

- Bignell C, Unemo M. 2012 European guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults. *Int J STD AIDS.* 2013;24:85–92.
- Lopez-Gracia J. Treatment of acute and subacute gonococcal urethritis with fosfomicin. *Chemotherapy.* 1977;23 Suppl 1:293–300.
- Yuan Z, He C, Yan S, Ke Y, Tang W. Randomized controlled clinical trial on the efficacy of fosfomicin trometamol for uncomplicated gonococcal urethritis in men. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22:507–12.
- Barbee LA, Soge OO, Holmes KK, Golden MR. In vitro synergy testing of novel antimicrobial combination therapies against *Neisseria gonorrhoeae*. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69:1572–8.
- Hauser C, Hirzberger L, Unemo M, Furrer H, Endimiani A. In vitro activity of fosfomicin alone and in combination with ceftriaxone or azithromycin against clinical *Neisseria gonorrhoeae* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59:1605–11.
- Wijma RA, Koch BCP, van Gelder T, Mouton JW. High interindividual variability in urinary fosfomicin concentrations in healthy female volunteers. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24:528–32.

Yuliya Zboromyrska\*, María Dolores Guerrero-Torres  
y Miguel Ángel Benítez

Consorci del Laboratori Intercomarcal de l'Alt Penedès, l'Anoia i el Garraf, Vilafranca del Penedès, Barcelona, España

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: zbores@cli.cat (Y. Zboromyrska).

<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.12.010>

0213-005X/ © 2019 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

### Infección mixta por cuatro patotipos diarregénicos de *Escherichia coli* en un caso de diarrea del viajero: caracterización de los aislados obtenidos mediante secuenciación del genoma completo



#### *Mixed infection of four diarrhoeagenic Escherichia coli pathotypes in a case of travellers' diarrhoea: Characterisation of the isolates by whole-genome sequencing*

La diarrea es el problema de salud más habitual entre los viajeros procedentes de países desarrollados que visitan países en desarrollo y/o regiones tropicales y semitropicales, diarrea que por este motivo se conoce como diarrea del viajero (DV)<sup>1</sup>. Más del 60% de los casos de DV están causados por agentes bacterianos, entre los cuales *Escherichia coli* diarregénico (DEC) desempeña un papel principal<sup>2</sup>. En concreto, *E. coli* enterotoxigénico (ETEC) y *E. coli* enteroagregativo (EAEC) se consideran actualmente las causas más comunes de DV, y se estima que conjuntamente ambos patotipos causan cerca de la mitad de los casos de DV procedentes de África y Latinoamérica y más de la tercera parte de los casos de DV procedentes del Sudeste asiático<sup>1</sup>. Si bien su importancia relativa como agentes de DV es menor, otros patotipos como *E. coli* verotoxigénico (VTEC), *E. coli* enteropatógeno (EPEC), tanto típico (tEPEC) como atípico (aEPEC), y *E. coli* enteroinvasivo (EIEC) deben considerarse asimismo como opción diagnóstica en este tipo de infecciones<sup>3-5</sup>.

En noviembre de 2015 se remitió al Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Río Hortega una muestra de heces de una niña de 2 años con antecedentes de viaje a Cuba. A los 3 días de regresar del viaje la niña había manifestado una disminución de la consistencia y aumento de frecuencia de sus deposiciones, sin otra clínica asociada. La exploración física fue normal y no se requirieron pruebas diagnósticas adicionales, aparte del coprocultivo. El cuadro persistió durante 15 días y se resolvió espontáneamente, con administración de probióticos como única medida terapéutica. En el coprocultivo se descartó la presencia de norovirus, adenovirus, astrovirus y rotavirus mediante inmunocromatografía (CerTest Biotech), y la de los enteropatógenos bacterianos más habituales —*Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Hafnia*, *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Campylobacter*— mediante métodos microbiológicos convencionales. Teniendo en cuenta los antecedentes de viaje reciente, la muestra se remitió al Centro Nacional de Microbiología para el diagnóstico de infección por DEC. La detección de los distintos patotipos se realizó mediante PCR para los genes que codifican las verotoxinas de VTEC (*vtx1*, *vtx2*), la intimina de EPEC y VTEC (*eae*), el plásmido de virulencia de EAEC (*aata*), las enterotoxinas de ETEC (*eltA*, *estA*) y las proteínas de invasión de EIEC (*ipaH*),

así como la adhesina BFP (*bfpA*), que diferencia entre tEPEC y aEPEC, a partir de un coprocultivo de la muestra en agar MacConkey (Becton–Dickinson), y se procedió al aislamiento de los patotipos detectados<sup>6</sup>. Los aislados obtenidos se secuenciaron en la plataforma NextSeq 500 (Illumina). Para la extracción del ADN genómico se empleó el kit QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit (QIAGEN) y se generaron librerías «paired-end» mediante el kit Nextera XT DNA Sample Preparation Kit (Illumina). A partir de las lecturas obtenidas se determinó el serotipo, secuenciotipo, perfil de genes de virulencia y perfil de genes de resistencia de cada aislado con las herramientas SerotypeFinder, MLST, VirulenceFinder y ResFinder, respectivamente, disponibles en el servidor Center for Genomic Epidemiology (<https://cge.cbs.dtu.dk/services>). Adicionalmente se estudió la sensibilidad antibiótica de los aislados mediante el método de difusión con discos, según criterios EUCAST y CLSI. El panel de antibióticos empleado incluyó ampicilina, cefotaxima, cefotaxidima, amoxicilina-ácido clavulánico, ertapenem, meropenem, ciprofloxacino, pefloxacino, gentamicina, cloranfenicol, trimetoprim, ácido nalidixico, tetraciclina, estreptomina, kanamicina y sulfametoxazol.

La muestra resultó positiva simultáneamente para los patotipos VTEC, EAEC, ETEC y aEPEC, y se consiguió el aislamiento de las cuatro cepas DEC presentes, cuya caracterización completa se muestra en la **tabla 1**. Aunque las infecciones mixtas por cepas DEC de diferente patotipo, así como las coinfecciones de cepas DEC con otros enteropatógenos tanto bacterianos como víricos o parasitarios, no son infrecuentes, especialmente en casos de DV<sup>5,7,8</sup>, hasta donde sabemos este es el primer caso de infección por DEC en el que se haya demostrado la presencia de cuatro patotipos distintos. No obstante, pese a su presencia frecuente en niños con diarrea, la implicación clínica de algunos de estos patotipos, como EAEC o aEPEC, no está claramente establecida, habiéndose descrito asimismo en niños asintomáticos. Sin embargo, ETEC es un grupo patogénico con una clara implicación clínica, considerado como una causa principal de DV en adultos de países desarrollados y la causa más importante de diarrea infantil en países en vías de desarrollo<sup>9</sup>. En este sentido, la producción de la enterotoxina termoestable ST-1a por parte de las cepas ETEC O8:H8 y VTEC/EPEC O100:H20 detectadas en este caso sería la principal responsable de las manifestaciones clínicas de la paciente. La producción adicional de la verotoxina 2e por parte de la cepa de patotipo híbrido VTEC/EPEC O100:H20 no supondría una mayor implicación clínica de esta cepa, al tratarse de una variante de verotoxina de escasa o nula patogenicidad para el hombre<sup>10</sup>.

Conviene destacar que la caracterización completa de las cuatro cepas implicadas en este caso, realizada mediante secuenciación del genoma completo, no habría sido posible mediante

**Tabla 1**  
Caracterización de las cuatro cepas de *Escherichia coli* diarreagénico aisladas a partir de la muestra de una paciente con diarrea del viajero procedente de Cuba

Patotipo	Serotipo <sup>a</sup>	MLST	Perfil de genes de virulencia <sup>b</sup>	Sensibilidad antibiótica. Fenotipo <sup>c</sup> /genotipo <sup>d</sup> de resistencia
VTEC/ETEC <sup>e</sup>	O100:H20	ST-2514	<b>vtx2A</b> (subtipo e), <b>vtx2B</b> (subtipo e), <b>sta1</b> , <b>stb</b> , <b>sepA</b>	TET/ <i>tetA</i>
EAEC	ONT:H19 <sup>f</sup>	ST-746	<b>aata</b> , <b>aggR</b> , <b>agg3A</b> , <b>agg3B</b> , <b>agg3C</b> , <b>agg3D</b> , <b>agg5A</b> , <b>astA</b> , <b>pic</b> , <b>pet</b> , <b>aap</b> , <b>mchB</b> , <b>mchC</b> , <b>mchF</b> , <b>capU</b> , <b>iha</b> , <b>aar</b> , <b>senB</b>	Sensible
ETEC	O8:H8	ST-4577	<b>sta1</b> , <b>stb</b> , <b>iss</b> , <b>sepA</b> , <b>lpfA</b> , <b>gad</b>	Sensible
aEPEC	O109:H21	ST-40	<b>eaec</b> , <b>tir</b> , <b>cif</b> , <b>iss</b> , <b>nleA</b> , <b>nleB</b> , <b>espA</b> , <b>espB</b> , <b>espJ</b> , <b>lpfA</b> , <b>efa1</b> , <b>gad</b>	Sensible

<sup>a</sup> Determinado a partir de las lecturas obtenidas de cada aislado con SerotypeFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services>) seleccionando un porcentaje de identidad mínimo del 90%.

<sup>b</sup> Determinado a partir de las lecturas obtenidas de cada aislado con VirulenceFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services>) seleccionando un porcentaje de identidad mínimo del 90%. En **negrita**, genes de virulencia que definen el patotipo. *sta1*: gen que codifica la enterotoxina termoestable ST-1a de *E. coli*.

<sup>c</sup> Se empleó el método de difusión con discos en agar Mueller-Hinton (Becton-Dickinson) y las tablas de puntos de corte de EUCAST y CLSI para la interpretación del diámetro de las zonas de inhibición (versión 7.0, 2017 y M100-S25, respectivamente). TET, tetraciclina.

<sup>d</sup> Determinado a partir de las lecturas obtenidas de cada aislado con ResFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services>) seleccionando un porcentaje de identidad mínimo del 90%.

<sup>e</sup> El aislado perteneció a un patotipo híbrido.

<sup>f</sup> No se pudo determinar el antígeno somático (O) del aislado.

técnicas convencionales, ante la imposibilidad de mantener una colección completa de antisueros para determinar el serotipo ni de ensayar mediante PCR toda la batería de genes de virulencia —y sus respectivas variantes— descritos hasta el momento, además de suponer un considerable ahorro de tiempo y trabajo efectivo en el laboratorio. Por otro lado, el análisis de las secuencias obtenidas fue rápido y sencillo, al tratarse de herramientas bioinformáticas de acceso libre y fácil manejo para un usuario no experto.

## Financiación

Este estudio ha sido financiado a través del Fondo de Investigaciones Sanitarias (proyectos MPY-1042/14 y P114CIII/00051).

## Conflicto de intereses

Nada que declarar.

## Agradecimientos

Agradecemos a Cristina García su excelente labor en la preparación de librerías genómicas y al personal de las Unidades de Genómica y Bioinformática del Centro Nacional de Microbiología su apoyo en la secuenciación de genomas completos y en el manejo de las secuencias obtenidas. Sergio Sánchez agradece al programa Miguel Servet del Fondo de Investigaciones Sanitarias la financiación de su contrato (CP13/00237).

## Bibliografía

- DuPont HL. Systematic review: The epidemiology and clinical features of travellers' diarrhoea. *Aliment Pharmacol Ther.* 2009;30:187–96.
- Shah N, DuPont HL, Ramsey DJ. Global etiology of travelers' diarrhea: Systematic review from 1973 to the present. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;80:609–14.
- Olesen B, Jensen C, Olsen KEP, Fussing V, Gerner-Smidt P, Scheutz F. VTEC O117:H7. A new clonal group of *E. coli* associated with persistent diarrhoea in Danish travellers. *Scand J Infect Dis.* 2005;37:288–94.

- Vieira N, Bates SJ, Solberg OD, Ponce K, Howsmon R, Cevallos W, et al. High prevalence of enteroinvasive *Escherichia coli* isolated in a remote region of northern coastal Ecuador. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;76:528–33.
- Lääveri T, Pakkanen SH, Antikainen J, Riutta J, Mero S, Kirveskari J, et al. High number of diarrhoeal co-infections in travellers to Benin, West Africa. *BMC Infect Dis.* 2014;14:81.
- Sánchez S, Herrera L, Llorente MT, Herrera-León S. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* infections in Spain: Did the German outbreak mark a before and after? *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014;32:130–5.
- Keskimäki M, Mattila L, Peltola H, Siitonen A. Prevalence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* in Finns with or without diarrhea during a round-the-world trip. *J Clin Microbiol.* 2000;38:4425–9.
- Paschke C, Apelt N, Fleischmann E, Perona P, Walentiny C, Löscher T, et al. Controlled study on enteropathogens in travellers returning from the tropics with and without diarrhoea. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:1194–200.
- Qadri F, Svennerholm AM, Faruque AS, Sack RB. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: Epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18:465–83.
- Scheutz F, Teel LD, Beutin L, Piérard D, Buvens G, Karch H, et al. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J Clin Microbiol.* 2012;50:2951–63.

Mónica de Frutos<sup>a</sup>, Raquel Ramiro<sup>b</sup>, José Isidoro Pereña<sup>c</sup> y Sergio Sánchez<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Río Hortega, Valladolid, España

<sup>b</sup> Laboratorio de Referencia e Investigación en Infecciones Bacterianas Transmitidas por Agua y Alimentos, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, España

<sup>c</sup> Pediatría, Área de Salud Valladolid Oeste, Valladolid, España

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [sergio.sanchez@isciii.es](mailto:sergio.sanchez@isciii.es) (S. Sánchez).

<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2019.01.003>

0213-005X/ © 2019 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española

de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.