

# Distribución de grupos filogenéticos, factores de virulencia y susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Escherichia coli* uropatógena

## Distribution of phylogenetic groups, virulence factors and antimicrobial susceptibility in strains of uropathogenic *Escherichia coli*

Ysheth Millán<sup>2</sup>, María Araque<sup>2</sup> y Ana Ramírez<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Microbiología del Suelo, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

<sup>2</sup>Laboratorio de Microbiología Molecular, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

Establecimiento(s) donde se realizó el trabajo: Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela (LMMFFB-ULA).

Conflictos de interés: los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

Este trabajo fue financiado a través del proyecto N° FA 598-16-03-B del Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad de Los Andes.

Recibido (versión final): 18 de diciembre de 2019 / Aceptado: 31 de enero de 2020

### Resumen

**Introducción:** La diferencia entre los aislados patógenos y comensales de *Escherichia coli* se fundamenta en sus antecedentes filogenéticos. En Venezuela son escasos los estudios que describen el potencial patogénico de los grupos filogenéticos en *E. coli*. **Objetivo:** Relacionar la susceptibilidad antimicrobiana, distribución de los grupos filogenéticos y genes de virulencia en cepas de *E. coli* uropatógena (ECUP) aisladas de pacientes con infección del tracto urinario. **Materiales y Métodos:** Se estudiaron 17 cepas de ECUP, aisladas de pacientes adultos hospitalizados en dos instituciones de salud. La susceptibilidad frente a ocho antimicrobianos se determinó por el método de microdilución en caldo (MDC). Las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y carbapenemasas fueron detectadas fenotípicamente. Los grupos filogenéticos y la detección de los genes de virulencia se determinaron por reacción de polimerasa en cadena. **Resultados:** Todas las cepas sintetizaban BLEE y de éstas, 41% se asoció a la producción de una carbapenemasa (KPC o MBL). El filogruppo B2 (41%) fue predominante. Los genes de virulencia más frecuentes fueron *fimH* y *fyuA* con 82% cada uno. Sólo un aislado clasificado en el filogruppo F fue positivo al conjunto de seis genes estudiados. **Discusión:** La diversidad de asociaciones entre genes de virulencia y perfiles de resistencia, en las cepas ECUP evolucionan continuamente. Además, su distribución en los distintos grupos filogenéticos depende en gran medida de las características clínico epidemiológicas de los grupos de estudios.

**Palabras clave:** *Escherichia coli* uropatógena; grupos filogenéticos; genes de virulencia;  $\beta$ -lactamasas.

### Abstract

**Background:** The difference between the pathogenic isolates and commensals of *Escherichia coli* is based on their phylogenetic antecedents. In Venezuela there are few studies that describe the pathogenic potential of phylogenetic groups in *E. coli*. **Aims:** Relate antimicrobial susceptibility, distribution of phylogenetic groups and virulence genes in strains of uropathogenic *E. coli* (ECUP) isolated from patients with UTI. **Methods:** We studied 17 ECUP strains, isolated from adult patients hospitalized in two health institutions. The susceptibility to 8 antibiotics was determined by the broth microdilution (MDC) method. Extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) and carbapenemases were phenotypically detected. The phylogenetic groups and the detection of the virulence genes were determined by PCR. **Results:** All strains synthesized ESBL and of these, 41% were associated with the production of a carbapenemases (KPC or MBL). The phylogroup B2 (41%) was the most predominant. The most frequent virulence genes were *fimH* and *fyuA* with 82% each. Only one strain from group F was positive to the 6 genes studied. **Discussion:** The diversity of associations between virulence genes and resistance profiles in the ECUP are evolving continuously, their distribution in the different phylogenetic groups depends to a large extent on the clinical epidemiological characteristics of the study groups.

**Keywords:** Uropathogenic *Escherichia coli*; phylogenetic groups, virulence genes,  $\beta$ -lactamases.

### Correspondencia a:

Ana Ramírez Arocha  
ramirezana@ula.ve

## Introducción

Las infecciones del tracto urinario (ITU) afectan a 150 millones de personas cada año en todo el mundo, siendo *Escherichia coli* uropatógena (ECUP) el agente etiológico responsable de aproximadamente 50% de las ITU asociadas a los cuidados de salud (ITU-ACS)<sup>1,2</sup> y de 70 a 95% en la comunidad<sup>3</sup>. Venezuela no escapa de esta realidad mundial y, aunque los estudios publicados sobre la distribución de *E. coli* como agente causal de las ITU son escasos en nuestro país, autores como López y cols., en niños, Capozzi y cols., y Quijada y cols., en adultos, reportan frecuencias de 23,2% (44/189), 53,9% (7/13) y 20% (8/40), respectivamente<sup>4-6</sup>.

La capacidad de ECUP de producir ITU depende de una compleja interacción entre las condiciones del hospedero y los diferentes factores de virulencia (FV) que posee la bacteria<sup>7</sup>, siendo las fimbrias: tipo 1 (codificado por el operon *fim*), P (codificada por operon *pap*), F1C (*focG*), S (*Sfa*) y las adhesinas no fimbriales Dr (*Afa/drBC*) y afa (*afaB/C*), las que intervienen en las etapas de colonización y adherencia, cuya presencia o ausencia en *E. coli* puede variar entre los distintos tipos de ITU (bacteriuria, cistitis o pielonefritis). Otros FV como la cápsula (*kpsMT*) son importantes en la evasión de la respuesta inmune y en los

cuadros invasores. Además, los sideróforos intervienen en la adquisición de nutrientes mientras que las toxinas  $\alpha$ -hemolisina (*hlyA*), el factor citotóxico necrosante (*cnf1*) y la toxina auto-transportadora Sat (*Sat*) son importantes en el tipo de daño causado al tejido renal, por lo que ayudan a definir el cuadro clínico producido por las ECUP en el tracto urinario<sup>7,8</sup>.

Por otra parte, las cepas de *E. coli* son genéticamente diversas<sup>9</sup>, de tal manera que se han descrito 8 grupos filogenéticos (A, B1, B2, C, D, E, F y clado 1), utilizando datos obtenidos mediante la tipificación de secuencias multilocus (MLST)<sup>10</sup>. Sin embargo, Clermont y cols., en 2013 describieron y validaron una nueva metodología para realizar dicha clasificación, basándose en el genotipo obtenido mediante reacción de polimerasa en cadena (RPC) múltiple que detecta los genes *arpA*, *chuA*, *yjaA* y el fragmento génico TspE4.C2. Estos autores demostraron que su metodología asigna correctamente 95 a 100% de las cepas al compararla con la técnica MLST<sup>11</sup>.

En general, se ha reportado que las cepas del grupo B2 expresan una mayor cantidad de FV y son las más frecuentes en casos de cistitis y bacteriuria asintomática complicada<sup>12</sup>; además, están asociadas con mayor frecuencia con la producción de  $\beta$ -lactamasas<sup>13</sup>.

En Venezuela son escasos los estudios que describen las bases genéticas que sustentan el potencial patogénico de los grupos filogenéticos de ECUP<sup>12,14,15</sup>. Por tal motivo, en este trabajo se relacionó la susceptibilidad antimicrobiana, distribución de los grupos filogenéticos y genes de virulencia en cepas de ECUP aisladas de pacientes adultos con ITU.

## Materiales y Métodos

Este estudio fue de tipo experimental, exploratorio y descriptivo.

### Cepas bacterianas

Se estudiaron 17 cepas de ECUP, pertenecientes a la colección del Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela (LMMFFB-ULA), las que fueron obtenidas de muestras de orina provenientes de pacientes adultos hospitalizados, 10 cepas durante el período marzo de 2011 a julio de 2013 y 7 durante el período enero a julio de 2015. Los criterios de inclusión fueron: cepas de *E. coli* donadas al LMMFFB-ULA, con sospecha de BLEE, aisladas de pacientes adultos con ITU; se excluyeron cepas de *E. coli* que no cumplieran con los criterios antes mencionados. En la Tabla 1 se muestran las características clínicas y epidemiológicas de los pacientes a partir de quienes se obtuvieron las cepas de ECUP incluidas en este estudio.

Tabla 1. Datos clínicos y epidemiológicos de los pacientes con ITU incluidos en el estudio

Aislados clínicos	Sexo	Edad (años)	Patología o estado fisiológico asociado
LMM-1147	F	73	ITU-AC
LMM-1195	F	43	ITU-AC
LMM-15131.1	F	53	ITU-AC
LMM-15131.2	F	42	ITU-AC
LMM-1194.3	M	34	ITU-AC
LMM-1199	F	68	ITU-AC
LMM-15494.2	M	70	ITU-AC
A-316	M	68	Cistocele con ITU
A-099	F	79	Atrofia renal con ITU
A-170	M	59	Atrofia renal con ITU
A-717	F	50	Cistocele con ITU
A-719	M	28	ITU-AC
A-967	F	17	Embarazo con ITU
A-038	F	51	Diabetes mellitus con ITU
A-726	M	74	ITU-AC
A-767	F	51	Lupus eritematoso con ITU
A-178	M	75	ITU-AC

ITU-AC: Infección urinaria asociada a catéter vesical. M = masculino; F = femenino.

### Prueba de susceptibilidad antimicrobiana

La susceptibilidad antimicrobiana se realizó determinando la concentración inhibitoria mínima (CIM) mediante el método de microdilución en caldo (MDC), de acuerdo a lo descrito por el Clinical and Laboratory Standards Institute<sup>16</sup>. Los antimicrobianos ensayados fueron: ampicilina (PlusAndex), cefotaxima (VitalisS.A.C.I.), piperacilina/tazobactam (CiplaLTD), ampicilina/sulbactam (Galeno), imipenem (CiplaLTD), amikacina (Rhenochem AG), ciprofloxacina (Behrens CA) y aztreonam (SM Pharma). *Escherichia coli* ATCC 25922 fue utilizada como cepa control en estos ensayos.

### Determinación fenotípica de $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y carbapenemasas

La confirmación de BLEE se realizó utilizando la prueba del disco combinado con ácido clavulánico siguiendo la metodología descrita por el CLSI (2018)<sup>16</sup>. Como cepas controles se utilizaron *E. coli* ATCC 25922 (BLEE negativo) y *E. coli* LMM-26 (BLEE positiva).

La detección fenotípica de carbapenemasas tipo metalo  $\beta$ -lactamasas (MBL) se realizó, utilizando discos de imipenem (10  $\mu$ g) (Baltimore Biological Laboratory (BBL<sup>TM</sup>), meropenem (10  $\mu$ g BBL<sup>TM</sup>) y ácido etilendiamino-tetracético-mercaptoacético de sodio (EDTA-SMA) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), de acuerdo a lo descrito por Guevara y cols.<sup>17</sup>; como control positivo se utilizó *Pseudomonas aeruginosa* 77297 (*bla<sub>VIM</sub>*). Para la detección de la enzima *Klebsiella pneumoniae*-carbapenemasa (KPC) se utilizaron discos de ácido borónico (BBL<sup>TM</sup>) y ertapenem (10  $\mu$ g BBL<sup>TM</sup>) según lo descrito por Nicola y cols.<sup>18</sup>. En esta prueba se utilizó como control positivo *K. oxytoca* LMM-SA26 (*bla<sub>KPC-2</sub>*).

### Extracción del ADN genómico

La extracción del ADN total se realizó mezclando varias colonias provenientes de cultivos frescos en 200  $\mu$ L de agua destilada estéril. Estas suspensiones se sometieron a ebullición durante 15 min. Los residuos celulares se separaron por centrifugación (13.000 g durante cinco min a temperatura ambiente) y el ADN disuelto en el sobrenadante se recuperó en un tubo Eppendorf estéril.

### Detección de los grupos filogenéticos

Para la identificación del grupo filogenético, inicialmente se realizó una RPC múltiple para determinar los genes *chuA*, *yjaA*, *arpa* y el fragmento génico TspE4. C2. Para diferenciar el grupo C del A y el grupo E del D se realizaron dos RPC simples, donde se utilizaron oligonucleótidos dirigidos al gen *trpA* y *arpa*, respectivamente. Todas las reacciones se realizaron utilizando los iniciadores y condiciones previamente establecidas

por Clermont y cols.<sup>11</sup> (Tabla suplementaria 1). Los resultados fueron interpretados utilizando el esquema de Clermont y cols.<sup>11</sup>. Para estos ensayos se utilizaron como cepas control: *E. coli* 09-ULA (*chuA*+, *yjaA*+ y TspE4. C2 +), *E. coli* A038-ULA (*arpa* + y *arpAgE* +) y *E. coli* SC20-ULA (*trpA* +).

### Detección de genes de virulencia

Se estudiaron seis genes de virulencia, incluyendo: cápsula polisacárida específica del grupo II (*kpsMTII*), adhesina de la fimbria tipo I (*fimH*), fimbria P (*papAH*), marcador de isla de patogenicidad<sub>CFT073</sub> (PAI), yersiniabactina (sideróforo *fyuA*) y proteína específica uropatógena (*usp*). Los genes *kpsMTII*, *fimH* y PAI fueron detectados mediante una RPC múltiple y el resto (*papAH*, *fyuA* y *usp*) por RPC simple, utilizando los iniciadores y condiciones de amplificación previamente descritos<sup>12</sup> (Tabla suplementaria 1). Las cepas control utilizadas en estos ensayos fueron *E. coli* LMM/E02-ULA (*fimH*+, *fyuA*+, *kpsMTII* + y PAI +), *E. coli* LMM/Sc03-ULA (*papAH*+) y *E. coli* LMM/E02-ULA (*usp*+).

## Resultados

Un total de 17 aislados clínicos de ECUP fueron evaluados por el método de MDC frente a ocho antimicrobianos. En todas las cepas se confirmó fenotípicamente la producción de BLEE y de éstas 41% (7/17) se asoció a la síntesis de una carbapenemasa (KPC o MBL). Sin embargo, tres (18%) de las cepas resistentes al imipenem no resultaron positivas en la prueba fenotípica para carbapenemasas. También se observó resistencia a ciprofloxacina en 100% de los aislados.

Por otra parte, al analizar la distribución de las cepas con base en los grupos filogenéticos, se determinó que el filogrupo B2 (41%) fue el predominante, seguido de los grupos A y E con 23,5% (4/17) cada uno y sólo 12% (2/17) correspondió al filogrupo F (Tabla suplementaria 2). Todas las cepas del grupo A fueron productoras de BLEE y carbapenemasas, mientras que las clasificadas dentro del filogrupo F sólo sintetizaban BLEE y las del grupo B2 mostraron un perfil de resistencia más heterogéneo (Tabla suplementaria 2).

En relación a la presencia de genes de virulencia, los más frecuentes fueron *fimHy* *fyuA* con 82% (14/17) cada uno, seguidos de *usp* (53%), *KpsMTII* (47%) PAI (41%) y *papAH* (18%). Sólo un aislado clasificado en el filogrupo F fue positivo al conjunto de seis genes estudiados (Tabla suplementaria 2), mientras que dos cepas del grupo A sólo presentaron el gen *fimH*. La mayoría de los aislados pertenecientes a los filogramas B2 y E presentaron entre tres y cinco genes de virulencia.

## Discusión

Las ECUP incluidas en este estudio presentaron un alto porcentaje (mayor al 65%) de resistencia frente a los ocho antimicrobianos ensayados, resultado que es consistente con lo reportado por varios autores<sup>19,20</sup>, sobre la multi-resistencia de *E. coli* frente a los antimicrobianos.

Por otra parte, 65% de los aislados clínicos fueron resistentes a carbapenemos y en 41% de éstos, el mecanismo de resistencia implicado fue la síntesis de carbapenemasas (KPC y MBL), lo que revela un cambio importante en el patrón de susceptibilidad frente a este grupo de antimicrobianos al compararlo con los resultados reportados en el 2014 por Abreu y cols.<sup>21</sup>, quienes señalaron que 100% de las cepas ECUP de origen hospitalario en Mérida-Venezuela, eran sensibles a carbapenemos. Es probable que al utilizar este grupo de antimicrobianos como opción terapéutica en infecciones causadas por bacterias productoras BLEE, se ejerciera presión selectiva y las bacterias rápidamente adquirieran mecanismos para evadir la acción de estos antimicrobianos<sup>22</sup>.

De igual forma, el elevado porcentaje de resistencia (100%) frente a ciprofloxacina y la asociación de dicha resistencia con la síntesis de BLEE, se correlaciona con lo referido por Montañez-Valverde y cols.<sup>23</sup>, en cepas ECUP en Perú. Este hallazgo puede indicar la posible circulación de elementos genéticos que codifiquen información sobre mecanismos de resistencia a varias familias de antimicrobianos, aspecto que debe ser confirmado en estudios posteriores.

Con respecto a la distribución filogenética en las cepas de *E. coli* analizadas se observó, al igual que otros autores<sup>1,24</sup> en Alemania (B2: 49%) y en Pakistán (B2: 44%) que el filogrupo B2 fue el más frecuente en cepas ECUP de origen hospitalario, mientras que un estudio realizado en Mérida-Venezuela con cepas ECUP de origen extra-hospitalario, predominó el filogrupo A (54%)<sup>12</sup>, evidenciándose que el origen de la cepa (hospitalario o extra-hospitalario) es una característica importante que se debe considerar cuando se establecen patrones particulares de distribución filogenética en cepas de *E. coli*<sup>25</sup>.

Si bien es cierto que la distribución de los FV en las cepas ECUP es heterogénea y que el potencial patogénico de estas cepas es multifactorial<sup>1,12,26</sup>, nuestros resultados sobre la fimbria tipo 1 (*fimH*) (82%) y el sideróforo yer-

siniabactina (*fyuA*) (82%) coinciden con los reportados por otros autores en Alemania<sup>25</sup>, Mongolia<sup>26</sup>, China<sup>27</sup> y Venezuela<sup>12</sup>, apoyando así, lo referido por diversos autores sobre la importancia de los genes *fyuA* y *fimH* como indicadores claves de virulencia en cepas ECUP<sup>2</sup>.

El predominio de *fyuA* en ECUP puede estar relacionado con la alta afinidad por el hierro y la mayor estabilidad que tiene yersiniabactina con respecto a otros sideróforos<sup>28</sup>, aspecto importante para la captación y acumulación de hierro, sobre todo en el tracto urinario que es un ambiente tan limitado de este nutriente<sup>27</sup>. De igual forma, la fimbria tipo 1 (*fimH*) prevalece en cepas ECUP debido a que sus receptores específicos se encuentran en el uroepitelio favoreciendo la entrada al tracto urinario; además, promueve la formación de biopelículas facilitando la colonización de catéteres vesicales<sup>8</sup>, factor predisponente más frecuente (59%) en este estudio.

En relación al número de genes de virulencia, se determinó que la mayoría (71%) de las cepas ECUP analizadas contenían tres o más de los genes investigados. Al compararlo con lo reportado por Millán y cols.<sup>12</sup>, se observa una importante diferencia en la carga genética, ya que estos autores reportan que 61% de las cepas contenían dos o menos genes de virulencia. Esta característica, aunado a los mecanismos de resistencia detectados, revela el alto grado de virulencia de las ECUP analizadas, pudiendo junto a los factores inherentes al hospedero conllevar a que el cuadro clínico sea más grave en este grupo de pacientes<sup>7</sup>.

A pesar que una limitación del estudio fue el número reducido de cepas analizadas, estos hallazgos, representan un aporte importante en el ámbito científico de nuestra región, ya que permiten conocer cambios en la susceptibilidad antimicrobiana, así como, la carga genética que describe la potencialidad patogénica relacionada a los grupos filogenéticos en cepas ECUP que circulan en las dos instituciones de salud involucradas en el estudio.

Los hallazgos obtenidos en este trabajo permiten concluir que la distribución de las ECUP en los distintos grupos filogenéticos depende en gran medida de las características clínico epidemiológicas de los grupos de estudios y que es evidente que la diversidad de asociaciones entre genes de virulencia, perfiles de resistencia, síntesis de BLEE y carbapenemasas en las cepas ECUP evolucionan continuamente, planteando un reto importante en el tratamiento de las ITU.

**Tabla Suplementaria 1. Descripción del protocolo para la detección de grupos filogenéticos y genes de virulencia mediante RPC en ECUP**

Tipo de RPC	Gen o fragmento de ADN	Secuencia del oligonucleótido	Amplificado (pb)	Temperatura de alineación	Composición de la mezcla de reacción Vf: 25 µl (22 µl mezcla + 3 µl de ADN)	Ref.		
RPC múltiple	<i>chuA</i>	<i>chuA</i> .1b 5'-ATGGTACCGGACGAACCAAC-3'	288	59 °C	Agua <sub>buil</sub> 6 µl	11		
		<i>chuA</i> .2 5'-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3'			Buffer 10X			
	<i>yjaA</i>	<i>yjaA</i> .1b 5'-CAAACGTGAAGTGCAGGAG-3'	211		dNTP's 10 mM			
		<i>yjaA</i> .2b 5'-AATGCGTTCTCAACCTGTG-3'			MgCl <sub>2</sub> 50 mM			
Grupos filogenéticos	<i>TspE4C2</i>	<i>TspE4C2</i> .1b 5'-CACTATTCTGAAGTTCATCC-3'	152	Cebadores 20 pmol/µl	( <i>chuA</i> .1b, <i>chuA</i> .2, <i>yjaA</i> .1b, <i>yjaA</i> .2b, <i>TspE4C2</i> .1b, <i>TspE4C2</i> .2b)	1 µl c/u		
		<i>TspE4C2</i> .2b 5'-AGTTTATCGCTGCCGGTTCGC-3'			( <i>AceK</i> .f, <i>ArpA</i> .1.r)	2 µl c/u		
	<i>arpA</i>	<i>AceK</i> .f 5'-AAGGCTATTCGCCAGCTTGC-3'	400	<i>Taq</i> polimerasa (5 U/µl)		0,4 µl		
		<i>ArpA</i> .1.r 5'-TCTCCCATACCGTACCGCTA-3'						
RPC simples para filogrupos C o E	<i>trpA</i>	<i>trpAppC</i> .1 5'-AGTTTTATGCCAGTGGAG-3'	219	59 °C	Agua <sub>buil</sub> 12,5 µl	11		
		<i>trpAppC</i> .2 5'-TCTGGCCGGTACAGCCC-3'			Buffer 10X			
	<i>arpA</i>	<i>ArpAppE</i> .f5'-GATTCATCTTGTCAAAATATGCC-3'	301	57 °C	dNTP's 10 mM			
		<i>ArpAppE</i> .r5'-GAAAAAGAAAAAGAAATTCCTCCAAAGAG-3'			MgCl <sub>2</sub> 50 mM			
				Cebadores 10 pmol/µl	(el par específicos del grupo C o E)	2 µl c/u		
				<i>Taq</i> polimerasa (5 U/µl)		0,2 µl		
RPC múltiple	<i>KpsMTIIF</i>	<i>KpsMTIIF</i> 5'-GCGCAITTTGCTGATACTGTTG-3'	272	63 °C	Agua <sub>buil</sub> 2,5 µl	12		
		<i>KpsMTIIR</i> 5'-CATCCAGACGATAAGCATGAGCA-3'			Buffer 10X			
	<i>fimH</i>	<i>fimHF</i> 5'-TGCAAGACGGATAAGCCGTGG-3'	508		dNTP's 10 mM			
		<i>fimHR</i> 5'-GCAGTACCTGCCCTCCGGTA-3'			MgCl <sub>2</sub> 50 mM			
	<i>PAI</i>	<i>PAIF</i> 5'-GGACATCTGTTACAGCGCGCA-3'	930		Cebadores 10 pmol/µl		( <i>KpsMTIIF</i> , <i>KpsMTIIR</i> , <i>fimHF</i> , <i>fimHR</i> )	2,5 µl
		<i>PAIR</i> 5'-TCGCCACCAATCACAGCCGAAC-3'			c/u		( <i>PAIF</i> y <i>PAIR</i> )	2µl c/u
				<i>Taq</i> polimerasa (5 U/µl)		0,3µl		
RPC simples para otros genes de virulencia	<i>papAH</i>	<i>papAHF</i> 5'-ATGCCAGTGGTCTTTTGGTG-3'	720	53°C	Agua <sub>buil</sub> 12,5 µl	12		
		<i>papAHR</i> 5'-CGTCCACCACATACGTCTTTC-3'			Buffer 10X			
	<i>fyuA</i>	<i>fyuAF</i> 5'-TGATTAACCCCGGACGGGAA-3'	880	63°C	dNTP's 10 mM			
		<i>fyuAR</i> 5'-CGCAGTAGGCACGATGTTGA-3'			MgCl <sub>2</sub> 50 mM			
	<i>usp</i>	<i>uspF</i> 5'-ATGCTACTGTTCCGGTAGTGTG-3'	1.000	57°C	Cebadores 10 pmol/µl (El par específico del gen a detectar)		2,5 µl	
		<i>uspR</i> 5'-CATCATGTAGTGGGGCGTAACAAT-3'			c/u	2,5 µl		
				<i>Taq</i> polimerasa (5 U/µl)		0,2 µl		

*fimH*: adhesina de la fimbria tipo 1; *fyuA*: *yersiniabactina*; *usp*: proteína específica uropatógena. *KpsMTIIF*: cápsula polisacárida específica del grupo II; *papAH*: fimbria P; *PAI*: marcador de isla de patogenicidad ICFT07; (pb): pares de bases. \*En todos los casos las condiciones de amplificación se iniciaron con 5 min de precalentamiento, posteriormente se aplicaron 30 ciclos de 1 min a 94°C; seguido por 1 min a la temperatura de alineamiento específica para cada juego de cebadores y 1 min a 72°C, una vez cumplidos los 30 ciclos se aplicaron 7 min para la fase de extensión final. Vf: volumen final; Agua<sub>buil</sub>: agua bidestiladaultrapura. Ref: referencia bibliográfica.



**Tabla suplementaria 2. Perfil de resistencia y características genéticas de cepas ECUP estudiadas**

Código de cepa	Perfil de resistencia		Grupo filogenético	Genes de virulencia
	Tipo de $\beta$ -lactamasa*	Resistencia asociada a otros antimicrobianos**		
<b>IAHULA</b>				
LMM-1147	BLEE+MBL	CIP, AK	A	<i>fimH</i>
LMM-1195	BLEE+MBL	CIP, AK	A	<i>fimH</i>
LMM-15131.1	BLEE+KPC	CIP, AK	A	<i>fimH, fyuA, usp</i>
LMM-15131.2	BLEE+KPC	CIP, AK	A	<i>fimH, usp</i>
LMM-1194.3	BLEE+KPC	CIP, AK	B2	<i>fimH, fyuA, KpsMTII</i>
LMM-1199	BLEE	CIP	E	<i>fimH, fyuA, usp</i>
LMM-15494.2	BLEE	CIP, AK, IMP	F	<i>fimH, fyuA, papAH, KpsMTII, PAI</i>
<b>ULE</b>				
A-316	BLEE	CIP, AK, IMP	B2	<i>fimH, fyuA, KpsMTII, PAI, usp</i>
A-099	BLEE	CIP, AK, IMP	B2	<i>fimH, fyuA, KpsMTII,</i>
A-170	BLEE	CIP, AK	B2	<i>fyuA, PAI</i>
A-717	BLEE+MBL	CIP, AK	B2	<i>fimH, fyuA, KpsMTII, usp</i>
A-719	BLEE+KPC	CIP, AK	B2	<i>fimH, fyuA, KpsMTII, PAI, usp</i>
A-967	BLEE	CIP	B2	<i>fimH, fyuA, papAH, KpsMTII,</i>
A-038	BLEE	CIP, AK	E	<i>fyuA, PAI, usp</i>
A-726	BLEE	CIP, AK	E	<i>fimH, fyuA, usp</i>
A-767	BLEE	CIP	E	<i>fyuA, PAI</i>
A-178	BLEE	CIP, AK, IMP	F	<i>fimH, fyuA, papAH, KpsMTII, PAI, usp</i>

\*Detección fenotípica; \*\*Otros antimicrobianos no incluidos en el perfil de hidrólisis de las  $\beta$ -lactamasas detectadas; IAHULA: Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes; ULE: Unidad de Larga Estancia Ambulatorio Venezuela; BLEE:  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido incluye resistencia a penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos, piperacilina/tazobactam, ampicilina/sulbactam y amoxicilina/ácido clavulánico; MBL: metalo  $\beta$ -lactamasas; KPC: *Klebsiella pneumoniae*-carbapenemasa; CIP: ciprofloxacina; AK: amikacina; IMP: imipenem; *fimH*: adhesina de la fimbria tipo 1; *fyuA*: *yersiniabactina*; *usp*: proteína específica uropatógena; *KpsMTII*: cápsula polisacárida específica del grupo II; *papAH*: fimbria P; PAI: marcador de isla de patogenicidad ICFT07.

## Referencias bibliográficas

- 1.- Kumar N, Nahid F, Zahra R. Association of virulence factors, phylogenetic groups and antimicrobial resistance markers in *Escherichia coli* from Badin city, Pakistan. *J Chemother* 2017; 29 (1): 8-13. DOI: 10.1080/1120009X.2016.1154682.
- 2.- Flores-Mireles A, Walker J, Caparon M, Hultgren S. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol* 2015; 13 (5): 269-84. DOI: 10.1038/nrmicro3432.
- 3.- Vimont S, Boyd A, Bleibtreu A, Bens M, Goujon J M, Garry L, et al. The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone 025b:H4-ST131 has high intestine colonization and urinary tract infection abilities. *PLoS ONE* 2012; 7 (9): 1-10. DOI: 10.1371/journal.pone.0046547.
- 4.- López D, Olivero R, Wong R, Aurenty L, Smith S, Nexans M, et al. Prevalencia y mortalidad por infecciones del tracto urinario asociadas a la atención de la salud en pediatría. *Bol Venez Infectol* 2015; 26 (2): 97-103. <http://docs.bvsalud.org/biblioref/2016/07/957/05-lopez-d-97-103.pdf>.
- 5.- Capozzi E, Mobili D, Kornett A, Perdomo M. Etiologic agents of urinary tract infections in older adults from a health center of Carabobo state, Venezuela. *Kasmera* 2016; 44 (1): 35-43. <http://www.scielo.org.ve/pdf/km/v44n1/art06.pdf>.
- 6.- Quijada-Martínez P, Flores-Carrero A, Labrador I, Araque M. Estudio clínico y microbiológico de la infección urinaria asociada a catéter, en los servicios de medicina interna de un hospital universitario venezolano. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 2017; 34 (1): 52-61.
- 7.- Miranda-Estrada L, Ruíz-Rosas M, Molina-López J, Parra-Rojas I, González-Villalobos E, Castro-Alarcón N. Relación entre factores de virulencia, resistencia a antibióticos y los grupos filogenéticos de *Escherichia coli* uropatógena en dos localidades de México. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2017; 35 (7): 426-33. DOI: 10.1016/j.eimc.2016.02.021.
- 8.- 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; 2012 (U): 1-15. DOI: 10.1155/2012/681473.
- 9.- Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66 (10): 4555-8. PMID: 11010916.
- 10.- Chaudhuri R, Henderson I. The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. *Infect Genet Evol* 2012; 12 (2): 214-26. DOI: 10.1016/j.meegid.2012.01.005.
- 11.- Clermont O, Christenson J K, Denamur E, Gordon D M. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep* 2013; 5 (1): 58-65. DOI: 10.1111/1758-2229.12019.
- 12.- Millán Y, Hernández E, Millán B, Araque M. Distribución de grupos filogenéticos y factores de virulencia en cepas de *Escherichia coli* uropatógena productora de  $\beta$ -lactamasa CTX-M-15 aisladas de pacientes de la comunidad en Mérida, Venezuela. *Rev Argent Microbiol* 2014; 46 (3): 175-81. DOI: 10.1016/S0325-7541(14)70069-0.

- 13.- Turret J, Denamur E. Population phylogenomics of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol Spectrum* 2016; 4 (1): 1-20. DOI:10.1128/microbiolspec.UTI-0010-2012.
- 14.- Quijada-Martínez P, Flores-Carrero A, Labrador I, Millán Y, Araque M. Microbiological profile and molecular characterization of multidrug-resistant gram-negative bacilli producing catheter-associated urinary tract infections in the internal medicine services of a Venezuelan university hospital. *Austin J Infect Dis* 2017; 4 (1): 2-8. DOI: ajid-v4-id1030.
- 15.- Varela Y, Millán B, Araque M. Diversidad genética de *Escherichia coli* extra-intestinales productoras de  $\beta$ -lactamasas TEM, SHV y CTX-M asociada a los cuidados de la salud. *Biomédica* 2017; 37 (2): 209-217. DOI:10.7705/biomedica.v37i3.3324
- 16.- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Test; 26th informational supplement. Wayne: CLSI; 2018.
- 17.- Guevara A, De Waard J, Araque M. Detección del gen *bla*<sub>VIM-2</sub> en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de metalo  $\beta$ -lactamasa aisladas en una unidad de cuidados intensivos en Ciudad Bolívar, Venezuela. *Rev Chilena Infectol* 2009; 26 (4): 336-41. DOI:10.4067/S0716-10182009000500005.
- 18.- Nicola F, Nievas J, Smayevsky J. Evaluación de diversos métodos fenotípicos para la detección de carbapenemasas KPC en *Klebsiella pneumoniae*. *Rev Argent Microbiol* 2012; 44 (4): 290-302. DOI: S0325-75412012000400010.
- 19.- Arana D, Rubio M, Alós J. Evolution of antibiotic multiresistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from urinary tract infections: A 12-year analysis (2003-2014) *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2017; 35 (5): 293-8. DOI: 10.1016/j.eimc.2016.02.018.
- 20.- Hernández E, Araque M, Millán Y, Millán B, Vielma S. Prevalencia de  $\beta$ -lactamasa CTX-M-15 en grupos filogenéticos de *Escherichia coli* uropatógena aisladas en pacientes de la comunidad en Mérida, Venezuela. *Invest Clin* 2014; 55 (1): 32-43. DOI: 372937029005.
- 21.- Abreu S, Varela Y, Millán B, Araque M. *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* productoras de beta-lactamasas de espectro extendido, aisladas en pacientes con infección asociada a los cuidados de la salud en un hospital universitario. *Enf Inf Microbiol* 2014; 34 (3): 92-9. DOI: ei-2014/ei143d.
- 22.- Ortega A, Oteo J, Aranzamendi-Zaldumbide M, Bartolomé R, Bou G, Cercenado E, et al. Spanish multicenter study of the epidemiology and mechanisms of amoxicillin clavulanate resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother* 2012; 56 (7): 3576-81. DOI: 10.1128/AAC.06393-11.
- 23.- Montañez-Valverde R, Montenegro-Idrogo J, Arenas-Significación F, Vásquez-Alva R. Infección urinaria alta comunitaria por *Escherichia coli* resistente a ciprofloxacino: características asociadas en pacientes de un hospital nacional en Perú. *An Fac Med* 2015; 76 (4): 385-91. DOI. 10.15381/anales.v76i4.11408.
- 24.- Toval F, Köhler C-D, Vogel U, Wagenlehner F, Mellmann A, Fruth A, et al. Characterization of *Escherichia coli* isolates from hospital inpatients or outpatients with urinary tract infection. *J Clin Microbiol* 2014; 52 (2): 407-18. DOI: 10.1128/JCM.02069-13.
- 25.- Bailey J, Pinyon J. Distribution of human commensal *Escherichia coli* phylogenetic groups Anantham S, Hall R. *J Clin Microbiol* 2010; 48 (9): 3455-6. DOI: 10.1128/JCM.00760-10.
- 26.- Munkhdelger Y, Gunregjav N, Dorjpurev A, Juniichiro N, Sarantuya J. Detection of virulence genes, phylogenetic group and antibiotic resistance of uropathogenic *Escherichia coli* in Mongolia. *Infect Dev Ctries* 2017; 11 (1): 51-7. DOI: 10.3855/jidc.7903.
- 27.- Luo Y, Ma Y, Zhao Q, Wang L, Guo L, Ye L, et al. Similarity and divergence of phylogenies, antimicrobial susceptibilities, and virulence factor profiles of *Escherichia coli* isolates causing recurrent urinary tract infections that persist or result from reinfection. *J Clin Microbiol* 2012; 50 (12): 4002-7. DOI: 10.1128/JCM.02086-12.
- 28.- Crosa J, Walsh C. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002; 66 (2): 223. DOI: 10.1128/mmbr.66.2.223-249.2002.