



ARTÍCULO ORIGINAL

Distribución de grupos filogenéticos y factores de virulencia en cepas de *Escherichia coli* uropatógena productora de β -lactamasa CTX-M-15 aisladas de pacientes de la comunidad en Mérida, Venezuela

Ysheth Millán^a, Erick Hernández^{a,b,c}, Beatriz Millán^a y María Araque^{a,*}

^a Laboratorio de Microbiología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

^b Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

^c Laboratorio de Salud Pública del estado Mérida, Mérida, Venezuela

Recibido el 11 de enero de 2014; aceptado el 6 de mayo de 2014

PALABRAS CLAVE

Escherichia coli
uropatógena;
Grupos filogenéticos;
Virulencia;
Beta-lactamasa
CTX-M-15

Resumen

En este estudio se determinó el perfil de distribución de grupos filogenéticos y la detección genética de factores de virulencia en cepas de *Escherichia coli* uropatógena (ECUP) productoras de β -lactamasa CTX-M-15. Veintiocho cepas fueron aisladas de pacientes con infección del tracto urinario (ITU) que asistieron al Laboratorio de Salud Pública del estado Mérida, Venezuela, durante el lapso comprendido entre enero 2009 y julio 2011. La determinación de los grupos filogenéticos y la detección de seis genes de virulencia, *fimH*, *fyuA*, *kpsMTII*, *usp*, *PAI* y *papAH*, se realizó mediante amplificación por PCR. Quince cepas de 28 se ubicaron principalmente en el filogrupo A, seguidos por el B2 (12/28) y D (1/28). No se observó una relación directa entre la recurrencia o gravedad de la ITU y la distribución de los filogrupos. Todos los factores de virulencia estudiados se encontraron con la frecuencia más alta en el grupo B2. El perfil de virulencia prevalente estuvo conformado por la asociación de tres genes principales: *fimH*, *fyuA* y *kpsMTII* y en menor frecuencia, por la presencia de otros determinantes como *usp*, *PAI* y/o *papAH*. Estos resultados indican que la mayoría de ECUP estuvieron dotadas de tres propiedades virulentas importantes: adhesión, captación de hierro y evasión de la fagocitosis, las cuales favorecieron la producción de ITU recurrentes. Este es el primer trabajo que describe la asociación de grupos filogenéticos con el potencial de virulencia de cepas de ECUP productoras de β -lactamasa CTX-M-15 en Venezuela.

© 2014 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: araquemc@ula.ve (M. Araque).

KEYWORDS

Uropathogenic
Escherichia coli;
Phylogenetic groups;
Virulence;
CTX-M-15 beta-
lactamase

Distribution of phylogenetic groups and virulence factors in CTX-M-15 β -lactamase-producing uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients in the community of Mérida, Venezuela

Abstract

In this study, the distribution of phylogenetic groups and the genetic detection of virulence factors in CTX-M-15 β -lactamase-producing uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains were analyzed. Twenty eight strains were isolated between January 2009 and July 2011 from patients with urinary tract infection (UTI) who attended the Public Health Laboratory at Mérida, Venezuela. Determination of phylogenetic groups and detection of six virulence genes, *fimH*, *fyuA*, *kpsMTII*, *usp*, PAI and *papAH*, were performed by PCR amplification. Fifteen of the 28 isolates were mainly located in the phylogenetic group A, followed by B2 (12/28) and D (1/28). No direct relationship between the severity or recurrence of UTI and the distribution of phylogroups was observed. All studied virulence factors were found in group B2 strains with the highest frequency. The prevalent virulence profile included the combination of three main genes: *fimH*, *kpsMTII* and *fyuA* and, to a lesser extent, the presence of other determinants such as *usp*, PAI and/or *papAH*. These results indicate that virulent UPEC incorporated three important properties: adhesion, iron uptake and evasion of phagocytosis, which favored the production of recurrent UTI. This is the first report describing the association of phylogenetic groups with the potential virulence of CTX-M-15 β -lactamase producing UPEC strains in Venezuela.

© 2014 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Escherichia coli es uno de los más importantes agentes causales de infección extraintestinal³¹. Esta especie bacteriana puede ser agrupada en cepas comensales, patotipos intestinales y patógenos extraintestinales. En este último grupo se encuentran las cepas de *E. coli* uropatógena (ECUP), las productoras de sepsis y meningitis²⁶.

ECUP es el agente etiológico más comúnmente involucrado en las infecciones del tracto urinario (ITU). Se estima que entre un 70 % a 95 % de las ITU de inicio comunitario y aproximadamente un 50 % de las de origen nosocomial son producidas por ECUP^{26,31}. Las cepas de *E. coli* son genéticamente diversas, de manera que las diferencias entre aislados patógenos y comensales se fundamentan en sus antecedentes filogenéticos. Las cepas comensales pertenecientes a los grupos A y B1 son consideradas de bajo poder virulento, mientras que las patógenas extraintestinales, además de albergar genes que codifican factores de virulencia responsables de promover las etapas de colonización, adherencia, invasión y la evasión de los mecanismos de defensa del hospedero humano, derivan principalmente de los filogrupos B2 y D^{5,26,31}. Las cepas de ECUP del grupo B2 producen el 69 % de las cistitis, 67 % de las pielonefritis y el 72 % de las sepsis con punto de partida en el tracto urinario^{5,12,26,28,31}.

La prevalencia y frecuencia de aislamiento de ECUP en ITU en pacientes de la comunidad se ha relacionado con el incremento de la resistencia antimicrobiana, especialmente a los antibióticos β -lactámicos, por la producción de β -lactamasas de espectro extenso (BLEE), principalmente las del tipo CTX-M^{17,26}. La β -lactamasa CTX-M-15, una de las variantes del grupo CTX-M-1, es la BLEE de más amplia diseminación mundial^{6,11,25,30}.

Es controversial la asociación de genes que median la resistencia antimicrobiana, grupos filogenéticos y la presencia de determinantes de virulencia como indicadores de patogenicidad^{5,13,21,22,28}. Sin embargo, Lee *et al.*¹⁸ encontraron una estrecha relación entre los genes involucrados en el transporte del hierro y la supervivencia en el suero (genes *iutA* y *traT*, respectivamente) y la presencia de CTX-M-1 y CTX-M-9 en cepas de ECUP del grupo B2. En este contexto, recientemente reportamos por primera vez en Latinoamérica la presencia de ECUP productora de CTX-M-32, filogrupos B2 que portaba cuatro genes asociados a virulencia (*fimH*, *kpsMTII*, *fyuA* y *usp*)².

En Venezuela son escasas las publicaciones que describen las bases genéticas que sustentan el potencial patogénico de los grupos filogenéticos de ECUP productoras de BLEE que circulan en la comunidad^{2,20}. Por tal motivo, en este estudio se determinó por primera vez la distribución de los filogrupos y la presencia genética de factores de virulencia en cepas de ECUP productoras de β -lactamasa CTX-M-15 aisladas de pacientes con ITU provenientes de la comunidad de Mérida, Venezuela.

Materiales y métodos**Cepas bacterianas**

Se estudió una colección de 28 cepas de *E. coli* productoras de CTX-M-15 aisladas de muestras de orina provenientes de pacientes que asistieron al Laboratorio de Salud Pública del estado Mérida, Venezuela, con diagnóstico de infección urinaria durante el período enero 2009 a julio 2011. Estas cepas fueron caracterizadas fenotípica y genéticamente para

genes *bla*_{BLEES} en un estudio previo¹¹. Dentro de las características clínico-epidemiológicas de los pacientes que asistieron a este centro de salud, resalta que la edad promedio fue 49,8 años (rango de 8 a 86 años), 24 pacientes pertenecieron al género femenino y 4 al masculino. Veinticuatro casos tenían diagnóstico de infección urinaria recurrente y la mitad de estos (12) presentó otra patología o condición clínica asociada, tales como: litiasis renal, vejiga neurogénica, atrofia renal, prolapso genital o vesical, diabetes mellitus y embarazo.

Preparación del ADN genómico

La extracción del ADN total se realizó mezclando varias colonias provenientes de cultivos frescos en 200 µl de agua destilada estéril. Estas suspensiones se congelaron a -20 °C durante 30 min y luego se sometieron a ebullición durante 15 min. Los residuos celulares se separaron por centrifugación (13 000 g durante 5 min a temperatura ambiente) y el ADN disuelto en el sobrenadante se recuperó en un tubo eppendorf estéril, el cual se almacenó a -20 °C hasta el momento de su uso.

Detección de los grupos filogenéticos

Las cepas fueron clasificadas dentro de los biotipos filogenéticos (A, B1, B2 y D) de acuerdo a la presencia de los genes *chuA*, *yjaA* y el fragmento génico TspE4.C2, mediante

una PCR múltiple utilizando los iniciadores (tabla 1) y condiciones previamente establecidas⁸. La mezcla de amplificación se realizó en un volumen final de 25 µl y estuvo compuesta por: 2,5 µl del buffer de reacción (10X; Bioneer, Daejeon, Korea), 1,5 µl de MgCl₂ (50 mM; Bioneer), 1,5 µl de dNTPs (10 mM; Bioneer), 2,5 µl de cada iniciador (10 pmol/µl), 0,3 µl de la *Taq* polimerasa (5 U/µl; Bioneer), 2,2 µl de agua bidestilada ultrapura y 2 µl del ADN extraído. Los resultados fueron interpretados con base en el esquema de Clermont *et al.*⁸ mediante la ausencia (-) o presencia (+) de los elementos antes descritos: grupo A: *chuA* - y TspE4.C2 -; B1: *chuA* - y TspE4.C2 +; B2: *chuA* + y *yjaA* + y el filogrupo D: *chuA* + y *yjaA* -. Para estos ensayos se utilizaron como cepas control: *E. coli* LMM36-ULA (*chuA* + y *yjaA* +) y *E. coli* LMM32-ULA (TspE4.C2 +).

Detección de genes de virulencia

Se estudiaron 6 genes de virulencia, los cuales incluyeron: cápsula polisacárida específica del grupo II (*kpsMTII*), adhesina de la fimbria tipo 1 (*fimH*), fimbria P (*papAH*), marcador de isla de patogenicidad (PAI), yersiniabactina (sideróforo *fyuA*) y proteína específica uropatógena (*usp*). Los genes *kpsMTII*, *fimH* y PAI fueron detectados mediante una PCR múltiple y el resto (*papAH*, *fyuA* y *usp*) por PCR simple, utilizando los iniciadores señalados en la tabla 1 y las condiciones de amplificación previamente establecidas¹⁶. La mezcla de reacción para las PCR múltiple estuvo compuesta

Tabla 1 Iniciadores utilizados en este estudio

Gen o fragmento de ADN	Nombre del iniciador	Secuencia del oligonucleótido	Tamaño del amplicón (pb) ^a	Referencia
		5' → 3'		
<i>chuA</i>	chuA 1	GACGAACCAACGGTCAGGAT	279	8
	chuA 2	TGCCGCCAGTACCAAGACA		
<i>yjaA</i>	yjaA 1	TGAAGTGTCAGGAGACGCTG	211	8
	yjaA 2	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC		
TspE4.C2	TspE4C21	GAGTAATGTCGGGGCATTCA	152	8
	TspE4C22	CGCGCCAACAAGTATTACG		
<i>kpsMTII</i>	KpsMTIIF	GCGCATTTGCTGATACTGTTG	272	16
	KpsMTIIR	CATCCAGACGATAAGCATGAGCA		
<i>fimH</i>	fimHF	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG	508	16
	fimHR	GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA		
PAI ^b	PAIF	GGACATCCTGTTACAGCGCGCA	930	16
	PAIR	TCGCCACCAATCACAGCCGAAC		
<i>papAH</i>	papAHF	ATGGCAGTGGTGTCTTTTGGTG	720	16
	papAHR	CGTCCCACCATACGTGCTCTTC		
<i>fyuA</i>	fyuAF	TGATTAACCCCGCGACGGGAA	880	16
	fyuAR	CGCAGTAGGCACGATGTTGTA		
<i>usp</i>	uspF	ATGCTACTGTTTCCGGGTAGTGTGT	1000	23
	uspR	CATCATGTAGTCGGGGCGTAACAAT		

^a pb; pares de bases.

^b PAI; Posición genómica: PAIF: 1021-1042; PAIR: 1921-1942 (Genbank accession n° AF003742).

por 2,5 µl de agua bidestilada ultrapura, 2,0 µl de buffer (10X; Bioneer), 2,0 µl de dNTPs (10 mM; Bioneer), 1,5 µl de MgCl₂ (50 mM; Bioneer), 0,3 µl de *Taq* polimerasa (5 U/µl; Bioneer), 2,5 µl de cada iniciador (10 pmol/µl) excepto para el *fimH* que se utilizó 2 µl y de ADN 2 µl para un volumen final de 25 µl. Para las PCR simples se utilizaron 12,3 µl de agua bidestilada ultrapura, 2,5 µl de buffer (10X; Bioneer), 1,5 µl de dNTPs (10mM; Bioneer), 1,5 µl de MgCl₂ (50 mM; Bioneer), 0,2 µl de *Taq* polimerasa (5 U/µl; Bioneer), 2,5 µl de cada iniciador (10 pmol/µl) y 2 µl de ADN para un volumen final de 25 µl. Las cepas control utilizadas en estos ensayos fueron *E. coli* LMM/E02-ULA (*fimH* +, *fyuA* +, *kpsMTII* + y PAI +) y *E. coli* LMM/Sc03-ULA (*papAH* +) y *E. coli* LMM/E02-ULA (*usp* +).

En todos los ensayos, los productos amplificados se separaron en un gel de agarosa (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA) al 1%, teñido con bromuro de etidio (0,5 µg/mL; Sigma-Aldrich) y fotografiados con el UVP Biodoc-It System. Se utilizó el marcador de peso molecular de 100 pb (Bioneer) para identificar el tamaño de los productos amplificados.

Las cepas de control utilizadas en este estudio pertenecen a la colección de referencia del Laboratorio de Microbiología Molecular (LMM) de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes (ULA), Mérida, Venezuela, las cuales fueron caracterizadas genéticamente en estudios anteriores^{2,11,20}.

Resultados

La distribución de los grupos filogenéticos en las 28 cepas de ECUP productoras de CTX-M-15 y su relación con el diagnóstico clínico se muestran en la tabla 2. Quince de los 28 aislados se concentraron principalmente en el filogrupo A. El filogrupo B2 estuvo representado por 12 cepas, mientras que la muestra restante se ubicó en el filogrupo D (1/28). En esta colección de ECUPs no se encontraron cepas pertenecientes al grupo B1. La relación de esta característica y el tipo de diagnóstico clínico, demostró que las cepas aisladas en pacientes con ITU sin complicación, o no recurrentes, se ubicaron mayoritariamente en el filogrupo A (3/4). En el caso de las ITU recurrentes sin asociación a otra patología o condición, las cepas se distribuyeron casi equitativamente entre el grupo A (6/12) y B2 (5/12) y fue en este grupo de pacientes donde se encontró la única cepa de ECUP del filogrupo D (1/12). Las cepas aisladas de ITU recurrentes asociadas con otras patologías o embarazo se ubicaron con igual número (6/12) en los filogrupos A y B2.

En la tabla 3 se muestran los factores de virulencia detectados en las cepas de ECUP y su frecuencia en los filogrupos A, B2 y D. Todos los factores de virulencia estudiados se encontraron con una frecuencia mayor en el grupo B2. El gen *fyuA* fue el más frecuente (19/28), seguidos de *fimH* (14/28) y *kpsMTII* (10/28). El gen *usp* fue detectado exclusivamente en las cepas pertenecientes al filogrupo B2 (7/28) y representó el tercero más frecuente en este grupo (7/15) luego de los genes *fyuA* (11/15), *fimH* y *kpsMTII* (9/15). En el grupo A no se encontró *kpsMTII* ni *usp*, mientras que solo 3 genes de virulencia (*fyuA*, *fimH* y *kpsMTII*) de los 6 estudiados, fueron detectados en la única cepa del grupo D.

Tabla 3 Distribución de los factores de virulencia en los diferentes filogrupos de ECUP productoras de CTX-M-15

Factores de Virulencia	Grupo filogenético			Total n
	A	B2	D	
	15	12	1	28
FimH	4	9	1	14
FyuA	7	11	1	19
KpsMTII	0	9	1	10
PAI	1	5	0	6
PapAH	1	1	0	2
Usp	0	7	0	7

Tabla 2 Distribución de los filogrupos de ECUP productoras de CTX-M-15 de acuerdo al diagnóstico clínico

	Grupo filogenético			
	n	A	B2	D
Diagnóstico Clínico	28	15	12	1
ITU	4	3	1	0
ITU recurrentes	12	6	5	1
ITU recurrentes asociadas con:	12	6	6	0
Litiasis renal	3	2	1	0
Vejiga neurogénica	1	0	1	0
Atrofia renal	1	0	1	0
Prolapso genital o vesical	4	2	2	0
Diabetes mellitus	2	1	1	0
Embarazo	1	1	0	0

^a ITU: Infección del tracto urinario.

La presencia y las diferentes asociaciones de factores de urovirulencia, así como la ausencia de estos en las cepas estudiadas, permitió identificar varios perfiles (tabla 4). El mayor número de cepas con ausencia de factores de virulencia fue observado en el filogrupo A (5/15), mientras que el grupo B2 concentró el mayor número de ECUP con la más alta frecuencia de asociaciones de genes de virulencia, en la que se incluyeron cepas con 4 (7/12) y 5 combinaciones diferentes (2/12).

Discusión

La ITU es una de las afecciones clínicas más frecuentes en el ámbito de la asistencia primaria en salud, especialmente

Tabla 4 Perfil de genes de virulencia en cepas de ECUP productoras de CTX-M-15 y su distribución de acuerdo a grupos filogenéticos

Cantidad de genes de virulencia	Perfil genético de los factores de virulencia	Grupo filogenético			Total n
		A	B2	D	
		15	12	1	28
0	-	5	1	0	6
1	<i>fyuA</i>	5	0	0	5
	<i>fimH</i>	3	0	0	3
2	<i>fyuA</i> , PAI	0	2	0	2
	<i>fyuA</i> , <i>fimH</i>	1	0	0	1
3	<i>fyuA</i> , PAI, <i>papAH</i>	1	0	0	1
	<i>fyuA</i> , <i>kpsMTII</i> , <i>fimH</i>	0	0	1	1
4	<i>usp</i> , <i>fyuA</i> , <i>kpsMTII</i> , <i>fimH</i>	0	5	0	5
	<i>fyuA</i> , <i>kpsMTII</i> , PAI, <i>fimH</i>	0	2	0	2
5	<i>usp</i> , <i>fyuA</i> , <i>kpsMTII</i> , PAI, <i>fimH</i>	0	1	0	1
	<i>usp</i> , <i>fyuA</i> , <i>kpsMTII</i> , <i>fimH</i> , <i>papAH</i>	0	1	0	1

en el género femenino. Se estima que el 10 % de las mujeres padece, por lo menos, una ITU al año y hasta un 60 % sufre un episodio en algún momento de su vida^{5,21}. En este estudio, la mayoría de las cepas de *E. coli* fueron aisladas en pacientes femeninas (24/28) que cursaron con ITU recurrente y la mitad de estas se asociaron a otra patología o condición clínica (tabla 2). Johnson *et al.*¹⁵ señalaron que las cepas de *E. coli* que causan ITU recurrentes, además de ser favorecidas por condiciones subyacentes del hospedero humano, poseen factores genéticos que facilitan su persistencia en el tracto urinario.

Durante los últimos años se ha incrementado el aislamiento de cepas de *E. coli* productoras de CTX-M-15 como un patógeno prevalente en infecciones de inicio comunitario, especialmente las relacionadas con el tracto urinario^{6,11,13,17,25}. Varios estudios reportan que independientemente de la diversidad genética de las cepas de *E. coli*, las β -lactamasas tipo CTX-M se encuentran extensamente distribuidas en este género bacteriano gracias a una plataforma genética eficiente que le permite a esta enzima diseminarse y movilizarse entre microorganismos diferentes^{6,19,25}. En este estudio, las cepas de ECUP productoras de CTX-M-15 se distribuyeron en tres (A, B2 y D) de los cuatro principales grupos filogenéticos, siendo el grupo A el dominante (tabla 2). Aunque los grupos B2 y D son considerados como los más frecuentemente implicados en ITU por su capacidad patogénica^{16,18,28}, en este trabajo no se observó una relación directa entre la severidad o complicación de la ITU y la distribución de los filogrupos. Por el contrario, cepas de

E. coli del grupo A, indistintamente produjeron ITU no complicada, recurrente y asociada a otra patología o condición clínica. Al respecto, reportes previos han señalado que no existe una distribución particular de los grupos filogenéticos de *E. coli* y el síndrome urinario^{14,22}. Sin embargo, la procedencia geográfica de las cepas, como también las características de la población estudiada, son elementos a considerar cuando se establecen patrones particulares de distribución filogenética en cepas de *E. coli*³.

Las cepas de ECUP poseen una variedad de determinantes de patogenicidad que hacen posible la colonización e invasión del tracto urinario. Estos determinantes median la presencia de fimbrias, adhesinas, sideróforos, toxinas, formación de cápsula, entre otros^{5,28}. En este estudio 22 de las 28 cepas de *E. coli* presentó por lo menos un factor de urovirulencia de los 6 analizados (tabla 3). Además, independientemente del grupo filogenético, se pudo observar que los genes *fyuA* y *fimH* fueron los más frecuentes (19/28 y 14/28, respectivamente).

El gen *fyuA* codifica la proteína yersiniabactina férrica (FyuA), la cual actúa como receptora para el sideróforo Fe-Ybt en los sistemas de captación de hierro⁵. El sistema FyuA/yersiniabactina participa en el crecimiento, colonización y formación de biopelículas de *E. coli* en el tracto urinario^{10,29}. Recientemente se ha considerado al gen *fyuA* como uno de los mejores marcadores de cepas de ECUP y junto con el gen *fimH* que codifica para una adhesina o fimbria tipo 1, constituyen los indicadores claves de virulencia en cepas de ECUP^{16,28,29}. En este estudio se demostró que en la mayoría de las cepas los genes *fyuA* y *fimH* fueron encontrados en asociación y formando parte de diferentes patrones de virulencia (tabla 4). De hecho, el gen *kpsMTII* que media la producción de proteínas de la cápsula, fue detectada en forma conjunta con los determinantes *fyuA* y *fimH*. Por otra parte, también destaca la estrecha relación observada entre la presencia del gen *fyuA* y el marcador de isla de patogenicidad (PAI, del inglés *pathogenicity island*). Al respecto, varios investigadores han confirmado la localización del *locus* que codifica el sideróforo Fe-YbtA/yersiniabactina en PAI II o en islas de alta patogenicidad (HPI, del inglés *high-pathogenicity island*)^{10,16,29}. Otro gen que se encuentra localizado en PAI es el que codifica la proteína específica uropatogénica (Usp)²³. Este factor, con funciones de bacteriocina, fue encontrado en el 25 % de las cepas y exclusivamente en las del filogrupo B2. Es probable que su presencia incremente las propiedades virulentas de las cepas que conforman este grupo.

La expresión de otras adhesinas, como las fimbrias P, con afinidad a receptores específicos distintos a las de tipo 1, puede conferir ventajas a las cepas de ECUP, especialmente aquellas que tienen importancia en el ascenso y patogénesis de la ITU superior como la pielonefritis⁵. Sin embargo, *papHA* (fimbrias P) fue el gen urovirulento que se encontró con menor frecuencia, detectándose solamente en 2 cepas una del grupo filogenético A y la otra en el filogrupo B2. En ambos casos estas cepas fueron causantes de ITU recurrentes asociadas a litiasis renal.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la mayoría de las cepas de ECUP estuvieron dotadas de tres propiedades virulentas importantes: adhesión, captación de hierro y evasión

de la fagocitosis, las cuales coadyuvaron a la producción de ITU recurrentes. Un perfil similar al descrito ha sido comunicado previamente en cepas de ECUP aisladas de pacientes con ITU²⁴, urosepsis^{1,16}, cistitis recurrentes¹⁵ y en pacientes con ITU asociados con diabetes mellitus⁹.

Por otra parte, 6 de las 28 cepas no mostraron ninguno de los factores de virulencia analizados en este trabajo, pero es probable que otros genes de virulencia, diferentes a los estudiados, pudieran estar presentes en estas cepas. En este sentido, trabajos previos describen que en una fracción apreciable de las cepas ECUP analizadas (10 % al 51 %), no se encontraron genes de virulencia tales como *traT*, *PAI*, *pap*, *sfa*, *aer*, *cnf1* y *hly*^{24,27}. Estos resultados reflejan la heterogeneidad en la distribución de los factores de virulencia y la condición multifactorial y compleja que tiene el potencial patogénico de las cepas de ECUP. Es importante destacar que estas cepas fueron aisladas como patógenos únicos en pacientes que, en su mayoría, se caracterizaron por la recurrencia de la infección y la presencia de condiciones predisponentes. Asimismo, al igual que en el resto de la colección de cepas de ECUP estudiadas, los 6 aislados que resultaron negativos para la detección de genes de virulencia, fueron portadores del gen *bla*_{CTX-M-15} y, particularmente, estos también presentaron resistencia a ciprofloxacina y tobramicina¹¹.

Diversos investigadores señalan que las β -lactamasas y los genes de virulencia pueden coexistir en cepas de *E. coli* como resultado de un proceso coevolutivo gradual, pero aún no está claro si la expresión de las BLEE afecta la virulencia y/o la eficacia biológica (*fitness*) de estas bacterias^{4,26,31}. Si bien establecer la relación del perfil de resistencia y el patrón de virulencia con el *fitness* de ECUP no fue un objetivo de este estudio, es razonable suponer que ambas características proporcionaron a las cepas estudiadas ventajas para mejorar los mecanismos adaptativos, los cuales potenciaron su desarrollo, colonización e infección del tracto urinario de manera recurrente. Al respecto, Van der Bij *et al.*³⁰ y Chen *et al.*⁷ comunicaron que la diversidad genómica, la presencia de factores de virulencia y la producción de BLEE, no afectaron el *fitness* de ECUP y que, por el contrario, estas características genéticas favorecieron la diseminación de algunos clones de importancia epidemiológica.

En conclusión, a pesar de que el tamaño de la muestra estudiada fue pequeño, los hallazgos obtenidos sustentan la hipótesis que los procesos fisiopatológicos que se activan en la instalación de una infección urinaria están mediados, además del estado inmunológico del paciente, por un conjunto de factores urovirulentos cuya combinación es particular para cada cepa. En este sentido, el perfil prevalente de las cepas de ECUP analizadas estuvo conformado por la asociación de tres genes principales: *fimH*, *fyuA* y *kpsMTII* y, en menor grado, por la presencia de otros determinantes genéticos como *usp*, *PAI* y/o *papAH*. Este perfil de virulencia de las cepas ECUP fue independiente del grupo filogenético y de la propiedad de producir la β -lactamasa CTX-M-15. Por consiguiente, los factores de virulencia expresados en las cepas de ECUP, y con una significación clínica importante, pueden constituir la clave para el desarrollo de vacunas como una estrategia para el control y prevención de las infecciones del tracto urinario.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico, Tecnológico y de las Artes de la Universidad de Los Andes (CDCHTA-ULA), código: ADG FA-02-97-07 y FA-523-12-03-EM y por el Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT), Venezuela (Proyecto N° 2012002321. Contrato N° 201201213).

Bibliografía

1. Ananias M, Yano T. Serogroups and virulence genotypes of *Escherichia coli* isolated from patients with sepsis. *Braz J Med Biol Res.* 2008;41:877-83.
2. Araque M, Millán B, Mendoza E, Salas M. CTX-M-32 β -lactamase-producing uropathogenic *Escherichia coli* isolated in Latin America. *J Infect Dev Ctries.* 2013;7:432-5.
3. Bailey JK, Pinyon JI, Anantham S, Hall RM. Distribution of human commensal *Escherichia coli* phylogenetic groups. *J Clin Microbiol.* 2010;48:3455-6.
4. Beceiro A, Tomás M, Bou G. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? *Clin Microbiol Rev.* 2013;26:185-230.
5. Bien J, Sokolova O, Bozko P. Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. *Int J Nephrol.* 2012. doi: 10.1155/2012/681473. <http://www.hidawi.com/journals/rjm/2012/681473>
6. Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M enzymes: origin and diffusion. *Front Microbiol.* 2012. doi:10.3389/fmicb.2012.00110. <http://www.frontiersin.org/journal/10.3389/fmicb.2012.00110/full>
7. Chen SL, Wu M, Henderson JP, Hooton TM, Hibbing ME, Hultgren SJ, Gordon JI. Genomic diversity and fitness of *E. coli* strains recovered from the intestinal and urinary tracts of women with recurrent urinary tract infection. *Sci Transl Med.* 2013;8:5(184). doi: 10.1126/scitranslmed.3005497. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc3695744/>
8. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66:4555-8.
9. Ghenghesh KS, Elkateb E, Berbash N, Nada RA, Ahmed SF, Rahouma A, Seif-Enasser N, Elkhabroun MA, Belresh T, Klena JD. Uropathogens from diabetic in patients Lybia: virulence

- factors and phylogenetic groups of *Escherichia coli* isolates. J Med Microb. 2009;58:1006-14.
10. Hancock V, Ferrières L, Klemm P. The ferric yersiniabactina uptake receptor FyuA is required for efficient biofilm formation by urinary tract infectious *Escherichia coli* in human urine. Microbiol. 2008;154:167-75.
 11. Hernández E, Araque M, Millán Y, Millán B, Vielma S. Prevalencia de β -lactamasas CTX-M-15 en grupos filogenéticos de *Escherichia coli* uropatógena aisladas en pacientes de la comunidad en Mérida, Venezuela. Invest Clin. 2014;55:32-43.
 12. Horvath DJ Jr, Dabdoub SM, Li B, Vanderbrink BA, Justice SS. New paradigms of urinary tract infections: implications for patient management. Indian J Urol. 2012;28:154-8.
 13. Jadhav S, Hussain A, Devi S, Kumar A, Parveen S, Gandham N, Wieler LH, Ewers C, Ahmed N. Virulence characteristics and genetic affinities of multiple drug resistant uropathogenic *Escherichia coli* from a semi urban locality in India. PLoS ONE. 2011. doi:10.1371/journal.pone.0018063. <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0018063>.
 14. Johnson JR, Kuskowski MA, Gajewski A, Soto S, Horcajada JP, Jimenez de Anta MT, Vila J. Extended virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from patients with cystitis, pyelonephritis or prostatitis. J Infect Dis. 2005;191:46-50.
 15. Johnson JR, O' Bryan TT, Delavari P, Kuskowski M, Stapleton A, Carlino U, Russo TA. Clonal relationships and extended virulence genotypes among *Escherichia coli* isolates from women with a first or recurrent episode of cystitis. J Infect Dis. 2001;183:1508-17.
 16. Johnson JR, Stell A. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. J Infect Dis. 2000;181:261-72.
 17. Leal AL, Cortés JA, Arias G, Ovalle MV, Saavedra SY, Buitrago G, Escobar JA, Castro BE, GREBO. Emergencia de fenotipos resistentes a cefalosporinas de tercera generación en *Enterobacteriaceae* causantes de infección del tracto urinario de inicio comunitario en hospitales de Colombia. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2013;31:298-303.
 18. Lee S, Yu JK, Park K, Oh EJ, Kim SY, Park YJ. Phylogenetic groups and virulence factors in pathogenic and commensal strains of *Escherichia coli* and their association with *bla*_{CTX-M}. Ann Clin Lab Sci. 2010;40:361-7.
 19. Millán B, Castro D, Ghiglione B, Gutkind G, Araque M. ISCR1 asociado a genes *bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{CTX-M-2} en plásmidos IncN e IncFIIA aislados en *Klebsiella pneumoniae* de origen nosocomial en Mérida, Venezuela. Biomédica. 2013;33:268-75.
 20. Millán Y. Genotipificación y distribución de los grupos filogenéticos y factores de virulencia en *Escherichia coli* uropatógena productoras de β -lactamasas de espectro extenso. Tesis de Maestría en Microbiología Clínica 2013. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.
 21. Momtaz H, Karimian A, Madani M, Dehkordi FS, Ranjbar R, Sarshar M, Souod N. Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: Serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2013;12:8 doi:10.1186/1476-0711-12-8. <http://www.ann-clinmicrob.com/content/12/1/8>
 22. Moreno E, Prats G, Planells I, Planes AM, Pérez T, Andreu A. Caracterización de *Escherichia coli* de los grupos filogenéticos A y B1 causantes de infección extraintestinal. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2006;24:483-9.
 23. Nakano M, Yamamoto S, Terai A, Ogawa O, Makino S, Hayashi H, Nair GB, Kurazono H. Structural and sequence diversity of the pathogenicity island of uropathogenic *Escherichia coli* which encodes the Usp protein. FEMS Microbiol Lett. 2001;205:71-6.
 24. Oliveira FA, Paludo KS, Arend LNV, Farah SMSS, Pedrosa FO, Souza EM, Surek M, Picheth G, Fadel-Picheth CMT. Virulence characteristics and antimicrobial susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* strains. Genet Mol Res. 2011;10:4114-25.
 25. Peirano G, Pitout JDD. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M β -lactamasas: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. Int J Antimicrob Agents. 2010;35:316-21.
 26. Pitout JDD. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance. Front Microbiol. 2012;3:9. doi:10.3389/fmicb.2012.00009. <http://www.frontiersin.org/journal/10.3389/fmicb.2012.00009/full>
 27. Santo E, Macedo C, Marin JM. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* from a university hospital in Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2006;48:185-8.
 28. Soto SM. Expresión de factores de virulencia en cepas extraintestinales de *Escherichia coli*. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2006;24:479-80.
 29. Spurbeck RR, Dinh PC, Walk ST, Stapleton AE, Hooton TM, Nolan LK, Kim SK, Johnson JR, Mobley HLT. *Escherichia coli* isolates that carry *vat*, *fyuA*, *chuA* and *yfcV* efficiently colonize the urinary tract. Infect Immun. 2012;80:4115-22.
 30. Van der Bij AK, Peirano G, Pitondo-Silva A, Pitout JDD. The presence of genes encoding for different virulence factors in clonally related *Escherichia coli* that produce CTX-Ms. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012;72:297-302.
 31. Vimont S, Boyd A, Bleibtreu A, Bens M, Goujon JM, Garry L, Clermont O, Denamur E, Arlet G, Vandewalle A. The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone O25b:H4-ST131 has high intestine colonization and urinary tract infection abilities. PLoS ONE. 2012;7:9. doi:10.1371/journal.pone.0046547. <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0046547>