



Hospital Universitario La Paz

Hospital de Cantoblanco
Hospital Carlos III

 Comunidad de Madrid



**Servicio de
Microbiología
y Parasitología**

IdiPAZ
Instituto de Investigación
Hospital Universitario La Paz

**Pirosecuenciación de SNPs y estudio de
marcadores de virulencia aplicado al análisis
poblacional de aislados extraintestinales de
Escherichia coli.**

TESIS DOCTORAL

F. Natalia Fernández Romero

Director de tesis: **Jesús Mingorance Cruz**

Tutor Académico: **José Berenguer Carlos**

Madrid, 2015

***A los que ya no están y
esperaban este momento***

Agradecimientos

En primer lugar quiero darle las gracias a mi director de tesis y amigo Jesús Mingorance (Mingo!) por todo lo que me ha enseñado, por su infinita paciencia y por creer en mí y animarme cuando perdía la confianza.

También agradecerle la oportunidad y la ayuda, a todo el Servicio de Microbiología del Hospital La Paz y en especial al Jefe de Servicio (y amigo) Dr. Julio García.

A todos los que han contribuido en el desarrollo de esta tesis: Dra. Marta Mora, Dr. Jesús Rodríguez-Baño, Dr. Álvaro Pascual y Dra. Lorena López-Cerero.

A mis compañeras Patry, Natalia, Estefanía, Elena y Alma por el apoyo que siempre me han demostrado y por ayudarme en mis peleas con el ordenador, la bibliografía...bueno vosotras ya lo sabéis.

A nivel personal, les doy las gracias a mis padres Juana y Manolo que me han enseñado a no rendirme y que siempre me han apoyado y creído en mi. A mis hermanos María (Nena) y Juan Manuel (Ganga) y a mi cuñaaaaaoooo Luis, por esos "Amos que tu puedes". A David, porque ha escuchado y aguantado todas mis explicaciones y quejas, porque no ha dejado de animarme ni un segundo y porque cuando me relajaba...me ha puesto las pilas. OS QUIERO MUCHO!

A Pablo porque ha estado desde el inicio y porque esta tesis la he realizado, en parte, gracias a él.

A mis amig@s Inma y Guille por esos ratos de cháchara y de desahogos, por los ánimos mutuos, por esos:"¿Cómo llevas la tesis?" seguidos de resoplidos desoladores. ¡Vamos que esto YA ESTÁ!

GRACIAS A TODOS!



Hospital Universitario La Paz
Hospital de Cantoblanco
Hospital Carlos III



**Servicio de
Microbiología
y Parasitología**



**Pirosecuenciación de SNPs y estudio de
marcadores de virulencia aplicado al análisis
poblacional de aislados extraintestinales de
Escherichia coli.**

TESIS DOCTORAL

F. Natalia Fernández Romero

Madrid, 2015

Índice

Índice

1.INTRODUCCIÓN.....	12
1.1. <i>Escherichia coli</i> : historia y descripción.....	13
1.2.Diversidad genética de <i>E.coli</i>	15
1.3.Patogenicidad de <i>E.coli</i>	19
1.4.Diversidad genética y patogenicidad de <i>E.coli</i>	27
2.OBJETIVOS.....	30
3.MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
3.1.Colección de aislados clínicos de <i>E.coli</i>	33
3.2.Medios, cultivos, tampones y reactivos.....	34
3.3.Purificación de ADN genómico.....	34
3.4.Obtención y almacenamiento de datos.....	35
3.5.Determinación rápida de grupos filogenéticos pro PCR múltiplex.....	36
3.6.Pirosecuenciación y polimorfismos de un solo nucleótido (SNP)	36
3.6.1.Pirosecuenciación.....	36
3.6.2.Selección de SNPs.....	37
3.6.3.Desarrollo del método.....	39
3.6.4.Obtención de perfiles alélicos.....	43
3.7.Selección y análisis de genes de virulencia.....	44
3.7.1.Selección de genes de virulencia.....	44
3.7.2.Estudio de genes de virulencia.....	46
3.7.3.Visualización y análisis de los resultados.....	46
3.8.Análisis de los datos.....	47
4.RESULTADOS.....	49
4.1.Diversidad genética de <i>E.coli</i>	56
4.1.1.Tipificación mediante PCR multiplex.....	56
4.1.2.Tipificación mediante pirosecuenciación de SNPs.....	57
4.2.Análisis de la diversidad del viruloma de <i>E.coli</i>	61
4.2.1.Genes de virulencia.....	61
4.2.1.1.Presencia o ausencia de genes de virulencia.....	61
4.2.1.2.Perfiles de virulencia.....	66
4.2.2.Asociación entre genes de virulencia y grupos filogenéticos.....	69

5.DISCUSIÓN.....	74
5.1.Distribución de la población ExPEC.....	75
5.2.SAPs mayoritarios.....	77
5.2.1.Perfiles alélicos en colecciones ExPEC-LaPaz.....	77
5.2.2.Perfiles alélicos en colección SEPEC-BLEE.....	78
5.2.3.Perfil alélico SAP131.....	79
5.3.Correlación con la clínica	80
5.4.Diversidad genómica de ExPEC	84
6.CONCLUSIONES.....	87
7.REFERENCIAS.....	89
8.ANEXOS.....	107
8.1.Tablas Anexas.....	109
8.2.Publicaciones Propias	112

Abreviaturas

E.coli : *Escherichia coli*

MLEE: Electroforesis de enzimas de múltiples locis (del inglés: **MultiLocus Enzyme Electrophoresis**)

ECOR: Colección de referencia de *Escherichia coli* (del inglés: **Escherichia coli Reference**)

MLST: Secuenciación de Múltiples Loci (del inglés: **Multilocus Sequence Typing**)

ST: Secuencia tipo (del inglés: **Sequence Type**)

SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido (del inglés: **Single Nucleotide Polymorphism**)

PAI: Isla de patogenicidad (del inglés: **Pathogenicity Island**)

EPEC: *Escherichia coli* Enteropatógena (del inglés: **EnteroPathogenic Escherichia coli**)

EHEC: *Escherichia coli* Enterohemorrágica (del inglés: **EnteroHaemorrhagic Escherichia coli**)

HUS: Síndrome Urémico Hemolítico (del inglés: **Hemolytic Uremic Syndrome**)

ETEC: *Escherichia coli* Enterotoxigénica (del inglés **Enterotoxigenic Escherichia coli**)

St: Enterotoxina termoestable (del inglés: **heat-stable enterotoxine**)

Lt: Enterotoxina termosensibles (del inglés: **heat-labile enterotoxine**)

EAEC: *Escherichia coli* Enteroagregativa (del inglés: **EnteroAggregative Escherichia coli**)

EIEC: *Escherichia coli* Enteroinvasivas (del inglés: **EnteroInvasive Escherichia coli**)

DAEC: *Escherichia coli* con Adherencia Difusa (del inglés: **Diffusively Adherent Escherichia coli**)

ExPEC: *Escherichia coli* Patógenas Extraintestinales (del inglés **Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli**)

UPEC: *Escherichia coli* Uropatógenas (del inglés: **Uropathogenic Escherichia coli**)

NMEC: *Escherichia coli* productoras de Meningitis Neonatal (del inglés: **Neonatal Meningitis Escherichia coli**)

SEPEC: *Escherichia coli* Septicémicas (del inglés: **SEPTicemic Escherichia coli**)

BLEE: Betalactamasas de Espectro Extendido

SAP: Perfil Alélico de SNP (del inglés: **SNP Allelic Profile**)

PV: Perfil de Virulencia

Introducción

1.-Introducción

Escherichia coli es una enterobacteria que forma parte de la flora intestinal normal de los mamíferos, incluido el hombre aunque también es capaz de producir infecciones intestinales y extraintestinales. En el ámbito clínico, *E.coli* es el principal microorganismo aislado en muestras urinarias (80-90% de aislados de *E. coli*) [1] y uno de los tres microorganismos más frecuentemente aislados en infecciones de sangre. Se trata, además, de un microorganismo que presenta una gran diversidad genética y ecológica. Durante los últimos sesenta años ha sido probablemente el microorganismo modelo más importante utilizado en diferentes áreas de la Biología, desde la Genética Molecular y la Bioquímica, hasta la Biología de Sistemas y la Biotecnología. Puede decirse que es uno de los seres vivos más ampliamente estudiado y mejor conocido. Pese a ello, todavía existen muchas incógnitas acerca de su papel en los diferentes tipos de infecciones que es capaz de producir.

En este trabajo presentamos un análisis de la diversidad genética de *E. coli* en diferentes colecciones de aislados clínicos extraintestinales, y de la relación entre la fracción conservada del genoma (*core genome*) y la fracción variable de genes de virulencia (*viruloma*).

1.1- *Escherichia coli* : historia y descripción

Escherichia coli fue descrita por primera vez en 1885 por el pediatra Theodor Escherich que aisló la bacteria a partir de heces de neonatos y niños sanos. Se trata de una bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa y no esporulante perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, orden Enterobacteriales, clase Gammaproteobacteria, filo Proteobacteria [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>]. Fenotípicamente es capaz de metabolizar la lactosa y el indol, y presenta actividad lisina-descarboxilasa [3]. Serotípicamente, presenta antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (K) que han sido utilizados para poder diferenciar entre distintas cepas dentro de la especie [4]. Su morfología es bacilar con un tamaño

medio de 2-3 μm de longitud y 1 μm de diámetro [5] pudiendo presentar diferentes estructuras como los flagelos que le proporcionan movilidad (Figura 1).

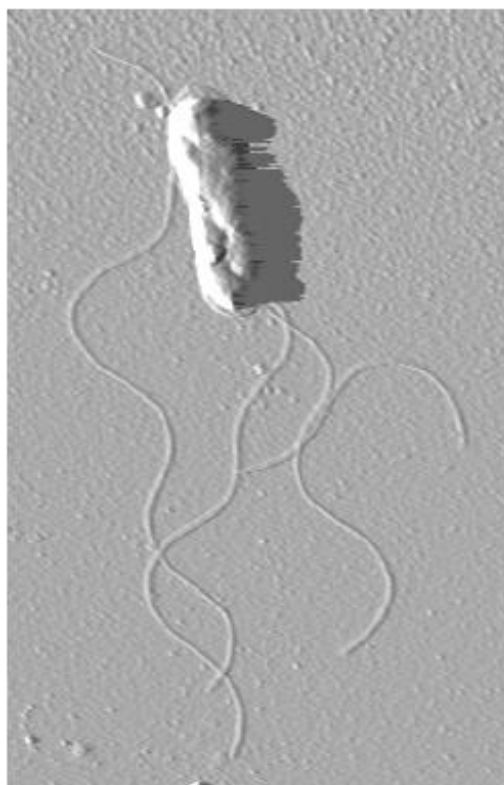


Figura 1: Imagen de microscopía de fuerza atómica (AFM) de una célula de *E. coli* mostrando algunos flagelos. Cortesía de M. Vélez, Instituto de Catálisis y Petroquímica, CSIC).

Su crecimiento es óptimo a 37°C en condiciones aerobias y medio rico en nutrientes (tiempo de duplicación \approx 20 min) y se cultiva con facilidad en el laboratorio. No es una bacteria competente de manera natural aunque en el laboratorio puede manipularse y ser usada en diferentes ensayos de transformación [6]. Su hábitat natural es el intestino de mamíferos y aves, donde puede suponer hasta un 1% del total de la flora intestinal aerobia. Habitualmente se asume que no sobrevive durante mucho tiempo fuera de este medio, y por ello se utiliza como indicador de contaminación fecal de aguas. Sin embargo, recientemente se han descrito cepas ambientales, capaces de crecer y dividirse en suelos y aguas dulces [7] [8].

Genéticamente, posee un único cromosoma circular de ADN bicatenario con un tamaño medio aproximado de 5 Mb, aunque pueden existir variaciones de hasta un 25% entre diferentes cepas. Estas diferencias se deben a una frecuencia

relativamente alta de recombinación y transferencia genética horizontal, principalmente por mecanismos de transducción y conjugación.

El genoma de cada cepa individual está formado por unos 3000 genes que forman el Genoma Conservado (*Core Genome*), que se encuentra en todas las cepas investigadas, el resto difiere en mayor o menor grado, y proviene de un conjunto de unos 16000 genes que forman el pangenoma de *E. coli* (Figura 2) [9] [10] [11][12].

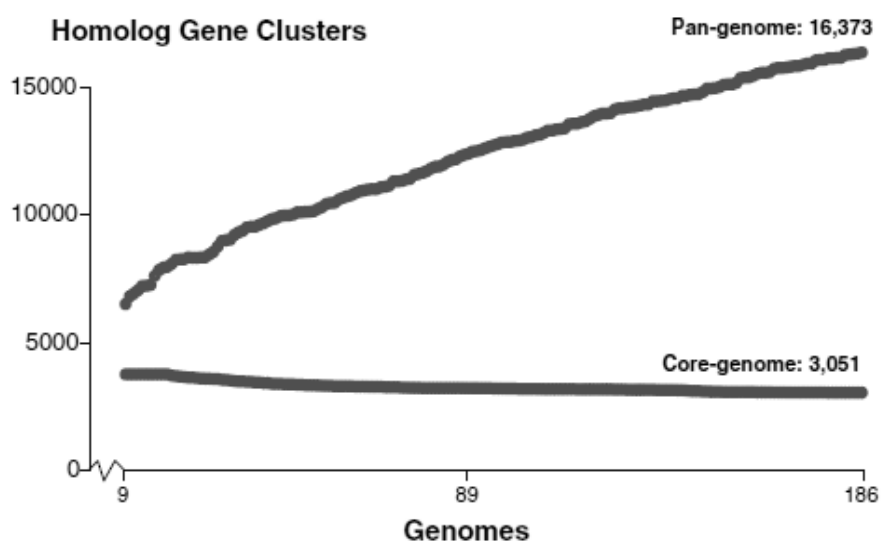


Figura 2: Grafica donde se observa el número de genes nuevos y diferentes según aumenta el número de genomas de *E.coli* secuenciados. Figura del estudio realizado por Kass et al., en 2012 [9].

1.2.-Diversidad Genética de *E. coli*

La diversidad genética de *E. coli* se ha venido estudiando a lo largo de los años mediante diversas técnicas, desde las clásicas de serotipado o fagotipado, hasta las más recientes comparaciones de genomas completos. *Selander et al.*, utilizaron en 1987 la Electroforesis de Enzimas Multilocus (*MultiLocus Enzyme Electrophoresis, MLEE*) para analizar una colección de 72 cepas obtenidas de diversos huéspedes y orígenes geográficos, conocida como colección de referencia de *E. coli* (ECOR) [13].

Este análisis permitió clasificar las cepas en seis grupos principales: A, B₁, B₂, C, D y E. (Figura 3) [14].

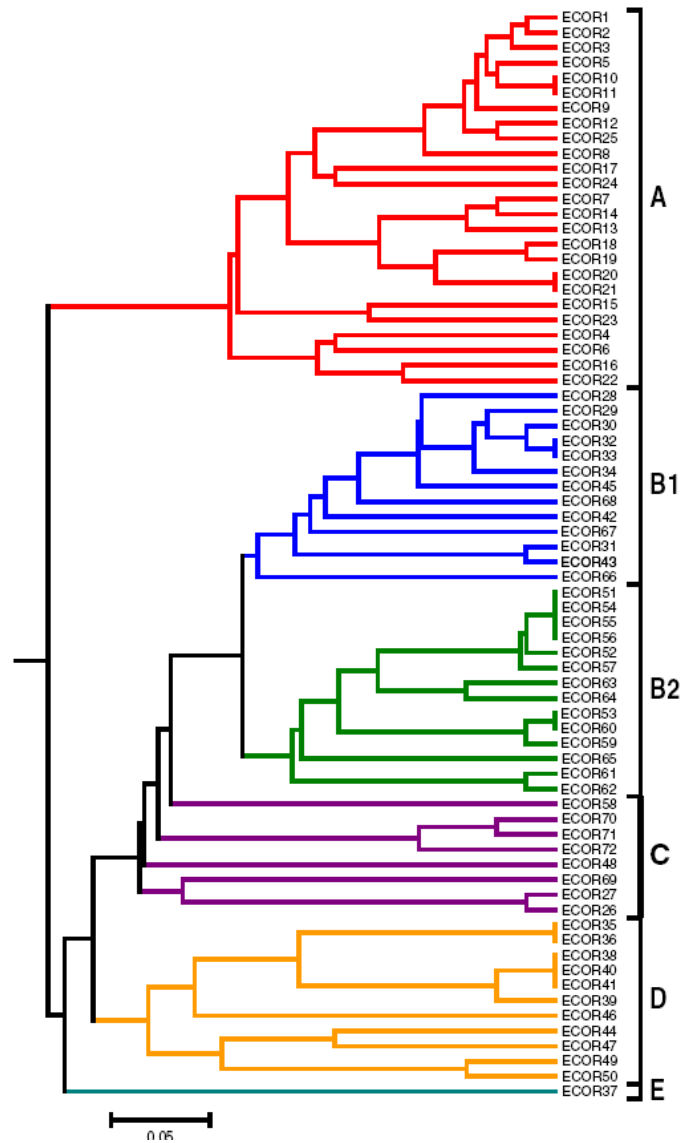


Figura 3: Esquema de la colección ECOR analizada por *Selander et al.*, utilizando la técnica de *MLEE*. [14]

Posteriormente, ésta colección de referencia se ha utilizado en numerosos estudios con diferentes metodologías[15][16] que han confirmado los grupos filogenéticos, aunque en la mayor parte de los estudios hay cuatro grupos principales: A, B₁, B₂, y D.

Clermont *et al.*, en el año 2000 utilizando la presencia o ausencia de tres secuencias de ADN de la parte conservada del genoma de *E.coli* (*chuA*, *yjaA*, *TSPE4.C2*), desarrollaron una PCR multiplex para determinar de manera rápida los cuatro grupos filogenéticos principales. (Figura 4) [17] [18].

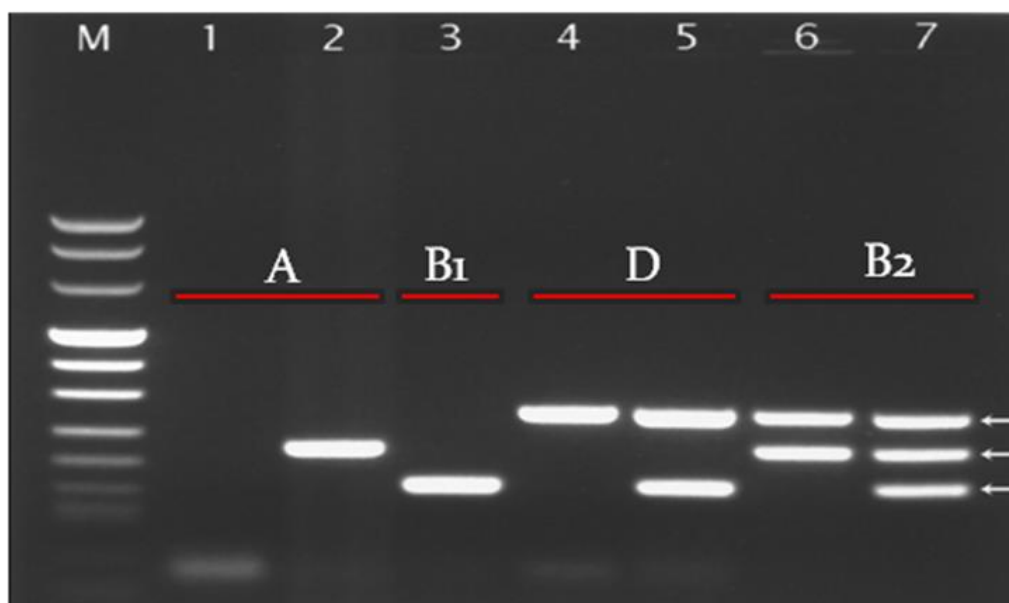


Figura 4: Gel de agarosa mostrando los patrones de bandas obtenidos por PCR multiplex de *E.coli* [17]: los carriles 1 y 2 muestran los patrones correspondientes al grupo filogenético A; el carril 3 representa el patrón del grupo filogenético B1; los carriles 4 y 5 corresponden a los patrones de bandas del grupo filogenético D; los carriles 6 y 7 corresponden a los patrones de bandas del grupo filogenético B1. El carril M corresponde al patrón de peso molecular de 100pb.

Otra técnica utilizada para el estudio de la diversidad genética de los aislados de *E. coli* es la Secuenciación de Múltiples Loci (*Multilocus Sequence Typing, MLST*). Esta técnica se basa en el análisis de la secuencia de una serie de genes conservados dentro de cada especie (genes del metabolismo basal: genes *housekeeping*). A cada secuencia se le asigna un número de alelo, generando para cada cepa un perfil alélico, que corresponde a un Secuenciotipo (*Sequence Type: ST*) [19].

Existen para *E. coli* tres esquemas de MLST diferentes que difieren en los genes *housekeeping* seleccionados [20][21][22]. En los tres casos, la diversidad genética, determinada por análisis de perfiles alélicos, es similar: la población está formada

mayoritariamente por clones aislados y varios complejos clonales relativamente pequeños (Figura 5) [<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>].

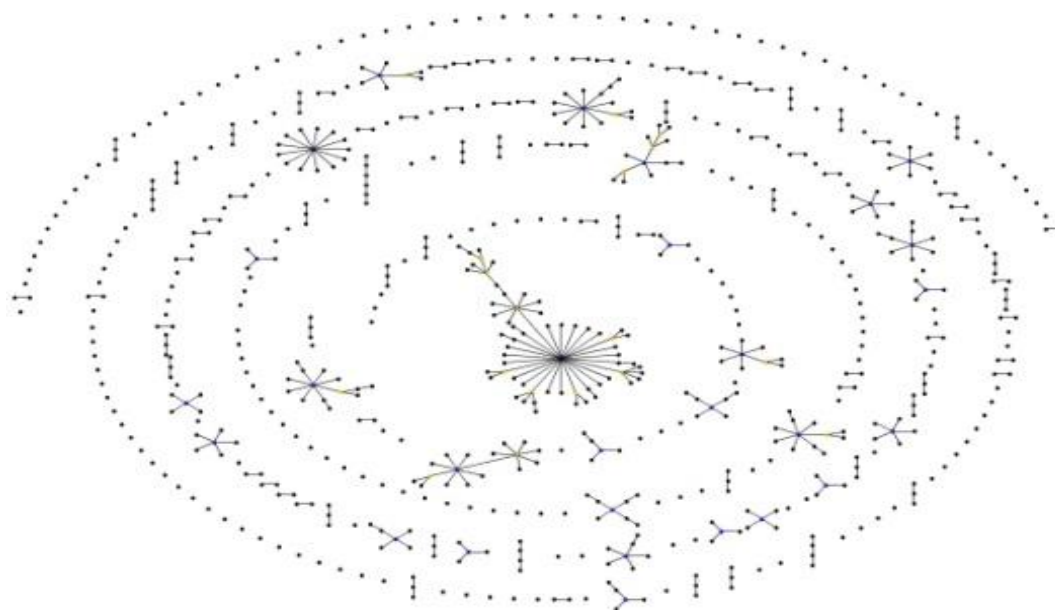


Figura 5: Esquema obtenido utilizando el programa e-BURST sobre el análisis de las diferentes cepas de *E.coli* de la base de datos de MLST de la Universidad de Cork.

Una variante del MLST desarrollada en este laboratorio es la Tipificación Mediante Pirosecuenciación de Polimorfismos de un Sólo Nucleótido (**SNP**: *Single Nucleotide Polymorphism* [24]). En este caso se seleccionan un número pequeño, entre 10 y 20, de SNPs dentro de los siete genes de un esquema MLST. Los SNPs se seleccionan entre las combinaciones de SNPs con mayor índice de discriminación de entre aquellas posiciones que son filogenéticamente informativas. La ventaja que tiene, frente a la secuenciación de *Sanger*, es que permite realizar análisis rápidos y a gran escala, aunque tiene una resolución inferior al MLST. Con este método se obtiene una estructura más clonal de la población, con los cuatro grupos filogenéticos principales bien diferenciados (Figura 6) [24].

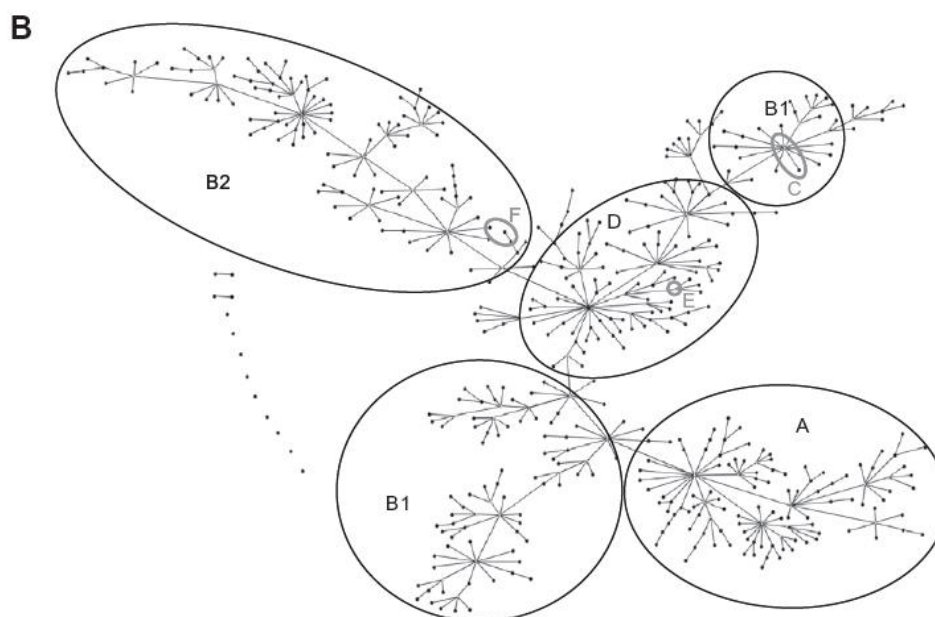


Figura 6: Localización de los principales grupos filogenéticos en la estructura de e-BURST obtenida por el análisis de SNPs de la base de datos de MLST de la Universidad de Cork.

1.3.- Patogenicidad de E. coli

Aunque la mayoría de las cepas de *E. coli* son comensales, existen cepas patógenas [25] que dan lugar a diferentes enfermedades tanto en animales como en el hombre. Diversos estudios muestran que algunas de estas cepas patógenas pueden derivar de cepas comensales que han adquirido de forma horizontal fragmentos cromosómicos o extra-cromosómicos relacionados con virulencia y resistencia a antibióticos (Genes de Virulencia, Islas de Patogenicidad, Plásmidos)[26][27]. Según su patogenicidad, las cepas de *E. coli* pueden clasificarse en tres grandes grupos: Comensales, Patógenos Intestinales y Patógenos Extraintestinales.

***E. coli* Comensales.** Las cepas de *E. coli* pertenecientes a este grupo se encuentran formando parte de la flora intestinal. Como parte de la flora intestinal, *E. coli* puede ser un comensal, o puede formar una relación mutualista con el hospedador proporcionándole algunas vitaminas [28]. Estas cepas coexisten con su hospedador sin producir enfermedad, por lo que se consideran avirulentas o de baja

virulencia, aunque éste es un concepto mal definido, puesto que se basa en la ausencia de evidencia de virulencia.

E. coli Patógenos. Estas cepas pueden formar parte de la flora intestinal pero por diversas razones pueden llegar a causar Infecciones Intestinales o Extraintestinales (Figura 7) [29].

Las cepas causantes de infecciones intestinales pueden ser comensales en las poblaciones de las zonas endémicas, que desarrollan tolerancia, y por tanto sólo afectan a aquellos individuos que entran en contacto con las cepas por primera vez, niños pequeños y viajeros procedentes de zonas no endémicas. También pueden ser comensales de animales, y producen la infección al colonizar a otros huéspedes. Los patógenos intestinales suelen tener mecanismos de patogenicidad y genes de virulencia bien definidos que utilizan para interactuar con la mucosa intestinal.

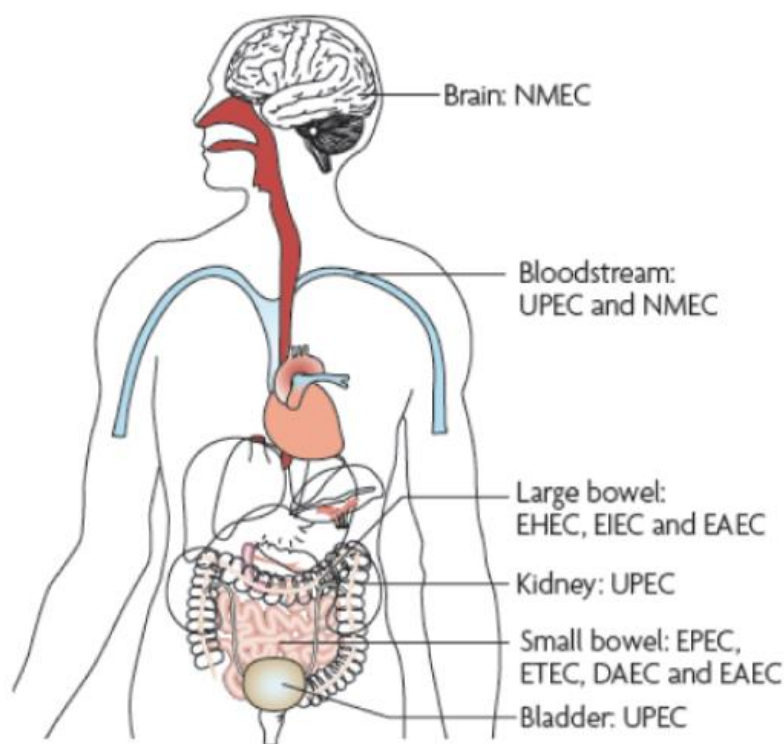


Figura 7: Esquema de las diferentes infecciones que pueden producirse por E.coli patógeno. [29].

Las cepas responsables de las infecciones extraintestinales no están tan bien definidas. En general se trata de cepas comensales, que conviven con el huésped, y aprovechan la caída de alguna barrera de contención, bien física o bien biológica, para invadir el organismo. Se trata por tanto de infecciones oportunistas cuyos mecanismos no están claros y la relación de los genes definidos como virulentos con la virulencia de la infección no es clara. Esto se debe en gran medida a que en la evolución de la infección están involucrados diversos factores del huésped (edad, estado inmunológico, etc.). Por otra parte, los genes de virulencia son un conjunto heterogéneo de genes de funciones muy diversas, implicados en virulencia por estudios de asociación y estudios con modelos animales, con frecuencia sin definirse un mecanismo de virulencia, y en muchos casos no cumpliendo los postulados de Koch. Ensayos con diferentes modelos animales [30] revelan que la eliminación de algunos genes no resulta en una disminución de la virulencia de la bacteria durante la infección. Este fenómeno puede atribuirse al hecho de que las cepas de *E.coli* patógenas presentan múltiples funciones redundantes, que hacen que la relación gen-virulencia, y la definición de estos genes sea todavía controvertida.

Las cepas patógenas de *E.coli*, además de poder poseer genes de virulencia que influyen en el desarrollo y gravedad de la infección, pueden presentar mecanismos de resistencias a antibióticos por adquisición de genes de resistencia o por mutaciones en diferentes genes. Estos genes de resistencia si bien no están implicados en el propio proceso de la infección sí lo están en el desarrollo de la misma y en el tratamiento utilizado para combatirla.

Tanto los genes de virulencia como los genes de resistencia pueden encontrarse en el cromosoma, transfiriéndose de manera vertical, y/o en elementos móviles cromosómicos ó extracromosómicos, como plásmidos, transfiriéndose de manera tanto vertical como horizontal. Algunos genes de virulencia suelen encontrarse en Islas de Patogenicidad (PAIs), zonas del cromosoma en las que se acumulan elementos móviles, genes de resistencia y de virulencia. En la transmisión de plásmidos y PAIs se transfieren múltiples genes de una vez.

Dependiendo de la localización de la infección, el mecanismo de patogenicidad y los genes de virulencia, las cepas patogénicas de *E.coli* se clasifican en:

➤ **Cepas de *E.coli* Patogénicas Intestinales.** Son cepas que se adquieren a través de alimentos o aguas contaminadas dando lugar a gastroenteritis. En la actualidad se reconocen seis tipos diferentes de cepas patogénicas intestinales según su mecanismo de patogenicidad (Figura 8) [29] y genes de virulencia (patotipos):

✓ **Cepas Enteropatógenicas (EPEC; del inglés: *EnteroPathogenic Escherichia coli*):** estas cepas dan lugar a lesiones características en el íleo debido a su mecanismo de acción conocido como *attaching/effacing* (A/E) (Figura 8a). Las cepas de este patotipo son portadoras de la isla de patogenicidad LEE responsable de su mecanismo A/E. [31].

✓ **Cepas Enterohemorrágicas (EHEC; del inglés: *EnteroHaemorrhagic Escherichia coli*):** estas cepas se asocian a colitis hemorrágicas y Síndrome Urémico Hemolítico (HUS). El serotipo más aislado en este tipo de infecciones es *E.coli* O:157. Se caracteriza por la presencia de toxinas Shiga ó Shiga-like (Stx1 y Stx2) responsables del HUS y con gran frecuencia estas cepas portan el plásmido de virulencia pO157 (Figura 8b)[32].

✓ **Cepas Enterotoxigénicas (ETEC; del inglés *Enterotoxigenic Escherichia coli*):** son las principales causantes de diarreas infantiles y diarreas del viajero. Se caracterizan principalmente por presentar genes que codifican dos tipos de enterotoxinas: termoestables (*heat-stable enterotoxins*, STs) y termosensibles (*heat-labile enterotoxine*, LT)[33][34][35] cuya presencia se utiliza para identificar la bacteria en muestras clínicas (Figura 8c).

✓ **Cepas Enteroagregativas (EAEC; del inglés: *EnteroAggregative Escherichia coli*):** considerado como un patógeno emergente, estas cepas son las responsables en segunda línea de las diarreas del viajero, por detrás de los ETEC (Figura 8d). En el año 2011 este patotipo adquirió gran importancia debido al aislamiento del serotipo O:104:H4 que desencadenó [36] la llamada “crisis del pepino español” en la cual más de 4.000 personas en Alemania fueron infectadas al consumir brotes de soja contaminados, y varios centenares murieron a causa de un síndrome hemolítico urémico asociado a la infección.

✓ Cepas Enteroinvasivas (EIEC; del inglés: *Enteroinvasive Escherichia coli*): La virulencia de estas cepas se debe en gran medida a un plásmido de 220Kb que codifica para un sistema de secreción T3SS necesario en la invasión, supervivencia e inducción de apoptosis de los macrófagos por parte de la bacteria que se comporta como un patógeno intracelular obligado.[37][38] (Figura 8e). Dentro de este grupo se encuentra *Shigella* que tiene el mismo mecanismo de patogenicidad que EIEC.

✓ Cepas con Adherencia Difusa (DAEC) (del inglés: *Diffusively Adherent Escherichia coli*): son cepas EAEC con capacidad de adherirse al epitelio intestinal (Figura 8f). La adhesión está mediada por adhesinas tanto del tipo fimbria como no-fimbria. Este patotipo coloniza el intestino delgado y está implicado en diarreas en niños; además pueden ser el responsable de algunas infecciones del tracto urinario en adultos [39].

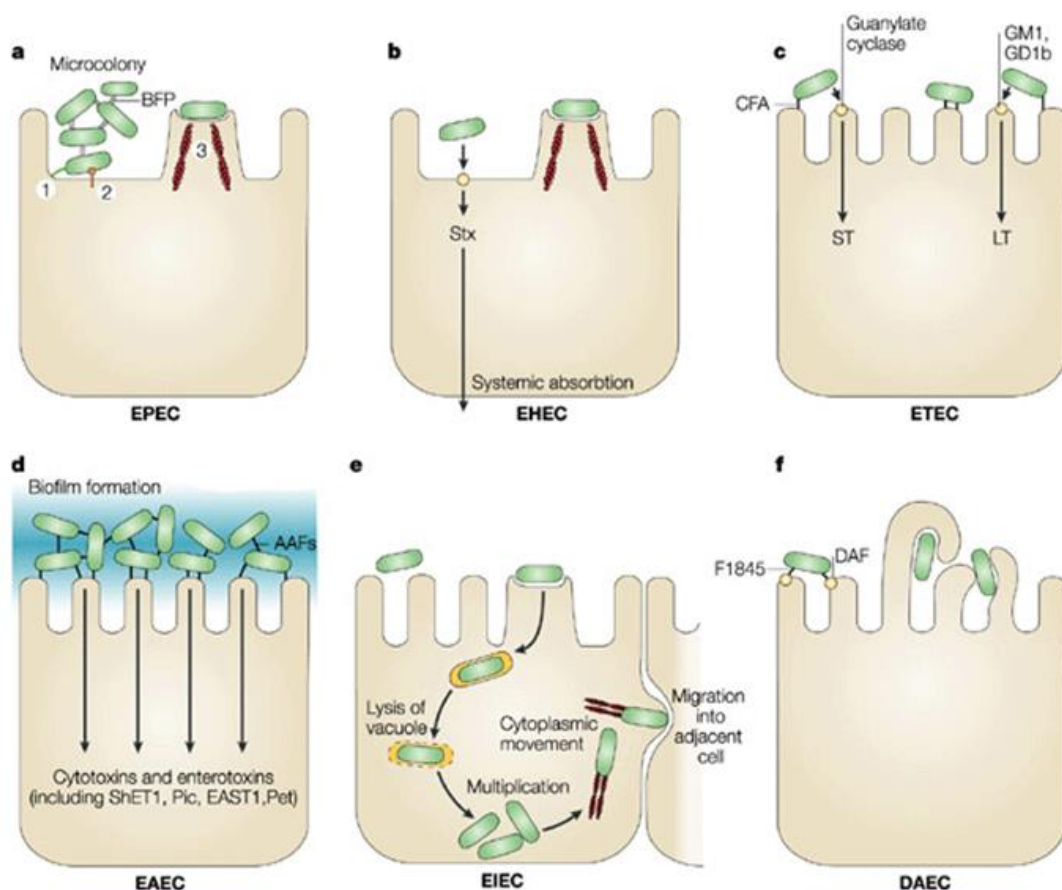


Figura 8: Esquema de los diferentes mecanismos de patogenicidad que se dan en cada patotipo de *E. coli* patógeno intestinal [29].

➤ Cepas de *E. coli* Patógenas Extraintestinales (ExPEC; del inglés *Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli*). Se trata de patógenos oportunistas, que producen infecciones fuera del tracto intestinal, incluyendo infecciones del tracto urinario, intra-abdominales, de tejidos blandos, sangre, meningitis neonatal, osteomielitis y neumonías.

La habilidad de este grupo para causar este tipo de infecciones está relacionada con la presencia y mantenimiento de diferentes genes y sistemas necesarios para sobrevivir y multiplicarse en el tracto urinario o el torrente sanguíneo, como los relacionados con adhesión (p.e. fimbrias P y S), sistemas de adquisición de hierro (p.e. aerobactinas, sideróforos) mecanismos de evasión del sistema inmune (p.e. antígenos capsulares) y producción de toxinas (p.e. hemolisinas) (Tabla 1).

Genes de Virulencia	Implicaciones/Funciones
Adhesinas	
<i>pap C</i>	Unión de las fimbrias P en membrana externa.
<i>pap G allele I</i>	Variante de <i>papG</i> asociada al plásmido J96
<i>pap G allele II</i>	Variante de <i>papG</i> asociada a pielonefritis
<i>pap G allele III</i>	Variante de <i>papG</i> asociada a cistitis
<i>afaB/C</i>	Operón de adhesión de fimbrias
<i>fimH</i>	Fimbria tipo 1
<i>iha</i>	Adhesina de no hemaglutinación
<i>sfa/foc DE</i>	Fimbrias tipo S y tipo F1C
Toxinas	
<i>cdtB</i>	Toxina citoletal
<i>cnf1</i>	Factor necrotizante citotóxico
<i>hlyA</i>	Alfa-hemolisina
<i>sat</i>	Toxina de secreción
<i>usp</i>	Proteína uro-patogénica
Protectinas	
<i>kps MTII</i>	Síntesis polisacárido capsular tipo II
Sideróforos	
<i>iroN</i>	Receptor de sideróforo
<i>ireA</i>	Receptor aerobactina férrica
<i>fyuA</i>	Receptor sideróforo de yersinia
<i>iutA</i>	Biosíntesis aerobactina
<i>iucD</i>	Biosíntesis aerobactina

(Continuación Tabla 1)

Genes de Virulencia	Comentarios/Implicaciones/Funciones
Otros	
<i>malX</i>	Gen marcador de PAI CFT073
<i>svg</i>	
<i>traT</i>	Proteína de membrana externa implicada en supervivencia al suero
<i>cvaC</i>	Colicina tipo V
<i>ibeA</i>	Invasión de endotelio cerebral
<i>ompT</i>	Proteína T de membrana externa

Tabla1: Principales genes de virulencia de *E.coli* patógeno extraintestinal y características de cada uno de ellos.

En la actualidad estos factores se reconocen como Factores de Virulencia Extraintestinales [40] [26] o más comúnmente Genes de Virulencia.

Es importante mencionar que aunque diversos autores han propuesto clasificaciones en patotipos análogas a la de los patógenos intestinales, estas clasificaciones se basan en el órgano infectado, no en los mecanismos involucrados, y no existen genes Patoespecíficos que ayuden a identificar el patotipo responsable de cada infección. Así pues, las cepas extraintestinales se clasifican según el lugar de la infección en:

✓ Cepas de *E.coli* Uropatogénicas (UPEC del inglés: *Uropathogenic Escherichia coli*): Las cepas uropatogénicas de *E. coli* son responsables del 80% de las infecciones del tracto urinario (UTI) [1]. Son de origen intestinal, y la infección se produce por contaminación fecal del tracto urinario, además pueden desplazarse hasta la vejiga para causar cistitis, y llegar incluso al riñón causando pielonefritis [29]. Se conocen muchos genes de virulencia implicados en la patogénesis de las UTIs, como las fimbrias tipo 1 y tipo P (operon *fim* y operon *pap*) implicadas en adhesión y motilidad, o las toxinas de acción citopatogénica (*sat*, *hlyA* y *vat*). [41] (Figura 9a) [29].

✓ Cepas de *E. coli* productoras de Meningitis Neonatal (NMEC del inglés: *Neonatal Meningitis Escherichia coli*): Estas cepas son las más frecuentes en meningitis neonatales causadas por bacterias gram-negativas. El proceso de patogénesis es complejo puesto que la bacteria tiene que entrar en la sangre desde el intestino y traspasar la barrera hematoencefálica (Figura 9b) [29]. Este tipo de infección se

puede producir si el canal del parto de la madre esta colonizado por *E.coli* posibilitando la transmisión de la bacteria al neonato, aunque el hecho de que exista colonización no es sinónimo de infección neonata. Se han encontrado factores de virulencia relacionados con la patogénesis de estas cepas como son *fimH* (pili tipo I), *ompA*, *cnf* e *ibeA*, siendo este último el único con una asociación clara a este tipo de infecciones [42][43][44].

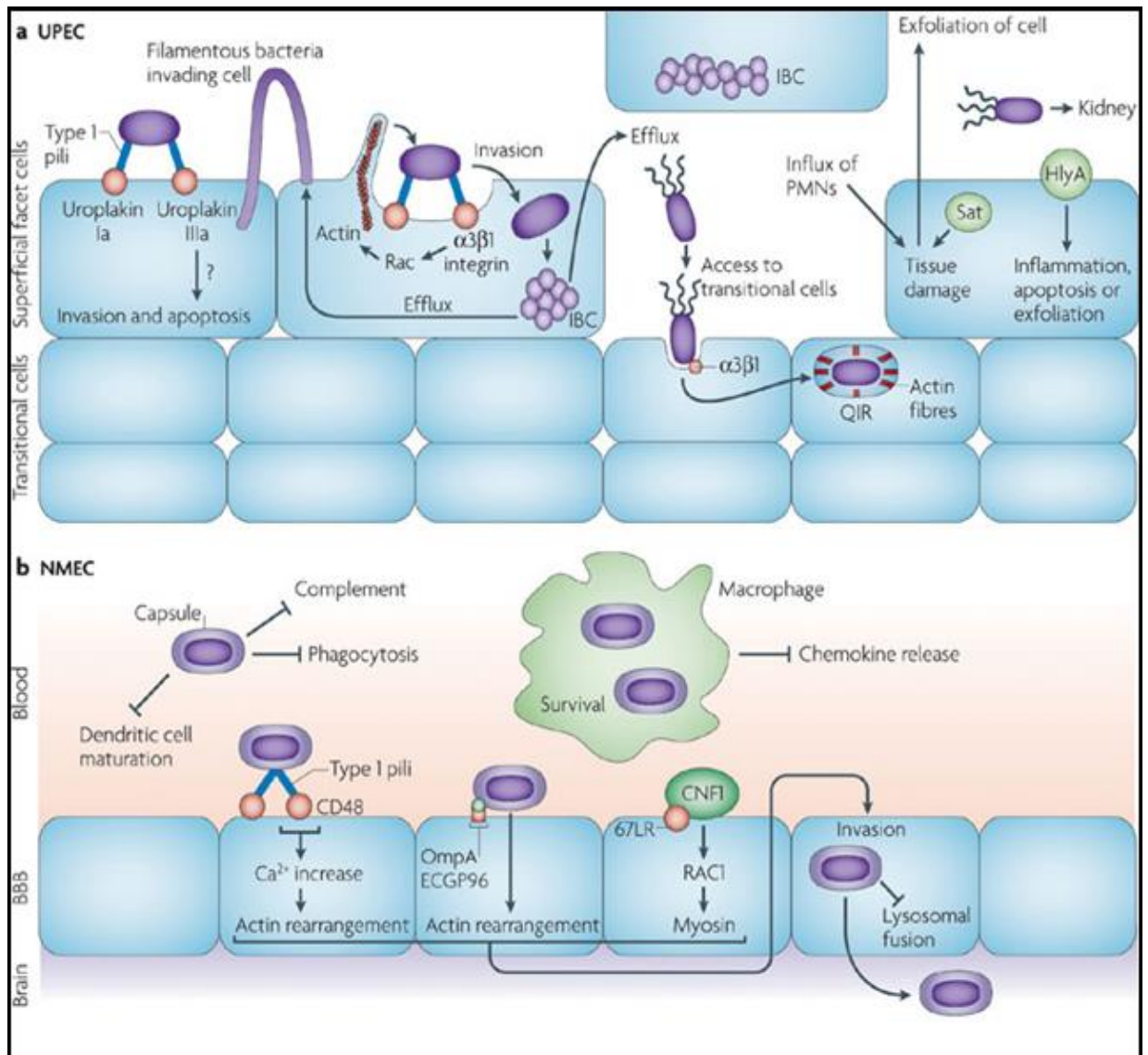


Figura 9: Imágen de los mecanismos de patogenicidad que se dan en (A) *E.coli* Uropatogénico y (B) *E.coli* responsable de la Meningitis Neonatal [29].

✓ Cepas de *E. coli* Septicémicas (SEPEC: del inglés *SE*Pticemic *ES*cherichia *CO*li):

Estas cepas son capaces de penetrar en el torrente sanguíneo y producir bacteriemia. Diversos estudios demuestran que casi la mitad de las bacteriemias en

España son debidas a *E. coli*, y que de éstas, la mitad tienen origen urinario [45][46]. Se han descrito diversos factores de riesgo que favorecen la bacteriemia por *E. coli*, incluyendo tratamientos antibióticos previos, inmunosupresión, uso de catéteres intravenosos, sondas urinarias o tubos de drenaje.

Durante la infección, *E.coli* tiene que sobrevivir en la sangre y resistir al sistema inmune del hospedador [47]. Para la supervivencia de *E.coli* en la sangre son indispensables dos requisitos:

Supervivencia en el suero: El suero tiene acción bactericida y las bacterias tienen diferentes factores involucrados en la resistencia a esta actividad, por ejemplo la cápsula y los lipopolisacáridos bacterianos. Los genes implicados en este proceso son los de la familia *kps* MT que codifican para las enzimas que sintetizan el lipopolisacárido capsular.

Eficiencia en la adquisición de hierro: El hierro es un elemento esencial en el metabolismo bacteriano y aunque en la sangre hay gran cantidad, está en su mayor parte unido a proteínas por lo que el hierro libre es un elemento limitante. Para competir por este elemento las cepas invasivas tienen diferentes sistemas de adquisición de hierro mediados por sideróforos. Los genes responsables de éstos sistemas pueden localizarse cromosómica o extracromosómicamente (plásmido de virulencia ColV) [47][46]. La mayoría de estos genes codifican receptores de sideróforos como los genes *iroN*, *fyuA* o *ireA* [48] [49].

1.4.- Diversidad Genética y Patogenicidad de *E. coli*

Una cuestión importante desde el punto de vista clínico, es si todos los clones son equivalentes o si existen diferencias entre ellos en lo que se refiere a la virulencia. Numerosos estudios publicados han investigado la relación entre filogenia y virulencia. Diferentes análisis [13] [50] muestran, por ejemplo, que las cepas de *E. coli* de los grupos B2 y D son más frecuentes en las infecciones por ExPEC, y que estos dos grupos filogenéticos son también los más virulentos si se define la virulencia por el número de genes de virulencia presentes en el genoma. Por otra parte en las infecciones intestinales se aíslan más frecuentemente cepas de los

grupos A y B1, que presentan un menor número de genes de virulencia [51][48][52][53].

Los aislados patogénicos intestinales presentan una diversidad genética relativamente baja pero no existen asociaciones fuertes entre clones y patotipos. Éstos se diferencian por la presencia de determinados genes de virulencia, y de hecho se utilizan éstos, para su identificación en muestras clínicas. Por otra parte, entre las cepas ExPEC, la diversidad genética es mayor y no hay ninguna asociación clara con el tipo de infección que pueden producir.

El estudio del origen y tipo de infección en las cepas ExPEC no ha proporcionado más claridad a la relación patógeno-infección. Aunque existen unos pocos grupos clonales más relacionados con un tipo de infección, en ningún caso esta relación es estricta pudiendo encontrar aislados pertenecientes a un mismo ST en diferentes tipos de infecciones.

Existen unos pocos STs que se aíslan con más frecuencia en infecciones extraintestinales a nivel mundial y que se conocen como linajes pandémicos [54]. Todos los aislados que se engloban dentro de cada uno de los grupos tienen unas características genéticas comunes como el grupo filogenético, unos genes de virulencia más frecuentes o resistencias a antibióticos específicos [54].

Uno de estos grupos clonales es ST95, que se asocia frecuentemente a cistitis. A este grupo pertenece *E. coli* UTI89, la cepa que se utiliza habitualmente como modelo de este tipo de infecciones. Aunque ST95 tradicionalmente se ha asociado con meningitis neonatal [55][56] existen estudios. [57][58] que demuestran que es el segundo grupo clonal más frecuente en bacteriemias. Genéticamente pertenece al grupo filogenético B2 y los diferentes aislados suelen presentar una serie de genes de virulencia que no son específicos pero sí muy frecuentes entre los aislados de este grupo como son los genes *fimH*, *fimAvMT78*, *papG II*, *iucD*, *iroN*, *kpsM II-K1*, *cvaC*, *iss*, *traT*, *malX*, *usp*, *ytsh*. [59]. Una característica distintiva de este grupo clonal es la baja frecuencia de cepas resistentes a antibióticos; aunque en estudios recientes el número de cepas resistentes pertenecientes a ST95 ha aumentado lo que hace pensar a los investigadores que es un grupo clonal pandémico emergente.

Otro grupo clonal considerado pandémico es ST73. Aunque estas cepas se han relacionado sobre todo con pielonefritis, también son las terceras más frecuentes en bacteriemias [60][61]. Dentro de este grupo está la cepa CFT073, prototipo de pielonefritis aislado por primera vez en sangre de una mujer con infección renal [62]. Genéticamente, las cepas ST73 pertenecen al grupo filogenético B2 y al igual que el grupo ST95, presentan una alta frecuencia de determinados genes de virulencia. Además estas cepas suelen portar el gen CTXM-15, que codifica una betalactamasa de espectro extendido (BLEE) que se ha expandido recientemente por todo el mundo [54].

Pero el grupo clonal considerado en la actualidad pandémico por excelencia es ST131. Este grupo es el principal responsable desde hace algunos años de las infecciones del tracto urinario y bacteriemias tanto en infecciones comunitarias como nosocomiales a nivel mundial [63] aunque también se ha aislado en muestras fecales de individuos sanos [64]. Pese a su gran variabilidad genética de manera general los aislados ST131 son B2 y portadores de BLEEs, principalmente diferentes variantes del gen CTX-M [65]. Son resistentes a fluoroquinolonas por mutaciones de genes cromosomales (*gyrA* y *parC*). En cuanto a la virulencia las cepas prototipo de ST131 tienen una alta frecuencia de genes de adhesión, toxinas y receptores de sideróforos [63][66][66][67].

Pese a la gran cantidad de estudios realizados, hasta la fecha no ha sido posible identificar ningún factor de virulencia como responsable único de la mayor patogenicidad de estos u otros clones ExPEC. En algunos casos, los resultados son incluso contradictorios, tal vez debido al uso de diferentes diseños, o diferentes poblaciones dentro de los estudios. Con frecuencia parece que en las infecciones por ExPEC tiene más peso los factores dependientes del huésped que los dependientes del propio patógeno. Sin embargo, está claro que hay diferencias en frecuencia y virulencia entre los clones aislados y entender las razones de estas diferencias podría ser importante para predecir los riesgos asociados a la infección [68].

Objetivos

2. Objetivos

Los objetivos de este estudio son:

- 1.-**Analizar la diversidad genética y la estructura poblacional del Genoma Núcleo en varias colecciones representativas de ExPEC utilizando pirosecuenciación de SNPs.

- 2.-**Analizar la diversidad genética y la estructura poblacional de la parte del Genoma Variable relacionada con virulencia (Viruloma) en varias colecciones representativas de ExPEC utilizando un conjunto definido de genes de virulencia.

- 3.-**Analizar la relación entre Genoma Núcleo y Viruloma en ExPEC

Materiales y Métodos

3. Materiales y Métodos

3.1.- Colecciones de aislados clínicos de *E. coli*

Se recogieron un total de cinco colecciones de aislados clínicos de *E. coli* de origen extraintestinal.

✓ **Colección SEPEC-I: ExPEC Septicémicos I.**- Colección de 124 aislados de *E. coli* procedentes de hemocultivos positivos obtenidos en el Hospital Universitario La Paz entre los años 2006-2008, recogidos de manera retrospectiva del cepario del Servicio de Microbiología del Hospital.

✓ **Colección UPEC: ExPEC Uropatógenicos (UPEC).**- Colección compuesta por 91 aislados de *E. coli* procedentes de urocultivos positivos ($>10^5$ cfu/ml). Se trata de una serie de aislados consecutivos obtenidos durante las dos primeras semanas de Septiembre de 2008 en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario La Paz de Madrid.

✓ **Colección SEPEC-II: ExPEC Septicémicos II.**- Colección de 148 aislados de *E. coli* procedentes de hemocultivos positivos de pacientes adultos con sospecha de sepsis ingresados durante el período 2010-2011 en el Hospital Universitario la Paz de Madrid. Esta colección se recogió en el marco de un estudio prospectivo en el que se registraron de manera detallada datos clínicos y demográficos de los pacientes (proyecto FIS PI10/00795; Tesis Doctoral Dra. Marta Mora, UAM, 2013) [69] (N=120). De los aislados de esta colección 28 proceden de pacientes del servicio de Nefrología del Hospital Universitario La Paz los cuales no se incluyen en el trabajo asociado al Servicio de Medicina Interna del mismo hospital

Hospital Universitario Virgen Macarena, Sevilla:

✓ **Colección SEPEC-BLEE: ExPEC Septicémicos productores de BLEE.**- Colección compuesta por 197 aislados de *E. coli* procedentes de hemocultivos positivos recogidos en diferentes hospitales españoles durante los años 2004 a 2006 en el

marco de un estudio multicéntrico centralizado en el Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla [70].

✓ **Colección ST131: ExPEC-ST131.-** Colección de ExPEC compuesta por 83 aislados de *E. coli* ST131-O25b y de diversos orígenes (SEPEC y UPEC) procedentes del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla [71]. En esta colección también se incluyen todos los aislados SAP131 de las cuatro colecciones anteriormente mencionadas.

3.2.- Medios de Cultivo, tampones y reactivos

Los aislados fueron sembrados en placas de Agar Sangre. Una colonia de cada placa se resuspendió en 1 ml de medio LB líquido (1:100 p/v de Triptona; 0.5:100 p/v de Extracto de Levadura; 1:100 p/v de NaCl) con glicerol (2:10 v/v) y se almacenó a -80°C.

Las identificaciones y las sensibilidades antibióticas de las cepas del Hospital Universitario La Paz, se determinaron mediante los sistemas Wider (Fco. Soria Melguizo, Madrid, Spain) o Vitek2_ (bioMérieux). La susceptibilidad se interpretó siguiendo los criterios del CLSI vigentes en el momento del aislamiento. La producción metalobetalactamasas se confirmó mediante E-test (bioMérieux).

El ADN bacteriano y los oligonucleótidos utilizados en los diferentes ensayos fueron diluidos en tampón TE 1X (10 mM Tris HCl pH8, 1 mM EDTA) y almacenados a -20°C.

Los geles de agarosa utilizados durante el estudio se hicieron en TAE 1X (1% Agarosa D1 Low EEO-GQT, Pronadisa). El tampón TAE 1X se obtuvo a partir de una dilución de tampón TAE 50X (242g/L Tris Base, 57.5ml/L acético glacial, 100ml/L EDTA pH 8)[72].

3.3.- Purificación de ADN genómico

El ADN genómico de *E. coli* se extrajo utilizando un *kit* comercial (Ultra Clean, Mo Bio). Con un asa de siembra estéril se recogían varias colonias de un cultivo en placa de Agar Sangre y se resuspendían en 1ml de suero salino. La purificación se realizó según el protocolo propio del *kit* que se caracteriza porque la lisis celular se lleva a cabo por abrasión mecánica en tubos con microgranos y agitación fuerte durante 10

minutos (*Vortex Adapter*, Mo Bio). Una vez lisadas las células se purifica el ADN total utilizando columnas de centrifugación con filtros de sílice y se eluye en 50 µl de tampón de elución del *kit* comercial.

El ADN se cuantificó por fluorescencia utilizando el *kit* Quant-iT™ (Invitogen™). Los ADNs obtenidos de cada una de las colecciones se dispusieron en placas maestras de 96 pocillos (92 aislados más dos controles positivos y dos controles negativo) a una concentración de 3-5 ng/µl en TE 1X, y se almacenaron a -20°C para su posterior utilización.

3.4.- Obtención y almacenamiento de datos

Para cada uno de los aislados del hospital La Paz se recogieron datos demográficos y microbiológicos: edad y sexo del paciente, servicio de procedencia y origen de la muestra, y susceptibilidad de la cepa a diferentes grupos de antibióticos_todos ellos proporcionados por el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario la Paz.

Para la colección SEPEC-II se realizó de manera prospectiva una encuesta exhaustiva y se recogieron datos relevantes de la infección y de los pacientes [73]:

- Datos Demográficos.
- Procedencia y lugar de ingreso.
- Enfermedad Subyacente
- Origen de Bacteriemia
- Estado de la infección: Sepsis, Sepsis Grave, Shock Septico.
- Evolución de la infección.

Los datos microbiológicos (Grupo filogenético por PCR múltiple y genes de resistencia a β-Lactámicos) de los diferentes aislados que componen las colecciones procedentes del Hospital Virgen de la Macarena fueron facilitados por la Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas y Microbiología del hospital sevillano descritos en el artículo de Rodríguez-Baño [70].

Todos los datos fueron almacenados en hojas de cálculo Excel para su posterior estudio.

3.5.- Determinación rápida de los grupos filogenéticos por PCR múltiplex.

El grupo filogenético al que pertenece cada aislado, se determinó mediante una PCR múltiplex en la que se utilizan tres pares de oligonucleótidos correspondientes a los genes *chuA* y *yjaA*, y al fragmento *TspE4.C2*. [17]. De esta forma cada aislado se asignó a uno de los cuatro grupos filogenéticos (A, B1, B2 y D) definidos originariamente mediante la técnica de *MLEE*. Las mezclas de reacción contenían tampón de reacción con $MgCl_2$ (*Biotools*) diluido a 1X, los seis oligonucleótidos a una concentración final de 0,2 μ M, mezcla de los cuatro dNTPs a una concentración final de 0,2 μ M, 1,5 U de ADN polimerasa (*Biotools*) y 15-25 ng de ADN en un volumen final de 50 μ l. La reacción de PCR constaba de un paso inicial de desnaturalización, 5 min a 95°C, seguido de 30 ciclos de 20s a 95°C, 20s a 55°C y 30s a 72°C, con un paso final de extensión de 5 min a 72°C.

Para visualizar los fragmentos amplificados se mezclaban 5 μ l del producto de PCR con tampón de carga (0,25% p/v de azul de bromofenol, 30% glicerol y 70% TAE 1X) y se cargaban en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio [72][33], junto con un marcador de peso molecular de 100pb (*Biotools*). La electroforesis se realizaba a 120 V durante 50 min. Para observar el gel se utilizó un transiluminador de luz ultravioleta.

Los grupos filogenéticos de los aislados de la colección BLEE fueron determinados por el grupo del Hospital Virgen Macarena de Sevilla y la Universidad de Sevilla [70].

3.6.- Pirosecuenciación y polimorfismo de un sólo nucleótido (SNP)

3.6.1 Pirosecuenciación

Es una técnica de secuenciación por síntesis con detección en tiempo real [74]. Consiste en una cascada de reacciones enzimáticas acopladas a la incorporación de dNTPs a una cadena creciente de ADN que resultan en la emisión de luz, que es detectada por una cámara CCD. La mezcla de reacción contiene ADN polimerasa, ATP sulfurilasa, luciferasa y apirasa. Los nucleótidos se añaden a la reacción de uno en uno de manera secuencial. La incorporación, mediada por la polimerasa, de un

nucleótido trifosfato a la cadena creciente de ADN libera un grupo pirofosfato (PPi). La ATP sulfurilasa utiliza AMP y el PPi liberado en la reacción anterior para producir ATP. La luciferasa cataliza la conversión de luciferina a oxiluciferina consumiendo ATP y generando luz. La apirasa es una fosfatasa que defosforila los dNTPs no utilizados en cada paso, dejando la reacción lista para el paso siguiente. (Figura 10). La detección de la luz emitida permite establecer el número y orden de los nucleótidos incorporados en la reacción de secuenciación.

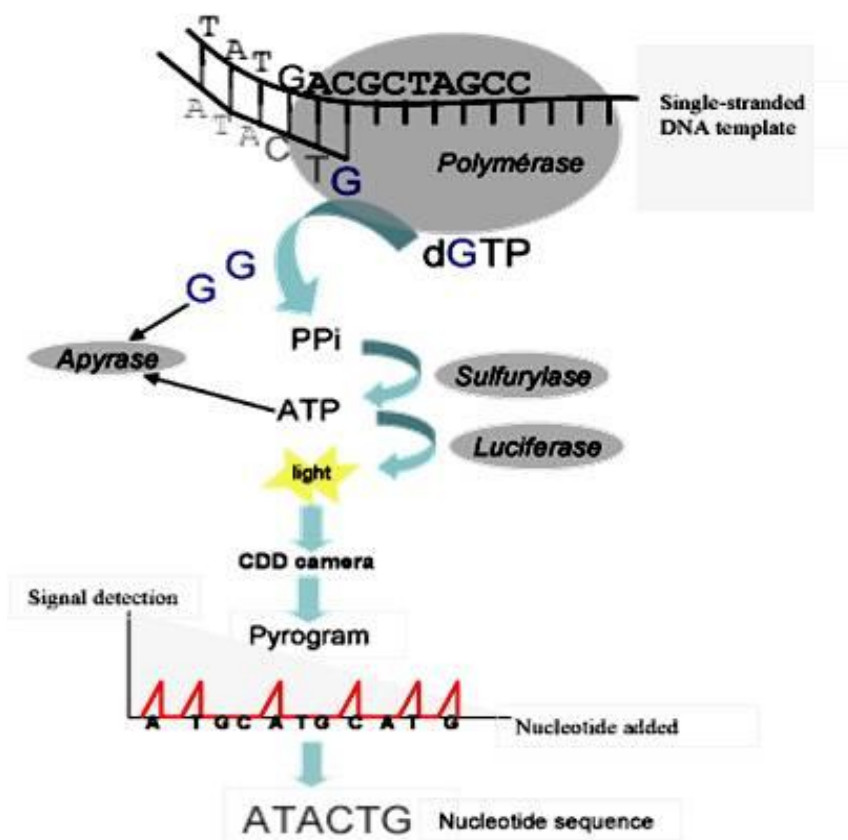


Figura 10: Esquema de la reacción de pirosecuenciación.

3.6.2 Selección de SNPs.

Para seleccionar los SNPs se utilizó como esquema de *MLST* de referencia el desarrollado por *Mark Achtman* en el Instituto *Max Planck*, en Alemania, y actualmente mantenida en la Universidad de Warwick, Reino Unido [23] (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>).

En este esquema se utilizan los genes: *adk*, *icd*, *mdh*, *gyrB*, *fumC*, *recA* y *purA*, que codifican funciones esenciales y están presentes en todas las cepas, además se encuentran uniformemente distribuidos por el genoma de *E. coli*. Las secuencias de éstos genes se descargaron de la base de datos y se concatenaron con un *script* de *Perl* diseñado para este propósito, se eliminaron las secuencias incompletas, y se obtuvo un alineamiento múltiple. Cuando las secuencias fueron descargadas la base de datos contenía 663 secuencias tipo (ST) (May, 2007), por lo que la descarga de datos se volvió a hacer al final del estudio (2013). Con el programa MEGA4 [<http://www.megasoftware.net>] se seleccionaron las posiciones filogenéticamente informativas (P_i s), que son aquellas en las que hay al menos dos nucleótidos diferentes y cada variación aparece al menos dos veces en la base de datos. Se extrajeron estas posiciones (P_i s/SNPs) y mediante el programa SNPT (<http://www.shigatox.net/cgi-bin/stec/snpt>) se calculó la capacidad de discriminación de diferentes combinaciones de SNPs con el objetivo de seleccionar el grupo mínimo de SNPs que aporte la mayor información posible. A partir de un determinado número de SNPs combinados, la discriminación va aumentando muy lentamente (Figura 11).

Para determinar el número de SNPs/ P_i s se buscó un compromiso entre minimizar el esfuerzo manteniendo el máximo poder de discriminación posible. De esta manera se seleccionaron 14 P_i s: 4 SNPs para *purA*, 3 SNPs para *gyrB*, 2 SNPs para *icd*, *recA* y un SNP para *adk*, *fumC* y *mdh* (Tabla2).

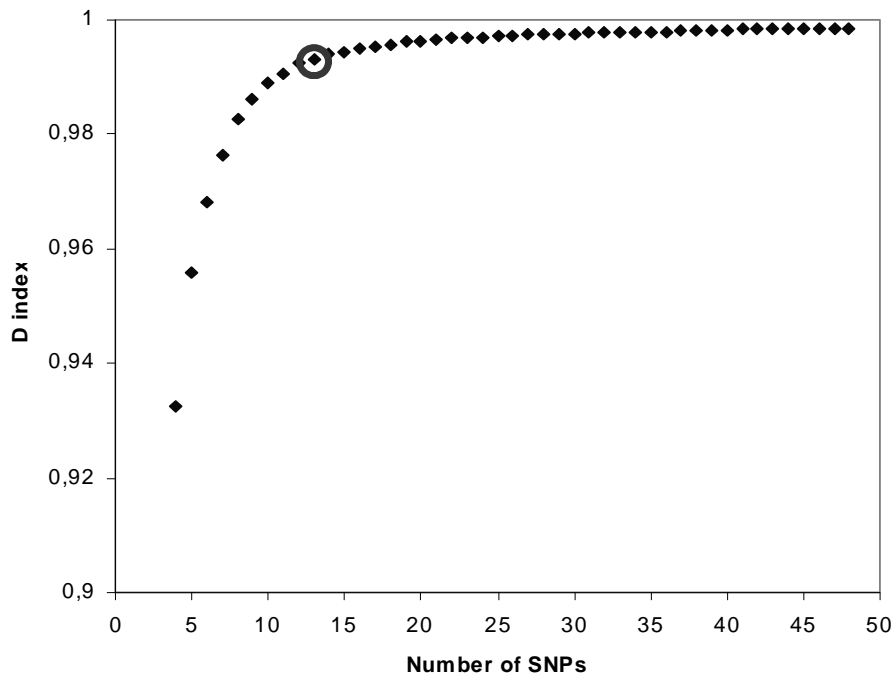


Figura 11: Gráfico que muestra el Índice de discriminación D máximo para cada número de combinaciones frente al número de SNPs combinados.

3.6.3 Desarrollo del método

Para la lectura de SNPs mediante pirosecuenciación se diseñaron, con la ayuda del programa informático *PSQ assay design* (incluido en el paquete *Pyromark*) tres oligonucleótidos por SNP: dos para la reacción de PCR y uno para la de Secuenciación. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por la casa comercial *Sigma GENOSYS* (Tabla 2). Uno de los oligonucleótidos utilizados en la reacción de PCR debe de estar biotinilado en posición 5' para purificar la hebra molde necesaria para la reacción de pirosecuenciación (Figura 12).

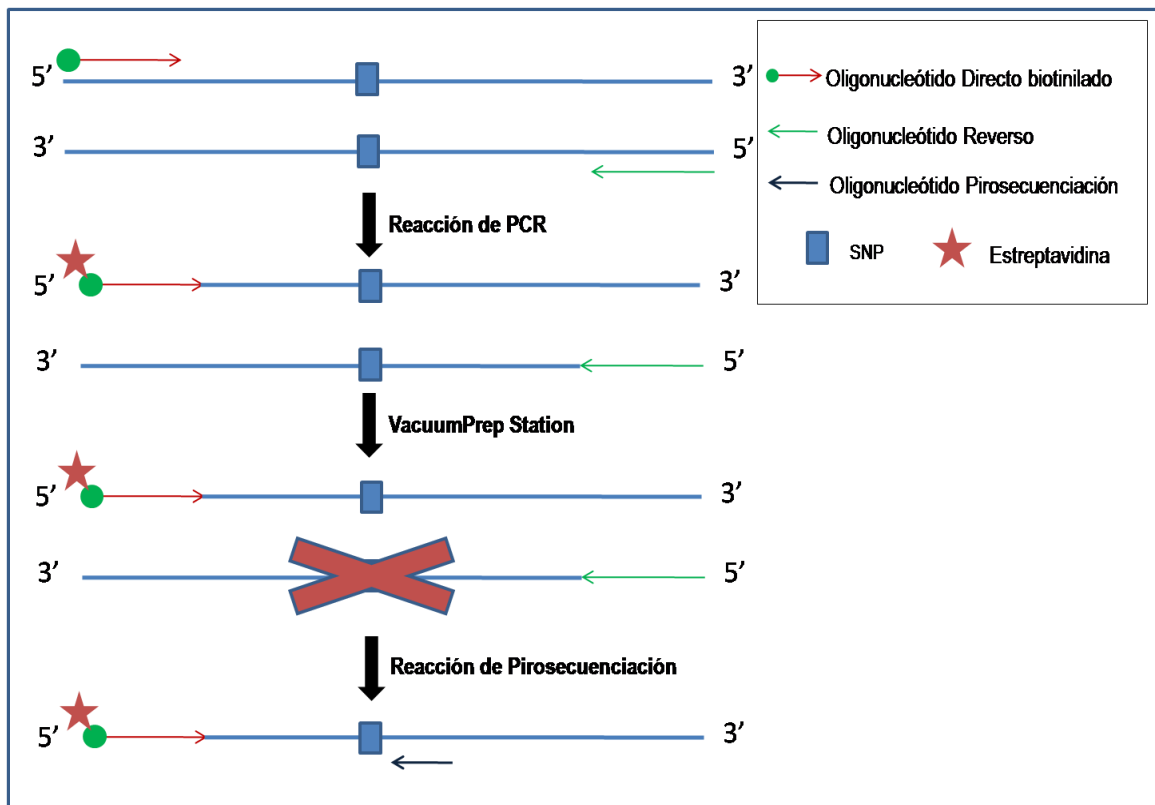


Figura 12: Esquema de las posiciones de los oligonucleótidos y su utilización en la reacción de pirosecuenciación.

Las reacciones de amplificación de cada uno de los SNPs se realizaron en placas de 96 pocillos. La mezcla de reacción contenía tampón de reacción 1X con $MgCl_2$ (*Biotoools*), los dos oligonucleótidos a $0,2\mu M$ concentración final, dNTPs (*Biotoools*) a $0,2\mu M$ concentración final, 1,5 U de ADN polimerasa-Ultratools (*Biotoools*) y 15-25 ng (5 μl) de ADN en un volumen final de 50 μl . Las placas se mantenían en frío durante la preparación. La placa maestra contenía el ADN bacteriano y dos pocillos de controles negativos. Las placas se calentaban 5 minutos a $95^\circ C$ antes de dispensar las muestras en las placas de reacción. Las reacciones de PCR constaban de: etapa inicial de 5 min a $95^\circ C$; 30 ciclos de 20s a $95^\circ C$, 20s a la temperatura de anillamiento (T_a)(Tabla2) de cada par de oligonucleótidos y 30s a $72^\circ C$, y una etapa final de 5 min a $72^\circ C$.

Gen	Oligonucleótidos PCR	Oligonucleótido Pirosecuenciación	T _m (°C)
<i>adk2</i>	F: 5'AAGAAGCGGGCATCAATGTT 3'	5'AACTGATYGTTGAYCGTAT 3'	56
	R: 5'TCGGCGGRITGAATTTAACG 3'*		
<i>fumC1</i>	F: 5'ACCCTAACGATGACGTGAACAAA 3'*	5'GCTTGCGCAGCGCCA 3'	44
	R: 5'AGGGTTTTAAGCTGCGGAATGA 3'		
<i>gyrB1</i>	F: 5'TGTCGCAAAAACCTGGAGCTG 3'	5'CACGGTGTACCGCAG 3'	44
	R: 5'ATGGTGCCGGTTTTTTTCAGTC 3'*		
<i>gyrB2</i>	F: 5'GGCGAGACTGAAAAAACCG 3'*	5'ATGGTGAARGTTTTCRAGGCT 3'	54
	R: 5'CATAGTGGAAGTGGTCTTCT 3'		
<i>gyrB3</i>	F: 5'ACTATGAAGGCGGCATCAARGCGTT 3'	5'CGAATATCTTCTACTTCTCC 3'	56
	R: 5'TTCGACGCCRATACCRTCTTTT 3'*		
<i>icd1</i>	F: 5'CGGTGAAAAATCCACACAGGTT 3'	5'ACACAGGTTTAYGGTCAG 3'	54
	R: 5'ACGCAGGCAGATGTAGAGATCC 3'*		
<i>icd2</i>	F: 5'AGCCGGTTAAACACCCTGAA 3'	5'GGTATTAAGCCGTGTTC 3'	54
	R: 5'GCTGCACGAACCAGACGTTT 3'*		
<i>mdh</i>	F: 5'TTATTGGYGGTCACTCTGG 3'	5'AGAACGCRGGTACTG 3'	44
	R: 5'CCATAGACAGGGTTGCMGACCCG 3'*		
<i>purA1</i>	F: 5'CCTGCTTATGAAGATAAAGT 3'	5'CCTGCTTATGAAGATAAAGT 3'	44
	R: 5'TAATCAACCGCTTCAGCKTTGTAG 3'*		
<i>purA2</i>	F: 5'CTATGGTGGTTGAYGTTTCTGA 3'	5'TGGTTGAYGTTTCTGA 3'	54
	R: 5'AGCAGTGGTGTGGAAGAWGTTAC 3'*		
<i>purA3</i>	F: 5'CTGGATATCGACCACGGYACWTATCCG 3'	5'GCGTTATGTTGATTAYGTT 3'	56
	R: 5'CACGAGTGGAGTAAGCTTTGAG 3'*		
<i>purA4</i>	F: 5'CCGCGTTATGTTGATTAYGTTCTG 3'	5'GGTATCCTCAAAGCTTACT 3'	56
	R: 5'TACCCTGCTTGCAGAGGAACT3'*		
<i>recA1</i>	F: 5'AGCAGGCACTGGAAATCTGT 3'	5'GCACTGGAAATCTGTGA 3'	58
	R: 5'CAAGGCCCATGTGAGAGTC 3'*		
<i>recA2</i>	F: 5'TATCGGCGCGGTGAAAGAG 3'	5'TGAAGAACAAAATCGCT 3'	58
	R: 5'GCCGTAGAAGTTGATACCTTCGC 3'*		

Tabla 2: Secuencias de los oligonucleótidos para cada uno de los SNPs y temperaturas de anillamiento de cada PCR. * Oligonucleótido Biotinilado.

La amplificación se verificaba mediante electroforesis en gel de agarosa y a continuación se realizaba la reacción de pirosecuenciación siguiendo las instrucciones del fabricante (*PyroMark ID*, *Qiagen*). Para purificar la cadena de ADN biotinilada, se mezclaban 40 µl de producto de PCR con tampón de unión y resina de cromatografía estreptavidina-Sepharose®. A continuación utilizando un sistema de vacío (*VacuumPrep Station*) se recogía la resina sobre un filtro y se eliminaba la cadena de ADN no biotinilada lavando 15s en Etanol Absoluto, 10s en NaOH 1M y finalmente 20s en tampón neutralizador (Tris-base 6:100 p/v, Ácido Acético 4M 8:100 v/v), por último se recogía la resina en placas de secuenciación de 96 pocillos conteniendo tampón de anillamiento (*Qiagen*), y se añadía el oligonucleótido de

secuenciación (2µM concentración final). Este oligonucleótido está diseñado para hibridar sobre la cadena biotinilada (Figura 12).

Para cada SNP se diseñó un programa de dispensación de nucleótidos específico que incluye un primer nucleótido de control negativo, entre 1 y 3 nucleótidos no variables anteriores al SNP, los nucleótidos posibles en el SNP, nucleótido de control negativo y dos o tres nucleótidos para las posiciones posteriores al SNP (Tabla 3 y Figura 13). Los controles negativos y positivos permiten establecer la línea base y la altura del pico producido por la incorporación de un nucleótido. Los resultados son analizados por el programa informático *PyroMark* asociado al pirosecuenciador.

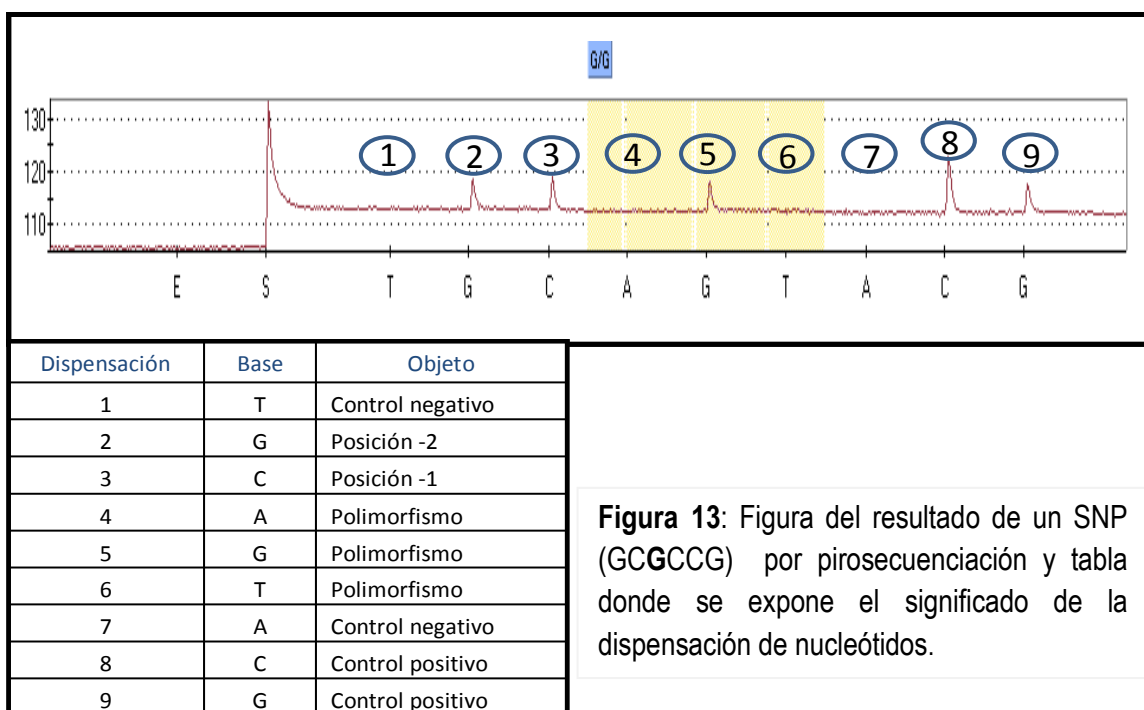


Figura 13: Figura del resultado de un SNP (GCGCCG) por pirosecuenciación y tabla donde se expone el significado de la dispensación de nucleótidos.

Los resultados obtenidos por el pirosecuenciador se verificaron mediante secuenciación de *Sanger* de los genes del *MLST* en 10 aislados seleccionados al azar de las colecciones SEPEC-I (6 aislados) y UPEC (4 aislados).

3.6.4 Obtención de perfiles alélicos.

El número de SNPs seleccionados en cada gen oscila entre 1 y 4. Las variantes que se pueden encontrar dentro de cada SNP se muestran en la Tabla 3.

SNP	Secuencia de SNP
<i>adk1</i>	ACCAG/ATTTGC
<i>adk2</i>	T/CGTC/A/T/GGGT/CCGCC
<i>fumC1</i>	G/C/TAGC/TG
<i>fumC2</i>	G/ATCCTGC
<i>gyrB1</i>	GCC/T/GCCGC/TTGGC
<i>gyrB2</i>	G/T/A/CGGCCAG
<i>gyrB3</i>	AC C/T GAAAAAAG
<i>icd1</i>	GAT/CGTC
<i>icd2</i>	G/T/AGAAGAA
<i>mdh</i>	AG/AGTGGTTGAA
<i>purA1</i>	G/AGCACGT
<i>purA2</i>	C/T/GCTGCTC
<i>purA3</i>	C/TTGGGTA
<i>purA4</i>	CC/A/TACTCG
<i>recA1</i>	C/TGCCCTGGC
<i>recA2</i>	A/G/TCCGTTT

Tabla 3: Orden de dispensación y secuencia a identificar de cada uno de los SNPs utilizados en el estudio. En color rojo bases que se pueden dar dentro de cada SNP.

Los SNPs de cada gen conforman un alelo que se designó con un número. El conjunto de alelos de cada uno de los siete genes en cada cepa conforman su perfil alélico que se denominó SAP (*SNP Allelic Profile*) (Tabla 4). Al utilizar sólo una fracción de las posiciones variables del esquema *MLST* se pierde información, y cada SAP puede englobar varios ST. Para evitar confusiones se optó por no introducir una numeración nueva, y se asignó el número del ST más bajo contenido en el perfil. Dado que los STs se numeran por orden de llegada a la base de datos, los números más bajos suelen corresponder a las cepas más frecuentes.

GEN	adk	fumC	gyrB			icd		mdh	purA				recA	
SNPs	adk2	fumC1	gyrB1	gyrB2	gyrB3	icd1	icd2	mdh	purA1	purA2	purA3	purA4	recA1	recA2
N1	C	G	C	C	T	C	G	A	A	C	C	C	C	G
Perfil alélico	2	2	8			2		1	2				2	

Tabla 4: Ejemplo de la obtención de un perfil alélico.

3.7.- Selección y análisis de genes de virulencia

3.7.1 Selección de Genes de Virulencia

La selección se realizó en base a la bibliografía revisada utilizando para el estudio aquellos genes de virulencia identificados con mayor frecuencia en infecciones del tracto urinario e infecciones de sangre [48][77-85] Estos genes están relacionados con diversas funciones, incluyendo adhesión, obtención de hierro, secreción de toxinas y otros factores relacionados con la patogenicidad de la cepa (Tabla 5).

Genes de Virulencia	Oligonucleótidos	Tm(°C)	Amplicón (pb)	Referencia
Adhesinas				
<i>pap C</i>	F: GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG	58	328	[77]
	R: ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA			
<i>pap G allele I</i>	F: CAACCTGCTCTCAATCTTACTG	50	692	[78]
	R: CATGGCTGGTTGTTCTAAACAT			
<i>pap G allele II</i>	F: GGAATGTGGTGATTAACAAGG	58	562	[78]
	R: TCCAGAGACTGTTCAAGAAGGAC			
<i>pap G allele III</i>	F: CATGGCTGGTTGTTCTAAACAT	58	421	[78]
	R: TCCAGAGACTGTGCAGAAGGAC			

(Continuación Tabla 5)

Genes de Virulencia	Oligonucleótidos	Tm(°C)	Amplicón (pb)	Referencia
Adhesinas				
<i>afaB/C</i>	F: GCTGGGCAGCAAAGTATAACTCTC	58	750	[77]
	R: CATCAAGCTGTTTGTTCGTCGCCG			
<i>fimH</i>	F: TGCAGAACGGATAAGCCGTGG	58	508	[48]
	R: GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA			
<i>iha</i>	F: CTGGCGGAGGCTCTGAGATCA	58	827	[48]
	R: TCCTTAAGCTCCCGCGGCTGA			
<i>sfa/foc DE</i>	F: CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	58	410	[77]
	R: CTCCGGAGAAGTGGGTGCATCTTAC			
Toxinas				
<i>cdtB</i>	F1: GAAAGTAAATGGAATATAAATGTCCG	50	430	[48]
	R1: AAATCACCAAGAATCATCCAGTTA			
	F2: GAAAGTAAATGGAACACACATGTCCG			
	R2: AAATCTCCTGCAATCATCCAGTTA			
<i>cnf1</i>	F: GAACTTATTAAGGATAGT	45	543	[79]
	R: CATTATTTATAACGCTG			
<i>hlyA</i>	F: AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	58	1177	[80]
	R: ACCATATAAGCGGTCATTCCCCTCA			
<i>sat</i>	F: GTTGTCTCTGGCTGTTGC	54	501	[81]
	R: CATCAGACGATAAGCATGAGCA			
<i>usp</i>	F: ATGCTACTGTTTCCGGGTAGTGTGT	58	805	[82]
	R: ACCTCCAGCCACAGCGCCTC (*)			
Protectinas				
<i>kps MTII</i>	F: GCGCATTTGCTGATACTGTTG	58	272	[48]
	R: CATCAGACGATAAGCATGAGCA			

(Continuación Tabla 5)

Genes de Virulencia	Oligonucleótidos	Tm(°C)	Amplicón (pb)	Referencia
Sideróforos				
<i>iroN</i>	F: AAGTCAAAGCAAGGGTTGCCCG	58	667	[48]
	R: GACGCCGACATTAAGACGCAG			
<i>ireA</i>	F: TCTGATAAAAAAGAAGATACG	45	1971	[83]
	R: GAAGGATACTCTTACATT			
<i>fyuA</i>	F: TGATTAACCCCGCGACGGGAA	58	880	[48]
	R: CGCAGTAGGCACGATGTTGTA			
<i>iutA</i>	F: GGCTGGACATCATGGGAACTGG	58	302	[48]
	R: CGTCGGGAACGGGTAGAATCG			
<i>iucD</i>	F:TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT	58	602	[80]
	R:AATATCTTCCTCCAGTCCGGAGAAG			
Otros				
<i>malX</i>	F: GCGATCGGCCAACCTGTTCT	54	429	[84]
	R: CGGTTCCGGCTGTGATTGGTG			
<i>svg</i>	F: TCCGGCTGATTACAAACCAAC	54	434	[85]
	R: CTGCACGAGGTTGTAGTCCTG			
<i>traT</i>	F: GGTGTGGTGCATGAGCACAG	58	290	[48]
	R: CACGGTTCAGCCATCCCTGAG			
<i>cvaC</i>	F: CACACACAAACGGGAGCTGTT	58	680	[48]
	R: CTTCCCGCAGCATAGTTCCAT			
<i>ibeA</i>	F: AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC	58	170	[48]
	R: TGGTGCTCCGGCAAACCATGC			
<i>ompT</i>	F: ATCTAGCCGAAGAAGGAGGC	58	559	[48]
	R: CCCGGGTCATAGTGTTCATC			

Tabla 5: Tabla de Genes de Virulencia utilizados en el estudio de la parte Variable de las poblaciones ExPEC. (*): Diseñado en nuestro estudio.

3.7.2 Estudio de genes de virulencia.

Para determinar el potencial de virulencia de los diferentes aislados de todas las colecciones en estudio, se determinó mediante PCR la presencia o ausencia de estos genes de virulencia sobre todas las colecciones ExPEC.

La mezcla de reacción se preparaba con tampón de reacción con MgCl₂ (*Biotoools*), 0,2 μM concentración final de cada uno de los oligonucleótidos, 0,2 μM concentración final de dNTPs (*Biotoools*), 1,5 U de ADN polimerasa (*Biotoools*) y 15-25 ng (5 μl) de ADN en un volumen final de 50 μl. Las reacciones se realizaban en placas de 96 pocillos donde además de los aislados clínicos en estudio se utilizaban cuatro pocillos de controles negativos y cuatro de controles positivos.

La reacción de amplificación constaba de: etapa inicial de 5 min a 95°C; 30 ciclos de 30s a 95°C, 30s a Ta correspondiente a cada par de oligonucleótidos (Tabla 5) y 1min a 72°C, y una etapa final de 5 min a 72°C.

3.7.3 Visualización y análisis de resultados

La visualización de los fragmentos amplificados se realizó utilizando geles de agarosa 1% para 96 muestras (*VG-FAST, Fisher Bioblock Scientific*). La electroforesis se realizaba a 95V durante 50 min a temperatura ambiente.

En una hoja Excel se anotaba la presencia (1) o ausencia (0) de cada gen de virulencia en cada uno de los aislados. Concatenando los valores de todos los genes se obtenía un perfil numérico, el perfil de virulencia (PV) que se utilizaba para comparar las colecciones ExPEC en estudio.

3.8.-Análisis de los datos

Para analizar las posibles diferencias entre las colecciones ExPEC de este estudio, se utilizó el test de Fisher [<http://graphpad.com/quickcalcs>].

Las relaciones entre los perfiles alélicos y la estructura global de la población se analizó mediante el programa eBURST v3 [<http://eburst.mlst.net/>]. En lugar de hacer

un análisis filogenético, el algoritmo de eBURST v3 relaciona aquellos perfiles que difieren en un sólo alelo y los representa como puntos unidos por una línea [88].

La diversidad de perfiles de SNPs en las poblaciones originales se estimó a partir de los perfiles de las colecciones estudiadas mediante el Índice de Chao1 [89]. Para evaluar la suficiencia del muestreo se realizaron curvas de distribución acumulativa o rarefacción representando el número de perfiles diferentes en función del número de aislados. Cuando las curvas de rarefacción muestran una tendencia a la saturación, indican que el muestreo llevado a cabo es suficiente e incluye la mayor parte de la diversidad presente en la población original. Si las curvas no muestran saturación, indica que el muestreo es insuficiente para la diversidad existente en la población, y cada nuevo aislado tiene una alta probabilidad de pertenecer a un nuevo tipo [90].

Resultados

4.-Resultados

Para estudiar la diversidad genética de las cepas de *E. coli* capaces de generar infecciones extraintestinales (ExPEC) se utilizaron 363 aislados clínicos del Hospital Universitario La Paz (Madrid) y 280 aislados clínicos del Hospital Universitario Virgen de la Macarena (Sevilla) pertenecientes a varias colecciones recogidas con diversos criterios.

✓ **Colección ExPEC Septicémicos I (SEPEC-I).** - Colección ExPEC compuesta por 124 aislados de *E.coli* procedentes de hemocultivos positivos obtenidos entre los años 2006-2008 (Servicio de Microbiología del Hospital Universitario La Paz de Madrid).

Datos Demográficos: Un 51,6% de los pacientes eran mujeres y el grupo de edad más frecuente fue el grupo de 61 a 70 años (18,5%). El 39,5% de los aislados procedían del servicio de Nefrología. (Figura 14).

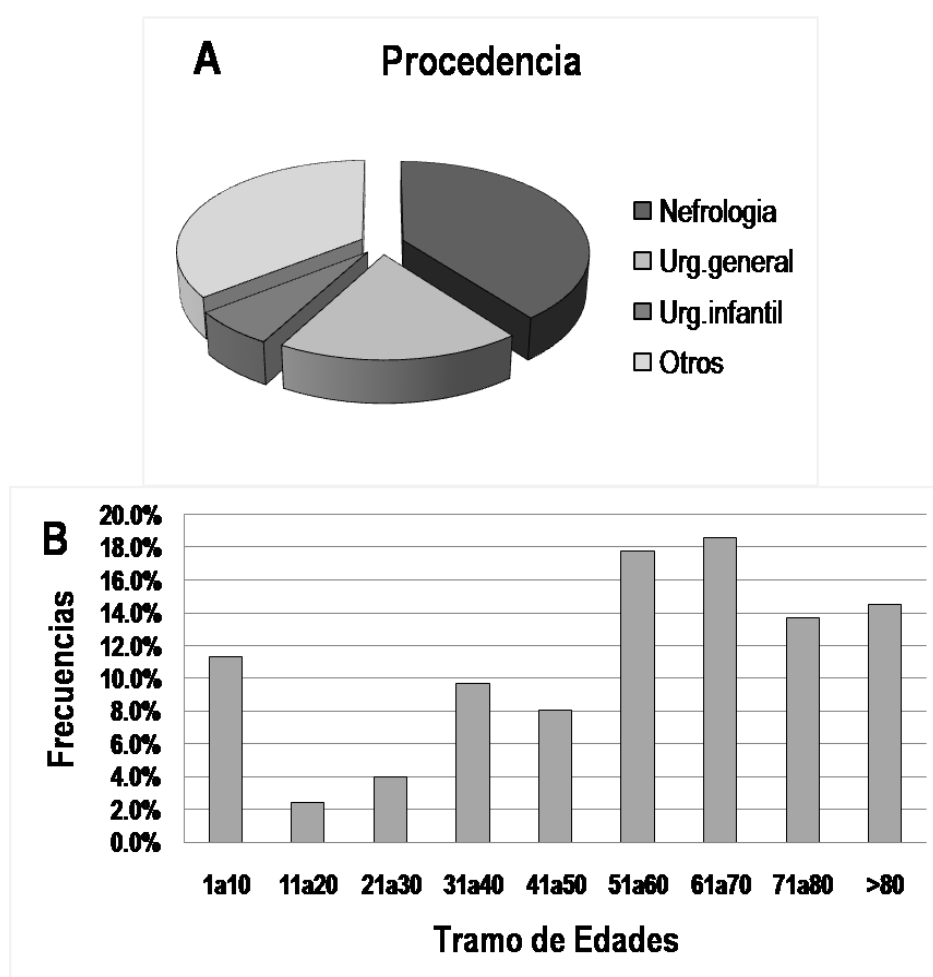


Figura 14: Datos demográficos de los pacientes de la colección SEPEC-I.

Susceptibilidad a antibióticos: Los aislados de esta colección presentaron baja frecuencia de resistencia a beta-lactámicos, exceptuando ampicilina y piperacilina (70,0% y 34,2% de resistencias respectivamente. El 11,7% eran productores de BLEEs, y tan sólo hubo una cepa productora de metalobetalactamasa VIM. Un 36,7% de los aislados fueron resistentes a ciprofloxacino (Tabla 6).

Antibióticos	% Aislados Resistentes
BLEE	11.70%
AMPICILINA	70.00%
PIPERACILINA	34.20%
AMOXICILINA/CLAVUL.	0.04% ^b
PIPERACILINA/AZOBAC	0.80%
CEFALOTINA	21.70%
CEFUROXIMA SODICA	14.20%
CEFUROXIMA	15.80%
CEFACLOR	21.70%
CEFOXITINA	0.04% ^a
CEFOTAXIMA	13.30%
CEFTAZIDIMA	14.20%
CEFEPIME	13.30%
IMIPENEM	0.00%
GENTAMICINA	8.30%
TOBRAMICINA	2.50%
AMIKACINA	0.01% ^a
CIPROFLOXACINO	36.70%

Tabla 6: Frecuencia de aislados resistentes a cada antibiótico analizado en la colección SEPEC-I. Los aislados con sensibilidades intermedias se contabilizaron como sensibles. (a)Estos datos se obtienen con un N=74 debido a la diversidad de los paneles de sensibilidad utilizados.

✓ **Colección ExPEC Uropatógenicos (UPEC).**- Colección ExPEC compuesta por 91 aislados de *E. coli* procedentes de urocultivos positivos ($>10^5$ cfu/ml). Se trata de una serie de aislados consecutivos obtenidos durante las dos primeras semanas de Septiembre de 2008 en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario La Paz de Madrid.

Datos Demográficos: El 82,4% de los pacientes eran mujeres y el grupo de edad más frecuente fue el grupo de población >80 años (27,5%). El 78,1% procedían de los

Centros de Atención Primaria y Especializada del área, el 5,5% procedían del servicio de Urgencias del Hospital General, y el 5,5% de Urgencias del Hospital Infantil. (Figura 15).

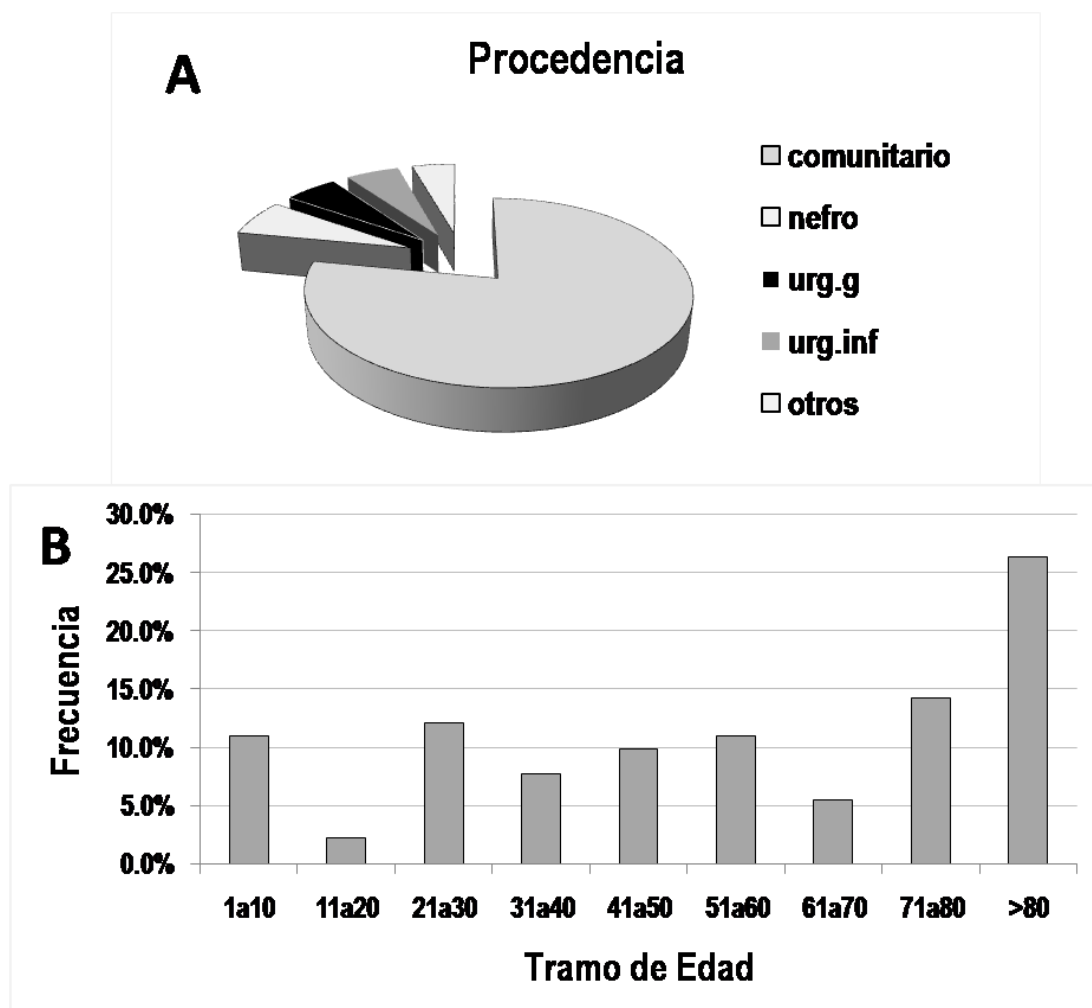


Figura 15: Datos demográficos de los pacientes de la colección UPEC.

Susceptibilidad a antibióticos: La frecuencia de resistencia a beta-lactámicos es más baja que en la colección anterior. Un 7,7% fueron productores de BLEEs y no hubo ningún productor de carbapenemasas. Mas del 35% presentaron resistencias a Trimetoprim y Cotrimoxazol, sin embargo la frecuencia de resistencia a quinolonas y aminoglucósidos fue moderada (20-40% y <10% respectivamente) (Tabla 7).

Antibióticos	% aislados Resistentes
BLEE	7.70%
AMOXICILINA	52.70%
AMOXICILINA/CLAVUL.	3.30%
PIPERACILINA/TAZOBAC	0.00%
CEFALOTINA	35.20%
CEFAZOLINA	8.80%
CEFUROXIMA	8.80%
CEFOTAXIMA	8.80%
CEFIXIMA	7.70%
CEFTAZIDIMA	7.70%
AZTREONAM	8.80%
ERTAPENEM	0.00%
IMIPENEM	0.00%
COLISTINA	0.00%
GENTAMICINA	6.60%
TOBRAMICINA	8.80%
AMIKACINA	1.10%
ACIDO NALIDIXICO	39.60%
NORFLOXACINO	22.00%
CIPROFLOXACINO	22.00%
TRIMETOPRIM	38.50%
COTRIMOXAZOL	36.30%
FOSFOMICINA	0.00%
NITROFURANTOINA	0.00%

Tabla 7: Frecuencia de aislados resistentes a cada antibiótico analizado en la colección UPEC. Los aislados con sensibilidades intermedias se contabilizaron como sensibles.

Colección ExPEC Septicémicos II (SEPEC-II).- Colección ExPEC compuesta por 148 aislados de *E.coli* procedentes de hemocultivos positivos de pacientes adultos con sospecha de sepsis ingresados durante el período 2010-2011 en el Hospital Universitario la Paz de Madrid.

Datos Demográficos: El 52% de los pacientes fueron mujeres, y el 73,4% eran mayores de 71 años. En cuanto a la procedencia, en el momento del estudio, el 65,8% de los pacientes se encontraban ingresados en servicios de área médica, el

22,2% en servicios de área quirúrgica, y el 12% en servicios de área de críticos. El 18,9% procedían del servicio de Nefrología (Figura 16).

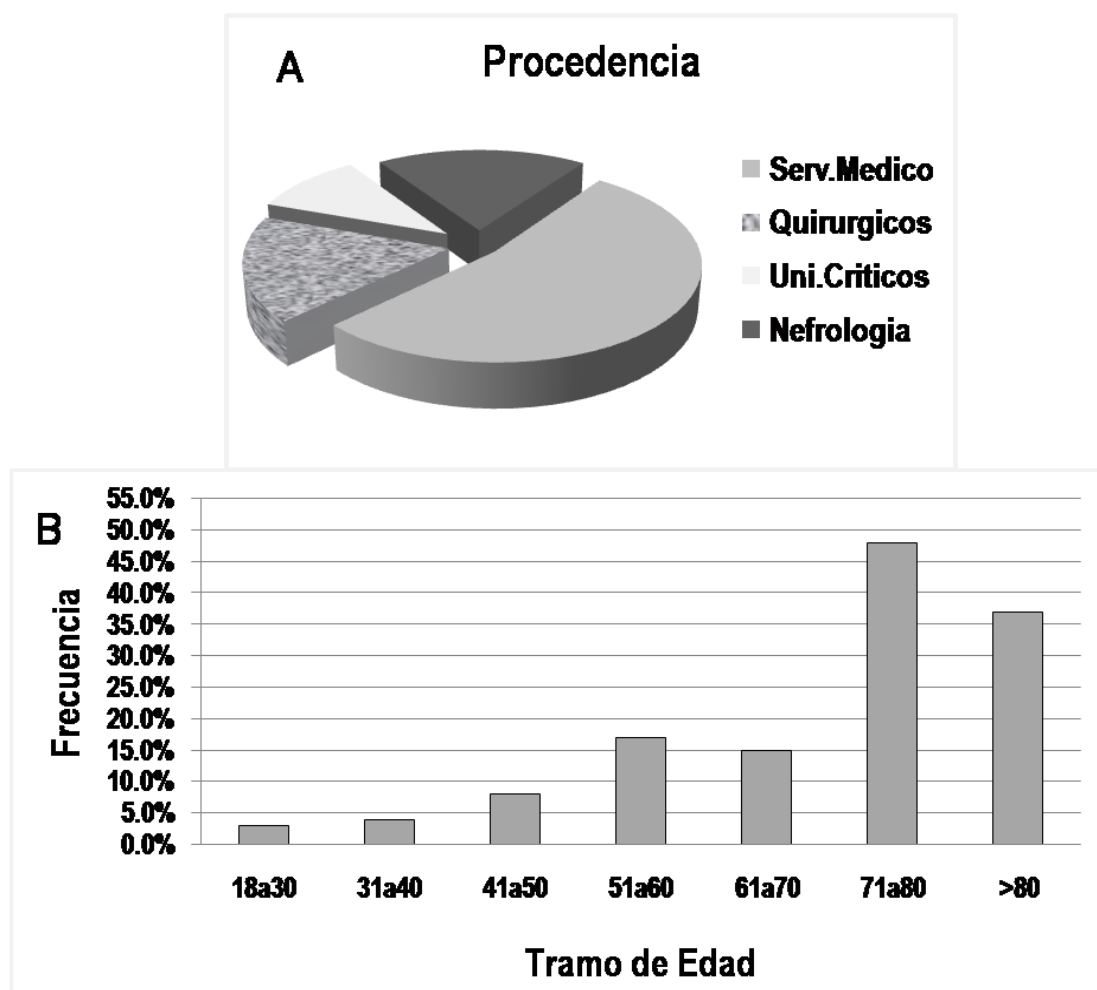


Figura 16: Datos demográficos de los pacientes de la colección SEPEC-II.

Datos clínicos de los aislados: La resistencia de estas cepas a beta-lactámicos es baja exceptuando ampicilina y piperaciclina con un 66% y un 61,1% de aislados resistentes respectivamente. Un 4.9% de aislados de esta colección son portadores de BLEEs. Todos los aislados son sensibles a carbapenémicos. Baja frecuencia (menor del 10% de aislados resistentes) de resistencia a aminoglucósidos. Y moderada frecuencia de resistencia a quinolonas (20-40% de aislados resistentes) (Tabla 8).

Antibióticos	% aislados resistentes
BLEE	4.90%
AMPICILINA	66.00%
PIPERACILINA	61.10%
AMOXICILINA/CLAVUL.	9.00%
PIPERACILINA/TAZOBAC	8.30%
CEFUROXIMA SODICA	9.00%
CEFUROXIMA AXETILO	9.00%
CEFOXITINA	4.90%
CEFOTAXIMA	4.90%
CEFTAZIDIMA	4.90%
CEFEPIME	4.90%
IMIPENEM	0.00%
GENTAMICINA	11.10%
TOBRAMICINA	5.60%
AMIKACINA	0.00%
TIGECICLINA	1.40%
CIPROFLOXACINO	28.50%

Tabla 8: Frecuencia de aislados resistentes a cada antibiótico analizado en la colección SEPEC-II. Los aislados con sensibilidades intermedias se contabilizaron como sensibles.

✓ Colección de ExPEC Septicémicos productores de BLEEs (SEPEC-BLEE).

Colección de ExPEC septicémicos productores de BLEEs compuesta por 197 aislados de *E. coli* procedentes de hemocultivos positivos recogidos en 13 hospitales españoles durante Octubre de 2004 hasta Enero de 2006, en el marco de un estudio multicéntrico centralizado en el Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla. Los datos microbiológicos de los diferentes aislados (Grupo filogenético Clermont y Genes de Resistencia a β -Lactámicos) fueron facilitados por la Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas y Microbiología del hospital sevillano. Los aislados de esta colección presentaban resistencia moderada (20-40% aislados resistentes) a beta-lactámicos exceptuando cefotaxima y cefepime con 96% y 65% respectivamente. El 68% de los aislados presentaba resistencia a ciprofloxacino y la resistencia a aminoglucósidos fue moderada (20% aislados resistentes a Gentamicina, 18% aislados resistentes a Tobramicina y 2% de aislados resistentes a Amikacina) [70].

✓ Colección de ExPEC-ST131 (ST131). Colección de ExPEC compuesta por 83 aislados de *E. coli* ST131-O25b obtenidos tanto de hemocultivos como de urocultivos

procedentes del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla [71]. En esta colección también se incluyen todos los aislados SAP131 de las cuatro colecciones anteriormente mencionadas.

4.1. Diversidad genética de E.coli

4.1.1.- Tipificación mediante PCR múltiplex

La distribución de los aislados en los diferentes grupos filogenéticos se determinó mediante PCR múltiplex [17](Figura 17).

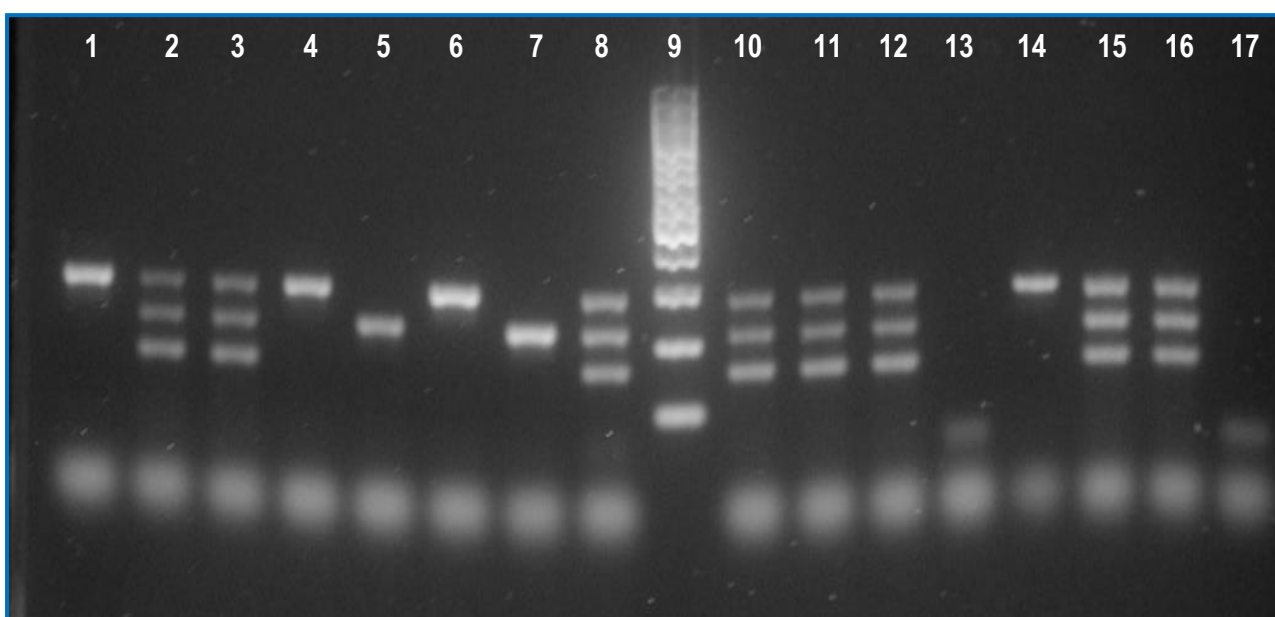


Imagen 17: Perfiles de PCR múltiplex obtenidos mediante el método de Clermont. La imagen muestra un fragmento de un gel de agarosa 1% de 96 pocillos. El carril central es el marcador de peso molecular de 100pb. Los carriles 1, 4, 7 y 14 son aislados del grupo D; los carriles 2, 3, 8, 10-12, 15 y 16 son aislados del grupo B2 ; los carriles 5, 7 y 13 son aislados del grupo A ; el carril 17 es un control negativo.

En el conjunto de las tres colecciones que agrupan la población ExPEC-LaPaz el grupo filogenético más frecuente fue el grupo B2, con un 47,8% del total de los aislados (176 aislados). Mientras que el grupo B1 con un 11,6% de aislados (42 aislados) fue el menos frecuente. Los resultados por colecciones se muestran en la tabla 9. La composición de las tres colecciones por separado es similar, y las diferencias no son estadísticamente significativas.

En la colección SEPEC-BLEE, por el contrario, el grupo B2 es el menos frecuente, con un 15,7% de los aislados, mientras que los grupos A, B1 y D tienen una representación similar con frecuencias de 28,8 %, 28,8% y 26,7% respectivamente (Tabla 9).

Las diferencias entre esta colección y las del Hospital Universitario La Paz son estadísticamente significativas (Test de Fisher $p < 0,05$)

GF/Colección	SEPECI	UPEC	SEPECII	SEPEC-BLEE*
A	21,0%	13,2%	25,8%	28,8%
B1	11,3%	8,8%	13,6%	28,8%
B2	49,2%	57,1%	40,8%	15,7%
D	18,5%	20,9%	19,7%	26,7%

Tabla 9: Frecuencias de los grupos filogenéticos determinados en cada colección por PCR multiplex .

(*) Datos facilitados por el Hospital Universitario Virgen de la Macarena de Sevilla [70].

4.1.2.- Tipificación mediante pirosecuenciación de SNPs

El análisis de perfiles alélicos de SNPs por pirosecuenciación es una técnica análoga al *MLST* que facilita el estudio de la diversidad genética de grandes colecciones. El esquema desarrollado se basa en 14 SNPs de siete genes conservados, los mismos utilizados en el esquema *MLST* de *M. Achtman* [19]. Se trata de genes esenciales, que están presentes en todas las cepas y forman parte del genoma básico (*core*). Para obtener los perfiles alélicos (SAPs) se realizó para cada aislado una PCR por cada SNP seleccionado y se determinó la secuencia del SNP mediante pirosecuenciación del producto de PCR. Los datos se utilizaron para asignar a cada SNP o grupo de SNPs correspondiente a un gen del *MLST*, un número de alelo: la combinación de los números alélicos para los siete genes es el perfil alélico SAP (Figura Anexa 1).

Los perfiles alélicos obtenidos presentan en las cuatro colecciones una estructura poblacional mixta, con aproximadamente la mitad de los aislados perteneciendo a unos pocos perfiles muy frecuentes, y la otra mitad formada por aislados únicos o poco frecuentes.

Globalmente, hay 9 perfiles que aparecen con una frecuencia superior al 5% en al menos una de las colecciones, y que sumados reúnen aproximadamente la mitad de los aislados en cada una de ellas. El resto de la población ExPEC está formada por 129 perfiles alélicos esporádicos o poco frecuentes, que en la mayoría de los casos aparecen una o dos veces (Figura 18).

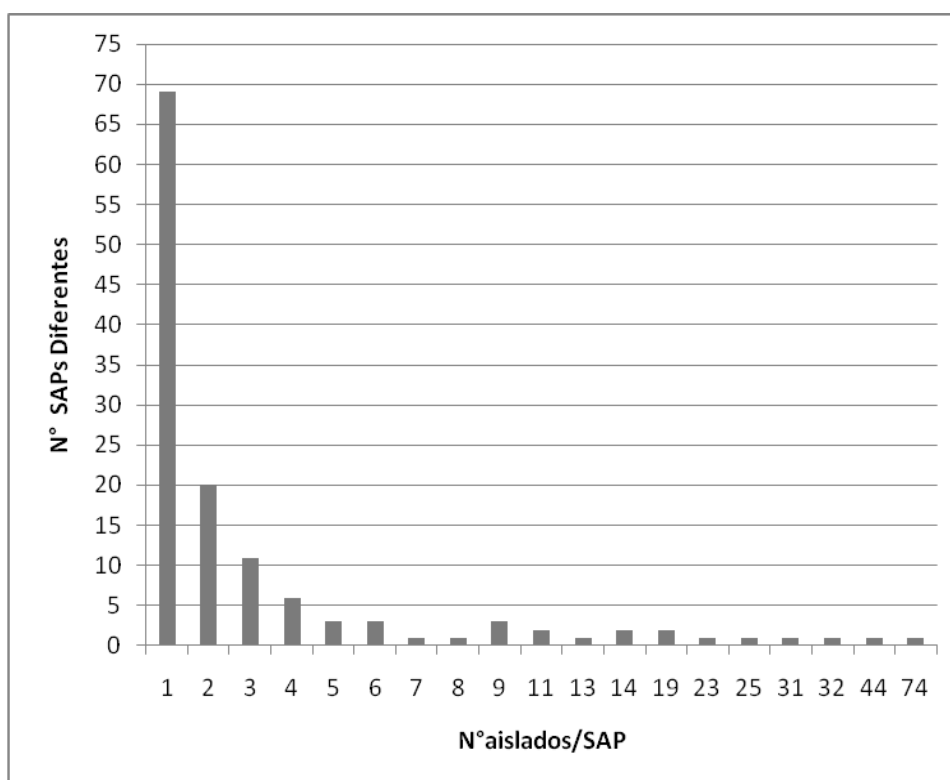


Figura 18: Gráfico de distribución de los aislados por perfiles alélicos SAPs en la población ExPEC en estudio (las cuatro colecciones juntas).

Las frecuencias de los perfiles mayoritarios son diferentes entre las colecciones. En las tres colecciones ExPEC-LaPaz, los cinco SAPs principales (SAP12, SAP23, SAP73, SAP95 y SAP131) comprenden casi la mitad de los aislados mientras que en la colección SEPEC-BLEE los cinco SAPs principales (SAP10, SAP117, SAP131, SAP 167, SAP316) sólo a un tercio de sus aislados .

Los 9 perfiles mayoritarios difieren entre las cuatro colecciones, aunque el mayoritario en todas ellas es el perfil SAP131 que corresponde al ST131.

En las tres colecciones ExPEC-LaPaz los perfiles SAP12, SAP23, SAP73 y SAP95 tienen frecuencias similares, y son minoritarios en la población SEPEC-BLEE. Por el contrario, los perfiles alélicos SAP117, SAP167 y SAP316 son frecuentes en la

colección SEPEC-BLEE y raros en las colecciones ExPEC-LaPaz (Tabla 10). Por último, SAP10 tiene una frecuencia en torno al 5% en las tres colecciones de hemocultivos, y no apareció en la colección UPEC.

Analizando los perfiles mayoritarios en las tres colecciones ExPEC-LaPaz, se observan diferencias significativas (Test de Fischer $p < 0,05$) entre la colección UPEC y SEPEC-I en la frecuencia de aislados SAP73 (17,6% Vs 7,3%).

	SEPEC-I	UPEC	SEPEC-II	SEPEC-BLEE
SAP10	4,0%	0,0%	6,1%	5,7%
SAP12	5,6%	6,6%	6,1%	0,5%
SAP23	8,9%	5,5%	6,1%	4,2%
SAP73	7,3%	17,6%	12,2%	0,5%
SAP95	6,5%	7,7%	9,5%	1,0%
SAP117	0,8%	0,0%	0,0%	6,3%
SAP131	16,9%	13,2%	11,5%	12,5%
SAP167	0,0%	0,0%	0,0%	5,7%
SAP316	2,4%	0,0%	0,8%	11,3%
Otros SAPs	47,6%	49,5%	48,0%	56,3%

Tabla 10: Frecuencias de los perfiles alélicos mayoritarios en las cuatro colecciones de ExPEC.

A pesar de la gran diversidad observada, el número de perfiles alélicos es limitado, en cada colección está en torno a la tercera parte del número de aislados, y más de la mitad de los aislados pertenecen a los perfiles mayoritarios, lo que sugiere que la diversidad es elevada, pero limitada. Para determinar el grado de completitud del muestreo se realizó un análisis de rarefacción de cada una de las colecciones. Para ello se representó la distribución acumulativa de perfiles alélicos en función del número de aislados, es decir, el número de perfiles observados al ir aumentando el número de aislados. En las cuatro colecciones se observan curvas de pendiente suave y con tendencia a la saturación (Figura 19).

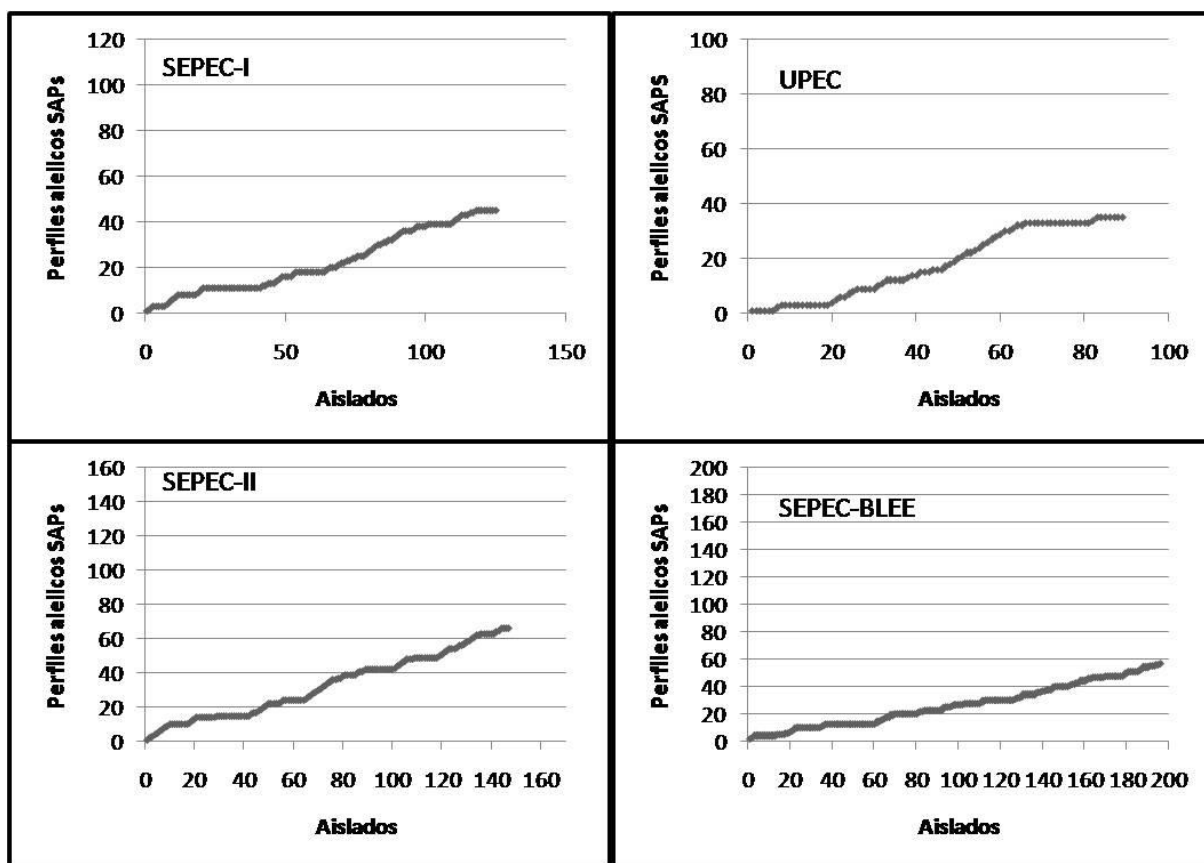


Figura 19: Análisis de rarefacción: Curvas de distribución acumulativa de las colecciones ExPEC en estudio (Exceptuando la colección EXPEC ST131 (N=83)) donde se determina el número de perfiles diferentes por cada aislado nuevo analizado en cada colección.

El índice de diversidad de Chao1 proporciona una estimación del punto en el que las curvas saturarían. El cálculo indica que en las colecciones estudiadas el número total de perfiles debe estar en torno a la centena. (Tabla 11).

Colección	Aislados	SAPs	% aislados en SAPs de baja frecuencia	% aislados en SAPs de alta frecuencia	Chao1
SEPEC-I	124	45	41,6	58,4	72
UPEC	91	35	42,7	57,3	77
SEPEC-II	148	66	45,8	54,2	183
SEPEC-BLEE	197	57	33,2	66,8	78

Tabla 11: Parámetros de diversidad alélica de las colecciones.

4.2. Análisis de la diversidad del viruloma de E.coli**4.2.1.- Genes de Virulencia**

Los genes de virulencia de las cepas ExPEC son una serie de genes definidos según diversos criterios e implicados de una u otra forma en patogénesis, invasividad, o simplemente en supervivencia en los tejidos. No son genes esenciales, y forman parte de la fracción variable del genoma de *E. coli*, pueden estar presentes o no. La presencia o ausencia de los genes de virulencia en las diferentes colecciones ExPEC, se estudió mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos para cada uno de los 25 genes seleccionados. De esta forma se determinó, para cada cepa, qué genes de virulencia están presentes en su genoma, el número total de genes de virulencia, y un perfil de virulencia definido por la presencia/ausencia de cada uno de los 25 genes (Figura 2 Anexa).

En este estudio se incluyeron las tres colecciones de ExPEC-LaPaz y las colecciones SEPEC-BLEE y ExPEC-ST131.

4.2.1.1 Presencia o ausencia de Genes de Virulencia

Los resultados por colecciones y genes, expresados en porcentajes, se detallan en la tabla 4R. Los genes más frecuentes en los aislados de ExPEC (las cinco colecciones) son *fimH*, *iutA*, *fyuA*, *iucD*, *traT* y *ompT* con más de un 75% de presencia en alguna de las colecciones mientras que los menos frecuentes son, *afa B/C*, *cdtB* y *svg* con menos de un 10% de presencia en alguna de las colecciones (Figura 20).

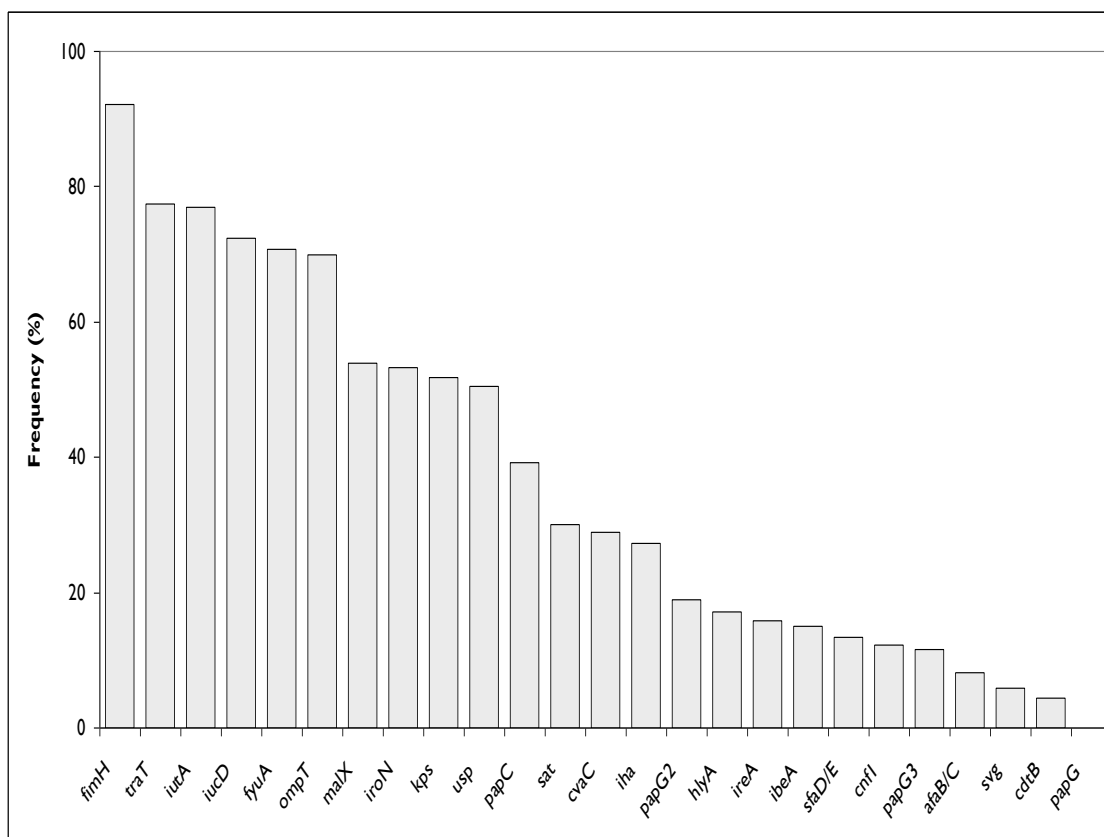


Figura 20: Frecuencia de los genes de virulencia en el conjunto de las cinco colecciones ExPEC estudiadas.

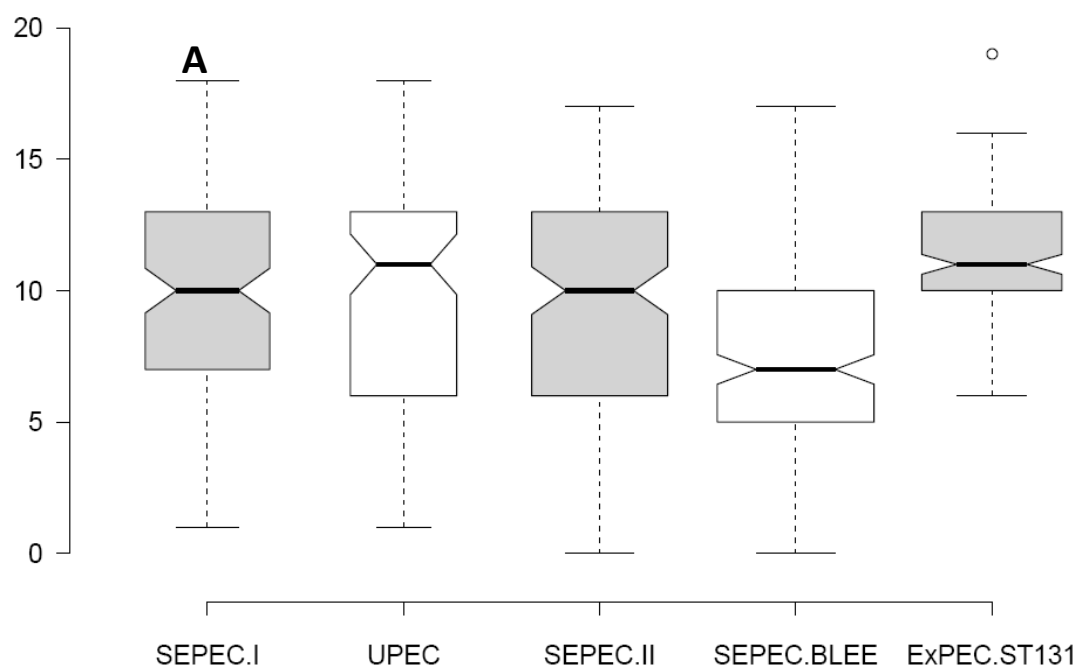
Las frecuencias de cada gen en las diferentes colecciones son bastante similares, sin embargo, existen algunas diferencias significativas en algunos casos: en la colección SEPEC-BLEE las frecuencias de los genes *hlyA* (3,6%) *cnf* (3,6%) y *kps MTII* (23,9%) son menores que en el resto de las colecciones (Test de Fisher $p < 0,05$) (Tabla 12).

Además la colección ExPEC-ST131 (N=157) muestra diferencias significativas con al menos una de las restantes colecciones en la mayoría de los genes (Tabla 12).

GV/Colecciones	SEPEC-I	UPEC	SEPEC-II	SEPEC-BLEE	ExPEC-ST131
Adhesinas					
<i>pap C</i>	51,6%	47,3%	51,4%	24,4%	28,7%
<i>pap G allele I</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
<i>pap G allele II</i>	23,4%	17,6%	31,8%	15,7%	8,3%*
<i>pap G allele III</i>	16,1%	13,2%	9,5%	5,1%	14,0%
<i>afaB/C</i>	7,3%	6,6%	5,4%	6,6%	23,6%*
<i>fimH</i>	91,9%	95,6%	95,9%	84,3%	94,3%
<i>iha</i>	16,9%	26,4%	35,1%	15,7%	57,3%*
<i>sfa/foc DE</i>	18,5%	30,8%	20,9%	3,6%	0,0%*
Toxinas					
<i>cdtB</i>	3,2%	5,5%	5,4%	2,5%	8,9%
<i>cnf1</i>	19,4%	28,6%	16,9%	3,6%	7,0%
<i>hlyA</i>	25,8%	29,7%	25,0%	3,6%	13,4%
<i>sat</i>	24,2%	27,5%	27,7%	20,3%	63,1%*
<i>usp</i>	54,8%	60,4%	56,8%	21,8%	94,9%*
Protectinas					
<i>kps MTII</i>	71,0%	70,3%	51,4%	23,9%	70,1%*
Sideróforos					
<i>iroN</i>	54,0%	57,1%	52,7%	62,4%	29,9%*
<i>ireA</i>	14,5%	26,4%	20,9%	14,7%	4,5%*
<i>fyuA</i>	71,8%	78,0%	76,4%	52,3%	98,7%*
<i>iutA</i>	78,2%	62,6%	68,9%	81,7%	89,2%*
<i>iucD</i>	77,4%	56,0%	63,5%	73,1%	85,4%*
Otros					
<i>malX</i>	58,9%	61,5%	42,6%	40,1%	93,6%*
<i>svg</i>	2,4%	7,7%	9,5%	1,5%	5,7%
<i>traT</i>	84,7%	74,7%	66,9%	74,1%	91,7%*
<i>cvaC</i>	32,3%	15,4%	20,9%	34,5%	25,5%
<i>ibeA</i>	14,5%	15,4%	11,5%	8,6%	27,4%*
<i>ompT</i>	66,1%	76,9%	75,0%	54,3%	94,3%

Tabla 12: Frecuencia de aislados positivos para cada gen de virulencia en cada una de las colecciones ExPEC. Los (*) corresponden a diferencias significativas utilizando el Test de Fisher ($p < 0.05$)

El número de genes de virulencia por aislado oscila entre 0 y 18. La colección SEPEC-BLEE es la que tiene una media de genes de virulencia más baja, con 7 genes por aislado frente a 10 u 11 que tienen de media el resto de las colecciones, aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa. Por otra parte, la colección ExPEC-ST131 muestra un rango más estrecho, con un número mínimo de 6 genes de virulencia por aislado, mientras que en el resto de las colecciones el mínimo es de 0-1 genes de virulencia por aislado (Figura 21) [<http://boxplot.tyerslab.com/>].



B	SEPEC.I	UPEC	SEPEC.II	SEPEC.BLEE	ExPEC.ST131
Valor Superior	18,00	18,00	17,00	17,00	16,00
3er cuartil	13,00	13,00	13,00	10,00	13,00
Media	10,00	11,00	10,00	7,00	11,00
1er cuartil	7,00	6,00	6,00	5,00	10,00
Valor Inferior	1,00	1,00	0,00	0,00	6,00
Número Muestral	124,00	91,00	148,00	197,00	157,00

Figura 21: **A:** Diagrama de cajas mostrando la distribución del número de genes por aislado de cada colección. **B:** Tabla correspondiente al gráfico superior. [<http://boxplot.tyerslab.com/>]

Las diferencias entre las frecuencias de los genes de virulencia en diferentes colecciones se analizaron mediante el Test de Fisher ($p < 0,05$). La comparación se hizo entre las colecciones de diferente origen SEPEC-I y UPEC recogidas en el mismo periodo temporal y las colecciones SEPEC-I y SEPEC-II, ambas de hemocultivos pero recogidas en periodos de tiempo diferentes.

➤ **SEPEC-I Vs UPEC.**- La colección SEPEC-I muestra una mayor frecuencia de aislados positivos para los genes *iutA*, *iucD* y *cvaC* y menor frecuencia de aislados positivos para el gen *ireA* frente a la colección UPEC (Figura 22).

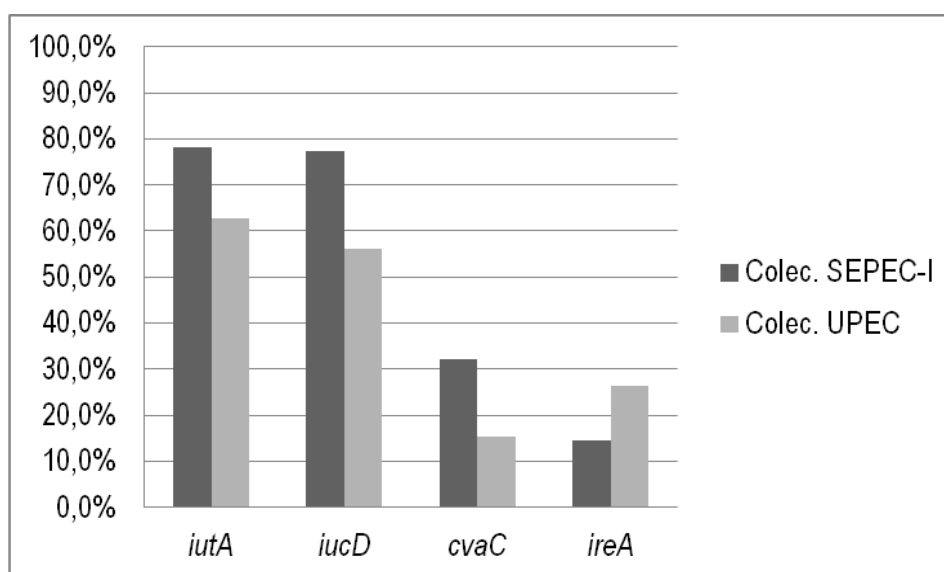


Figura22: Gráfico comparativo de los genes con diferencias estadísticamente significativas entre las colecciones SEPEC-I Vs UPEC.

➤ **SEPEC-I Vs SEPEC-II.**- En la colección SEPEC-I el número de aislados positivos para los genes *kpsMT II*, *iucD* y *traT* es mayor, mientras que el número de aislados positivos para los genes *iha*, *svg* y es menor que en la colección SEPEC-II (Figura 23).

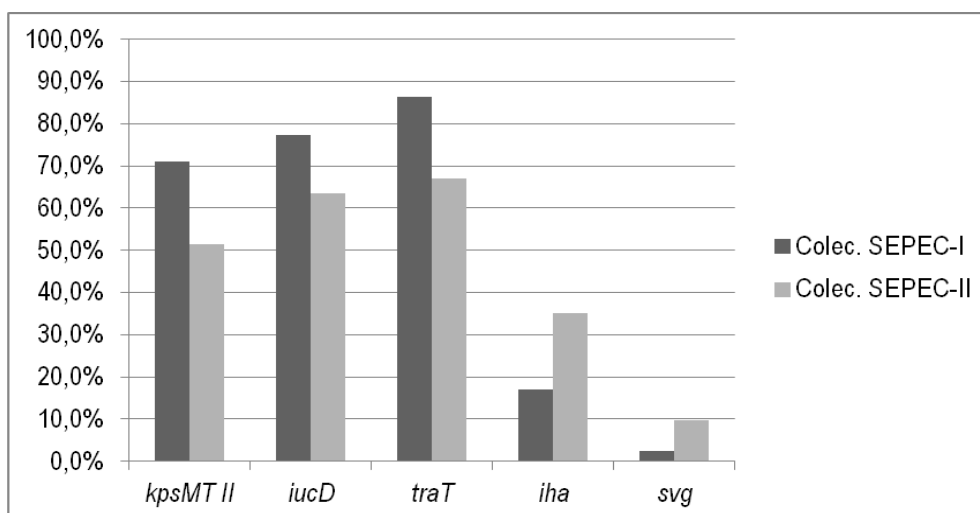


Figura23: Gráficos comparativo de los genes con diferencias estadísticamente significativas entre las colecciones SEPEC-I Vs SEPEC-II.

4.2.1.2 Perfiles de Virulencia

Para construir los perfil de virulencia en cada cepa se registró la presencia (1) o ausencia (0) de los 25 genes seleccionados (Figura 2 Anexa).). Los perfiles numéricos así obtenidos pueden ordenarse y compararse fácilmente.

La población ExPEC (N=643aislados) contiene 467 perfiles de virulencia diferentes (relación nº perfiles /nº aislados = 0,72) de los cuales 395 son únicos. Las frecuencias de los perfiles de virulencia se muestran en la tabla 13.

PV diferentes	Nºaislados/PV
395	1
47	2
10	3
4	4
5	6
1	7
1	9
2	11
1	12
1	13
1	15

Tabla 13: Distribución de número de aislados en los diferentes perfiles de virulencia de toda la población de ExPEC en estudio (las cinco colecciones).

La colección SEPEC-I (N=124) contiene 113 perfiles de virulencia de los cuales 104 perfiles son únicos y 9 se repiten 2-3 veces. La colección UPEC (N=91) contiene 82 perfiles de virulencia de los cuales 76 perfiles son únicos y 6 se repiten entre 2 y 4 veces. La colección SEPEC-II (N=148) incluye 132 perfiles de virulencia de los cuales 121 son únicos, 10 perfiles se repiten 2-3 veces y uno se repite en 5 aislados.

La colección SEPEC-BLEE (N=197) incluye 147 perfiles de virulencia de los cuales 120 son únicos, 27 se repiten con una frecuencia de 2-4 veces y 4 perfiles se repiten con una frecuencia de 5-6 veces.

Por último, la colección ExPEC-ST131 (N=157) contiene 99 perfiles de virulencia de los cuales 75 son únicos, 19 se repiten con una frecuencia de 2-3 veces, además existen cuatro perfiles que se repiten 5, 8, 12 y 15 veces respectivamente. Yo creo que vale la pena poner aquí una tablita con los perfiles de 8, 12 y 15 veces.

Igual que con los perfiles de SNPs, para determinar la completitud del muestreo se realizó un análisis de rarefacción con los perfiles de virulencia de cada una de las colecciones. Para ello se representaron las distribuciones acumulativas de los perfiles nuevos encontrados por cada nuevo aislado analizado. En todas las colecciones se observa una acumulación lineal de nuevos perfiles, sin tendencia a la saturación (Figura 24).

Para las tres colecciones SEPEC y la colección UPEC los datos pueden ajustarse a una recta con una pendiente cercana a 1, es decir casi cada nuevo aislado es un nuevo perfil de virulencia. Para la colección ST131 también puede realizarse un buen ajuste a una recta, pero en este caso la pendiente es menor, 0,77.

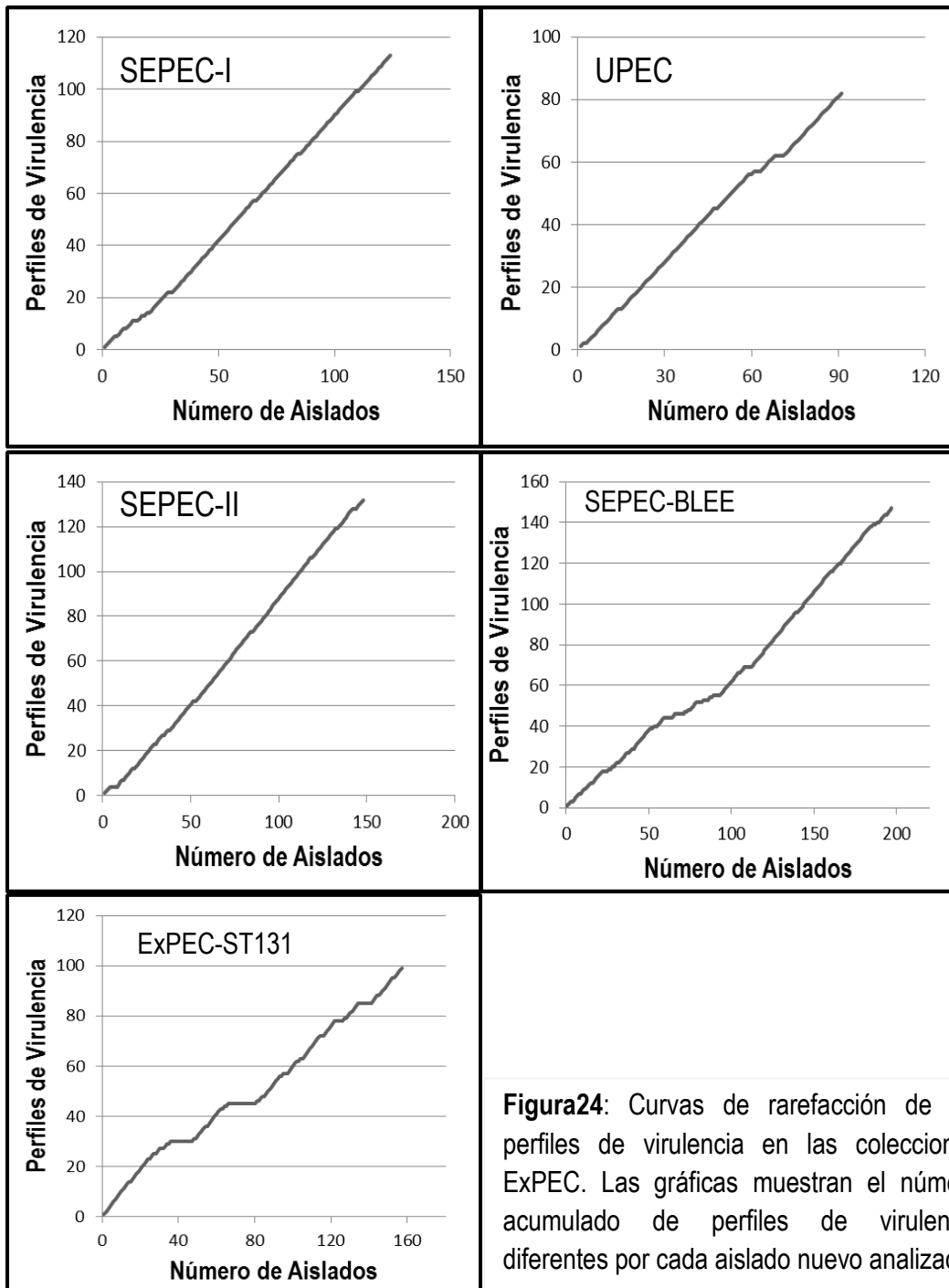


Figura24: Curvas de rarefacción de los perfiles de virulencia en las colecciones ExPEC. Las gráficas muestran el número acumulado de perfiles de virulencia diferentes por cada aislado nuevo analizado.

4.2.2.- Asociaciones entre genes de virulencia y grupos filogenéticos

Para estudiar la posible asociación entre perfiles y genes de virulencia con los grupos filogenéticos obtenidos por PCR múltiple, se analizó el perfil de virulencia y la frecuencia de cada uno de los genes de virulencia en los cuatro grupos filogenéticos (A, B1, B2, y D) en el conjunto de las tres colecciones ExPEC-LaPaz (Tabla 14)

No se observó ningún perfil de virulencia o gen de virulencia característico de ninguno de los grupos filogenéticos, aunque sí que existen algunas diferencias entre los diferentes grupos. Los genes de virulencia *sfaD/E*, *cnf*, *hlyA*, *usp*, *ireA*, *fyuA*, *malX* y *svg* fueron más frecuentes en el grupo B2 que en los otros grupos, y los genes *papC*, *papG alelo II*, *papG alelo III*, *iha*, *sat*, *kpsMTII*, *ibeA* y *ompT* fueron más frecuentes en los grupos D y B2. Por último, el gen *iroN* fue más frecuente en los aislados del grupo B1 y B2 (Tabla 14).

GV/GF	A(N=76)	B1 (N=42)	B2 (N=173)	D (N=71)
Adhesinas				
<i>papC</i>	30,3%	33,3%	59,0%*	60,6%*
<i>papG alelo I</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
<i>papG alelo II</i>	7,9%	9,5%	32,9%*	33,8%*
<i>pap G allele III</i>	3,9%	0,0%	17,9%*	15,5%*
<i>afaB/C</i>	2,6%	0,0%	10,4%	4,2%
<i>fimH</i>	88,2%	100,0%	94,8%	95,8%
<i>iha</i>	11,8%	9,5%	31,8%*	40,8%*
<i>sfa/focDE</i>	5,3%	7,1%	41,0%*	4,2%
Toxinas				
<i>cdtB</i>	0,0%	0,0%	7,5%*	5,6%
<i>cnf1</i>	2,6%	2,4%	38,2%*	7,0%
<i>hlyA</i>	9,2%	7,1%	43,4%*	14,1%
<i>sat</i>	6,6%	9,5%	32,4%*	43,7%*
<i>usp</i>	11,8%	16,7%	97,7%*	29,6%

(Continuación Tabla 14)

GV/GF	A(N=76)	B1 (N=42)	B2 (N=173)	D (N=71)
Protectinas				
kpsMTII	27,6%	26,2%	84,4%*	70,4%*
Sideróforos				
iroN	46,1%	64,3%*	64,7%*	31,0%
ireA	7,9%	11,9%	28,9%*	15,5%
fyuA	48,7%	47,6%	97,1%*	66,2%
iutA	67,1%	71,4%	72,3%	70,4%
iucD	61,8%	71,4%	65,3%	71,8%
Otros				
malX	13,2%	26,2%	83,8%*	35,2%
svg	1,3%	4,8%	11,0%*	2,8%
traT	61,8%	88,1%	78,6%	71,8%
cvaC	31,6%	31,0%	20,8%	16,9%
ibeA	2,6%	2,4%	19,1%*	18,3%*
ompT	38,2%	42,9%	93,6%*	74,6%*

Tabla 14: Frecuencias de los genes de virulencia en cada grupo filogenético determinado por PCR multiplex.

(*)Diferencias estadísticamente significativas (Test de Fisher ($p < 0,05$)) entre la colección señalada y alguna de las otras colecciones.

Para estudiar la posible asociación entre perfiles y genes de virulencia con los grupos filogenéticos SAPs, se analizó la frecuencia de cada gen de virulencia y los diferentes perfiles de virulencia en cada uno de los nueve SAPs principales (conjunto de todas las colecciones ExPEC).

Aunque no existe ningún gen de virulencia característico de ninguno de los nueve SAPs, sí existen algunas características destacables (Tabla 15).

- SAP10 y SAP167 destacan porque carecen de genes de toxinas y adhesinas, con la excepción de *fimH*.
- El 64,5% de los aislados pertenecientes a SAP95 fueron positivos para el gen *svg*, mientras que en el resto de los SAPs la frecuencia de este gen fue menor del 5% (Test de Fisher ($p < 0,05$)).
- Los SAPs mayoritarios en la colección SEPEC-BLEE (exceptuando SAP131: que engloba los aislados SAP131 de todas las colecciones y los pertenecientes a la

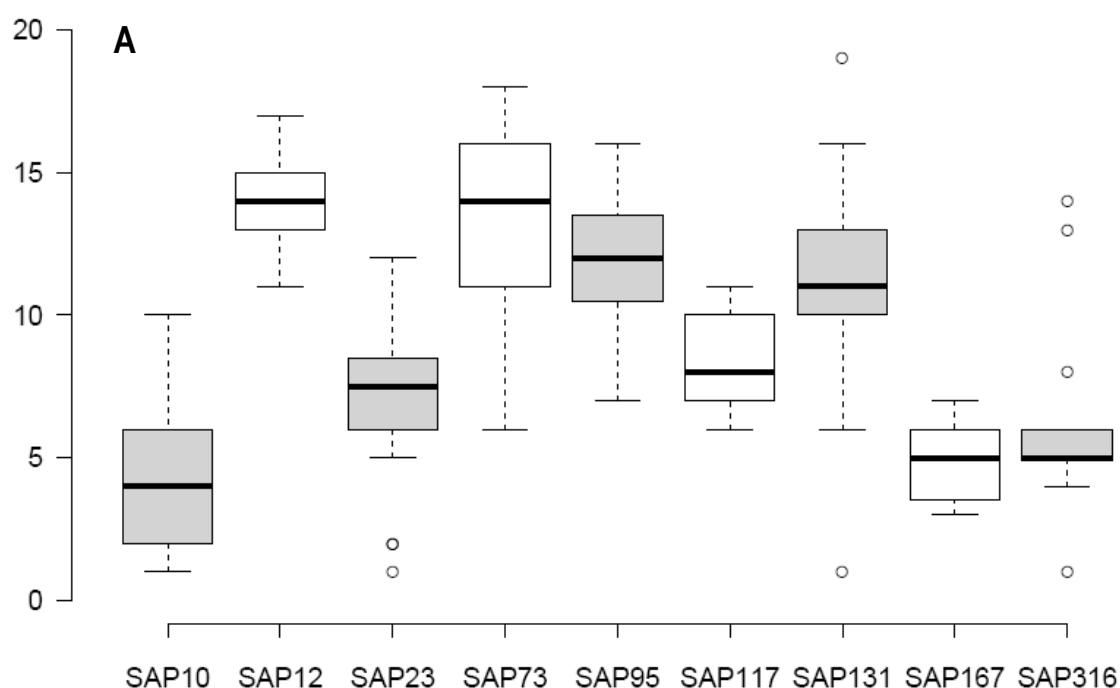
colección ExPEC-ST131)) tienen una frecuencia de aislados positivos para *kpsMIII*, más baja que el resto de los SAPs.

GV/SAP	SAP10 (N=23)	SAP12 (N=25)	SAP23 (N=32)	SAP73 (N=44)	SAP95 (N=32)	SAP117 (N=13)	SAP131 (N=157)	SAP167 (N=11)	SAP316 (N=19)
Adhesinas									
<i>papC</i>	0,0%	100,0%	56,3%	68,2%	83,9%	53,8%	28,7%	0,0%	10,5%
<i>papG</i> alelo I	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
<i>papG</i> alelo II	0,0%	73,9%	9,4%	38,6%	64,5%	53,8%	8,3%	0,0%	0,0%
<i>papG</i> alelo III	0,0%	43,5%	6,3%	15,9%	0,0%	0,0%	14,0%	0,0%	5,3%
<i>afaB/C</i>	0,0%	0,0%	0,0%	2,3%	9,7%	0,0%	23,6%	0,0%	0,0%
<i>fimH</i>	72,7%	91,3%	96,9%	97,7%	90,3%	92,3%	94,3%	27,3%	94,7%
<i>iha</i>	0,0%	43,5%	9,4%	50,0%	0,0%	0,0%	57,3%	0,0%	0,0%
<i>sfa/focDE</i>	0,0%	82,6%	0,0%	86,4%	9,7%	0,0%	0,0%	0,0%	5,3%
Toxinas									
<i>cdtB</i>	0,0%	0,0%	0,0%	6,8%	12,9%	7,7%	8,9%	0,0%	0,0%
<i>cnf1</i>	0,0%	87,0%	0,0%	79,5%	3,2%	0,0%	7,0%	0,0%	10,5%
<i>hlyA</i>	0,0%	100,0%	0,0%	88,6%	3,2%	0,0%	13,4%	0,0%	10,5%
<i>sat</i>	0,0%	0,0%	6,3%	52,3%	3,2%	15,4%	63,1%	0,0%	0,0%
<i>usp</i>	0,0%	100,0%	0,0%	97,7%	96,8%	0,0%	94,9%	0,0%	15,8%
Protectinas									
<i>kpsMTII</i>	9,1%	52,2%	15,6%	79,5%	96,8%	0,0%	70,1%	0,0%	10,5%
Sideróforos									
<i>iroN</i>	54,5%	82,6%	68,8%	90,9%	77,4%	76,9%	29,9%	72,7%	89,5%
<i>ireA</i>	0,0%	39,1%	12,5%	27,3%	77,4%	76,9%	4,5%	0,0%	0,0%
<i>fyuA</i>	0,0%	95,7%	71,9%	97,7%	100,0%	0,0%	98,7%	0,0%	31,6%
<i>iutA</i>	63,6%	60,9%	81,3%	68,2%	77,4%	84,6%	89,2%	100,0%	94,7%
<i>iucD</i>	54,5%	69,6%	81,3%	65,9%	67,7%	84,6%	85,4%	100,0%	94,7%
Otros									
<i>malX</i>	9,1%	87,0%	3,1%	81,8%	87,1%	100,0%	93,6%	0,0%	5,3%
<i>svg</i>	0,0%	0,0%	0,0%	2,3%	64,5%	0,0%	5,7%	0,0%	0,0%
<i>traT</i>	63,6%	78,3%	78,1%	68,2%	87,1%	92,3%	91,7%	100,0%	52,6%
<i>cvaC</i>	54,5%	4,3%	46,9%	6,8%	54,8%	30,8%	25,5%	45,5%	68,4%
<i>ibeA</i>	9,1%	4,3%	6,3%	0,0%	12,9%	7,7%	27,4%	0,0%	0,0%
<i>ompT</i>	0,0%	95,7%	59,4%	97,7%	93,5%	92,3%	94,3%	27,3%	5,3%

Tabla 15: Frecuencias de los genes de virulencia en estudio en los SAPs mayoritarios de toda la población ExPEC analizada.

En cuanto al número de genes de virulencia medio en cada SAP principal:

- El perfil alélico SAP10 presenta menor número de genes de virulencia, con una media de 4 genes de virulencia por aislado (rango 1-10) frente a 14 del SAP73 (rango 6-18) o SAP12 (rango 11-17) (Figura 25) [<http://boxplot.tyerslab.com/>].
- En conjunto, los SAPs mayoritarios en la colección SEPEC-BLEE (SAP10, SAP117, SAP167, SAP316), excluyendo SAP131, presentan menor número de genes de virulencia (Figura 25)[<http://boxplot.tyerslab.com/>].



B	SAP10	SAP12	SAP23	SAP73	SAP95	SAP117	SAP131	SAP167	SAP316
Valor Superior	10,00	17,00	12,00	18,00	16,00	11,00	16,00	7,00	6,00
Media	4,00	14,00	7,50	14,00	12,00	8,00	11,00	5,00	5,00
Valor Inferior	1,00	11,00	5,00	6,00	7,00	6,00	6,00	3,00	4,00
Numero Muestral	25,00	23,00	32,00	44,00	31,00	13,00	157,00	11,00	19,00

Figura 25: A: Diagrama de cajas de la distribución del número de genes de virulencia por aislado dentro de cada perfil alélico mayoritario. **B:** Tabla correspondiente al gráfico superior. [<http://boxplot.tyerslab.com/>]

Finalmente, no existe ningún perfil de virulencia asociado a ningún SAP principal. La relación entre el número perfiles/número de aislados varía entre 0,63 y 0,93 dependiendo del SAP, indicando una diversidad muy alta de perfiles de virulencia incluso dentro de cada perfil alélico (Tabla 16).

SAPs	Nº aislados	Nº PV	Nº PV/Nº aislados
SAP10	25	20	0,80
SAP12	23	20	0,87
SAP23	32	30	0,93
SAP73	44	37	0,75
SAP95	31	27	0,87
SAP117	13	11	0,85
SAP131	157	99	0,63
SAP167	11	7	0,63
SAP316	19	12	0,63

Tabla 16: Diversidad de perfiles alélicos dentro de cada perfil SAP de la población ExPEC-LaPaz.

Discusión

5. DISCUSIÓN

Durante los últimos años se han secuenciado multitud de genomas bacterianos. La comparación de los genomas de diferentes aislados de una misma especie ha mostrado que existen dos fracciones que presentan un patrón de distribución diferente, una fracción conservada en todos los aislados, el genoma básico o "*core genome*", y una fracción variable con un rango de variación muy amplio.

En este trabajo hemos estudiado la diversidad genética de diferentes colecciones de aislados clínicos ExPEC diferenciando entre las dos fracciones del genoma. Por una parte hemos analizado la diversidad de la secuencia de ADN en el genoma básico (*core genome*), utilizando un grupo de genes esenciales, presentes en todos los aislados. Por otra parte hemos estudiado la diversidad en términos de presencia-ausencia de una serie de genes de virulencia que pueden ser representativos de la fracción variable del genoma.

Este estudio se centra en los patotipos ExPEC que en 2014 en el Hospital Universitario de la Paz fueron los responsables del XX% de las infecciones del tracto urinario (UPEC) y del 38% de las infecciones de sangre SEPEC. (Mapa Microbiológico 2014 Hospital Universitario La Paz).

5.1. Distribución poblacional de ExPEC

El estudio de la parte conservada del genoma se realizó con una colección de aislados de urocultivos (Colección UPEC) y tres colecciones de aislados de hemocultivos (Colecciones SEPEC-I, SEPEC-II y SEPEC-BLEE). Los resultados del análisis por PCR multiplex para determinar los grupos filogenéticos de los aislados muestran concordancia con estudios previos de otros grupos, que han encontrado mayor frecuencia de aislados de los grupos B2 y D, y menor frecuencia de los grupos B1 y A en infecciones extraintestinales [92][48][93]. La colección SEPEC-BLEE tiene un perfil de aislados diferente, donde los grupos mayoritarios son A, B1 y D mientras que el grupo B2 es minoritario.

El análisis de las cuatro colecciones por el método de tipificación de SNPs mostró estructuras similares en el número de SAPs y número de aislados por SAP.

En todos los casos hay 4-5 SAPs mayoritarios, que son los mismos en las colecciones ExPEC-LaPaz y difieren entre éstas colecciones y la colección SEPEC-BLEE. El único SAP mayoritario común a las cuatro colecciones fue el SAP131.

En todas las colecciones los SAPs mayoritarios incluyen a casi la mitad de los aislados, mientras que la otra mitad está formada por perfiles únicos o que se repiten 2 ó 3 veces. Resultados similares se han obtenido en otros estudios donde se utilizaron diferentes métodos como el de *MLST* [60] o estudios de genomas completos [94]. Esto sugiere que esta estructura genética es un rasgo característico de las poblaciones ExPEC, con algunos clones/perfiles que aparecen con mayor frecuencia en diferentes estudios, y que podrían considerarse clones epidémicos, y un mayor número de clones/perfiles esporádicos que aparecen una o dos veces, y que no son comunes en las diferentes colecciones lo que sugiere que son clones oportunistas [95][70].

Las diferencias observadas, en los dos análisis, entre la colección SEPEC-BLEE y las colecciones de La Paz podrían deberse a un sesgo de selección, puesto que la primera está formada exclusivamente por aislados BLEE positivos y en las otras tres no se tuvo en cuenta el fenotipo. Otro factor podría ser la localización geográfica de los aislados: las tres colecciones que forman la población de ExPEC-LaPaz están formada por aislados recogidos en el Hospital Universitario La Paz de Madrid, por lo que la mayoría de los pacientes son de la comunidad de Madrid, sin embargo, la colección SEPEC-BLEE procede de un estudio multicéntrico y los aislados fueron obtenidos en 13 hospitales de diferentes partes de España[70][96]. Existen estudios como los de *Souza et al.*, en 1999 o *Duriez et al.*, en 2001 que observan diferencias en la distribución de los grupos filogenéticos ST de *E. coli* dependiendo del continente o país donde se seleccionen las colecciones de aislados, coincidiendo con los resultados obtenidos en este estudio [97][25].

Por tanto, nuestros resultados mostrarían que o la zona geográfica o las características genéticas de la propia bacteria o ambos factores, influyen en los perfiles que definen una población bacteriana.

5.2 SAPs mayoritarios

5.2.1 Perfiles Alélicos en las colecciones ExPEC-LaPaz.

Es importante destacar que los cinco perfiles mayoritarios de las tres colecciones ExPEC-LaPAZ son comunes e independientes del origen de los aislados, y que entre los cinco incluyen al 47,1% de los aislados. No se encuentran diferencias significativas en los porcentajes de estos cinco SAPs mayoritarios, exceptuando SAP73 que es significativamente más frecuente en la colección UPEC frente a la colección SEPEC-I (Test de Fisher: $p < 0,05$).

✓ **Perfil alélico SAP12.**- Estas cepas además de encontrarse en humanos han sido descritas en infecciones en aves [98]. Son cepas del grupo B2 y tienen un número relativamente alto de genes de virulencia (Figura 25). Además estas cepas suelen ser cepas productoras de β -lactamasa de espectro extendido (BLEE) debido a la presencia de genes CTX-M [60] aunque en nuestro estudio no hemos llevado a cabo este análisis.

✓ **Perfil alélico SAP23.**- Los aislados descritos del perfil SAP23 suelen ser del grupo filogenético A, con baja frecuencia de genes de virulencia [99]. Esto está en concordancia con nuestros resultados, puesto que todos los aislados SAP23 estudiados fueron del grupo A y la media de genes de virulencia por aislado es la más baja de los cinco perfiles alélicos principales: ocho genes de virulencia frente a 11 genes de SAP131 o 14 genes de los SAP12 y SAP73 (Figura 25).

✓ **Perfil alélico SAP73.** Este perfil alélico incluye a cepas de *E. coli* tan diversas como CFT073[100], *Nissle* 1917 [101] o la cepa 83972 [102]. *E.coli* CFT073 es responsable del 80-90% de las cistitis y 70% de las pielonefritis en el hombre y es frecuente aislarla también en hemocultivos [1]. Sin embargo las cepas *Nissle* 1917 y *E.coli* 83972 no son patógenas, e incluso se utilizan como probióticos [103]. La principal diferencia entre estas cepas es la presencia de diferentes genes de virulencia en la isla de patogenicidad PAI-CFT073. En general, las cepas SAP73 presentan una alta frecuencia de genes de virulencia como *sfa D/E, hlyA, cnf* y *sat*

[104][105][100] , datos que coinciden con los obtenidos en este estudio (Figura 26) ya que estos genes se encuentran con una mayor frecuencia en este perfil.

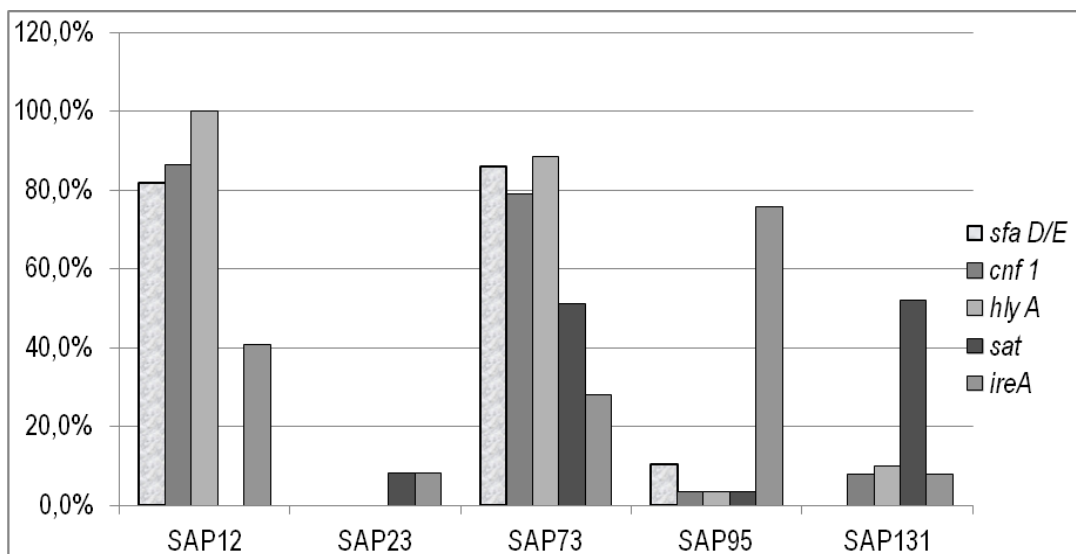


Figura 26: Gráfico comparativo de la frecuencia de varios genes de virulencia seleccionados dentro de los diferentes perfiles alélicos SAPs de la población ExPEC-LaPaz.

✓ **Perfil alélico SAP95.**- Dentro de este grupo clonal se encuentran las cepas de *E. coli* UTI89 [12], NU14 [106] y RS218 [107]. La primera es responsable de un gran número de cistitis no complicadas, mientras que las dos últimas lo son de meningitis neonatal [108]. Este perfil, como el SAP73, presenta una alta frecuencia de aislados positivos para los genes *sfa D/E*, *hlyA*, *ireA* y *cnf* (Gráfico 26) diferenciándose del resto de las cepas por la alta frecuencia de aislados positivos para el gen de virulencia *svg* (más del 60% de aislados positivos frente a porcentajes no superiores al 2% en cualquiera de los otros perfiles mayoritarios). (Tabla 15).

5.2.2 Perfiles Alélicos en la colección SEPEC-BLEE.

Los perfiles alélicos SAP10, SAP117, SAP167 y SAP316 son mayoritarios en esta colección pero minoritarios en las tres colecciones de la población ExPEC-LaPaz. Estos perfiles suelen estar relacionados con aislados BLEE positivos por la presencia del gen CTX-M explicando su alta presencia en esta colección y baja en el resto de las colecciones estudiadas. [109] [110] [111]. Además se ha descrito que los aislados de

éstos perfiles tienen un número de genes de virulencia relativamente bajo [58] en concordancia con los resultados de nuestro estudio, que mostró una media de 4-8 genes de virulencia frente a los 8-14 genes de las colecciones ExPEC-LaPaz .

Por otra parte, los perfiles alélicos SAP10 y SAP117, también son frecuentes en infecciones de aves y otros animales por lo que algunos autores los consideran cepas zoonóticas [111].

5.2.3 Perfil Alélico SAP131

El perfil SAP131 es el mayoritario tanto en las tres colecciones ExPEC-LaPaz como SEPEC-BLEE. Este perfil incluye principalmente las cepas de secuenciotipo ST131, por ello no es sorprendente que estos aislados sean los más frecuentes en todas las colecciones ya que se trata de un clon pandémico de amplia dispersión mundial. Las cepas ST131 fueron identificadas en tres continentes diferentes (Europa, Australia y Estados Unidos) entre los años 2000-2006 dispersándose rápidamente por todo el mundo [112]. Pertenecen al grupo B2, suelen ser productoras de BLEEs, sobre todo de diferentes variantes de CTX-M siendo CTX-M-15 la más frecuente [113][114][115], y han sido descritas como muy virulentas aunque todavía hoy es un tema controvertido.

En un total de 157 aislados SAP131 (de todas las colecciones del estudio) se observaron 99 perfiles de virulencia diferentes lo que indica que el viruloma de *E. coli* es enormemente diverso incluso a nivel de secuenciotipos (clones). Esta gran diversidad impide atribuir un perfil de virulencia característico a los clones identificados por *MLST* u otra metodología similar.

Sin embargo, analizando la frecuencia de los genes de virulencia podemos destacar que aunque esta colección presenta mayores porcentajes de aislados positivos para la mayoría de los genes de virulencia estudiados, la frecuencia de los genes *sfaD/E*, *papC*, *papG alelo-II* e *ireA* (Figura 27) es más baja. Estos resultados coinciden con algunos ya publicados en los que estos clones carecen de algunos genes de virulencia los cuales se esperaría encontrar debido a las características de las cepas [115][112].

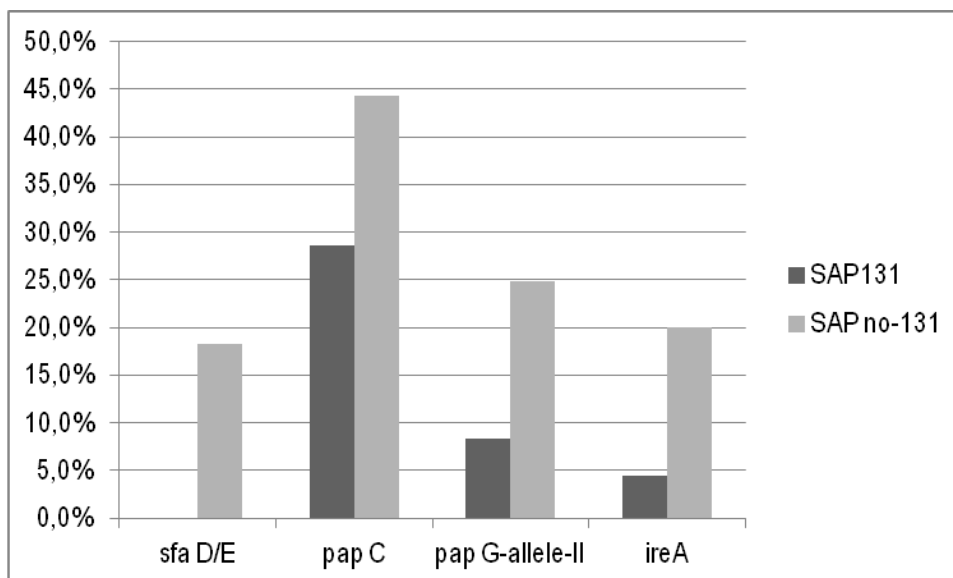


Figura 27: Gráfico donde se muestran los genes de virulencia menos frecuentes en el perfil alélico SAP131 frente a los aislados no-SAP131 de nuestro estudio.

Según los estudios realizados hasta ahora se puede concluir que *E.coli* ST131 es que es un clon de rápida dispersión mundial y que posee genes de resistencia a β -lactámicos. EL viruloma de estos clones presenta una gran diversidad encontrando *E.coli* ST131 con un alto número de genes de virulencia, y también *E. coli* ST131 con un número de genes de virulencia similar a la de cepa comensales de *E. coli* [115].

5.3 Correlaciones con la clínica

Aunque este estudio se ha centrado en la descripción genética de las poblaciones, entre las motivaciones originales del trabajo estaba la cuestión de la relación entre la cepa responsable de la infección y las manifestaciones o consecuencias clínicas. Existen muchos estudios durante los últimos años que han buscado asociaciones entre genes de virulencia y parámetros clínicos con el objetivo de predecir el riesgo o la evolución de las infecciones producidas por los diferentes clones. En la mayoría de los estudios se observa que los factores que más peso tienen suelen ser factores dependientes del paciente, no del microorganismo, sin embargo en muchos de ellos se observan también asociaciones entre determinados genes de virulencia y morbilidad o mortalidad. El problema es que mientras que los factores dependientes del paciente aparecen de

manera reproducible en la mayoría de los trabajos, las asociaciones con genes de virulencia varían entre unos trabajos y otros, y a veces son contradictorias.

En dos de las colecciones presentadas en este trabajo (SEPEC-II y SEPEC-BLEE) se recogieron de manera exhaustiva datos clínicos, lo que nos permitió explorar las asociaciones entre factores microbiológicos y factores del paciente.

El estudio de la colección SEPEC-II se realizó en colaboración con el servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario La Paz, y el análisis estadístico de las asociaciones entre datos clínicos y microbiológicos formó parte de la tesis Doctoral de la Dra. Marta Mora Rillo [69] [73]. Las principales conclusiones fueron :

1.- Se observa una asociación entre el gen *cnf* (Del Inglés : **Cytotoxic Necrotizing Factor**), cuyo producto es una proteína citotóxica, y el desarrollo de Sepsis Grave o Shock Séptico. La gran toxicidad en las células que parece producir la expresión de este gen, podría corresponderse con su asociación con Sepsis Grave o Shock Séptico en nuestro trabajo. Estos resultados coinciden con lo descrito por Jaureguy, et al., en 2007 [116], aunque en otros estudios esta asociación no se ha observado [96].

2.- El gen de virulencia *fyuA* se asocia de manera independiente con mortalidad. Este gen codifica para el receptor del sideróforo yersiniabactina. De nuevo, nuestros datos coinciden con lo publicado por Jaureguy, et al., en 2007 [116], aunque otros investigadores como Leforr et al., en su estudio de 2011 [117] ven con sus análisis resultados opuestos a este.

3.- Los genes *papG-alelo-II* y *papG-alelo-III* se asocian con una mayor supervivencia de los pacientes. Estos genes codifican diferentes variantes de la subunidad distal de las fimbrias de tipo P. Estas proteínas son altamente inmunogénicas, lo que podría tener como consecuencia que estos aislados sean neutralizados con más facilidad [116].

Por otra parte, el estudio de la colección SEPEC-BLEE se hizo en colaboración con el Servicio de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla [70][96]. Las principales conclusiones fueron:

1.- Ni los grupos filogenéticos, ni ningún gen de virulencia se asoció significativamente con factores de predisposición del paciente ni con el origen de la bacteriemia [70].

2.- El gen *papG-alelo- II* parece tener carácter protector frente a mortalidad. Además este gen mostró asociación con el grupo filogenético D y con aislados portadores del gen CTXM-9 [96]. Este resultado concuerda con el obtenido en el trabajo de *Mora-Rillo M. et al.*, publicado en 2015 donde este gen se asocia a mayor supervivencia de los pacientes [73].

3.- El gen *ibeA* se asoció significativamente a mayor mortalidad. Los aislados positivos para este gen se asociaron también a cepas ST131-B2 [96]. Estos resultados coinciden con el estudio en un modelo de infección murino desarrollado por *Johnson JR. et al.*, en 2006 [118].

4.- Los aislados fueron agrupados por su similitud en perfiles de virulencia (Figura 28).

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	Others
<i>papC</i>					■	■	
<i>papGI</i>					■		
<i>papGII</i>					■		
<i>papGIII</i>						■	
<i>sfaD/E</i>						■	
<i>afaB/C</i>				■			
<i>iha</i>				■	■		
<i>fimH</i>	■	■	■	■	■	■	■
<i>hlyA</i>						■	
<i>cnf1</i>						■	
<i>cdtB</i>							
<i>sat</i>		■		■	■	■	
<i>fyuA</i>	■	■	■	■	■	■	■
<i>iutA</i>	■	■	■	■	■	■	■
<i>iucD</i>	■	■	■	■	■	■	■
<i>iroN</i>	■	■	■	■	■	■	■
<i>Kps MTII</i>		■		■		■	
<i>traT</i>	■	■	■	■	■	■	■
<i>cvaC</i>	■	■			■	■	
<i>ompT</i>	■	■	■	■	■	■	■
<i>ibeA</i>						■	
<i>usp</i>				■		■	
<i>malX</i>		■	■	■	■	■	■
<i>svg</i>							
<i>ireA</i>			■		■		

Figura 28: Distribución de los genes de virulencia por grupos. Figura obtenida del estudio realizado por Rodríguez-Baño et al, en 2012. [70]

Estos grupos mostraron algunas asociaciones interesantes [70]:

- ✓ Grupo C1: Se asoció significativamente a infecciones en pacientes jóvenes.
- ✓ Grupo C2: Asociados con mayor frecuencia a infecciones de origen del tracto urinario.
- ✓ Grupo C4: Mayor frecuencia de aislados positivos para los genes del grupo CTX-M-1, resistentes a amoxicilina/clavulánico y tobramicina. Además este grupo se asocia a bacteriemias con origen de la infección del tracto urinario o tracto biliar.

- ✓ Grupo C5: Tienen una menor frecuencia de factores de predisposición local.
- ✓ Grupo C6: Aislados con menor frecuencia de resistencia a ciprofloxacino.

Estos resultados coinciden con algunos estudios como el realizado en 2009 por *Pitout JDD. et al.*, [119] o el de *Courpon-Claudinonnet al.*, en 2011 [120], aunque otros investigadores como *Sannes MR. et al.*, en 2004 [67] o *Bukh AS. et al.*, en 2009 [121] encuentran resultados contrarios en sus estudios.

Los resultados de ambos estudios muestran una alta diversidad en presencia de genes de virulencia y de perfiles de virulencia incluso dentro de un mismo grupo clonal. Esto dificulta encontrar asociaciones entre gen de virulencia y/o grupo clonal con factores relacionados con el paciente. Los estudios basados en presencia/ausencia de genes de virulencia no tienen en cuenta ni las interacciones entre los genes y el fondo genético, ni la expresión de los mismos. Por este motivo se están planteando aproximaciones diferentes [95] como el análisis de perfiles de virulencia [70] o de genomas completos [94] que podrían mostrar resultados más robustos que el estudio de genes y aislados individuales.

5.4 Diversidad genómica de los ExPEC

Una consecuencia del desarrollo de la secuenciación de genomas completos, y de la genómica comparativa durante los últimos años es que el concepto de clonalidad de las especies bacterianas se ha difuminado. Cuando se estudia la parte conservada del genoma resulta razonable hablar de clones, puesto que existen grupos de aislados que tienen exactamente el mismo perfil alélico. Pero cuando se analiza la parte variable de la población, se observa una diversidad enorme incluso dentro de los perfiles alélicos "clonales". Esta variación se debe principalmente a la alta movilidad de algunos elementos como islas de patogenicidad, integrones o plásmidos.

Utilizando un esquema de SNPs basado en un *MLST* hemos analizado varias colecciones de ExPECs. El análisis de la cobertura del muestreo mediante curvas de rarefacción (Figura 29) muestra que la diversidad de la fracción conservada es limitada, las curvas tienen tendencia a la saturación, y el cálculo de diversidad

mediante el índice de Chao1 indica que el número de perfiles diferentes es del orden de unos pocos centenares. La fracción variable sin embargo tiene un comportamiento diferente, sin tendencia a la saturación.

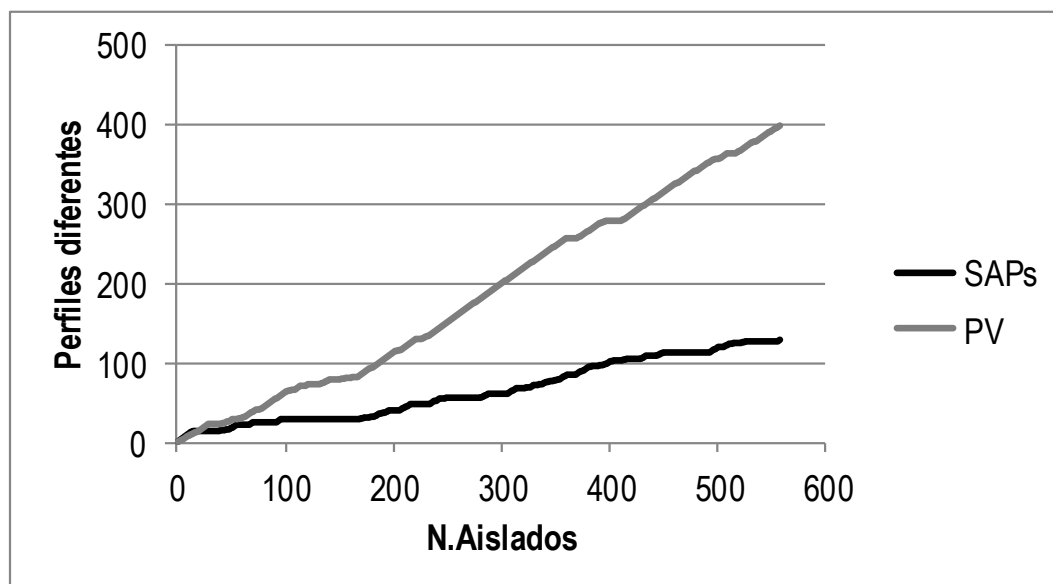


Figura 29: Curvas de rarefacción de las colecciones ExPEC donde se muestra el número de perfiles alélicos y de virulencia diferentes por cada aislado nuevo.

Hasta cierto punto estos resultados eran previsibles puesto que el pangenoma de *E. coli* es abierto [122][10]. Aunque la limitación del estudio a un grupo poblacional como son las cepas patógenas extraintestinales responsables de bacteriemias o urocultivos podría haber limitado la diversidad, los resultados muestran lo contrario, lo que identificamos como ExPECs no corresponde a un grupo genéticamente bien definido, sino que hay una amplia variedad de clones capaces de causar infección. Esto es lógico, puesto que se trata de infecciones oportunistas, en las que también juega un papel importante el paciente, su estado inmunológico, sus enfermedades de base, y otros factores relacionados como puede ser la presencia de dispositivos o los tratamientos antibióticos previos. Es interesante destacar que las cuatro colecciones mostraron un patrón similar, unos pocos clones agrupan la mitad de los aislados, mientras que la mitad restante está formada por clones poco frecuentes, muchos de ellos únicos. Es decir, que a pesar

de la gran diversidad, sí existen algunos clones más frecuentes. La cuestión es entonces si estos clones son más virulentos, o simplemente son más prevalentes en la población. Aunque se han publicado diversos trabajos intentando resolver esta cuestión [25] [123] [124], no se ha llegado a una conclusión definitiva, y probablemente lo que se necesitarían serían estudios en población sana para establecer las frecuencias basales de los diferentes clones.

Este estudio tiene algunas limitaciones, la principal es que como ya se ha comentado, no tenemos ninguna colección de *E. coli* no patógeno/comensal con la que poder comparar los resultados obtenidos con la población ExPEC. Por otro lado, el análisis del viruloma se limita a determinar la presencia o ausencia de una serie de genes de virulencia pero en ningún caso se estudia la expresión de éstos genes y sus variaciones en las diferentes cepas. El estudio de la expresión de genes de virulencia sería muy interesante pero es difícil definir las condiciones en las que debería medirse la expresión de estos genes. La expresión de un gen puede variar dependiendo de las condiciones de su entorno por lo que determinar si la expresión se debe medir en medios de cultivo, en sangre de pacientes o en animales modelos es un punto clave para la obtención de resultados aplicables en las infecciones en humanos.

Con los datos obtenidos en este trabajo se puede concluir que el Pangenoma de *E. coli* Patógeno Extraintestinal es altamente diverso incluso a nivel subclonal. Utilizando un conjunto de 25 genes de virulencia (0,5% de un genoma típico) encontramos 468 perfiles de virulencia diferentes en 643 aislados clínicos. A esta diversidad habría que añadir las diferencias en expresión de los diferentes genes en cada fondo genético. Si a esto se añade la heterogeneidad de los pacientes, no es extraño que las correlaciones con los estudios clínicos sean poco reproducibles, o contradictorias en diferentes estudios. Determinar el impacto clínico de los diferentes genes de virulencia requerirá cambiar el enfoque "gen a gen" por un enfoque más global que incluya no sólo secuenciación genómico, sino análisis de tipo GWAS (*genome-wide association studies*).

Conclusiones

6. CONCLUSIONES

1.- Las diferentes colecciones de *E. coli* patogénicos Extraintestinales presentan una estructura similar: la mitad de la población está formada por unos pocos perfiles alélicos muy frecuentes y la otra mitad por perfiles alélicos de baja frecuencia, únicos en su mayoría.

2.- La diversidad genética de los genes conservados (MLST) determinada por pirosecuenciación de SNPs es alta pero limitada, e indica una población subyacente de unos pocos centenares de perfiles alélicos.

3.- La diversidad genética de la fracción variable del genoma representada por un grupo de genes de virulencia y medida en términos de presencia/ausencia de los genes es proporcional al número de aislados y aparentemente ilimitada.

4.- Esta diversidad es muy elevada incluso para los aislados que comparten un mismo perfil alélico. Así, la diversidad de la fracción variable en los aislados SAP131 es también proporcional al número de aislados y aparentemente ilimitada.

5.- Las dos medidas de diversidad muestran patrones diferentes e indican que el genoma conservado y el variable están desacoplados, es decir tienen dinámicas diferentes e independientes.

Referencias

- [1] G. J. Da Silva, N. Mendonça, and G. Da Silva, "Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*," *Virulence*, vol. 3, no. 1, pp. 18–28, 2012.
- [2] "Escherichia. Taxonomy Browser.": <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=83333>.
- [3] P. M. Hawkey, P. R. Edwards, and W. H. Ewing, *Identification of Enterobacteriaceae.*, Third edit. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 1972.
- [4] I. Orskov, F. Orskov, B. Jann, and K. Jann, "Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*," *Bacteriol. Rev.*, vol. 41, no. 3, pp. 667–710, Sep. 1977.
- [5] H. E. Kubitschek, "Cell volume increase in *Escherichia coli* after shifts to richer media," *J. Bacteriol.*, vol. 172, no. 1, pp. 94–101, Jan. 1990.
- [6] W. B. Peter Feng, Stephen D. Weagant , Michael A. Grant, "Laboratory Methods - Bacteriological Analytical Manual (BAM)," in *Center for Food Safety and Applied*, 8th ed., Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2013.
- [7] D. K. Goto and T. Yan, "Genotypic diversity of *Escherichia coli* in the water and soil of tropical watersheds in Hawaii," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 77, no. 12, pp. 3988–97, Jun. 2011.
- [8] M. Islam, M. P. Doyle, S. C. Phatak, P. Millner, and X. Jiang, "Persistence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in Soil and on Leaf Lettuce and Parsley Grown in Fields Treated with Contaminated Manure Composts or Irrigation Water," *J. Food Prot.*, pp. 1328–1547, 2004.
- [9] R. S. Kaas, C. Friis, D. W. Ussery, and F. M. Aarestrup, "Estimating variation within the genes and inferring the phylogeny of 186 sequenced diverse *Escherichia coli* genomes.," *BMC Genomics*, vol. 13, p. 577, Jan. 2012.

- [10] D. a Rasko, M. J. Rosovitz, G. S. a Myers, E. F. Mongodin, W. F. Fricke, P. Gajer, J. Crabtree, M. Sebahia, N. R. Thomson, R. Chaudhuri, I. R. Henderson, V. Sperandio, and J. Ravel, "The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates.," *J. Bacteriol.*, vol. 190, no. 20, pp. 6881–93, Oct. 2008.
- [11] S. Fukiya, H. Mizoguchi, T. Tobe, and H. Mori, "Extensive genomic diversity in pathogenic *Escherichia coli* and *Shigella* Strains revealed by comparative genomic hybridization microarray.," *J. Bacteriol.*, vol. 186, no. 12, pp. 3911–21, Jun. 2004.
- [12] S. S. L. Chen, C.-S. C. Hung, J. Xu, C. S. Reigstad, V. Magrini, A. Sabo, D. Blasiar, T. Bieri, R. R. Meyer, P. Ozersky, J. R. Armstrong, R. S. Fulton, J. P. Latreille, J. Spieth, T. M. Hooton, E. R. Mardis, S. J. Hultgren, and J. I. Gordon, "Identification of genes subject to positive selection in uropathogenic strains of *Escherichia coli*: a comparative genomics approach," *Proc. ...*, vol. 103, no. 15, pp. 5977–82, Apr. 2006.
- [13] R. K. Selander, D. A. Caugant, H. Ochman, J. M. Musser, M. N. Gilmour, and T. S. Whittam, "Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 51, no. 5, pp. 873–84, May 1986.
- [14] R. R. Chaudhuri and I. R. Henderson, "The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny," *Infect. Genet. Evol.*, vol. 12, no. 2, pp. 214–226, Mar. 2012.
- [15] P. Desjardins, B. Picard, B. Kaltenböck, J. Elion, and E. Denamur, "Sex in *Escherichia coli* does not disrupt the clonal structure of the population: evidence from random amplified polymorphic DNA and restriction-fragment-length polymorphism.," *J. Mol. Evol.*, vol. 41, no. 4, pp. 440–8, Oct. 1995.
- [16] E. Diamant, Y. Palti, R. Gur-Arie, H. Cohen, E. M. Hallerman, and Y. Kashi, "Phylogeny and strain typing of *Escherichia coli*, inferred from variation at

- mononucleotide repeat loci.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 70, no. 4, pp. 2464–73, Apr. 2004.
- [17] O. Clermont, S. Bonacorsi, and E. Bingen, "Rapid and simple determination of the Escherichia coli phylogenetic group.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 66, no. 10, pp. 4555–8, Oct. 2000.
- [18] O. Clermont, J. K. Christenson, E. Denamur, and D. M. Gordon, "The Clermont Escherichia coli phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups.," *Environ. Microbiol. Rep.*, vol. 5, no. 1, pp. 58–65, Feb. 2013.
- [19] M. C. Maiden, J. A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J. E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D. A. Caugant, I. M. Feavers, M. Achtman, and B. G. Spratt, "Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, no. 6, pp. 3140–5, Mar. 1998.
- [20] T. Wirth, D. Falush, R. Lan, F. Colles, P. Mensa, L. H. Wieler, H. Karch, P. R. Reeves, M. C. J. Maiden, H. Ochman, and M. Achtman, "Sex and virulence in Escherichia coli: an evolutionary perspective.," *Mol. Microbiol.*, vol. 60, no. 5, pp. 1136–51, Jun. 2006.
- [21] P. Escobar-Páramo, A. Sabbagh, P. Darlu, O. Pradillon, C. Vaury, E. Denamur, and G. Lecointre, "Decreasing the effects of horizontal gene transfer on bacterial phylogeny: the Escherichia coli case study.," *Mol. Phylogenet. Evol.*, vol. 30, no. 1, pp. 243–50, Jan. 2004.
- [22] G. Lecointre, L. Rachdi, P. Darlu, and E. Denamur, "Escherichia coli molecular phylogeny using the incongruence length difference test.," *Mol. Biol. Evol.*, vol. 15, no. 12, pp. 1685–1695, Dec. 1998.
- [23] "MultiLocus Sequence Type Escherichia coli.":
<http://www.mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>.

- [24] N. Fernández-Romero, M. P. Romero-Gómez, M. R. Gómez-Gil, and J. Mingorance, "Epidemic population structure of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* determined by single nucleotide polymorphism pyrosequencing.," *Infect. Genet. Evol.*, vol. 11, no. 7, pp. 1655–63, Oct. 2011.
- [25] P. Duriez, O. Clermont, S. Bonacorsi, E. Bingen, A. Chaventré, J. Elion, B. Picard, E. Denamur, E. Bingen, B. Picard, E. Denamur, S. Bonacorsi, A. Chaventré, E. Bingen, A. Chaventré, J. Elion, B. Picard, and E. Denamur, "Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations.," *Microbiology*, vol. 147, no. Pt 6, pp. 1671–6, Jun. 2001.
- [26] B. B. Finlay and S. Falkow, "Common themes in microbial pathogenicity revisited.," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 61, no. 2, pp. 136–69, Jun. 1997.
- [27] H. Ochman and I. B. Jones, "Evolutionary dynamics of full genome content in *Escherichia coli*.," *EMBO J.*, vol. 19, no. 24, pp. 6637–43, Dec. 2000.
- [28] R. Bentley and R. Meganathan, "Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria.," *Microbiol. Rev.*, vol. 46, no. 3, pp. 241–80, Sep. 1982.
- [29] M. a Croxen and B. B. Finlay, "Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity.," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 8, no. 1, pp. 26–38, Jan. 2010.
- [30] T. J. Wiles, J. M. Bower, M. J. Redd, and M. a Mulvey, "Use of zebrafish to probe the divergent virulence potentials and toxin requirements of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*.," *PLoS Pathog.*, vol. 5, no. 12, p. e1000697, Dec. 2009.
- [31] T. K. McDaniel, K. G. Jarvis, M. S. Sonnenberg, and J. B. Kaper, "A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, no. 5, pp. 1664–8, Feb. 1995.

- [32] G. Wu, B. Carter, M. Mafura, E. Liebana, M. J. Woodward, and M. F. Anjum, "Genetic diversity among *Escherichia coli* O157:H7 isolates and identification of genes linked to human infections.," *Infect. Immun.*, vol. 76, no. 2, pp. 845–56, Mar. 2008.
- [33] A. M. Johnson, R. S. Kaushik, D. H. Francis, J. M. Fleckenstein, and P. R. Hardwidge, "Heat-labile enterotoxin promotes *Escherichia coli* adherence to intestinal epithelial cells.," *J. Bacteriol.*, vol. 191, no. 1, pp. 178–86, Jan. 2009.
- [34] N. C. Kesty, K. M. Mason, M. Reedy, S. E. Miller, and M. J. Kuehn, "Enterotoxigenic *Escherichia coli* vesicles target toxin delivery into mammalian cells.," *EMBO J.*, vol. 23, no. 23, pp. 4538–49, Nov. 2004.
- [35] K. Chakraborty, S. Ghosh, H. Koley, A. K. Mukhopadhyay, T. Ramamurthy, D. R. Saha, D. Mukhopadhyay, S. Roychowdhury, T. Hamabata, Y. Takeda, and S. Das, "Bacterial exotoxins downregulate cathelicidin (hCAP-18/LL-37) and human beta-defensin 1 (HBD-1) expression in the intestinal epithelial cells.," *Cell. Microbiol.*, vol. 10, no. 12, pp. 2520–37, Dec. 2008.
- [36] D. A. Rasko, D. R. Webster, J. W. Sahl, A. Bashir, N. Boisen, F. Scheutz, E. E. Paxinos, R. Sebra, C.-S. Chin, D. Iliopoulos, A. Klammer, P. Peluso, L. Lee, A. O. Kislyuk, J. Bullard, A. Kasarskis, S. Wang, J. Eid, D. Rank, J. C. Redman, S. R. Steyert, J. Frimodt-Møller, C. Struve, A. M. Petersen, K. A. Krogfelt, J. P. Nataro, E. E. Schadt, and M. K. Waldor, "Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 365, no. 8, pp. 709–17, Aug. 2011.
- [37] M. Ogawa, Y. Handa, H. Ashida, M. Suzuki, and C. Sasakawa, "The versatility of *Shigella* effectors.," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 6, no. 1, pp. 11–6, Jan. 2008.
- [38] G. N. Schroeder and H. Hilbi, "Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion.," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 21, no. 1, pp. 134–56, Jan. 2008.

- [39] A. L. Servin, "Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering Escherichia coli.," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 18, no. 2, pp. 264–92, Apr. 2005.
- [40] B. I. Eisenstein and G. W. Jones, "The spectrum of infections and pathogenic mechanisms of Escherichia coli.," *Adv. Intern. Med.*, vol. 33, pp. 231–52, Jan. 1988.
- [41] T. Wiles, R. Kulesus, and M. Mulvey, "Origins and virulence mechanisms of uropathogenic Escherichia coli.," *Exp. Mol. Pathol.*, vol. 85, no. 1, pp. 11–19, 2008.
- [42] N. A. Khan, Y. Kim, S. Shin, and K. S. Kim, "FimH-mediated Escherichia coli K1 invasion of human brain microvascular endothelial cells.," *Cell. Microbiol.*, vol. 9, no. 1, pp. 169–78, Jan. 2007.
- [43] N. V Prasadarao, "Identification of Escherichia coli outer membrane protein A receptor on human brain microvascular endothelial cells.," *Infect. Immun.*, vol. 70, no. 8, pp. 4556–63, Aug. 2002.
- [44] K. S. Kim, "Mechanisms of microbial traversal of the blood-brain barrier.," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 6, no. 8, pp. 625–34, Aug. 2008.
- [45] G. Muñoz-Gamito, "Bacteriemias en la población de mayores de 80 años," *Rev. clínica española*, vol. 212, no. 6, pp. 273–280, 2012.
- [46] O. Ferrández, S. Grau, P. Saballs, S. Luque, R. Terradas, and E. Salas, "[Mortality risk factors for bloodstream infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing microorganisms].," *Rev. clínica española*, vol. 211, no. 3, pp. 119–26, Mar. 2011.
- [47] E. Z. Ron, "Distribution and evolution of virulence factors in septicemic Escherichia coli.," *Int. J. Med. Microbiol.*, vol. 300, no. 6, pp. 367–70, Aug. 2010.

- [48] J. R. Johnson and A. L. Stell, "Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise.," *J. Infect. Dis.*, vol. 181, no. 1, pp. 261–72, Jan. 2000.
- [49] T. A. Russo, U. B. Carlino, and J. R. Johnson, "Identification of a new iron-regulated virulence gene, *ireA*, in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*," *Infect. Immun.*, vol. 69, no. 10, pp. 6209–16, Oct. 2001.
- [50] P. J. Herzer, S. Inouye, M. Inouye, and T. S. Whittam, "Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*," *J. Bacteriol.*, vol. 172, no. 11, pp. 6175–81, Nov. 1990.
- [51] T. Russo and J. Johnson, "Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC," *J. Infect. Dis.*, pp. 1753–1754, 2000.
- [52] G. J. Sharples and R. G. Lloyd, "A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 18, no. 22, pp. 6503–8, Nov. 1990.
- [53] J. R. Johnson and T. a. Russo, "Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: 'The other bad E coli,'" *J. Lab. Clin. Med.*, vol. 139, no. 3, pp. 155–162, Mar. 2002.
- [54] L. W. Riley, "Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*," *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 20, no. 5, pp. 380–90, May 2014.
- [55] M. P. Glode, A. Sutton, J. B. Robbins, G. H. McCracken, E. C. Gotschlich, B. Kaijser, and L. A. Hanson, "Neonatal meningitis due of *Escherichia coli* K1.," *J. Infect. Dis.*, vol. 136 Suppl, pp. S93–S97, Aug. 1977.
- [56] K. A. Tivendale, C. M. Logue, S. Kariyawasam, D. Jordan, A. Hussein, G. Li, Y. Wannemuehler, and L. K. Nolan, "Avian-pathogenic *Escherichia coli* strains are similar to neonatal meningitis *E. coli* strains and are able to cause meningitis in

- the rat model of human disease.," *Infect. Immun.*, vol. 78, no. 8, pp. 3412–9, Aug. 2010.
- [57] A. Mora, C. López, G. Dabhi, M. Blanco, J. E. Blanco, M. P. Alonso, A. Herrera, R. Mamani, S. Bonacorsi, M. Moulin-Schouleur, and J. Blanco, "Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O1:K1:H7/NM from human and avian origin: detection of clonal groups B2 ST95 and D ST59 with different host distribution.," *BMC Microbiol.*, vol. 9, p. 132, Jan. 2009.
- [58] F. Bert, J. R. Johnson, B. Ouattara, V. Leflon-Guibout, B. Johnston, E. Marcon, D. Valla, R. Moreau, and M.-H. Nicolas-Chanoine, "Genetic diversity and virulence profiles of *Escherichia coli* isolates causing spontaneous bacterial peritonitis and bacteremia in patients with cirrhosis.," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 48, no. 8, pp. 2709–14, Aug. 2010.
- [59] S. J. Weissman, S. Chattopadhyay, P. Aprikian, M. Obata-Yasuoka, Y. Yarova-Yarovaya, A. Stapleton, W. Ba-Thein, D. Dykhuizen, J. R. Johnson, and E. V. Sokurenko, "Clonal analysis reveals high rate of structural mutations in fimbrial adhesins of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*," *Mol. Microbiol.*, vol. 59, no. 3, pp. 975–88, Feb. 2006.
- [60] S. Adams-Sapper, B. A. Diep, F. Perdreau-Remington, and L. W. Riley, "Clonal composition and community clustering of drug-susceptible and -resistant *Escherichia coli* isolates from bloodstream infections.," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 57, no. 1, pp. 490–7, Jan. 2013.
- [61] S. Brisse, L. Diancourt, C. Laouénan, M. Vigan, V. Caro, G. Arlet, L. Drieux, V. Leflon-Guibout, F. Mentré, V. Jarlier, and M.-H. Nicolas-Chanoine, "Phylogenetic distribution of CTX-M- and non-extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates: group B2 isolates, except clone ST131, rarely produce CTX-M enzymes.," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 50, no. 9, pp. 2974–81, Sep. 2012.

- [62] J. R. Johnson, B. Johnston, C. R. Clabots, M. A. Kuskowski, E. Roberts, and C. DebRoy, "Virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* serogroup O6 isolates from humans, dogs, and cats.," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 46, no. 2, pp. 417–22, Feb. 2008.
- [63] M. Totsika, S. A. Beatson, S. Sarkar, M.-D. Phan, N. K. Petty, N. Bachmann, M. Szubert, H. E. Sidjabat, D. L. Paterson, M. Upton, and M. A. Schembri, "Insights into a multidrug resistant *Escherichia coli* pathogen of the globally disseminated ST131 lineage: genome analysis and virulence mechanisms.," *PLoS One*, vol. 6, no. 10, p. e26578, Jan. 2011.
- [64] V. Leflon-Guibout, J. Blanco, K. Amaqdouf, A. Mora, L. Guize, and M.-H. Nicolas-Chanoine, "Absence of CTX-M enzymes but high prevalence of clones, including clone ST131, among fecal *Escherichia coli* isolates from healthy subjects living in the area of Paris, France.," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 46, no. 12, pp. 3900–5, Dec. 2008.
- [65] T. M. Coque, A. Novais, A. Carattoli, L. Poirel, J. Pitout, L. Peixe, F. Baquero, R. Cantón, and P. Nordmann, "Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15.," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 14, no. 2, pp. 195–200, Feb. 2008.
- [66] O. Clermont, M. Lavollay, S. Vimont, C. Deschamps, C. Forestier, C. Branger, E. Denamur, and G. Arlet, "The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup.," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 61, no. 5, pp. 1024–8, May 2008.
- [67] M. R. Sannes, M. A. Kuskowski, K. Owens, A. Gajewski, and J. R. Johnson, "Virulence factor profiles and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from veterans with bacteremia and uninfected control subjects.," *J. Infect. Dis.*, vol. 190, no. 12, pp. 2121–8, Dec. 2004.
- [68] S. F. Murphy and P. Thumbikat, "The importance of the 'V'-Factor: *Escherichia coli* bacteremia and sepsis," *Virulence*, vol. 6, no. 2, pp. 107–108, Feb. 2015.

- [69] M. Mora-Rillo, Tesis Doctoral: "Relevancia de los factores de virulencia de *Escherichia coli* en el desarrollo del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica y mortalidad en pacientes con bacteriemia por *E. coli*," Universidad Autónoma de Madrid, 2013.
- [70] J. Rodríguez-Baño, J. Mingorance, N. Fernández-Romero, L. Serrano, L. López-Cerero, A. Pascual, P. Gijón, J. Ramón, J. M. Cisneros, and C. Peña, "Virulence profiles of bacteremic extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*: association with epidemiological and clinical features," *PLoS One*, vol. 7, no. 9, p. e44238, Sep. 2012.
- [71] L. López-Cerero, M. D. Navarro, M. Bellido, A. Martín-Peña, L. Viñas, J. M. Cisneros, S. L. Gómez-Langley, H. Sánchez-Monteseirín, I. Morales, A. Pascual, and J. Rodríguez-Baño, "Escherichia coli belonging to the worldwide emerging epidemic clonal group O25b/ST131: risk factors and clinical implications.," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 69, no. 3, pp. 809–14, Mar. 2014.
- [72] Maniatis J., T. Sambrook, and E. F. Fritsch, *Molecular cloning: a laboratory manual*. 1982.
- [73] M. Mora-Rillo, N. Fernández-Romero, C. N.-S. Francisco, J. Díez-Sebastián, M. P. Romero-Gómez, F. A. Fernández, J. R. A. López, and J. Mingorance, "Impact of virulence genes on sepsis severity and survival in *Escherichia coli* bacteremia.," *Virulence*, vol. 6, no. 1, pp. 93–100, Jan. 2015.
- [74] M. Ronaghi, M. Uhlén, and P. Nyérén, "A sequencing method based on real-time pyrophosphate.," *Science*, vol. 281, no. 5375, pp. 363, 365, 1998.
- [75] "MEGA4." : <http://www.megasoftware.net>.
- [76] "SNPT." : <http://www.shigatox.net/cgi-bin/stec/snpt>.
- [77] C. Le Bouguenec, M. Archambaud, and A. Labigne, "Rapid and specific detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* adhesin-encoding operons in uropathogenic

- Escherichia coli strains by polymerase chain reaction," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 30, no. 5, pp. 1189–1193, Jul. 1992.
- [78] U.-M. Kärkkäinen, J. Kauppinen, R. Ikäheimo, M.-L. Katila, and A. Siitonen, "Rapid and specific detection of three different G adhesin classes of P-fimbriae in uropathogenic Escherichia coli by polymerase chain reaction," *J. Microbiol. Methods*, vol. 34, no. 1, pp. 23–29, Sep. 1998.
- [79] M. Blanco, J. E. Blanco, M. P. Alonso, A. Mora, C. Balsalobre, F. Munoa, A. Juárez, and J. Blanco, "Detection of pap, sfa and afa adhesin-encoding operons in uropathogenic Escherichia coli strains: Relationship with expression of adhesins and production of toxins," *Res. Microbiol.*, vol. 148, no. 9, pp. 745–755, Dec. 1997.
- [80] S. Yamamoto, "Detection of urovirulence factors in Escherichia coli by multiplex polymerase chain reaction," *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, vol. 12, no. 2, pp. 85–90, Oct. 1995.
- [81] M. Ananias and T. Yano, "Serogroups and virulence genotypes of Escherichia coli isolated from patients with sepsis.," *Braz. J. Med. Biol. Res.*, vol. 41, no. 10, pp. 877–883, Oct. 2008.
- [82] M. Nakano, "Structural and sequence diversity of the pathogenicity island of uropathogenic Escherichia coli which encodes the USP protein," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 205, no. 1, pp. 71–76, Nov. 2001.
- [83] T. A. Russo, U. B. Carlino, and J. R. Johnson, "Identification of a New Iron-Regulated Virulence Gene, ireA, in an Extraintestinal Pathogenic Isolate of Escherichia coli," *Infect. Immun.*, vol. 69, no. 10, pp. 6209–6216, Oct. 2001.
- [84] J. P. Girardeau, L. Lalioui, A. M. O. Said, C. De Champs, and C. Le Bouguenec, "Extended Virulence Genotype of Pathogenic Escherichia coli Isolates Carrying the afa-8 Operon: Evidence of Similarities between Isolates from Humans and

- Animals with Extraintestinal Infections,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 41, no. 1, pp. 218–226, Jan. 2003.
- [85] P. Bidet, A. Metais, F. Mahjoub-Messai, L. Durand, M. Dehem, Y. Aujard, E. Bingen, X. Nassif, and S. Bonacorsi, “Detection and Identification by PCR of a Highly Virulent Phylogenetic Subgroup among Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli B2 Strains,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, no. 7, pp. 2373–2377, Apr. 2007.
- [86] “Análisis Estadístico on line.” : <http://graphpad.com/quickcalcs>.
- [87] “E-Burst.” : <http://eburst.mlst.net/>.
- [88] E. J. Feil, B. C. Li, D. M. Aanensen, W. P. Hanage, and B. G. Spratt, “eBURST: Inferring Patterns of Evolutionary Descent among Clusters of Related Bacterial Genotypes from Multilocus Sequence Typing Data,” *J. Bacteriol.*, vol. 186, no. 5, pp. 1518–1530, Mar. 2004.
- [89] P. D. Schloss, S. L. Westcott, T. Ryabin, J. R. Hall, M. Hartmann, E. B. Hollister, R. A. Lesniewski, B. B. Oakley, D. H. Parks, C. J. Robinson, J. W. Sahl, B. Stres, G. G. Thallinger, D. J. Van Horn, and C. F. Weber, “Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 75, no. 23, pp. 7537–41, Dec. 2009.
- [90] N. J. Gotelli and R. K. Colwell, “Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness,” *Ecol. Lett.*, vol. 4, no. 4, pp. 379–391, Jul. 2001.
- [91] “BoxPlot.” : <http://boxplot.tyerslab.com/>.
- [92] M. Bingen-Bidois, “Phylogenetic Analysis and Prevalence of Urosepsis Strains of Escherichia coli Bearing Pathogenicity Island-Like Domains,” *Infect. Immun.*, vol. 70, no. 6, pp. 3216–3226, Jun. 2002.

- [93] B. Picard, J. S. Garcia, S. Gouriou, P. Duriez, N. Brahimi, E. Bingen, J. Elion, and E. Denamur, "The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection?," *Infect. Immun.*, vol. 67, no. 2, pp. 546–553, Feb. 1999.
- [94] S. J. Salipante, T. Kawashima, C. Rosenthal, D. R. Hoogestraat, L. A. Cummings, D. J. Sengupta, T. T. Harkins, B. T. Cookson, and N. G. Hoffman, "Performance comparison of Illumina and ion torrent next-generation sequencing platforms for 16S rRNA-based bacterial community profiling," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 80, no. 24, pp. 7583–91, Dec. 2014.
- [95] N. Fernández-Romero, M. P. Romero-Gómez, M. Mora-Rillo, J. Rodríguez-Baño, L. López-Cerero, Á. Pascual, and J. Mingorance, "Uncoupling between core genome and virulome in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*," *Can. J. Microbiol.*, pp. 1–6, Feb. 2015.
- [96] J. Rodríguez-Baño, J. Mingorance, N. Fernández-Romero, L. Serrano, L. López-Cerero, and A. Pascual, "Outcome of bacteraemia due to extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*: Impact of microbiological determinants," *J. Infect.*, vol. 67, no. 1, pp. 27–34, 2013.
- [97] V. Souza, M. Rocha, A. Valera, and L. E. Eguiarte, "Genetic structure of natural populations of *Escherichia coli* in wild hosts on different continents," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 65, no. 8, pp. 3373–3385, 1999.
- [98] S. Guenther, K. Aschenbrenner, I. Stamm, A. Bethe, T. Semmler, A. Stubbe, M. Stubbe, N. Batsajkhan, Y. Glupczynski, L. H. Wieler, and C. Ewers, "Comparable high rates of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in birds of prey from Germany and Mongolia," *PLoS One*, vol. 7, no. 12, p. e53039, Jan. 2012.
- [99] L. Crémet, N. Caroff, C. Giraudeau, S. Dauvergne, D. Lepelletier, A. Reynaud, and S. Corvec, "Occurrence of ST23 complex phylogroup A *Escherichia coli* isolates producing extended-spectrum AmpC beta-lactamase in a French

- hospital.," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 54, no. 5, pp. 2216–8, May 2010.
- [100] R. A. Welch, V. Burland, G. Plunkett, P. Redford, P. Roesch, D. Rasko, E. L. Buckles, S.-R. Liou, A. Boutin, J. Hackett, D. Stroud, G. F. Mayhew, D. J. Rose, S. Zhou, D. C. Schwartz, N. T. Perna, H. L. T. Mobley, M. S. Donnenberg, and F. R. Blattner, "Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*," *Proc. ...*, vol. 99, no. 26, pp. 17020–4, Dec. 2002.
- [101] L. Grozdanov, C. Raasch, J. Schulze, U. Sonnenborn, G. Gottschalk, J. Hacker, and U. Dobrindt, "Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917.," *J. Bacteriol.*, vol. 186, no. 16, pp. 5432–41, Aug. 2004.
- [102] P. Klemm, V. Roos, G. C. Ulett, C. Svanborg, and M. A. Schembri, "Molecular characterization of the *Escherichia coli* asymptomatic bacteriuria strain 83972: the taming of a pathogen.," *Infect. Immun.*, vol. 74, no. 1, pp. 781–5, Jan. 2006.
- [103] A. Leimbach, J. Hacker, and U. Dobrindt, "E. coli as an All-Rounder: The Thin Line Between Commensalism and Pathogenicity," in *Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol. 358, 2013, pp. 3–32.
- [104] A. L. Lloyd, T. a Henderson, P. D. Vigil, and H. L. T. Mobley, "Genomic islands of uropathogenic *Escherichia coli* contribute to virulence.," *J. Bacteriol.*, vol. 191, no. 11, pp. 3469–81, Jun. 2009.
- [105] J. S. Kao, D. M. Stucker, J. W. Warren, and H. L. T. Mobley, "Pathogenicity island sequences of pyelonephritogenic *Escherichia coli* CFT073 are associated with virulent uropathogenic strains," *Infect. Immun.*, vol. 65, no. 7, pp. 2812–2820, 1997.

- [106] J. R. Johnson, S. J. Weissman, A. L. Stell, E. Trintchina, D. E. Dykhuizen, and E. V. Sokurenko, "Clonal and pathotypic analysis of archetypal *Escherichia coli* cystitis isolate NU14.," *J. Infect. Dis.*, vol. 184, no. 12, pp. 1556–65, Dec. 2001.
- [107] Y. Xie, V. Kolisnychenko, M. Paul-Satyaseela, S. Elliott, G. Parthasarathy, Y. Yao, G. Plunkett, F. R. Blattner, and K. S. Kim, "Identification and characterization of *Escherichia coli* RS218-derived islands in the pathogenesis of *E. coli* meningitis.," *J. Infect. Dis.*, vol. 194, no. 3, pp. 358–64, Aug. 2006.
- [108] T. J. Johnson, Y. Wannemuehler, S. J. Johnson, A. L. Stell, C. Doetkott, J. R. Johnson, K. S. Kim, L. Spanjaard, and L. K. Nolan, "Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 74, no. 22, pp. 7043–50, Nov. 2008.
- [109] I. Aibinu, T. Odugbemi, W. Koenig, and B. Ghebremedhin, "Sequence type ST131 and ST10 complex (ST617) predominant among CTX-M-15-producing *Escherichia coli* isolates from Nigeria.," *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 18, no. 3, pp. E49–51, Mar. 2012.
- [110] H. Shi, F. Sun, J. Chen, Q. Ou, W. Feng, X. Yong, and P. Xia, "Epidemiology of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing nosocomial -*Escherichia coli* infection in China.," *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, vol. 14, p. 4, Jan. 2015.
- [111] R. P. Maluta, C. M. Logue, M. R. T. Casas, T. Meng, E. A. L. Guastalli, T. C. G. Rojas, A. C. Montelli, T. Sadatsune, M. de Carvalho Ramos, L. K. Nolan, and W. D. da Silveira, "Overlapped sequence types (STs) and serogroups of avian pathogenic (APEC) and human extra-intestinal pathogenic (ExPEC) *Escherichia coli* isolated in Brazil.," *PLoS One*, vol. 9, no. 8, p. e105016, Jan. 2014.
- [112] H.-C. Chung, C.-H. Lai, J.-N. Lin, C.-K. Huang, S.-H. Liang, W.-F. Chen, Y.-C. Shih, H.-H. Lin, and J.-L. Wang, "Bacteremia caused by extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* sequence type ST131 and non-ST131

- clones: comparison of demographic data, clinical features, and mortality.," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 56, no. 2, pp. 618–22, Mar. 2012.
- [113] M. H. Nicolas-Chanoine, J. Blanco, V. Leflon-Guibout, R. Demarty, M. P. Alonso, M. M. Caniça, Y. J. Park, J. P. Lavigne, J. Pitout, and J. R. Johnson, "Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 61, no. 2, pp. 273–281, 2008.
- [114] J. R. Johnson, S. B. Porter, G. Zhanel, M. a Kuskowski, and E. Denamur, "Virulence of *Escherichia coli* clinical isolates in a murine sepsis model in relation to sequence type ST131 status, fluoroquinolone resistance, and virulence genotype.," *Infect. Immun.*, vol. 80, no. 4, pp. 1554–62, Apr. 2012.
- [115] J.-P. P. Lavigne, A. C. Vergunst, L. Goret, A. Sotto, C. Combescure, J. Blanco, D. O'Callaghan, and M.-H. H. Nicolas-Chanoine, "Virulence potential and genomic mapping of the worldwide clone *Escherichia coli* ST131," *PLoS One*, vol. 7, no. 3, pp. 1–10, Jan. 2012.
- [116] F. Jauréguy, E. Carbonnelle, S. Bonacorsi, C. Clec'h, P. Casassus, E. Bingen, B. Picard, X. Nassif, and O. Lortholary, "Host and bacterial determinants of initial severity and outcome of *Escherichia coli* sepsis," *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 13, no. 9, pp. 854–862, Sep. 2007.
- [117] A. Lefort, X. Panhard, O. Clermont, P.-L. Woerther, C. Branger, F. Mentré, B. Fantin, M. Wolff, and E. Denamur, "Host factors and portal of entry outweigh bacterial determinants to predict the severity of *Escherichia coli* bacteremia.," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 49, no. 3, pp. 777–83, Mar. 2011.
- [118] J. R. Johnson, O. Clermont, M. Menard, M. a Kuskowski, B. Picard, and E. Denamur, "Experimental mouse lethality of *Escherichia coli* isolates, in relation to accessory traits, phylogenetic group, and ecological source.," *J. Infect. Dis.*, vol. 194, no. 8, pp. 1141–1150, 2006.

- [119] J. D. D. Pitout, D. B. Gregson, L. Campbell, and K. B. Laupland, "Molecular characteristics of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates causing bacteremia in the Calgary Health Region from 2000 to 2007: emergence of clone ST131 as a cause of community-acquired infections," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 53, no. 7, pp. 2846–51, Jul. 2009.
- [120] A. Courpon-Claudinon, A. Lefort, X. Panhard, O. Clermont, Q. Dornic, B. Fantin, F. Mentré, M. Wolff, E. Denamur, and C. Branger, "Bacteraemia caused by third-generation cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in France: prevalence, molecular epidemiology and clinical features," *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 17, no. 4, pp. 557–65, Apr. 2011.
- [121] A. S. Bukh, H. C. Schønheyder, J. M. G. Emmersen, M. Sjøgaard, S. Bastholm, and P. Roslev, "Escherichia coli phylogenetic groups are associated with site of infection and level of antibiotic resistance in community-acquired bacteraemia: a 10 year population-based study in Denmark," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 64, no. 1, pp. 163–8, Jul. 2009.
- [122] A. Mira, A. B. Martín-Cuadrado, G. D'Áuria, F. Rodríguez-Valera, G. D. Áuria, F. Rodríguez-Valera, G. D'Áuria, and F. Rodríguez-Valera, "The bacterial pan-genome: A new paradigm in microbiology," *Int. Microbiol.*, vol. 13, no. 2, pp. 45–57, 2010.
- [123] M. Diard, L. Garry, M. Selva, T. Mosser, E. Denamur, and I. Matic, "Pathogenicity-associated islands in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* are fitness elements involved in intestinal colonization," *J. Bacteriol.*, vol. 192, no. 19, pp. 4885–93, Oct. 2010.
- [124] T. Le Gall, O. Clermont, S. Gouriou, B. Picard, X. Nassif, E. Denamur, and O. Tenaillon, "Extraintestinal virulence is a coincidental by-product of commensalism in B2 phylogenetic group *Escherichia coli* strains," *Mol. Biol. Evol.*, vol. 24, no. 11, pp. 2373–84, Nov. 2007.

Anexos

Tablas Anexas

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W
1	ID	SAP	adk2	fumC1	ggrB1	ggrB2	ggrB3	icd1	icd2	mdh	purA1	purA2	purA3	purA4	recA1	recA2	adk	fumC	ggrB	icd	mdh	purA	recA
2	N1	SAP10	C	G	C	C	T	C	G	A	A	C	C	C	C	G	2	2	8	2	1	2	2
3	N2	SAP86	C	G	T	C	C	T	G	G	A	C	C	C	C	A	2	2	13	4	2	2	1
4	N3	SAP196	A	G	C	C	C	C	G	A	A	C	C	C	C	G	1	2	5	2	1	6	2
5	N4	SAP4	A	G	C	C	T	C	G	A	A	C	C	C	C	G	1	2	8	2	1	2	2
6	N5	SAP73	A	G	C	A	C	C	G	G	G	T	C	C	T	G	1	2	7	2	2	4	4
7	N6	SAP57	A	G	T	C	T	T	T	G	G	C	C	C	C	G	1	2	14	5	2	6	2
8	N7	SAP23	A	G	C	T	T	T	G	G	A	C	C	A	C	A	1	2	10	4	2	1	1
9	N8	SAP131	A	A	C	A	C	C	G	G	A	C	C	C	C	G	1	1	5	2	2	2	2
10	N9	SAP131	A	A	C	A	C	C	G	G	A	C	C	C	C	G	1	1	5	2	2	2	2
11	N11	SAP624	C	G	T	C	T	T	T	G	G	T	C	C	C	G	2	2	14	5	2	9	2
12	N12	SAP131	A	A	C	A	C	C	G	G	A	C	C	C	C	G	1	1	5	2	2	2	2
13	N13	SAP624	C	G	T	C	T	T	T	G	G	T	C	C	C	G	2	2	14	5	2	9	2
14	N14	SAP131	A	A	C	A	C	C	G	G	A	C	C	C	C	G	1	1	5	2	2	2	2
15	N15	SAP23	A	G	C	T	T	T	G	G	A	C	C	A	C	A	1	2	10	4	2	1	1
16	N17	SAP10	C	G	C	C	T	C	G	A	A	C	C	C	C	G	2	2	8	2	1	2	2
17	N18	SAP95	A	G	C	A	C	C	G	G	G	T	C	C	C	G	1	2	5	2	2	9	2
18	N19	SAP402	C	G	T	C	C	T	G	G	G	C	C	C	C	T	2	2	13	4	2	6	3
19	N20	SAP131	A	A	C	A	C	C	G	G	A	C	C	C	C	G	1	1	5	2	2	2	2
20	N21	SAP131	A	A	C	A	C	C	G	G	A	C	C	C	C	G	1	1	5	2	2	2	2
21	N22	SAP1	C	G	C	T	C	T	G	G	G	C	C	C	C	G	2	2	9	4	2	6	2
22	N23	SAP23	A	G	C	T	T	T	G	G	A	C	C	A	C	A	1	2	10	4	2	1	1
23	N24	SAP23	A	G	C	T	T	T	G	G	A	C	C	A	C	A	1	2	10	4	2	1	1
24	N25	SAP1011	A	G	T	C	C	C	T	G	G	C	C	C	C	G	1	2	13	3	2	6	2
25	N26	SAP216	C	G	C	C	T	C	G	G	A	C	C	A	C	G	2	2	8	2	2	1	2
26	N27	SAP95	A	G	C	A	C	C	G	G	G	T	C	C	C	G	1	2	5	2	2	9	2
27	N28	SAP131	A	A	C	A	C	C	G	G	A	C	C	C	C	G	1	1	5	2	2	2	2
28	N29	SAP69	C	G	T	A	C	T	T	G	G	C	C	C	C	G	2	2	11	5	2	6	2
29	N30	SAP131	A	A	C	A	C	C	G	G	A	C	C	C	C	G	1	1	5	2	2	2	2
30	N31	SAP131	A	A	C	A	C	C	G	G	A	C	C	C	C	G	1	1	5	2	2	2	2
31	N32	SAP95	A	G	C	A	C	C	G	G	G	T	C	C	C	G	1	2	5	2	2	9	2
32	N33	SAP23	A	G	C	T	T	T	G	G	A	C	C	A	C	A	1	2	10	4	2	1	1
33	N34	SAP131	A	A	C	A	C	C	G	G	A	C	C	C	C	G	1	1	5	2	2	2	2
34	N36	SAP617	C	G	C	C	T	C	G	A	A	C	C	A	C	T	2	2	8	2	1	1	3
35	N37	SAP23	A	G	C	T	T	T	G	G	A	C	C	A	C	A	1	2	10	4	2	1	1
36	N38	SAP23	A	G	C	T	T	T	G	G	A	C	C	A	C	A	1	2	10	4	2	1	1
37	N39	SAP372	A	A	C	A	C	C	T	G	G	C	T	C	C	G	1	1	5	3	2	8	2
38	N40	SAP12	A	A	C	A	C	C	G	G	G	T	T	C	T	G	1	1	5	2	2	10	4
39	N41	SAP131	A	A	C	A	C	C	G	G	A	C	C	C	C	G	1	1	5	2	2	11	2
40	N42	SAP73	A	G	C	A	C	C	G	G	G	T	C	C	T	G	1	2	5	2	2	9	4
41	N44	SAP6	G	G	T	C	C	T	G	A	A	C	C	C	C	G	3	2	13	4	1	2	2
42	N45	SAP476	A	A	C	A	C	C	G	G	G	T	C	C	T	G	1	2	5	2	2	9	4
43	N46	SAP131	A	A	C	A	C	C	G	G	A	C	C	C	C	G	1	1	6	2	2	2	2
44	N47	SAP14	A	A	C	A	C	C	G	G	A	C	C	A	C	G	1	1	5	2	2	1	2
45	N48	SAP1304	A	G	C	C	T	T	T	A	A	C	C	A	C	A	1	2	7	5	1	1	1
46	N49	SAP73	A	G	C	A	C	C	G	G	G	T	C	C	T	G	1	2	5	2	2	9	4
47	N50	SAP316	A	G	T	C	C	T	T	A	A	C	C	C	C	G	1	2	13	5	1	2	2
48	N51	SAP58	A	G	C	C	T	C	G	G	A	C	C	C	C	A	1	2	8	2	2	2	1
49	N52	SAP92	A	A	C	A	C	C	T	G	G	T	C	C	C	G	1	1	5	3	2	9	2
50	N53	SAP354	A	A	C	A	T	T	T	G	G	T	C	C	C	G	1	2	6	5	2	9	2

Figura Anexa 1: Imagen de archivo Excell donde se observan algunos de los resultados de los SNPs y la transformación a perfil numérico de algunos aislados de la colección SEPEC-I para la obtención de los perfiles alélicos (SAPs).

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	
ID	<i>mal</i>	<i>svg</i>	<i>fimH</i>	<i>sfa</i>	<i>afa</i>	<i>hly</i>	<i>cnf</i>	<i>usp</i>	<i>ivc</i>	<i>kps</i>	<i>pap C</i>	<i>pap G</i>	<i>pap</i>	<i>pap</i>	<i>iro N</i>	<i>iha</i>	<i>sat</i>	<i>ibe A</i>	<i>trat T</i>	<i>eva C</i>	<i>iut A</i>	<i>igu A</i>	<i>cdtB</i>	<i>ireA</i>	<i>empT</i>	<i>PV</i>	
H16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	00000000000000000000000000	
M29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	00000000100001000010000
P1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	00000001000001000110000	
H12	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0000000100001000010001	
2N12	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0000000110001000110010	
N17	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	00010001100000000101000	
N72	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0000100111000010111001	
2N10	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	00100000000000000000000000	
M49	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	00100000000000000000000000	
M59	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	00100000000000000000000000	
F16	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	00100000000000000000000000	
H42	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	00100000000000000000000000	
H104	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	00100000000000000000000000	
H114	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	00100000000000000000000000	
H118	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	00100000000000000000000000	
P17	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	00100000000000000000000000	
2N21	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	00100000000000000000000001	
N2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	001000000000000000000001000	
H19	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0010000000000000000000010000	
M46	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0010000000000000000000011000	
N48	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0010000000000000000001000000	
M68	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0010000000000000000001000000	
F25	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0010000000000000000001000000	
H89	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0010000000000000000001000000	
P14	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0010000000000000000001000001	
P28	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0010000000000000000001000001	
N44	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0010000000000000000001001000	
M85	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0010000000000000000001001000	
M5	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0010000000000000000001001000	
N26	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0010000000000000000001011001	
H92	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	00100000000000010000000000	
H101	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0010000000000001001000000	
H80	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	00100000000000010000010000	
H102	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	00100000000000010000001001	
H33	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	00100000000000010001000000	
H110	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	00100000000000010001000000	
H120	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	00100000000000010001000000	
M4	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	00100000001000000001001001	
M56	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	00100000001000000001001001	
H87	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0010000000100010001001001	
P27	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	00100000001000000000010000	
M57	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	00100000001000000000000001	
H109	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	00100000001000000001000010	
M69	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	00100000001000000001001001	

Figura Anexa 2: Imagen de archivo Excell donde se observan algunos de los resultados de ausencia (0)/ presencia (1) de los 25 genes de virulencia y los perfiles de virulencia obtenidos (PV).

Publicaciones Propias
