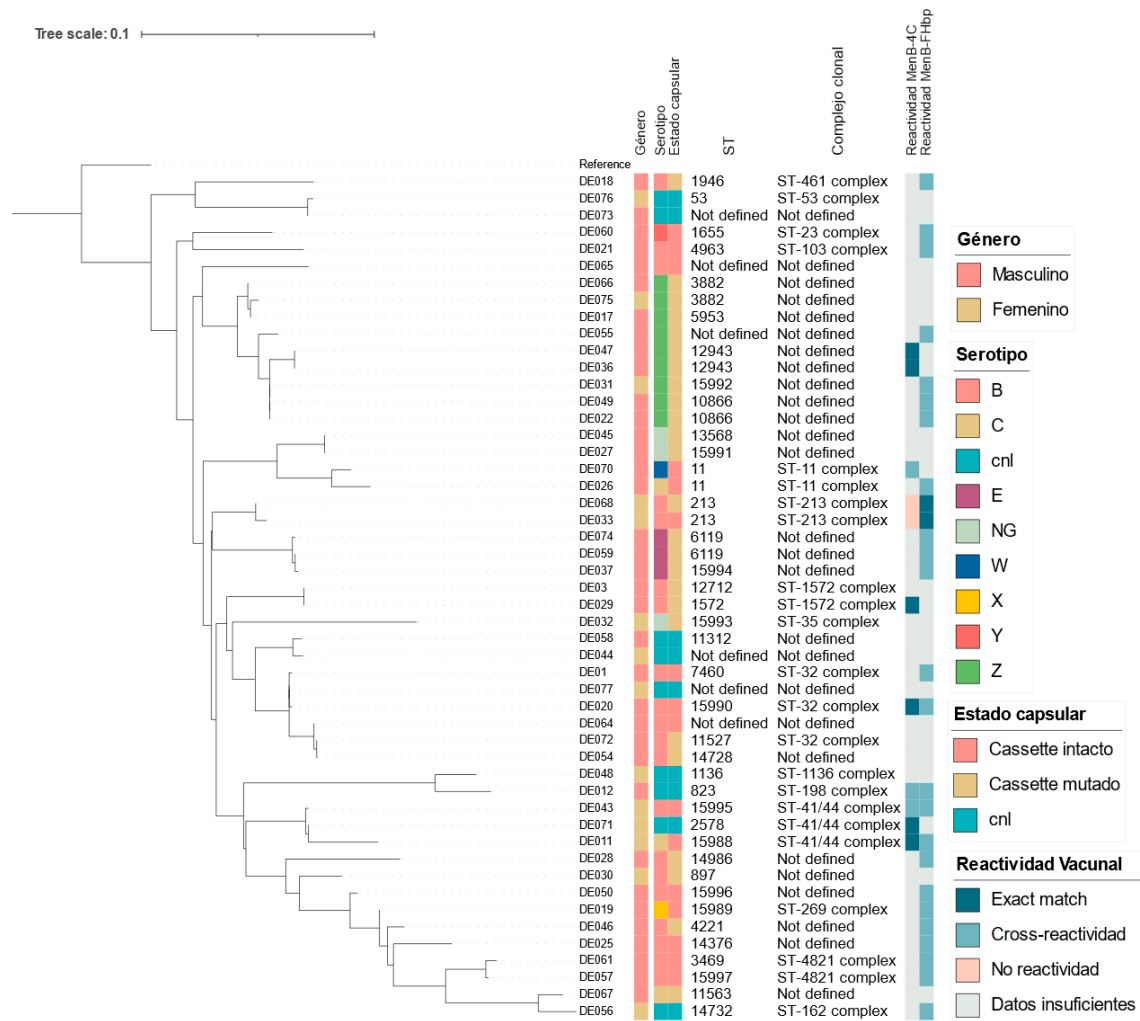


Figura 3: Análisis filogenético de los aislados de *N. meningitidis*. Árbol de maximum likelihood de los 50 aislados recogidos en este estudio con el genoma NZ_LR134526 como referencia. El género del portador asintomático, como características de los aislados se pueden observar a la derecha de la filogenia.

3.1.4.2 Comparación con otros aislados depositados.

Recientemente Neri et al 2021 publicó un estudio de portadores asintomáticos HSH en Roma (Italia). Se compararon los aislados de este estudio con los obtenidos de hombres. Para ello, se realizó un *minimum spanning tree* basado en la comparación de alelos de cgMLST de PubMLST de *Neisseria meningitidis*, el cual se puede observar en las Figuras 4, 5AB. En la Figura 4, se puede observar las redondas coloreadas por serogrupo. Del mismo modo que observábamos en la filogenia, los aislados del serogrupo B y *cnl* se encuentran repartidos por el árbol, en cambio los del serogrupo E y Z se encuentran juntos, tanto para los aislados de Barcelona como los italianos. También cabe destacar que se observa un clúster de aislados de serogrupo no agrupable (NG) formado por dos aislados españoles y uno italiano.

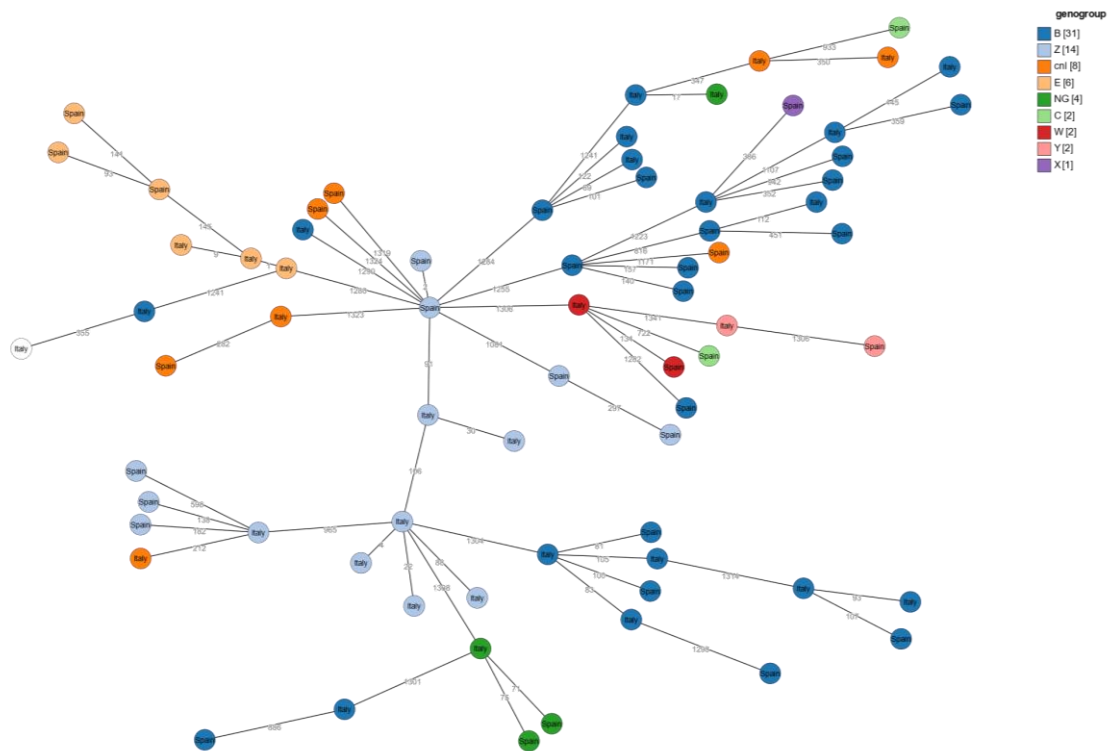


Figura 4: Minimum spanning tree realizado con el cgMLST de PubMLST y visualizado con GrapeTree de los aislados de hombres del estudio y los aislados del estudio de HSH realizado por Neri et al, 2021. En el círculo se representa el país de origen de la muestra. Los colores representan los serogrupos capsulares predichos, sin tener en cuenta las posibles mutaciones. La distancia entre los aislados se representa de forma logarítmica.

Por lo que respecta al ST, se puede observar en la Figura 5A como comparten ST diversos aislados de ambos países, como es el caso de ST11, ST10866, ST12943, ST1572, ST1946, ST12712, ST13568, ST3469, ST7460. En la Figura 5B se puede observar la imagen colorada por CC y cabe destacar que todos los CC con más de un aislado se encuentran en ambos países a excepción del CC162.

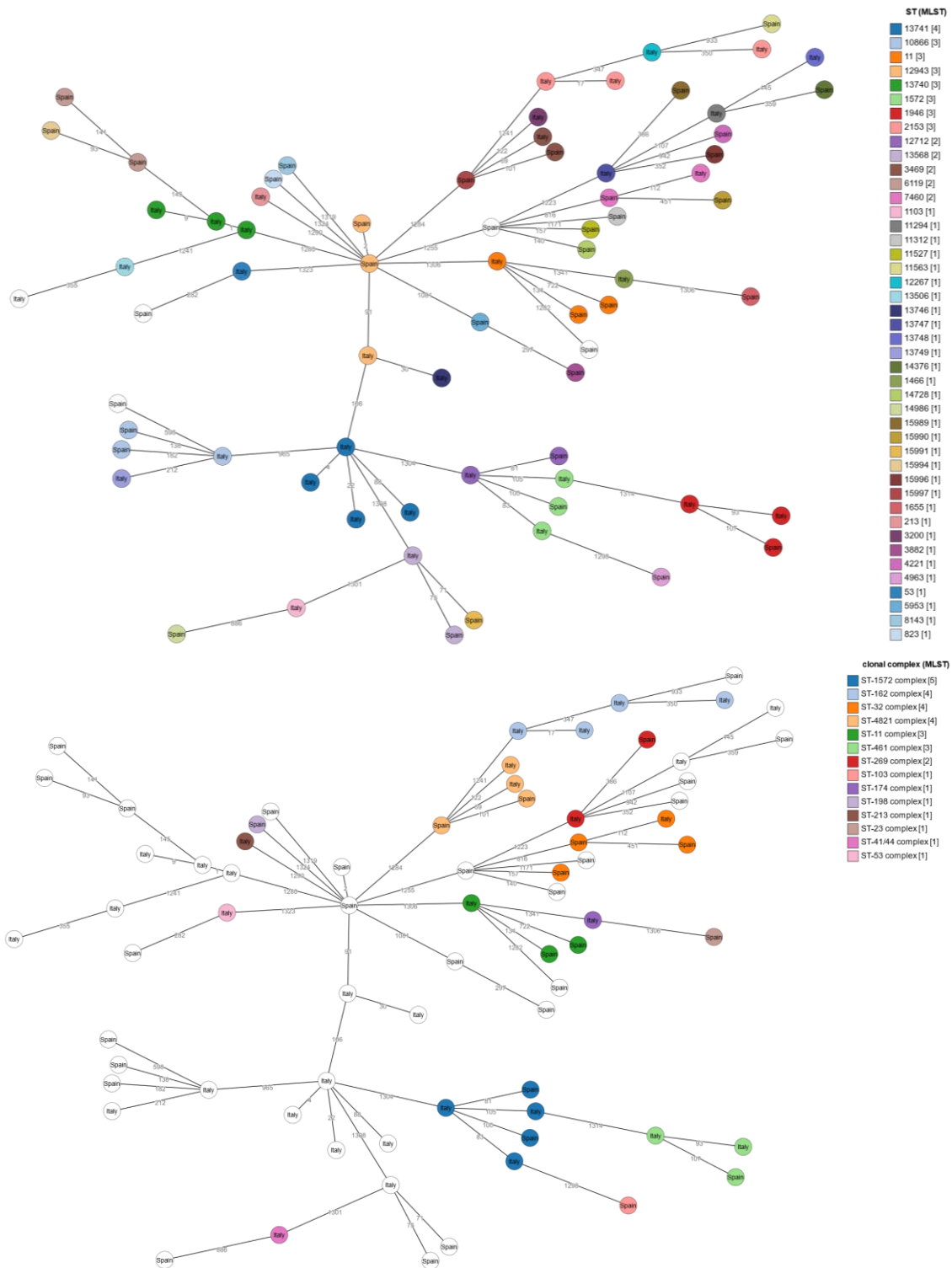


Figura 5: Minimum spanning tree realizado con el cgMLST de PubMLST y visualizado con GrapeTree GrapeTree de los aislados de hombres del estudio y los aislados del estudio de HSH realizado por Neri et al, 2021. En el círculo se representa el país de origen de la muestra A: coloreado por ST. B: coloreado por CC. La distancia entre los aislados se representa de forma logarítmica.

3.2 Discusión *Nisseria meningitidis*

En el actual trabajo se han caracterizado aislados de *N. meningitidis* procedentes de colonización orofaríngea de personas sometidas a un cribado de ITS. Aunque se han

detectado aislados de los principales linajes de esta especie, no se ha detectado uno mayoritario ya que la una diversidad genética entre ellos fue elevada.

En otros estudios de colonización realizados previamente en adolescentes, tanto en Italia como en Noruega, se detectó un predominio claro de los aislados *cnl* con un 47% y 40% respectivamente (29,43). En cambio, en Reino Unido con este genotipo solo detectaron el 16% (44) y un porcentaje muy similar detectaron en estudios de colonización en HSH en Nueva York (17%) y en Roma (16%) (24,45). En el caso de este trabajo el porcentaje de aislados *cnl* fue similar al de Reino Unido y los otros trabajos en HSH de un 18%. Sin embargo, si desglosamos la comparación por sexos, en el caso de las mujeres el porcentaje de *cnl* fue del 42%, más similar a lo observado en Italia y Noruega y por el contrario la frecuencia en HSH baja hasta un 8%.

Por lo que respecta a la expresión capsular, no todos reportan los datos. Aquellos expresados de forma más comparables a los obtenidos son los reportados en Nueva York. El 61% de los aislados neoyorkinos presentaron alguna mutación en el *cassette* capsular y el 22% presentó el *cassette* intacto. En comparación con el presente estudio, el porcentaje mutado es ligeramente inferior, ya que fue del 50%, y el de intacto fue superior con un 32%. Por lo que respecta a los serogrupos, en el caso de los mutados el que más detectaron fue el B con un 42% y el Z con un 36%, muy similar a lo observado. Por el contrario por lo que respecta al *cassette* intacto, prácticamente solo detectaron el serogrupo B (92%), que aunque también fue el serogrupo más frecuente en nuestro estudio el porcentaje obtenido fue inferior, un 69% (24).

En cuanto a los linajes detectados, tanto en el estudio italiano como en el noruego, los linajes mayoritarios fueron aquellos relacionados con el genotipo *cnl*, el CC198 y el CC1136 (29,43). En el caso del presente trabajo no se ha detectado ningún linaje predominante entre los *cnl*, pero si se ha detectado un aislado de cada uno de estos complejos clónales. Por lo que respecta al estudio neoyorquino, el CC mayoritario fue el CC4821 seguido del CC32 y el CC11(24). Dos aislados del CC4821 se detectaron en HSH en este estudio. Este CC está relacionado con la producción de EMI en Asia y a raíz de la detección en Nueva York, se determinó que un sublinaje de este CC podría estar transmitiéndose por vía sexual en Estados Unidos y Europa. Se han descrito diversas infecciones uretrales debido a este CC, una ellas en Barcelona (46).

Finalmente en el estudio italiano realizado en HSH, como se ha podido observar en la comparación genómica que se ha realizado, ningún CC fue muy mayoritario y varios de los ST fueron compartidos entre ambos estudios.

En España el principal serogrupo productor de EMI es el B. En los últimos años, se ha visto un aumento de la frecuencia del CC213, hasta convertirse en el CC más aislado entre aquellos del serogrupo B y considerarse de alto riesgo epidemiológico (47). De entre los aislados de este estudio, se aisló un aislado de este CC con la capsula completa y otro con una mutación. Además, observamos como varios aislados sin CC o ST designado clusterizan con aislados que pertenecen al CC32, que aunque no formen parte estrictamente porque no han sido designados por PubMLST, podrían ser considerados en un futuro. De ser así sería el CC más frecuente detectado en este trabajo, con 6 aislados (12%). Estos aislados fueron mayoritariamente B aunque

solamente la mitad mantenía el *cassette* capsular completo. El CC32 era el complejo clonal productor de EMI más prevalente en el periodo 2001-2007 en España, pero en los años siguientes se observó una disminución de la prevalencia, a costa del incremento de otros CC, como es el CC213(47). Así mismo, como se ha señalado anteriormente los aislados del serogrupo C del CC11 han sido reportado como uno de los principales causantes de EMI y se han descrito casos de brotes en HSH (22). En este estudio se ha detectado un aislado del CC11 del serogrupo C con el *cassette* capsular completo. Además se detectó un segundo aislado del CC11 pero del serogrupo W. En los últimos años se ha reportado un aumento de las EMI producidas por este serogrupo mayoritariamente debidas a este CC y se ha alertado en varios países europeos por su tendencia a la alza (48).

Por lo que respecta a la distancia genética detectada, a excepción de dos aislados del ST12943 que presentaron solamente 2 alelos de diferencia del cgMLST, el resto de cepas fueron distantes genéticamente por lo que habría que descartar un evento de transmisión reciente y también fueron distantes a las detectadas en Italia.

3.3 Resultados *Escherichia coli*

Se obtuvo el ensamblado de 24 aislados de *Escherichia coli* productores de BLEE mediante el *pipeline Unicycler*, 21 de HSH y 3 de mujeres. Además las lecturas se colgaron en la base de datos *Enterobase* para su caracterización.

3.3.1 Filogrupo, MLST y tipado.

El filogrupo mayoritariamente observado entre los aislados de este estudio fue el B2 (54%), seguido del A (17%), el D (13%), el E (8%) y el F y G (4%).

Por lo que respecta al MLST el 25% de los aislados pertenecían al ST14, el 16% al ST131 y el resto a otros ST. Destacar el ST1193, el cual pertenece al CC14. Los aislados de estos tres ST pertenecían a muestras de hombres. En cuanto al serogrupo capsular se encontró ligado al MLST. Los aislados del ST14 fueron O75H5 y los del ST131 O25H4.

Los ST detectados en mujeres fueron el ST219, ST2003 y el ST3877, los cuales pertenecían al filogrupo, A, E y D.

3.3.2 Genes de resistencia antimicrobianos

Se caracterizaron los genes de resistencia a antimicrobianos. La BLEE más detectada fue *bla*_{CTX-M-15} en el 33% de los aislados, seguida de *bla*_{SHV-12} en el 25%, *bla*_{CTX-M-27} en el 16% y otras minoritarias como *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-55}, y *bla*_{CTX-M-65}.

Por MLST, todos los aislados del ST14 eran portadores de *bla*_{SHV-12} y todos los del ST131 eran portadores de *bla*_{CTX-M-27}.

En cuanto a determinantes que confieren resistencias a fluoroquinolonas, encontramos genes plasmídicos y QRDR. El 75% de los aislados presentaron mutaciones en QRDR, el 45% una sustitución S83L en *gyrA* y el 29% una triple

mutación S83L, D87N en *gyrA* y S80L en *parC*. En cuanto a genes que confieren resistencia, el 25% presentaron el gen *qnrS1*.

Respecto a la resistencia a macrólidos, el 67% eran portadores del gen *mphA* y para co-trimoxazol el 79% era portador de al menos un gen del tipo *dfrA* y el 58% de al menos algún gen del tipo *sul*.

3.3.3 Genes de virulencia

3.3.3.1 Absorción de metales.

Entre los aislados estudiados se han detectados varios mecanismos de captación de hierro. El 83% de las cepas presentaron el mecanismo Chu – absorción del grupo Hemo el cual fue detectado en todos los filogrupos excepto en aquellos aislados del A. El mismo porcentaje presento transporte de hierro/manganeso libre. Todos los aislados del filogrupo B2 y D junto con un aislados del A, F, G presentaron sideróforos del tipo yersiniobactina, los cuales representaron el 79% de las cepas. Finalmente, en el 75% se detectó aerobactina.

3.3.3.2 Toxinas

Por lo que respecta a los genes de toxinas detectados, el 91% presentaron el gen de citolisina A (*hlyE/clyA*), el 62% presentaron el gen *senB* productor de la enterotoxina TieB y el 54% el gen de la Colicin-like Usp. Este último, solo fue detectado en los aislados del filogrupo B2.

3.3.3.3 fimH

Al igual que el serogrupo, el gen *fimH* se encontró muy ligado al ST y no se encontraron aislados de diferente ST con un mismo alelo de *fimH*. Cabe destacar que todos los aislados del ST14 presentaron el alelo *fimH27*. Por lo que respecta al ST131, tres de los 4 aislados presentaron el alelo *fimH99* y uno el alelo *fimH30*. Para tres aislados no se detectó.

3.3.4 Plásmidos

3.3.4.1 Grupos de incompatibilidad plasmídica

El *Inc group* mayoritariamente detectado entre los aislados fue el F, presente en el 92% de los aislados en alguna de sus variantes alélicas. 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*.

Entre los aislados de los ST mayoritarios presentaron los mismos alelos de pMLST del *IncF*. Los aislados del ST14 presentaron la forma F29:A-:B10, excepto un aislados que presento F10/29:A-:B10 y para ST131 fue F1:A2/6:B20.

3.3.4.2 pKSR100

El plásmido pKSR100 es muy prevalente entre los aislados de *Shigella* relacionadas con transmisión sexual, y por consiguiente se decidió realizar su detección en los aislados estudiados. Ninguna de las cepas de este estudio presentó más de un 90% de cobertura del plásmido pKSR100 usado de referencia. No obstante, el 45% presentó más del 80% de cobertura, por lo que es de esperar presenten un plásmido similar.

3.3.5 Relación genética entre aislados

3.3.5.1 wgMLST

Se realizó un *minimum spanning tree* basado en las diferencias de alelos del esquema de wgMLST instaurado en Enterobase basado en 25002 loci (37), este se puede observar en la Figura 6. En él se puede ver como la distancia genética entre los tres aislados del ST131 que compartían fimH es muy pequeña, 4 alelos de diferencia entre DE039 y DE063; y 11 entre DE008 y DE063. También es reducida la distancia entre los aislados del ST14, sobre todo entre DE041 y DE069 (12 alelos). El resto de aislados de otros ST se encuentran muy distantes.

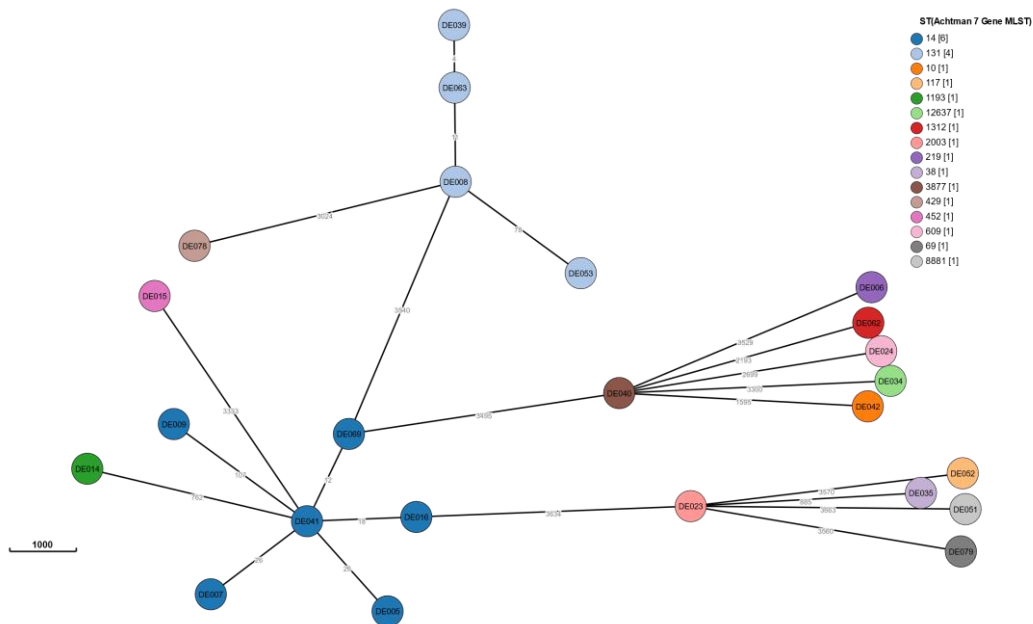


Figura 6: Minimum spanning tree realizado con el wgMLST de Enterobase y visualizado con GrapeTree de los aislados del estudio. Se encuentra coloreado por MLST. La distancia entre los aislados se representa de forma logarítmica.

3.3.5.2 Filogenia

El análisis de SNPs detectó 56541 posiciones polimórficas entre los aislados y la cepa de referencia una vez eliminadas aquellas posiciones en regiones recombinantes. En la filogenia de la Figura 7, basada en el alineamiento de los SNPs anteriormente nombrados, podemos ver como los aislados se agrupan por filogrupos y ST como cabe esperar.

En cuanto a los genes de resistencia representados, observamos que ST14 fue portador de *bla*_{SHV-12}, una mutación en la QRDR de *gyrA* (S83L), *mphA* y *dfrA1*. Por lo que respecta al otro ST mayoritario, el ST131 todos los aislados eran portadores de *bla*_{CTX-M-27}, la triple mutación en QRDR en *gyrA* (S83L y D87N) y *parC* (S80I), *mphA*, *dfrA17*, *sul1* y *sul2*.

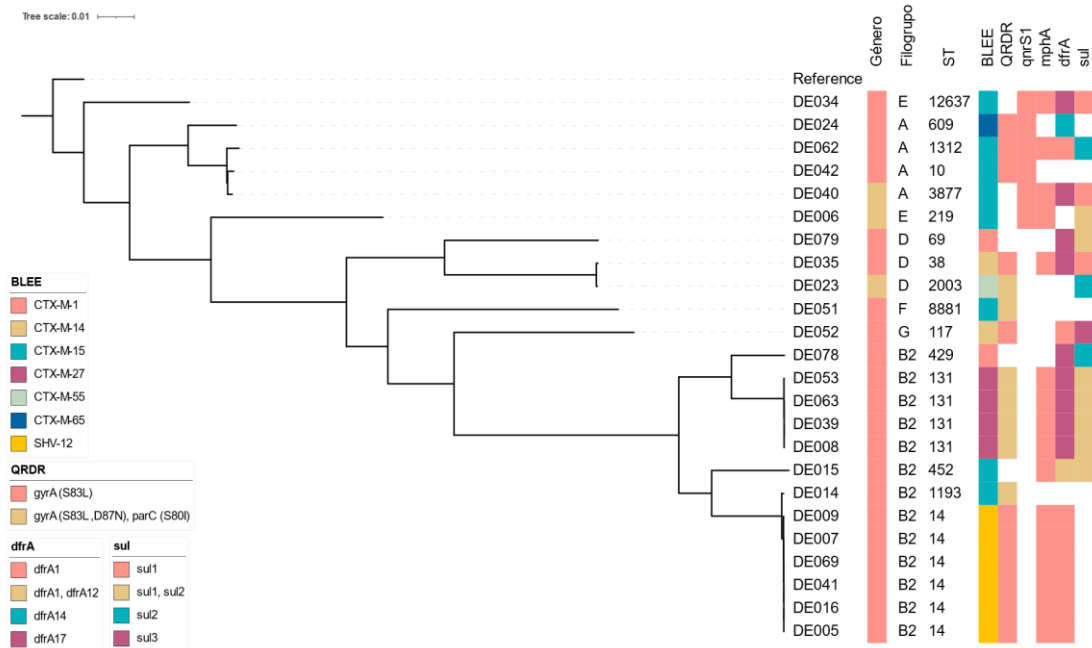


Figura 7: Análisis filogenético de los aislados de *E. coli*. Árbol de maximum likelihood de los 24 aislados recogidos en este estudio con el genoma NZ_CP048010 como referencia. El género del portador asintomático, como características de los aislados se pueden observar a la derecha de la filogenia.

3.3.5.3 Comparación con otros aislados depositados.

Los aislados de los ST mayoritarios se compararon con aislados depositados en Enterobase pertenecientes al mismo clúster jerárquico (HierCC). Para ST14 se utilizó el HC50 69350, el cual era el clúster mínimo compartido por todas las cepas del estudio. En el árbol de este HierCC representado en la Figura 8 se pueden ver cómo hay varios aislados de diferentes países. Caben destacar tres aislados muy próximos (<30 alelos) de los cuales solo se sabe que han sido depositados por un investigador holandés.

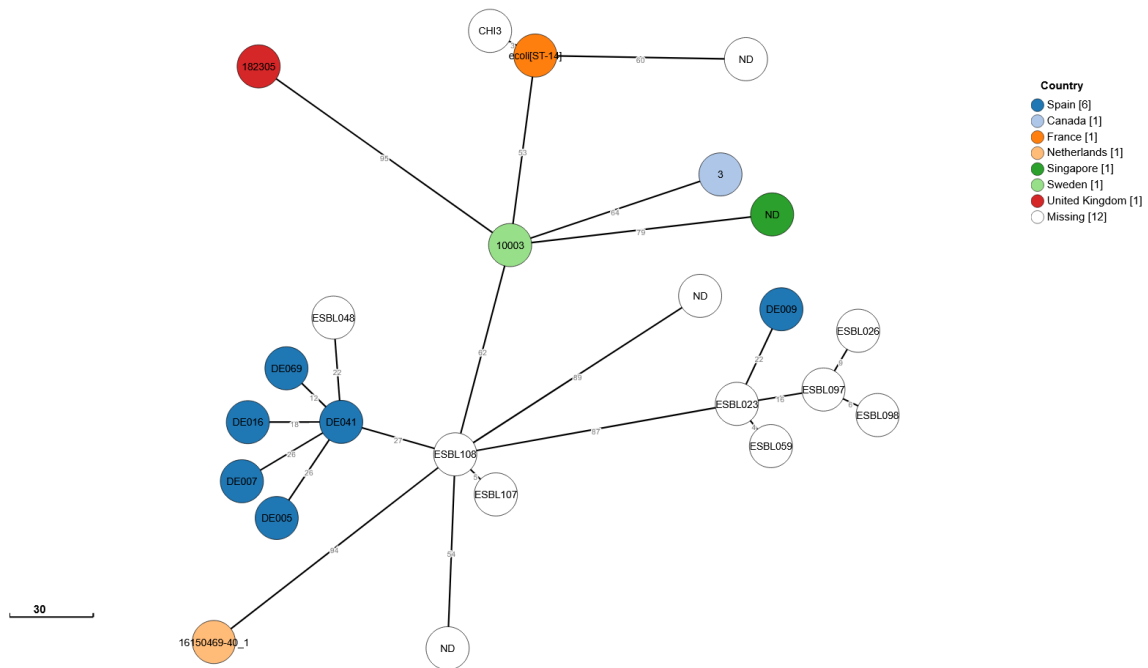


Figura 8: Minimum spanning tree realizado con el wgMLST de Enterobase y visualizado con GrapeTree de los aislados del HC50 69350. Se encuentra coloreado por país de origen de la muestra. La distancia entre los aislados se representa de forma logarítmica.

Por lo que respecta al ST131, el clúster más cercano con aislados de otros estudios fue el HC20 7, el cual está formado por 4738 aislados [consultado: 03/12/2021]. Los más próximos a los aislados del estudio se seleccionaron para la Figura 9. Lo forman aislados de un estudio australiano de control de la transmisión hospitalaria de bacterias multirresistentes (Bioproject PRJNA565795) y una cepa canadiense de un proyecto de caracterización de aislados hospitalarios (Bioproject PRJNA564992).

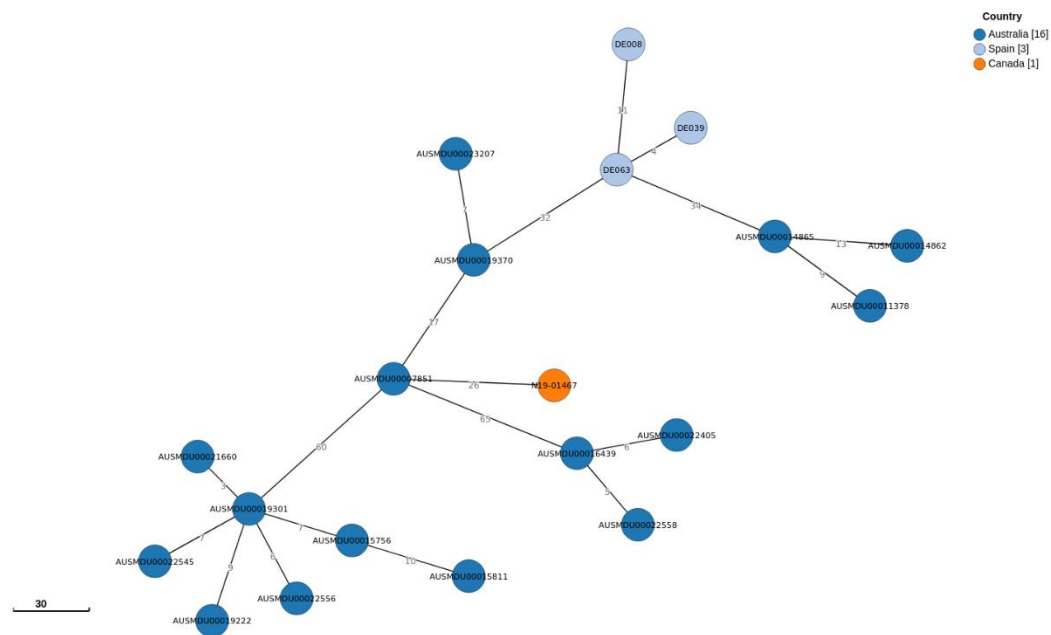


Figura 9: Minimum spanning tree realizado con el wgMLST de Enterobase y visualizado con GrapeTree de los aislados del HC20 7 seleccionados por proximidad a los genomas de estudio. Se encuentra coloreado por país de origen de la muestra. La distancia entre los aislados se representa de forma logarítmica.

3.4 Discusión *Escherichia coli*

En este trabajo se realizó un estudio de aislados provenientes de cribados de ITS en personas asintomáticas donde la mayor parte de los aislados obtenidos (87,5%) prevenía de HSH. Entre los aislados estudiados, el filogrupa más frecuente fue el B2 (54%) seguido del D (13%). En un estudio realizado por Rodríguez-Navarro *et al* (49), en población general asintomática en Barcelona entre los años 2014 y 2015, el filogrupa mayoritariamente observado en *E. coli* productores de BLEE también fue el B2 aunque en un porcentaje menor, un 31%, seguido del B1 y el D con un 23%. Cabe destacar que ambos estudios realizados en personas sanas, los filogrupos mayoritarios son aquellos que están más relacionados con ExPEC.

En un estudio de cribado a nivel estatal también en personas asintomáticas en Países Bajos que tenía por objetivo determinar la prevalencia de enterobacterias productoras de BLEE, el ST mayoritario fue el ST131 (23,6%) seguido del ST38 (12,4%) y del ST10 (7,9%) (50). En este caso se observaron mayoritariamente secuenciotipos muy frecuentes con la infección extraintestinal (14,51,52). En caso del presente estudio, aunque uno de los más frecuentes fue el ST131 al igual que en Países Bajos, no fue el más detectado y el ST14 es relativamente poco frecuente (53).

El ST14 a diferencia del ST1193, perteneciente al mismo CC, no está muy extendido. En un estudio realizado por Tchesnokova *et. al*, determinaron que el ST1193 incrementó ampliamente su frecuencia de aislamiento en infecciones urinarias entre 2013 y 2017, superando por 2 la prevalencia de ST14 y convirtiéndose en el segundo ST más detectado entre los aislados resistentes a fluoroquinolonas por detrás del ST131 (53).

También cabe destacar que el ST131 se ha subdividido en sublinajes, siendo el más extendido el ST131-C2-H30-Rx, el cual es portador del alelo fimH30, mutaciones en QRDR y *bla*_{CTX-M-15} (54,55). Ninguno de los aislados estudiados pertenecía a este sublinaje. No obstante, uno si era portador de fimH30, aunque presentara *bla*_{CTX-M-27}, por lo que pertenecería al sublinaje conocido como C1-M27, el cual ha sido descrito como uno de los más frecuentes después del C2-H30-Rx (55,56). En cambio, los otros tres aislados presentaron fimH99, un alelo poco frecuente en el que se ha reportado con muy baja frecuencia en varios estudios de infección urinaria y bacteriemia en Dinamarca, Corea del sur y Reino unido (51,52,57).

Como era de esperar la BLEE más detectada fue CTX-M-15 en un 33% de los aislados. En el estudio de población general en Barcelona fue detectada en el 31% de los casos, prácticamente igual que en este estudio y en Países Bajos fue detectada en el 44%, ligeramente superior. Por lo que respecta a las otras BLEE detectadas, es destacable que los dos linajes detectados con mayor frecuencia presentaran otras β -lactamasas como son la CTX-M-27 y la SHV-12. El porcentaje de estas en población general en Barcelona fue del 8% cada una y en Países Bajos fue del 14% y 2% respectivamente, muy inferior a lo detectado en este estudio (49,50).

Respecto a los plásmidos detectados, la mayor parte de los aislados era portador de un plásmido del tipo F. El perfil de pMLST detectado en el ST14 (F29:A-:B10) es el

perfil más detectado entre cepas del CC14 que no pertenecen al ST1193 (58) y además también fue uno de los perfiles más frecuentes en Barcelona (49). De la misma manera el perfil detectado en ST131, el F1:A2:B20, también fue detectado anteriormente en Barcelona, y está muy relacionado con la diseminación del clon C1-M27 (49,56,59).

El plásmido pKSR100 no se identificó entre los aislados estudiados. Esto puede ser debido a varias posibilidades, (i) que no exista la transmisión horizontal del plásmido entre *Shigella* y la microbiota intestinal de los huéspedes, (ii) que debido a la baja prevalencia de *Shigella* no se haya analizado ningún paciente que haya tenido contacto con el patógeno, por lo que sería necesario ampliar el número de muestras, (iii) este plásmido tradicionalmente se ha vinculado a la diseminación de determinantes de resistencia a macrólidos, es reciente su asociación con la expansión de CTX-M-27 (43), por lo que es posible que bacterias portadoras del plásmido hayan pasado desapercibidas, ya que el medio utilizado para el aislamiento era selectivo para productoras de BLEE.

La cercanía genética entre algunos aislados detectados hace sospechar que la adquisición de estos puede estar relacionada, ya sea porque ha habido un contacto directo entre las personas o indirecto. Debido a que son dos clústers muy cercanos genéticamente como en el tiempo, recordemos que todas las muestras se aislaron el mismo mes y con al menos 3 personas, hace pensar que sí que podría existir una posible transmisión de estos organismos por vía sexual. Debido a la posibilidad de que estos resultados estén enmarcados en un contexto de brote, 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.

4 Conclusiones

- La mayoría de los aislados de *N. meningitidis* obtenidos de colonización faríngea en personas sometidas a un cribado de ITS presentaron el *cassette* capsular mutado o el locus *cnl*. La pérdida de expresión de la capsula integra por parte del microorganismo, siendo ésta su principal factor de virulencia, limitaría su patogenicidad para el desarrollo de la enfermedad meningocócica invasiva.
- Se han detectado entre los portadores orofaríngeos, aunque en una frecuencia baja, linajes de *N. meningitidis* altamente virulentos y de gran distribución relacionados con la enfermedad meningocócica invasiva en nuestra región como son el CC11, CC213, considerados linajes de alto riesgo epidemiológico.
- Los linajes identificados entre HSH fueron muy similares a aquellos detectados en el mismo colectivo en Roma, aunque no se ha detectado ningún clúster dominante en ambos países.
- La diversidad genética entre los aislados de meningococo estudiados nos hace pensar que no hay un linaje de *N. meningitidis* específico que este circulando entre los hombres que mantienen relaciones sexuales con hombres en nuestro entorno.

- Los aislados de *E. coli* productores de β -lactamasa provenientes de frotis rectales de personas sanas sometidas a un cribado de ITS, el filogrupo mayoritario fue el B2, el más relacionado con infecciones extraintestinales por sus características de virulencia.
- Los principales secuenciotipos detectados distan de los linajes más habitualmente detectados produciendo infección extraintestinal. Aunque se han reportado infecciones por ST14, estas son poco frecuentes. Del mismo modo aunque el ST131 es el linaje más extendido y la principal causa de infección extraintestinal, la detección de los alelos de fimH99 es escasa.
- CTX-M-15 ha sido la principal β -lactamasa de espectro extendido detectada en el estudio, aunque cabe destacar la elevada frecuencia de detección de CTX-M-27 y SHV-12.
- La cobertura del plásmido pKSR100 por parte de las muestras ha sido menor del 90%, por lo que se ha descartado que los aislados fueran portadores de él. No se puede confirmar que exista una transmisión horizontal en la microbiota de los HSH de este plásmido.
- La distancia genética entre los aislados de los principales secuenciotipos, ST14 y ST 131, es muy cercana, lo que podría deberse a una reciente transmisión. Este hecho hace confirmar la transmisión por vía sexual de estos microorganismos.
- No se han identificado aislados *E. coli* en la bibliografía relacionados genéticamente a los del estudio y que pertenecieran a HSH.

4.1 Líneas de futuro

Sería interesante aumentar el periodo de estudio y las muestras para poder observar si los resultados obtenidos obedecen a un suceso puntual o los linajes de *E. coli* más prevalentes son los que más circulan entre HSH y si se pueden detectar más eventos de transmisión en meningococo. También sería interesante la detección de portadores asintomáticos de meningococo a nivel rectal y uretral.

4.2 Seguimiento de la planificación

La planificación y la metodología se ha seguido tal y como se detalló en el plan de trabajo a excepción del análisis de polimorfismos con genomas de referencia. Debido a que no se disponía de las lecturas (reads) de los aislados detectados como más próximos genéticamente, se tuvo que cambiar la estrategia de comparación de alelos de cgMLST en el caso de *N. meningitidis* y wgMLST para *E. coli* y la representación mediante *minimum spanning tree*.

5 Glosario

BLEE: β -lactamasa de espectro extendido

CC: Complejo clonal

cnl: Capsule null locus

EMI: Enfermedad meningocócica invasiva

ExPEC : *Escherichia coli* patogénico extraintestinal

HierCC: Clúster jerárquico

HSH: Hombres que mantienen relaciones sexuales con Hombres

ITS: Infección de transmisión sexual

MSH: Mujeres que mantienen relaciones sexuales con Hombres

QRDR: Región determinante de resistencia a quinolonas

ST: Secuenciotipo

WGS: Whole genome sequencing

6 Bibliografía

1. 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.* 1 de octubre de 2017;43(10):1464-75.
2. Cosgrove SE. The Relationship between Antimicrobial Resistance and Patient Outcomes: Mortality, Length of Hospital Stay, and Health Care Costs. *Clinical Infectious Diseases.* 15 de enero de 2006;42(Supplement_2):S82-9.
3. No Time to Wait: Securing the future from drug-resistant infections [Internet]. WHO. World Health Organization; [citado 15 de febrero de 2021]. Disponible en: https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/IACG_final_report_ES.pdf
4. Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS, et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *The Lancet Infectious Diseases.* 1 de enero de 2019;19(1):56-66.
5. MetaSUB Consortium, Chng KR, Li C, Bertrand D, Ng AHQ, Kwah JS, et al. Cartography of opportunistic pathogens and antibiotic resistance genes in a tertiary hospital environment. *Nat Med.* junio de 2020;26(6):941-51.
6. Rossotti R, Merli M, Cantone M, Moioli MC, Motta D, Orceese C, et al. Risk factors for community-acquired bacterial meningitis: men who have sex with men (MSM) as a population at risk for meningococcal nasopharyngeal carriage. *Infectious Diseases.* 2 de septiembre de 2019;51(9):714-7.

7. 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. *Clinical Infectious Diseases*. 15 de octubre de 2019;69(9):1535-44.
8. Moreno-Mingorance A, Espinal P, Rodriguez V, Goterris L, Fàbrega A, Serra-Pladevall J, et al. Circulation of multi-drug-resistant *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* among men who have sex with men in Barcelona, Spain, 2015–2019. *International Journal of Antimicrobial Agents*. septiembre de 2021;58(3):106378.
9. 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*. agosto de 2015;15(8):913-21.
10. Wilmer A, Romney MG, Gustafson R, Sandhu J, Chu T, Ng C, et al. *Shigella flexneri* serotype 1 infections in men who have sex with men in Vancouver, Canada. *HIV Medicine*. 2015;16(3):168-75.
11. 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*. diciembre de 2018;9(1):1462.
12. 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. *Int J Antimicrob Agents*. marzo de 2021;57(3):106276.
13. Belotserkovsky I, Sansonetti PJ. *Shigella* and Enteroinvasive *Escherichia Coli*. En: Frankel G, Ron EZ, editores. *Escherichia coli, a Versatile Pathogen* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2018 [citado 21 de septiembre de 2021]. p. 1-26. (Current Topics in Microbiology and Immunology; vol. 416). Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/82_2018_104
14. Manges AR, Geum HM, Guo A, Edens TJ, Fibke CD, Pitout JDD. Global Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) Lineages. *Clin Microbiol Reviews*. 12 de junio de 2019;32(3):e00135-18, /cmr/32/3/CMR.00135-18.atom.
15. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, editores. *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. Ninth edition. Philadelphia, PA: Elsevier; 2020. 1 p.
16. Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups: A new *E. coli* phylo-typing method. *Environmental Microbiology Reports*. febrero de 2013;5(1):58-65.
17. Castanheira M, Simner PJ, Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. *JAC Antimicrob Resist*. 16 de julio de 2021;3(3):dlab092.

18. Chong Y, Shimoda S, Shimono N. Current epidemiology, genetic evolution and clinical impact of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infection, Genetics and Evolution*. julio de 2018;61:185-8.
19. Poirel L, Madec J-Y, Lupo A, Schink A-K, Kieffer N, Nordmann P, et al. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr*. julio de 2018;6(4).
20. Gomes C, Ruiz-Roldán L, Mateu J, Ochoa TJ, Ruiz J. Azithromycin resistance levels and mechanisms in *Escherichia coli*. *Sci Rep*. diciembre de 2019;9(1):6089.
21. Johnson TJ, Nolan LK. Plasmid Replicon Typing. En: Caugant DA, editor. *Molecular Epidemiology of Microorganisms* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2009 [citado 9 de diciembre de 2021]. p. 27-35. (Methods in Molecular Biology; vol. 551). Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-1-60327-999-4_3
22. Ladhani SN, Lucidarme J, Parikh SR, Campbell H, Borrow R, Ramsay ME. Meningococcal disease and sexual transmission: urogenital and anorectal infections and invasive disease due to *Neisseria meningitidis*. *The Lancet*. 13 de junio de 2020;395(10240):1865-77.
23. Abad R, Martín-Torres F, Santolaya ME, Banzhoff A, González-Inchausti C, Graña MG, et al. Del genoma de un patógeno a una vacuna efectiva: la vacuna de cuatro componentes frente a los meningococos del serogrupo B. *Rev Esp Quimioter*. 2019;32(3):208-16.
24. Ngai S, Weiss D, Bell JA, Majrud D, Zayas G, Crawley A, et al. Carriage of *Neisseria meningitidis* in Men Who Have Sex With Men Presenting to Public Sexual Health Clinics, New York City. *Sexually Transmitted Diseases*. agosto de 2020;47(8):541-8.
25. Tinggaard M, Slotved H-C, Fuursted K, Rosenstjerne MW, Kronborg G, Lebech A-M, et al. Oral and anal carriage of *Neisseria meningitidis* among sexually active HIV-infected men who have sex with men in Denmark 2014–15. *International Journal of Infectious Diseases*. 1 de abril de 2021;105:337-44.
26. Read RC. *Neisseria meningitidis* and meningococcal disease: recent discoveries and innovations. *Curr Opin Infect Dis*. diciembre de 2019;32(6):601-8.
27. Abad R, Martín-Torres F, Santolaya ME, Banzhoff A, González-Inchausti C, Graña MG, et al. [From a pathogen's genome to an effective vaccine: the four-component meningococcal serogroup B vaccine]. *Rev Esp Quimioter*. junio de 2019;32(3):208-16.
28. Neri A, Fazio C, Ambrosio L, Vacca P, Barbui A, Daprai L, et al. Carriage meningococcal isolates with capsule null locus dominate among high school students in a non-endemic period, Italy, 2012-2013. *Int J Med Microbiol*. junio de 2019;309(3-4):182-8.

29. Wagle SV, Caugant DA, Tunheim G, Bekkevold T, Laake I, Brynildsrud OB, et al. Meningococcal carriage in Norwegian teenagers: strain characterisation and assessment of risk factors. *Epidemiol Infect.* 148:e80.
30. Tinggaard M, Slotved H-C, Fuursted K, Rosenstjerne MW, Kronborg G, Lebech A-M, et al. Oral and anal carriage of *Neisseria meningitidis* among sexually active HIV-infected men who have sex with men in Denmark 2014–15. *International Journal of Infectious Diseases.* abril de 2021;105:337-44.
31. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 1 de agosto de 2014;30(15):2114-20.
32. Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLOS Computational Biology.* 8 de junio de 2017;13(6):e1005595.
33. Seemann T. mlst [Internet]. 2021 [citado 24 de diciembre de 2021]. Disponible en: <https://github.com/tseemann/mlst>
34. 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.* 8 de enero de 2020;48(D1):D517-25.
35. Liu B, Zheng D, Jin Q, Chen L, Yang J. VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic Acids Res.* 8 de enero de 2019;47(Database issue):D687-92.
36. Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, et al. In Silico Detection and Typing of Plasmids using PlasmidFinder and Plasmid Multilocus Sequence Typing. *Antimicrob Agents Chemother.* julio de 2014;58(7):3895-903.
37. Zhou Z, Alikhan N-F, Mohamed K, Fan Y, Achtman M. The EnteroBase user's guide, with case studies on *Salmonella* transmissions, *Yersinia pestis* phylogeny, and *Escherichia* core genomic diversity. *Genome Res.* enero de 2020;30(1):138-52.
38. Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res.* 2018;3:124.
39. Rodrigues CMC, Jolley KA, Smith A, Cameron JC, Feavers IM, Maiden MCJ. Meningococcal Deduced Vaccine Antigen Reactivity (MenDeVAR) Index: a Rapid and Accessible Tool That Exploits Genomic Data in Public Health and Clinical Microbiology Applications. *J Clin Microbiol.* 17 de diciembre de 2020;59(1):e02161-20.
40. Seemann T. Snippy [Internet]. 2021 [citado 24 de diciembre de 2021]. Disponible en: <https://github.com/tseemann/snippy>

41. 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*. 18 de febrero de 2015;43(3):e15.
42. Nguyen L-T, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Mol Biol Evol*. enero de 2015;32(1):268-74.
43. Neri A, Fazio C, Ambrosio L, Vacca P, Barbui A, Daprai L, et al. Carriage meningococcal isolates with capsule null locus dominate among high school students in a non-endemic period, Italy, 2012-2013. *Int J Med Microbiol*. junio de 2019;309(3-4):182-8.
44. MacLennan JM, Rodrigues CMC, Bratcher HB, Lekshmi A, Finn A, Oliver J, et al. Meningococcal carriage in periods of high and low invasive meningococcal disease incidence in the UK: comparison of UKMenCar1–4 cross-sectional survey results. *The Lancet Infectious Diseases*. 1 de mayo de 2021;21(5):677-87.
45. Neri A, Palmieri A, Prignano G, Giuliani M, Latini A, Fazio C, et al. Molecular characterisation and antibiotic susceptibility of meningococcal isolates from healthy men who have sex with men. *Sex Transm Infect*. 17 de noviembre de 2021;sextrans-2021-055173.
46. Lucidarme J, Zhu B, Xu L, Bai X, Gao Y, González-López JJ, et al. Genomic analysis of the meningococcal ST-4821 complex–Western clade, potential sexual transmission and predicted antibiotic susceptibility and vaccine coverage. *PLOS ONE*. 10 de diciembre de 2020;15(12):e0243426.
47. Abad R, García-Amil C, Navarro C, Martín E, Martín-Díaz A, Vázquez JA. Molecular characterization of invasive serogroup B *Neisseria meningitidis* isolates from Spain during 2015–2018: Evolution of the vaccine antigen factor H binding protein (FHbp). *Journal of Infection*. 1 de abril de 2021;82(4):37-44.
48. Krone M, Gray S, Abad R, Skoczyńska A, Stefanelli P, Ende A van der, et al. Increase of invasive meningococcal serogroup W disease in Europe, 2013 to 2017. *Eurosurveillance*. 4 de abril de 2019;24(14):1800245.
49. 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* [Internet]. 21 de abril de 2020 [citado 2 de noviembre de 2021];64(5). Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.02064-19>
50. van den Bunt G, van Pelt W, Hidalgo L, Scharringa J, de Greeff SC, Schürch AC, et al. Prevalence, risk factors and genetic characterisation of extended-spectrum beta-lactamase and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (ESBL-E and CPE): a community-based cross-sectional study, the Netherlands, 2014 to 2016. *Euro Surveill*. octubre de 2019;24(41).

51. 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, longitudinal, microbial population genomic study. *The Lancet Microbe*. 1 de julio de 2021;2(7):e331-41.
52. 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*. 1 de julio de 2017;72(7):1922-9.
53. Tchesnokova V, Radey M, Chattopadhyay S, Larson L, Weaver JL, Kisiela D, et al. Pandemic fluoroquinolone resistant *Escherichia coli* clone ST1193 emerged via simultaneous homologous recombinations in 11 gene loci. *Proc Natl Acad Sci USA*. 16 de julio de 2019;116(29):14740-8.
54. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JDD. The Role of Epidemic Resistance Plasmids and International High-Risk Clones in the Spread of Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev*. julio de 2015;28(3):565-91.
55. 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 β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Causing Human Extraintestinal Infections in Patients From Two Hospitals of Spain and France During 2015. *Front Cell Infect Microbiol*. 24 de marzo de 2020;10:125.
56. Ghosh H, Doijad 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*. octubre de 2017;23(10):1754-6.
57. Kim B, Kim J-H, Lee Y. Virulence Factors Associated With *Escherichia coli* Bacteremia and Urinary Tract Infection. *Ann Lab Med*. 1 de marzo de 2022;42(2):203-12.
58. Johnson TJ, Elnekave E, Miller EA, Munoz-Aguayo J, Flores Figueroa C, Johnston B, et al. Phylogenomic Analysis of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Sequence Type 1193, an Emerging Multidrug-Resistant Clonal Group. *Antimicrob Agents Chemother*. 21 de diciembre de 2018;63(1):e01913-18.
59. 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*. 21 de abril de 2020;64(5):e00202-20.
60. 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. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [Internet]. 17 de noviembre de 2020 [citado 2 de marzo de 2021];64(12). Disponible en: <https://aac.asm.org/content/64/12/e01518-20>

