

**PEDECIBA BIOLOGÍA**

**TESIS DE DOCTORADO**

**MICROCINAS Y VIRULENCIA EN CEPAS DE  
*ESCHERICHIA COLI* UROPATÓGENO**

**M<sup>a</sup> Eloisa Poey Larrea**

**Orientadora: Dra. Magela Laviña**

**Sección de Fisiología y Genética Bacterianas  
Facultad de Ciencias  
Montevideo  
Uruguay  
2011**

Tribunal: Dra. María Hortal (Presidente)

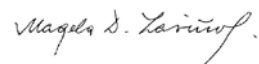
Dra. Lina Bettucci (Vocal)

Dr. Pablo Zunino (Vocal)

MAGELA D. LAVIÑA URIARTE, Investigadora G° 4 del PEDECIBA Biología

Deja constancia que la M. Sc. María Eloisa Poey Larrea ha realizado bajo su dirección el trabajo de Tesis de Doctorado titulado “Microcinas y virulencia en cepas de *Escherichia coli* uropatógeno” y que considera que éste está apto para ser sometido a la consideración de un Tribunal.

En Montevideo, a los 24 días de agosto de 2011

A handwritten signature in cursive script, reading "Magela D. Laviña".

Dra. Magela D. Laviña

*A mis padres*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Magela Laviña, mi orientadora de Tesis, por haberme otorgado una sólida formación en el área de Microbiología. Asimismo, por brindarme un apoyo constante y dedicación en la guía de este trabajo junto con valiosas instancias de discusión de los resultados obtenidos.

A la Dra. Graciela Borthagaray, por haberme facilitado los aislamientos clínicos provenientes de urocultivos pertenecientes a la colección de referencia.

A la Dra. María Albini, por haberme otorgado los aislamientos clínicos provenientes de urocultivos de mujeres embarazadas y de niños, así como por sus fructíferas enseñanzas.

Al M. Sc. Gustavo Saona, por la asistencia en el análisis estadístico de los datos.

A mi compañera de laboratorio, M<sup>a</sup> Fernanda Azpiroz por su colaboración en algunas etapas experimentales, por las diferentes instancias de discusión de los resultados, así como por su constante apoyo.

A Alicia Parente, por su asistencia técnica diaria invaluable en la preparación del material empleado en el transcurso de la Tesis. Por su dedicación incondicional y apoyo.

## ABREVIATURAS

|              |                                                                |
|--------------|----------------------------------------------------------------|
| <b>Mcc</b>   | <b>Microcina</b>                                               |
| <b>HMMM</b>  | <b>Microcinas de mayor masa molecular</b>                      |
| <b>ColV</b>  | <b>ColicinaV</b>                                               |
| <b>UPEC</b>  | <b><i>Escherichia coli</i> uropatógeno</b>                     |
| <b>ExPEC</b> | <b><i>Escherichia coli</i> patógeno extraintestinal</b>        |
| <b>NMEC</b>  | <b><i>Escherichia coli</i> causante de meningitis neonatal</b> |
| <b>APEC</b>  | <b><i>Escherichia coli</i> patógeno aviar</b>                  |
| <b>DAEC</b>  | <b><i>Escherichia coli</i> de adhesión difusa</b>              |
| <b>AIEC</b>  | <b><i>Escherichia coli</i> adherente e invasiva</b>            |
| <b>PAI</b>   | <b>Isla de patogenicidad</b>                                   |
| <b>HPI</b>   | <b>Isla de alta patogenicidad de <i>Yersinia</i></b>           |
| <b>CE</b>    | <b>Colección de embarazadas</b>                                |
| <b>CN</b>    | <b>Colección de niños</b>                                      |
| <b>JCA</b>   | <b>Análisis de correspondencia múltiple</b>                    |

## RESUMEN

Las microcinas de mayor masa molecular son péptidos antibióticos producidos por cepas de la familia *Enterobacteriaceae*, fundamentalmente pertenecientes a la especie *Escherichia coli*, que actúan sobre otras cepas de la misma familia. Se ha detectado la producción de estos antibióticos principalmente en cepas de *E. coli* uropatógeno, razón por la cual este trabajo se centró, en una primera instancia, en analizar la vinculación entre la producción de estas microcinas y la urovirulencia de cepas de *E. coli*. Los aislamientos analizados procedieron de urocultivos de una población heterogénea atendida en un hospital de asistencia general. Mediante un abordaje de epidemiología molecular se observaron tres perfiles de urovirulencia según el tipo de microcina producida. La detección de estos perfiles indicó la existencia de compatibilidades e incompatibilidades entre los distintos factores de urovirulencia y de éstos con las microcinas. Posteriormente, estos estudios se ampliaron a cepas de *E. coli* uropatógeno productoras o no de microcinas procedentes ahora de dos grupos poblacionales bien definidos: mujeres embarazadas y niños. En este segundo análisis se corroboró la existencia de los contextos de virulencia previamente identificados, los que se vieron ampliados por la inclusión de cepas no productoras de microcina pero portadoras de ciertos genes microcina. Es así que estos genes resultaron ser verdaderos marcadores de diferentes contextos de urovirulencia. Se propone entonces que las propias microcinas serían factores de virulencia. Además, siguiendo el criterio de compatibilidad, se detectaron dos perfiles adicionales no relacionados con microcinas. El 53% de un total de 230 aislamientos analizados, pertenecientes a las dos últimas colecciones, pudo ser asignado a alguno de los cinco perfiles de urovirulencia identificados. Asimismo, se observó una correlación entre las cepas con algunos de estos perfiles y el tipo de hospedero de donde procedían.

## ÍNDICE

|                                                                                                     |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>I. INTRODUCCIÓN</b>                                                                              | <b>1</b>  |
| I.1. Microcinas de mayor masa molecular                                                             | 1         |
| I.1.1. ColV                                                                                         | 5         |
| I.1.2. Microcinas catecol                                                                           | 5         |
| I.2. <i>Escherichia coli</i> uropatógeno                                                            | 7         |
| <b>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>                                                                    | <b>14</b> |
| II.1. Hipótesis                                                                                     | 14        |
| II.2. Objetivo general                                                                              | 14        |
| II.3. Objetivos específicos                                                                         | 14        |
| <b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>                                                                    | <b>15</b> |
| III.1. Estirpes bacterianas y plásmidos                                                             | 15        |
| III.2. Medios de cultivos y preservación de cepas                                                   | 16        |
| III.3. Detección e identificación de las actividades correspondientes a HMMM                        | 16        |
| III.4. Actividad hemolítica                                                                         | 19        |
| III.5. Extracción de DNA                                                                            | 19        |
| III.6. Determinación del grupo filogenético                                                         | 19        |
| III.7. Detección molecular de genes para las distintas HMMM                                         | 19        |
| III.8. Detección molecular de genes de virulencia                                                   | 20        |
| III.9. Secuenciación del DNA                                                                        | 20        |
| III.10. Análisis estadísticos                                                                       | 22        |
| <b>IV. RESULTADOS</b>                                                                               | <b>23</b> |
| IV.1. Análisis de las cepas de referencia y de la colección de referencia                           | 23        |
| IV.1.1. Caracterización fenotípica                                                                  | 23        |
| IV.1.2. Caracterización genotípica                                                                  | 24        |
| IV. 2. Análisis de los aislamientos de UPEC procedentes de mujeres embarazadas (CE) y de niños (CN) | 27        |
| IV. 2.1. Caracterización fenotípica                                                                 | 27        |
| IV. 2.2. Caracterización genotípica                                                                 | 28        |
| IV. 3. Identificación de perfiles de urovirulencia                                                  | 32        |
| IV. 4. Especificidad de hospedero de las cepas de UPEC con diferentes perfiles de virulencia        | 39        |
| IV. 5. Análisis estadísticos de los datos de virulencia                                             | 40        |
| <b>V. DISCUSIÓN</b>                                                                                 | <b>46</b> |
| <b>VI. CONCLUSIÓN</b>                                                                               | <b>55</b> |
| <b>VII. REFERENCIAS</b>                                                                             | <b>56</b> |
| <b>VIII. ANEXO I</b>                                                                                | <b>66</b> |
| <b>IX. ANEXO II</b>                                                                                 | <b>77</b> |

## I. INTRODUCCIÓN

Hace más de dos décadas, nuestro laboratorio comenzó sus investigaciones estudiando unos antibióticos peptídicos de síntesis ribosómica denominados microcinas. Éstos son producidos por algunas cepas de enterobacterias, fundamentalmente pertenecientes a la especie *Escherichia coli*. Tienen un espectro de acción reducido a bacterias gram-negativas filogenéticamente relacionadas con las cepas productoras. Las microcinas se pueden subdividir en dos grupos principales: uno compuesto por pequeños péptidos modificados postraduccionalmente, con una masa molecular inferior a 3,5 kDa, y el otro integrado por péptidos de mayor tamaño, de 5 a 9 kDa, que pueden estar o no modificados postraduccionalmente. A estos últimos se les denominó microcinas de mayor masa molecular (HMMM) (Azpiroz & Laviña, 2007).

En los últimos años se comenzó a vincular la producción de las HMMM con cepas *E. coli* uropatógeno (UPEC). En efecto, se observó que estas microcinas eran fundamentalmente producidas por cepas de UPEC. En este sentido, resultados obtenidos en el marco de mi tesis de maestría permitieron proponer a las HMMM como posibles factores de urovirulencia (Grozdanov et al., 2004; Poey et al., 2006).

El presente trabajo se ha centrado entonces en la vinculación entre la producción de HMMM y la virulencia de UPEC. A continuación se describirán las características generales de las HMMM y luego se incursionará en las características de las cepas de *E. coli* que ocasionan infecciones urinarias.

### I. 1. Microcinas de mayor masa molecular

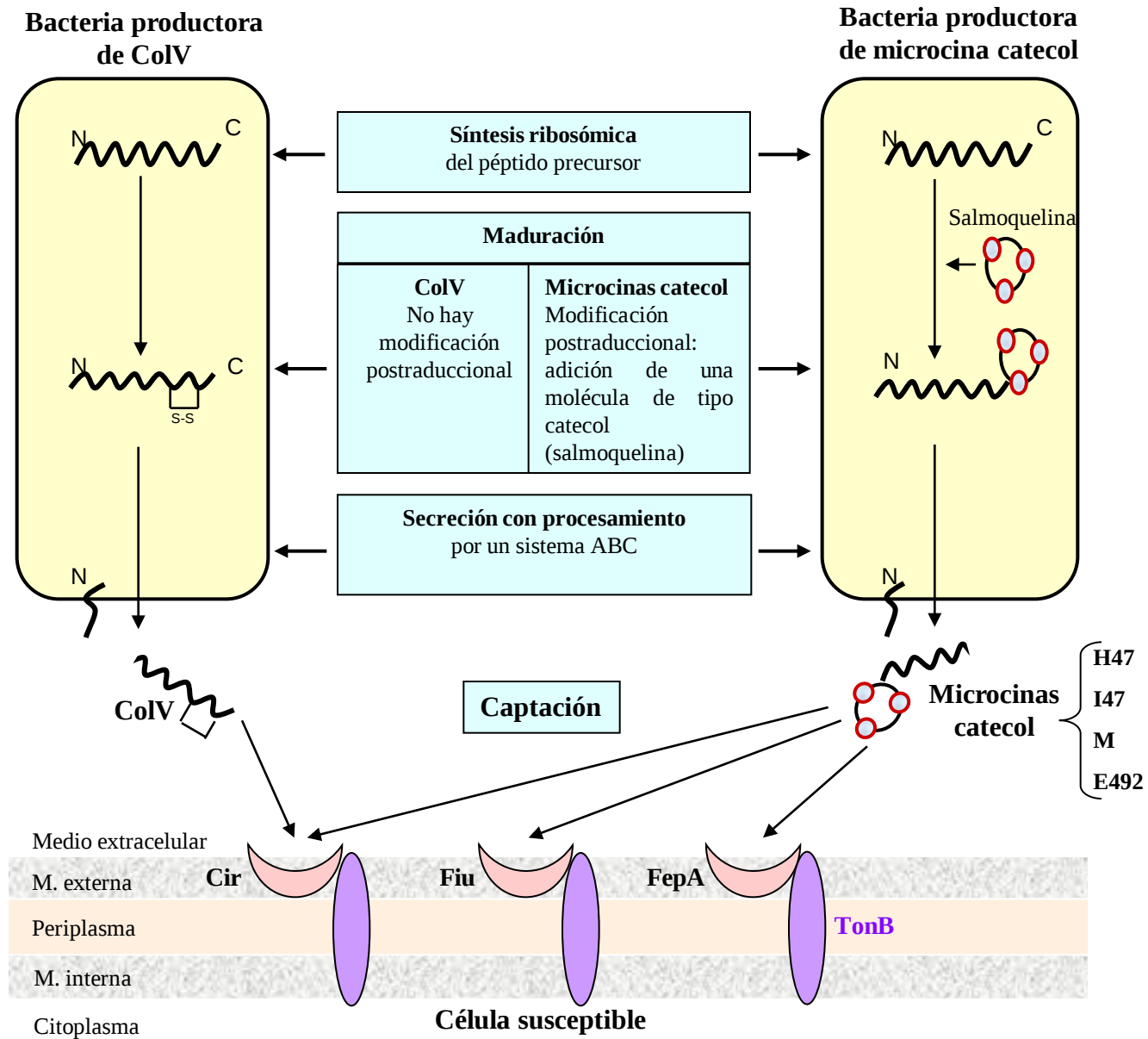
Las microcinas de mayor masa molecular tienen entre 60 y 90 residuos aminoacídicos. Actualmente se conocen cinco variantes: H47 (MccH47), I47 (MccI47), M (MccM), E492 (MccE492), y colicina V (ColV). Cabe destacar que todas son producidas por cepas de *E. coli* a excepción de la MccE492, que es producida por cepas de *Klebsiella pneumoniae* (Poey et al., 2006; Azpiroz & Laviña, 2007).

Las HMMM comparten un conjunto de características. Se sintetizan como precursores a partir de la expresión de un gen denominado “de actividad”. Estos precursores son péptidos que presentan una estructura general común constituida por tres dominios: i) de secreción, en el extremo amino terminal, que contiene un motivo de tipo doble glicina, ii) tóxico, en la porción central del péptido, que confiere la

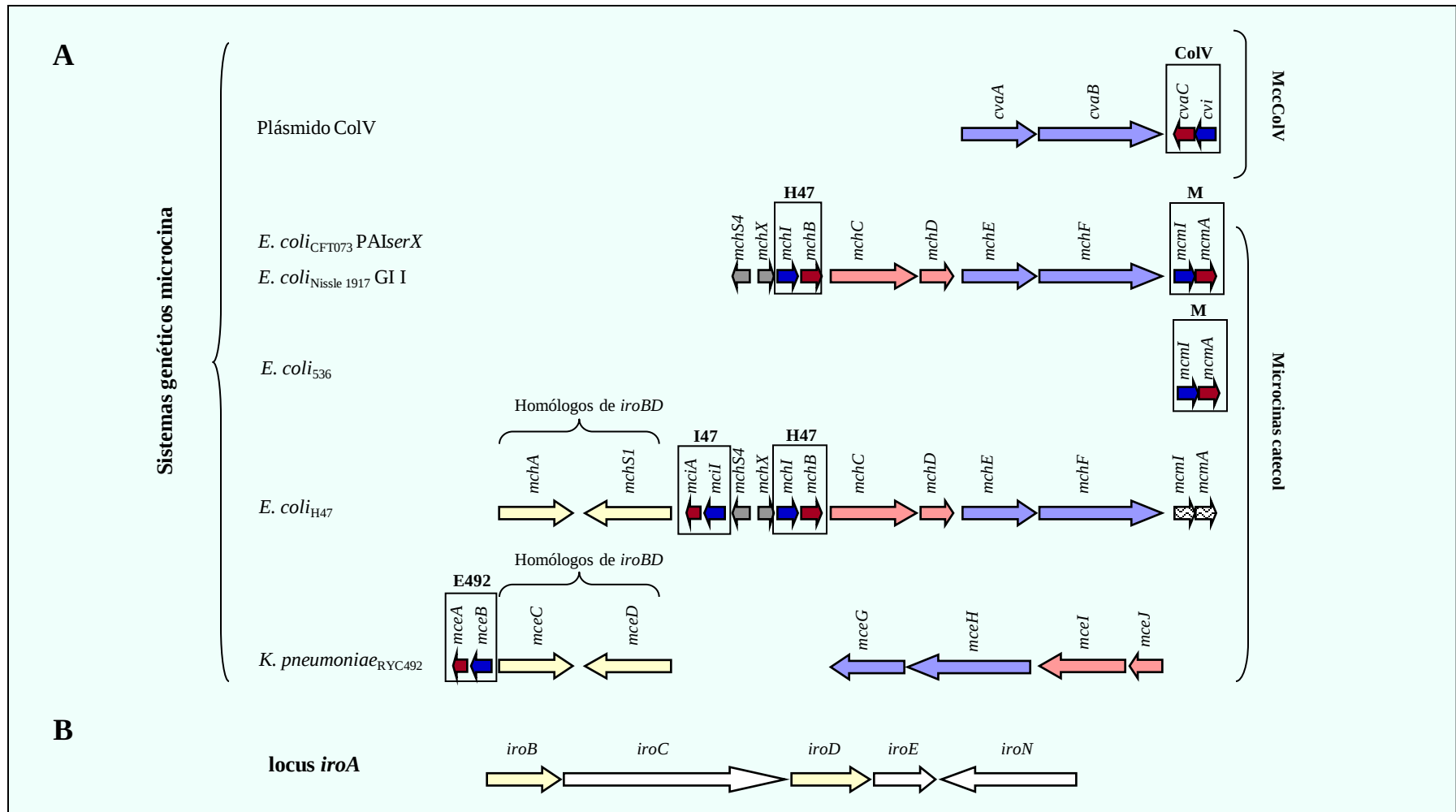
especificidad antibiótica, y iii) de captación, en el extremo carboxilo terminal. El dominio N-terminal es responsable de dirigir la molécula a través de un sistema exportador de tipo ABC (ATP-Binding Cassette) de modo que el péptido es secretado al medio extracelular al tiempo que se procesa y pierde dicho dominio. Una vez secretadas, estas microcinas ingresan en las células susceptibles a través de la vía de ingreso de los sideróforos de tipo catecol, siendo su dominio C-terminal de captación el que actúa a tales efectos. A su vez, cada microcina posee una especificidad antibiótica, conferida por el dominio tóxico del péptido (Fig. 1) (Poey et al., 2006; Azpiroz & Laviña, 2007).

Estas microcinas pueden o no ser modificadas postraduccionalmente. Dentro de las modificadas se encuentran las microcinas H47, I47, M, y E492, mientras que ColV no sufre modificaciones postraduccionales. Las modificaciones de las primeras consisten en la adición de un grupo catecol al extremo carboxilo del péptido. Este grupo tiene la estructura de un sideróforo de tipo salmoquelina. Por este motivo, estas actividades se denominaron colectivamente microcinas catecol (Fig. 1) (Azpiroz & Laviña, 2004; Poey et al., 2006).

Los sistemas genéticos que codifican para las HMMM son muy parecidos entre sí, presentando una estructura básica común que consiste en: i) una pareja de genes de actividad-inmunidad, donde el gen de actividad codifica para el péptido precursor antibiótico y el gen de inmunidad protege a la bacteria de la propia microcina producida, y ii) dos genes de secreción que codifican para un sistema exportador de tipo ABC (Fig. 2A). La complejidad de los sistemas genéticos para las HMMM se vincula a que las microcinas producidas sean o no modificadas. Es así que el sistema genético ColV es el más sencillo y los sistemas para las microcinas catecol son más extensos y complejos (Fig. 2A) (Rodríguez & Laviña, 1998; Lagos et al., 2001; Poey et al., 2006).



**Fig. 1. Representación esquemática de la síntesis, secreción y captación de las microcinas de mayor masa molecular.**



**Fig 2. Sistemas genéticos para las microcinas de mayor masa molecular y para salmoquelinas.** **A.** Sistemas genéticos para microcinas. A la izquierda se indica la cepa o el plásmido donde se localiza el sistema representado. A la derecha se señala el tipo de microcina de mayor masa molecular codificada. En recuadros se muestran las parejas de genes de actividad-inmunidad de las microcinas. Arriba de dichos recuadros se menciona la microcina codificada. **B.** Locus *iroA*. PAI: isla de patogenicidad; GI: isla genómica.

### I. 1. 1. ColV

ColV es un péptido de 88 residuos aminoacídicos, no modificado postraduccionalmente, pero en el que se forma espontáneamente un puente disulfuro entre dos cisteínas de su porción C-terminal. Esta microcina está codificada a partir de un grupo heterogéneo de plásmidos de virulencia denominados genéricamente plásmidos ColV. La producción de este tipo de microcina se ha relacionado con cepas patógenas extraintestinales de *E. coli* (ExPEC), grupo que incluye las cepas de UPEC. El sistema genético para ColV presenta la estructura básica general compartida por todas las HMMM. El mismo consta de cuatro genes: el gen de actividad, el gen de inmunidad y dos genes de secreción, siendo estos dos últimos homólogos a los genes de secreción para las microcinas catecol (Figs. 1 y 2A) (Gilson et al., 1990; Waters & Crosa., 1991; Azpiroz et al., 2001). Para ingresar en las células susceptibles, ColV emplea el receptor de tipo catecol Cir junto con la vía TonB, la que aporta la energía necesaria para atravesar la membrana externa (Fig. 1) (Azpiroz & Laviña, 2007).

### I. 1. 2. Microcinas catecol

Dentro de las HMMM, las microcinas catecol son H47, I47, M y E492, de 60, 62, 77 y 84 residuos aminoacídicos, respectivamente. Las mismas son modificadas postraduccionalmente mediante la unión covalente de un grupo catecol de tipo salmoquelina (Fig. 1) (Azpiroz & Laviña., 2004; Thomas et al., 2004; Nolan et al., 2007). Las salmoquelinas son sideróforos derivados por mono o diglucosilación de la enterobactina, que es el principal sideróforo de tipo catecol producido por la mayor parte de las enterobacterias. Por su parte, las salmoquelinas son producidas por algunas enterobacterias patógenas, incluyendo toda la especie *Salmonella enterica* y cepas de UPEC (Hantke et al., 2003). Por lo tanto, las cepas productoras de microcinas catecol deben producir conjuntamente salmoquelina para modificar el péptido precursor, originándose así el antibiótico maduro. El sistema genético para las microcinas catecol es de localización cromosómica; en muchos de los casos se ha demostrado que reside en islas de patogenicidad. Este sistema presenta la estructura básica general compartida por las HMMM, a la que se añaden cuatro genes de maduración cuyos productos confieren la modificación postraducciona l requerida (Fig. 2A). Cabe mencionar que tanto los genes de maduración de los péptidos precursores como los de secreción del antibiótico son homólogos entre los diferentes sistemas genéticos para las microcinas catecol, al punto de ser intercambiables entre sí. Esto mismo ocurre para el caso de los genes de

secreción de ColV, que al ser homólogos con los de las microcinas catecol pueden ser intercambiados con los de estas últimas (Azpiroz et al., 2001; Poey et al., 2006).

Los genes para la síntesis de salmoquelinas pueden encontrarse en dos versiones según la cepa. En algunas de ellas la síntesis de salmoquelinas está codificada por el locus *iroA*, que consiste en un sistema genético constituido por cinco genes (*iroBCDEN*) (Fig. 2B). Esta versión de sistema genético salmoquelina se encuentra presente en las cepas uropatógenas de *E. coli* 536 y CFT073, y en una cepa empleada como probiótico, *E. coli* Nissle 1917. CFT073 y Nissle 1917 contienen un sistema genético para las microcinas catecol H47 y M idéntico en ambas cepas, habiéndose probado la producción conjunta de estas dos microcinas en Nissle 1917. Por su parte, *E. coli* 536 sólo posee los genes de actividad-inmunidad para la MccM. En todos estos casos, el locus *iroA* no integra el sistema microcina pero se encuentra en la misma isla genómica (Fig. 2) (Welch et al., 2002; Patzer et al., 2003; Poey et al., 2006). La otra versión para la síntesis de salmoquelina es la presentada en la cepa de *E. coli* H47, productora de microcinas H47 e I47, conjuntamente, y en la cepa RYC492 de *K. pneumoniae*, productora de MccE492. En éstas existen homólogos de los genes *iroBD* incluidos en el sistema genético microcina. Se desconoce en estas cepas si el locus *iroA* se encuentra también presente debido a que sus genomas no están totalmente secuenciados (Fig. 2A) (Lagos et al., 2001; Poey et al., 2006). Es de destacar que varias cepas producen conjuntamente más de una microcina catecol, H47 y M, y H47 e I47. En estos casos, los sistemas genéticos microcina contienen las parejas de genes de actividad e inmunidad correspondientes a las microcinas producidas junto con un único juego de genes de maduración y secreción, i.e los sistemas de modificación y de secreción son compartidos (Fig 2A) (Poey et al., 2006). Cabe mencionar que la producción de MccI47 es detectada sólo en condiciones de privación de hierro, por lo que en condiciones normales de crecimiento estas cepas parecen producir sólo MccH47 (Poey et al., 2006). Una vez secretadas, las microcinas catecol ingresan en las células susceptibles a través de cualquiera de los receptores de catecoles. En *E. coli* K12, éstos son las proteínas de membrana externa Cir, Fiu y FepA. Además, estas microcinas requieren de la vía TonB para atravesar la membrana externa (Fig. 1) (Trujillo et al., 2001; Poey et al., 2006).

## **I. 2. *E. coli* uropatógeno**

*E. coli* es una especie muy diversa que comprende cepas comensales que habitan en el intestino de mamíferos y aves, cepas enteropatógenas y cepas patógenas extraintestinales (ExPEC). El grupo de las ExPEC puede atacar cualquier localización extraintestinal del organismo, siendo las cepas de UPEC las más frecuentes. Otros tipos de ExPEC que han sido muy estudiados son los procedentes de sangre (bacteriemia/sepsis), las cepas de NMEC (Neonatal Meningitis E. coli), procedentes de líquido cefalorraquídeo en casos de meningitis neonatal, y las cepas de APEC (Avian Pathogenic E. coli), que proceden de infecciones aviarias (Russo & Johnson, 2000; Johnson et al., 2006).

Las infecciones urinarias constituyen uno de los tipos más comunes de infecciones en humanos, siendo *E. coli* el principal agente etiológico de las mismas. Dicho agente es responsable de aproximadamente el 85% de estas infecciones en personas con buen estado general de salud y del 50% en personas con estado de salud comprometido. UPEC ocasiona varios síndromes clínicos, desde bacteriuria asintomática hasta cuadros sintomáticos de cistitis y pielonefritis, pudiendo incluso en este último caso alcanzar el torrente sanguíneo y generar urosepsis. Es de aceptación general que la principal vía de ingreso de UPEC en el tracto urinario es ascendente, i.e. que UPEC ingresaría desde el periné por el meato urinario. Se postula que dichas UPEC procederían de la flora intestinal del propio individuo ya que estas cepas pueden colonizar el intestino sin ocasionar infección, i.e. comportándose en ese sitio físico como comensales. Más aún, pueden ser las cepas de *E. coli* predominantes en el intestino de hasta un 20% de los individuos sanos (Johnson, 1991; Zhang & Foxman, 2003; Reese & Betts, 2004).

Se han identificado cuatro poblaciones más propensas a padecer infecciones urinarias. Una de ellas está constituida por mujeres en edad reproductiva, no embarazadas, que presentan infecciones agudas no complicadas, generalmente diagnosticadas como cistitis. Las restantes tres poblaciones suelen padecer infecciones más severas, denominadas complicadas, y comprenden a mujeres embarazadas, niños con infecciones recurrentes, generalmente por anomalías anatómicas o funcionales del tracto urinario, y adultos con un estado de salud comprometido o con alteraciones del tránsito urinario (Zhang & Foxman, 2003; Reese & Betts, 2004).

Se han identificado varios factores de urovirulencia que están presentes con mayor frecuencia en cepas de UPEC que en cepas de origen intestinal, e.g. cápsulas, adhesinas, citotoxinas y sistemas reforzados de captación de hierro (Johnson, 1991). A continuación se presentan las generalidades de los principales factores de urovirulencia descritos, indicándose en qué etapa de la infección -colonización o invasión- actúan. Además, se hará un énfasis particular en aquellos genes y funciones que serán estudiados en el presente trabajo.

**Cápsula.** Consiste en una malla compuesta principalmente de polisacáridos, aunque las hay de polipéptidos, que se localiza por fuera de la pared celular de las bacterias. La cápsula confiere diferentes tipos de protección al microorganismo y, en el caso de un proceso infeccioso, le permite resistir a ciertos sistemas de defensa del hospedero como la fagocitosis. Por lo tanto, las cápsulas son factores de virulencia de la mayor importancia en los procesos infecciosos invasivos.

Existen diferentes tipos de cápsula, encontrándose su mayor diversidad en las bacterias gram-negativas. Los diferentes tipos se deben a la presencia de diferentes antígenos capsulares (K). Dichos antígenos consisten en unidades repetidas de oligosacáridos que difieren en sus constituyentes, longitud de cadena y densidad. Los antígenos capsulares K de *E. coli* se clasificaron en dos familias, I y II, a partir de criterios físicos, químicos y genéticos. De ellos, los antígenos de la familia II son los que se vinculan a la patogenicidad extraintestinal. Las cepas de *E. coli* que producen cápsula de tipo II suelen proceder de infecciones extraintestinales invasivas. Además, este tipo de cápsula sólo se produce a temperaturas fisiológicas en torno a los 37°C. Algunos antígenos capsulares de la familia II, como K1 y K5, son estructuralmente similares a ciertos componentes de las células de organismos animales: K1 al ácido siálico y K5 a un intermediario de la síntesis de heparina. Dentro de los antígenos capsulares de la familia II, K1 ha recibido particular atención. Las cepas de *E. coli* K1<sup>+</sup> son capaces de causar importantes procesos invasivos, incluyendo sepsis y meningitis neonatal, así como también infecciones urinarias. Este antígeno posee la misma estructura química -un tipo de ácido siálico- que el polisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* del grupo B (Roberts et al., 1986; Rick & Silver, 1996).

Las proteínas necesarias para la síntesis y expresión de las cápsulas están codificadas cromosómicamente. El proceso de producción de cápsula es complejo e involucra dos etapas, la biosíntesis de los componentes capsulares y su transporte hacia el exterior celular. Los genes de exportación son característicos de cada familia. Es así

que la detección de los mismos indica la familia a la que pertenece la cápsula. En el caso de la familia II, siempre estarán presentes los genes de exportación, de los que *kpsM* y *kpsT* son los más empleados para dicha detección (Roberts et al., 1986; Rick & Silver, 1996).

Los determinantes para el antígeno K1 se encuentran en un locus cromosomal que se puede dividir funcionalmente en tres regiones. La región central contiene los genes de síntesis, que se denominan *neu*, siendo *neuA* el gen que codifica para la sintetasa de ácido siálico. Flanqueando esta región, están las regiones conservadas para los diferentes antígenos de la familia II, dedicadas a la exportación. Por fuera de este locus para cápsula K1, algunas cepas poseen el gen *neuO*, que codifica para una acetiltransferasa de ácido siálico. En consecuencia, existen variantes acetiladas y no acetiladas de cápsula K1 (Rick & Silver, 1996; Deszo et al., 2005).

**Adhesinas.** Son componentes macromoleculares de la superficie de las bacterias que son reconocidos por receptores específicos de las células eucariotas. Las adhesinas pueden ser fimbriales o no fimbriales. Las fimbriales son filamentos proteicos que se extienden al medio extracelular mientras que las no fimbriales son proteínas o polisacáridos que se disponen en forma no estructurada en la superficie de las bacterias. Las adhesinas actúan fundamentalmente en la colonización, es decir, en el establecimiento del patógeno en el portal de entrada al hospedero, a nivel de la superficie epitelial. Sin embargo, como se indicará más adelante, se ha visto que algunas de ellas actuarían en una etapa más avanzada, una vez que la bacteria alcanzó el medio interno, es decir en la invasión. Como ejemplo de adhesinas fimbriales se encuentran las fimbrias de tipo I, las fimbrias P y las fimbrias S, todas codificadas a nivel cromosómico.

Las fimbrias de tipo I, codificadas por el locus *fim*, se encuentran en la mayoría de las bacterias gram-negativas, sean o no patógenas. En cepas de UPEC se ha encontrado que contribuyen en el proceso de patogenicidad en los tramos bajos del tracto urinario. Estas fimbrias están constituidas por una subunidad estructural mayor, FimA, y por varios componentes menores, incluidos la adhesina FimH. Esta última, posicionada en la punta de la fimbria, reconoce residuos terminales D-manosa de glicoproteínas presentes en células o secretadas (Johnson, 1991; Connell et al, 1996).

Las fimbrias P están codificadas por el locus *pap* (pili asociado a pielonefritis) presente en cepas de UPEC. El gen *papG* codifica para la adhesina de la fimbria. Existen tres tipos de adhesinas codificadas por los alelos *papGI*, II y III, siendo el

primero sumamente infrecuente. Algunas cepas pueden codificar para más de un tipo de adhesina (Johnson., 1998; Jantunen et al., 2000). Estas adhesinas usan como receptor el disacárido Gal $\alpha$ 1-4 Gal $\beta$  de glicolípidos, siendo estos últimos abundantes en las células uroepiteliales de la corteza renal así como en los endotelios vasculares. Las fimbrias P actuarían entonces no sólo en la colonización sino también en procesos invasivos con bacteriemia (Bergsten et al., 2005).

Las fimbrias S fueron asociadas a procesos altamente invasivos, incluyendo urosepsis y meningitis neonatal. El gen *sfaA* codifica para la unidad estructural. Estas fimbrias se unen preferentemente a riñón y a vasos sanguíneos usando como receptor moléculas con residuos de ácido siálico (Dobrindt et al., 2001).

Existe una familia de adhesinas denominada Dr/Afa que incluye formas fimbriales y no fimbriales. Están codificadas por un operón, de estructura bastante conservada, cuya localización puede ser cromosómica o plasmídica. Este operón codifica para dos tipos de funciones coordinadas entre sí, adhesión e invasión. Las adhesinas Dr/Afa se han encontrado en un tipo de cepas de *E. coli* denominadas “diffusely-adhering *E. coli*” (DAEC), que pueden proceder de infecciones entéricas o urinarias. Dentro de esta familia se encuentran las fimbrias Dr, que tienen como receptores el colágeno tipo IV y el factor acelerador del decaimiento, DAF (Nowicki, 2001; Das et. al., 2005; Servin et. al., 2005).

**Citotoxinas.** Son moléculas sintetizadas por microorganismos patógenos que provocan daño sobre las células eucariotas. Las cepas de UPEC pueden producir varios tipos de exotoxinas, que son proteínas de elevada toxicidad. Las más estudiadas son la hemolisina, el factor citotóxico necrotizante, la colibactina y la toxina autotransportadora Sat.

Algunas cepas de UPEC producen hemolisina  $\alpha$ , codificada a nivel cromosómico o plasmídico. Su síntesis y secreción está codificada por cuatro genes adyacentes, siendo *hlyA* su gen estructural. La hemolisina  $\alpha$  actúa como una citolisina: se inserta en la membrana de los eritrocitos, linfocitos y granulocitos, generando poros y causando de esta manera la lisis celular (Beutin, 1991).

El factor citotóxico necrotizante (Cnf) es una toxina que está codificada a nivel cromosómico en varias cepas de UPEC. Si bien su función en la patogenicidad de las infecciones urinarias es desconocida, se sabe que Cnf cataliza la desamidación de proteínas GTPasas como Rho. Dicha desamidación hace que las GTPasas se activen de

forma constitutiva provocando importantes alteraciones celulares (Rippere-Lambe et al., 2001).

La colibactina es un híbrido entre péptido de síntesis no ribosomal y compuesto policetónico. Es producida por varias cepas de UPEC así como por otras enterobacterias. Los genes para su síntesis son de localización cromosómica, organizados en un operón, donde *clbB* codifica para una de las enzimas de síntesis. La colibactina actúa como ciclomodulina, es decir a nivel de la progresión del ciclo celular de la célula eucariota. Provoca una detención en la fase G2 del ciclo celular, observándose una megalocitosis de las células atacadas (Homburg et al., 2007; Putze et al., 2009; Dubois et al., 2011).

La proteína Sat, de “secreted autotransporter toxin”, pertenece a una amplia familia de toxinas autotransportadoras con actividad serín-proteasa en la que se incluyen otras toxinas con alta homología a Sat. Esta toxina es producida por cepas de UPEC. Sat está codificada por el cromosoma y su función no está totalmente dilucidada. Sin embargo, se ha observado que genera un efecto citopático en ciertas líneas celulares humanas de vejiga e hígado, provocando la vacuolización del citoplasma. Esto último muy probablemente se deba a que Sat corta la espectrina, un componente del citoesqueleto (Guyer et al., 2000; Dutta et al., 2002; Guyer et al., 2002).

**Sistemas reforzados para captación de hierro.** Estos factores son fundamentales tanto en la colonización como en la invasión. En la colonización actúan como factores de competencia. En la invasión, el microorganismo se encuentra en el medio interno del hospedero, sitio donde no hay biodisponibilidad de hierro y sólo estos mecanismos reforzados pueden proveerle este metal.

El hierro es un elemento esencial para el crecimiento de las bacterias. Éste forma parte de proteínas necesarias en procesos celulares indispensables, e.g. transporte de electrones, activación de oxígeno, síntesis de aminoácidos y de nucleótidos, entre otros. Si bien el hierro es abundante en el medio ambiente, éste se encuentra oxidado (FeIII), formando complejos insolubles no biológicamente disponibles. Para colmar las necesidades de este elemento, las bacterias poseen diferentes mecanismos para su captación, entre los que se encuentra la producción de sideróforos. Se trata de sustancias producidas por las bacterias, que se secretan al medio externo donde quelan el hierro, que luego ingresan a la bacteria para su posterior utilización metabólica (Wandersman & Delepelaire, 2004). El medio interno de los animales está particularmente privado de hierro biodisponible, siendo éste un mecanismo de defensa contra las infecciones.

Existen proteínas del hospedero, como la transferrina y la lactoferrina, que quelan fuertemente el hierro. Por ello, los microorganismos patógenos invasivos dependen de mecanismos de alta afinidad por hierro que puedan superar a los del hospedero. A continuación, se presentarán los principales mecanismos reforzados de captación de hierro de *E. coli* patógeno extraintestinal.

Los sideróforos de tipo catecol son producidos por todas las cepas de enterobacterias. Dentro de este tipo se encuentra la enterobactina, cuya síntesis y utilización están determinadas por un sistema genético cromosómico. Sin embargo, la enterobactina es fácilmente neutralizada por mecanismos de defensa del hospedero. Muchas cepas patógenas extraintestinales de *E. coli* producen unos sideróforos derivados de la enterobactina que son resistentes a dichos mecanismos. Estos sideróforos se denominan salmoquelinas, que derivan de la enterobactina por mono o diglucosilación (Earhart, 1996; Valdebenito et al., 2005; Fischbach et al., 2005).

El sideróforo yersiniabactina es producido por aislamientos virulentos del género *Yersinia* así como también por varios tipos de *E. coli* patógenos, incluyendo cepas de UPEC. Los determinantes para su síntesis, transporte y regulación se encuentran en la “High Pathogeny Island”, HPI, de localización cromosómica. El gen *fyuA* codifica para el receptor del sideróforo (Crosa & Walsh., 2002).

La aerobactina, producida por cepas patógenas de *E. coli*, es un sideróforo de tipo hidroxamato. Los determinantes para la misma pueden ser de localización cromosómica o plasmídica. El locus comprende cuatro genes de síntesis, *iucABCD*, y el gen *iutA*, que codifica para el receptor del sideróforo (Earhart, 1996).

Otra molécula asociada a cepas patógenas de *E. coli* es la denominada proteína Iha, codificada a nivel cromosómico. Cumpliría una función dual, como adhesina y como receptor de sideróforos de tipo catecol (Tarr et al., 2000; Lévêillé et al., 2006).

Si bien las cepas de UPEC presentan una mayor proporción de los factores antes mencionados en comparación con otras cepas, distan mucho de ser un grupo homogéneo, i.e. carecen de un denominador común que las caracterice. Se han realizado varios estudios de la virulencia de estas cepas a nivel de su fenotipo y genotipo, así como también de su filogenia. Estos estudios sistemáticamente han revelado una gran heterogeneidad, encontrándose desde cepas ricas en factores de urovirulencia hasta otras que carecen de los mismos. Más aún, no se ha evidenciado una correlación entre las diferentes manifestaciones clínicas de las infecciones urinarias y las cepas causantes. En

este sentido, cepas que presentan los mismos factores de virulencia son capaces de ocasionar diferentes síndromes clínicos o, a la inversa, un mismo síndrome puede ser ocasionado por cepas de UPEC que portan diferentes factores de virulencia. En resumen, la gran heterogeneidad de las cepas de UPEC no ha permitido detectar hasta la fecha “patotipos”, i.e. linajes con determinados perfiles de virulencia responsables de los distintos síndromes y/o de la afectación de determinados tipos de hospedero (Escobar-Páramo et al., 2004; Marrs et al., 2005; Moreno et al., 2005, Jauregui, 2008). Por lo tanto, la definición actual de UPEC es muy general y radica en la habilidad de estas cepas de generar infección urinaria, obteniéndose dichas cepas en un alto conteo en urocultivos.

En el marco de la búsqueda de patotipos dentro de las cepas de UPEC, hubo varios intentos de correlacionar la filogenia con la virulencia. Clásicamente, las cepas de *E. coli* fueron clasificadas en diferentes grupos filogenéticos mediante las técnicas de ribotipado y de “Multilocus Enzyme Electrophoresis” (MLEE) (Selander et al., 1986; Bingen et al., 1996). Se definieron entonces cuatro grupos filogenéticos principales: A, B1, B2 y D (Selander et al., 1987). Actualmente, se ha generalizado el empleo de un método sencillo y rápido basado en un triple PCR para la determinación del grupo filogenético (Clermont et al., 2000). Los resultados alcanzados indicaron que los grupos B2 y D serían los más frecuentes en cepas de UPEC. Además, se observó que las cepas más ricas en factores de urovirulencia pertenecían al grupo filogenético B2 (Picard et al., 1999).

A partir de todo lo anterior, es evidente que nos encontramos en etapas aún iniciales en lo que respecta al conocimiento de la patogenia de las infecciones urinarias ocasionadas por UPEC. Si bien no se han identificado patotipos, resulta difícil pensar que el contenido genético o las propiedades fenotípicas de las cepas de UPEC no sean relevantes en el proceso patogénico que desencadenan o en su espectro de hospedero. Cabe pensar entonces que nuevos factores de virulencia de UPEC quedan por descubrir, los que podrían ayudar a la identificación de perfiles genéticos exhibidos por subgrupos de UPEC. De esta manera, se contribuiría al entendimiento de la interacción parásito-hospedero desde el punto de vista del microorganismo. No debemos olvidar que, como en toda interacción, la naturaleza del hospedero también debe cumplir una función importante en el desarrollo del proceso infeccioso.

## II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### II. 1. Hipótesis

La hipótesis de este trabajo fue que la producción de microcinas de mayor masa molecular estaría vinculada a la virulencia de algunas cepas de *E. coli* patógenas extraintestinales, en particular uropatógenas.

### II. 2. Objetivo general

Realizar un estudio de epidemiología molecular en cepas de *E. coli* para evaluar la posible vinculación entre las microcinas de mayor masa molecular y la uropatogenicidad.

### II. 3. Objetivos específicos

- ❖ Analizar fenotípica y genotípicamente tres conjuntos de aislamientos de UPEC obtenidos a partir de urocultivos de tres poblaciones diferentes: i) conjunto heterogéneo de pacientes asistidos en un servicio general de salud, ii) mujeres embarazadas y iii) niños.
- ❖ Analizar el conjunto de los datos obtenidos para detectar asociaciones entre las microcinas de mayor masa molecular y la urovirulencia.

#### Análisis fenotípicos

- ❖ Estudiar la capacidad de los aislamientos de producir actividad antibiótica
- ❖ Identificar las actividades antibióticas correspondientes a HMMM producidas por los aislamientos
- ❖ Analizar la actividad hemolítica de los aislamientos

#### Análisis genotípicos

- ❖ Determinar a qué grupo filogenético pertenecen los aislamientos
- ❖ Detectar a nivel molecular la presencia de genes para las distintas HMMM
- ❖ Detectar a nivel molecular la presencia de genes para diferentes factores de urovirulencia: sistemas de captación de hierro, toxinas, adhesinas y cápsulas

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### III. 1. Estirpes bacterianas y plásmidos

Los genotipos, fenotipos y procedencia de las estirpes bacterianas de *E. coli* K12 y de los plásmidos utilizados se describen en la Tabla 1.

**Cepas de referencia.** Se empleó un conjunto de cepas bien caracterizadas como referencia, algunas naturales y otras de construcción en el laboratorio. Las cepas naturales utilizadas fueron: *E. coli* H47 (productora de MccH47); *E. coli* Nissle1917 (productora de MccH47 y MccM conjuntamente); *E. coli* CFT073 (portadora de la misma información genética para microcina que Nissle1917); dos cepas de *E. coli* ampliamente utilizadas en microbiología clínica, ATCC25922 y ATCC35218, y la cepa de *K. pneumoniae* RYC492 (productora de MccE492). Además, se emplearon varias cepas de *E. coli* K12 de laboratorio. Dos de ellas derivan de la cepa salvaje W3110, cuyo genoma se encuentra totalmente secuenciado (Hayashi et al., 2006): BZB1011 (W3110 *gyrA*) y PAP222 [W3110 (pK270)], cuyo plásmido es de tipo ColV y determina la producción de esta microcina. Otras cepas de *E. coli* K12 fueron RYC1000(pEX100::*Tn5*<sub>76</sub>) (productora de MccI47 en condiciones de privación de hierro) y RYC1000 (pEX100::*Tn5*<sub>76</sub>, pMAI) (productora de MccM y, en condiciones de privación de hierro, también de MccI47) (Tabla 1).

**Colección de referencia.** Está constituida por 27 aislamientos de UPEC y uno de *K. pneumoniae*, todos productores de actividades antibióticas con las características de captación presentadas por las microcinas de mayor masa molecular: uso de la vía TonB y de receptores de catecoles para su ingreso en las células susceptibles de *E. coli* K12. Esta colección fue previamente analizada, en forma parcial, para la producción de microcinas catecol (Poey et al., 2006). La misma procedió de un relevamiento de 160 aislamientos de bacterias gram-negativas (78% *E. coli* y el resto distribuido entre especies de otros géneros) procedentes de urocultivos (con un conteo  $>10^4$  ufc/ml) de un centro hospitalario de asistencia general de Montevideo. Los 28 aislamientos de esta colección fueron todos aquellos que produjeron actividades antibióticas de tipo HMMM del total de los 160. Si bien en esta instancia no se contó con información sobre los pacientes, cabe presumir que los aislamientos procedían de una población heterogénea debido a que el hospital de origen es de asistencia general y posee un único servicio de microbiología clínica.

### **Colección de aislamientos de UPEC procedentes de mujeres embarazadas (CE).**

Está constituida por 112 aislamientos procedentes de urocultivos de mujeres embarazadas, internadas por un período breve por parto o por amenaza de parto prematuro en un hospital de asistencia materno-infantil de Montevideo. Los aislamientos fueron tomados durante un período de cuatro meses en 2007 y correspondieron a aquellos cultivos de orina que presentaron un conteo alto ( $>10^5$  ufc/ml) o, de lo contrario, que procedían de pacientes con dato clínico de infección urinaria.

**Colección de aislamientos de UPEC procedentes de niños (CN).** Está constituida por 118 aislamientos procedentes de urocultivos de niños que fueron tratados ambulatoriamente en el servicio de nefrología pediátrica del hospital materno-infantil anteriormente mencionado. Los niños tenían entre 0 y 12 años, padecían de patología crónica del tracto urinario y, en consecuencia, de infecciones urinarias recurrentes. Se colectaron los aislamientos entre los años 2008 y 2009. El conteo bacteriano en esta colección siempre fue  $>10^5$  ufc/ml.

En los casos en los que más de un aislamiento, tanto en la CE como en la CN, procedía de un mismo paciente, se incluyeron sólo aquellos que evidenciaron diferencias genotípicas y/o fenotípicas. Es así que la CE procedió de 105 mujeres y la CN de 86 niños.

### **III. 2. Medios de cultivos y preservación de cepas.**

Se emplearon los siguientes medios de cultivos: medio LB (Luria-Bertani), TSA sangre (ovina al 5%) y medio mínimo M63 adicionado de una fuente de carbono y vitamina B1. Los antibióticos incorporados en el medio de cultivo se emplearon en las siguientes concentraciones finales: ampicilina (Ap), 50 µg/ml; cloranfenicol (Cm), 60 µg/ml; tetraciclina (Tc), 15 µg/ml. Para su almacenamiento por períodos prolongados las cepas se conservaron a -20°C en LB adicionado de glicerol al 20% (Miller, 1992).

### **III. 3. Detección e identificación de las actividades correspondientes a HMMM**

El análisis de la producción antibiótica de los aislamientos se realizó empleando la técnica de picada sobre tapiz (Rodríguez et. al., 1999). Ésta consiste en picar las

cepas a estudiar, mediante un palillo estéril, sobre una placa de medio mínimo sembrada con un tapiz de una cepa indicadora. Posteriormente, las placas son incubadas durante 24hs a 37°C. La producción antibiótica es evidenciada como halos de inhibición del crecimiento de la cepa indicadora alrededor de aquellas picadas productoras. Para la detección de producción antibiótica se empleó la cepa indicadora de *E. coli* K12 MC4100.

Una vez detectadas las cepas productoras de actividad antibiótica, se procedió a la identificación de las actividades de tipo HMMM. Para ello se estudió la vía de captación de las actividades encontradas empleando el test de picada sobre tapiz. Se utilizaron como indicadoras varias cepas isogénicas derivadas de MC4100: un mutante para la vía TonB, y mutantes simples, dobles y triple de los receptores de catecoles Cir, Fiu y FepA (Tabla 1). Debido a que todas las HMMM requieren de la vía TonB para su ingreso en las células susceptibles, aquellas actividades que dejaran de producir un halo de antibiosis sobre el mutante *tonB* serían candidatas a ser HMMM. Con el fin de poder discernir las actividades de tipo catecol de las de tipo ColV, se estudió la vía de captación a nivel de receptores de membrana externa. Las microcinas de tipo catecol generarían halos de antibiosis en todos los tapices indicadores a excepción del triple mutante *cir fiu fepA*, mientras que las de tipo ColV dejarían de producir halos en todos aquellos tapices deficientes para el receptor Cir. Las actividades que empleasen las vías de captación antes mencionadas tendrían grandes posibilidades de ser HMMM.

Para la identificación de las producciones de HMMM, se usó un ensayo basado en el “criterio de inmunidad”. Como se mencionó anteriormente, cada microcina posee una actividad antibiótica específica y es producida junto con su péptido de inmunidad. Cada péptido de inmunidad es específico de su microcina, de modo que sólo protegerá contra ésta y no contra otras actividades antibióticas. Esta especificidad es empleada para la identificación de las microcinas según el criterio de inmunidad. Se picaron los aislamientos productores sobre distintos tapices de cepas inmunes o resistentes a las distintas HMMM, todas derivadas de MC4100 (Tabla 1). Las cepas inmunes portan cada una un gen de inmunidad microcina diferente clonado en un vector: i) MC4100(pUY69), inmune a MccH47, ii) MC4100 (pMVDS3), inmune a MccI47, iii) MC4100(pMI), inmune a MccM, iv) MC4100(pB492), inmune a MccE492 y v) MC41000(pUY272), inmune a ColV. Además, se incluyó la cepa FGB099, isogénica de MC4100, que es un mutante de diana de la MccH47 y por lo tanto resistente a la misma. Considerando que se ha descrito la producción conjunta de MccH47 y MccM, y de

MccH47 y MccI47, se construyeron cepas inmunes/resistentes a estas parejas de antibióticos: FGB099(pMI), resistente a MccH47 e inmune a MccM, y FGB099(pMVDS3), resistente a MccH47 e inmune a MccI47. Cuando los aislamientos no generaron halos de antibiosis sobre un tapiz inmune o resistente a determinada microcina, se identificó que dicha actividad correspondía a esa misma microcina.

**Tabla 1. Estirpes de *E. coli* K12 y plásmidos utilizados**

| Bacteria/plásmido         | Genotipo/Fenotipo                                                              | Referencia                |
|---------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| <i>E. coli</i> K12        |                                                                                |                           |
| MC4100                    | <i>araD lacU169 rpsL thiA</i>                                                  | Colección del laboratorio |
| BZB1011                   | <i>gyrA</i>                                                                    | Pugsley, 1985             |
| RYC1000                   | <i>araD gyrA lacU169 rbs relA rpsL thiA</i>                                    | Colección del laboratorio |
| FGB11                     | MC4100 <i>tonB::Tn5</i>                                                        | Trujillo et al., 2001     |
| FGB099                    | MC4100 <i>atpB::Tn5</i> 99                                                     | Poey et al., 2006         |
| FGB1876                   | MC4100 <i>rpsL<sup>+</sup> cir fepA::Tn10 fiu::Mud1X</i>                       | Poey et al., 2006         |
| FGB1870                   | MC4100 <i>rpsL<sup>+</sup> cir fepA::Tn10</i>                                  | Poey et al., 2006         |
| FGB1728                   | MC4100 <i>rpsL<sup>+</sup> cir fiu::Mud1X</i>                                  | Poey et al., 2006         |
| FGB1594                   | MC4100 <i>rpsL<sup>+</sup> fiu::Mud1X</i>                                      | Poey et al., 2006         |
| FGB202                    | MC4100 <i>rpsL<sup>+</sup> cir</i>                                             | Azpiroz & Laviña, 2007    |
| FGB102                    | MC4100 <i>fepA::Tn10</i>                                                       | Azpiroz & Laviña, 2004    |
| Plásmidos                 |                                                                                |                           |
| pUCYC5                    | Plásmido vector <i>lacZ'</i> replicón p15A (Cm <sup>R</sup> )                  | Azpiroz et al., 2009      |
| pUC13                     | Plásmido vector <i>lacZ'</i> replicón pMB1 (Ap <sup>R</sup> )                  | Miller, 1992              |
| pACYC184                  | Plásmido vector replicón p15A (Tc <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup> )               | Miller, 1992              |
| pBR322                    | Plásmido vector replicón pMB1 (Tc <sup>R</sup> Ap <sup>R</sup> )               | Miller, 1992              |
| pUY69                     | pUC13 con el gen <i>mchI</i> (inmunidad MccH47) (Ap <sup>R</sup> )             | Rodríguez & Laviña, 1998  |
| pMVDS3                    | pACYC184 con el gen <i>mchS3</i> (inmunidad MccI47) (Cm <sup>R</sup> )         | Poey et al., 2006         |
| pMI                       | pUCYC5 con el gen <i>mcmI</i> (inmunidad MccM) (Cm <sup>R</sup> )              | Azpiroz et al., 2009      |
| pB492                     | pUC13 con el gen <i>mceB</i> (inmunidad MccE492) (Ap <sup>R</sup> )            | Poey et al., 2006         |
| pUY272                    | pUC13 con el gen <i>cvi</i> (inmunidad ColV) (Ap <sup>R</sup> )                | Azpiroz & Laviña, 2007    |
| pMAI                      | pBR322 con los genes <i>mcmIA</i> (inmun.-act. MccM) (Tc <sup>R</sup> )        | Azpiroz et al., 2009      |
| pEX100                    | pACYC184 con el sistema MccH47 (Cm <sup>R</sup> )                              | Gaggero et al., 1993      |
| pEX100::Tn5 <sub>76</sub> | pEX100 <i>mchB::Tn5</i> (productora MccI47) (Cm <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> ) | Rodríguez et al., 1999    |
| pK270                     | plásmido ColV                                                                  | Pugsley, 1985             |

### III. 4. Actividad hemolítica

La actividad hemolítica de las cepas fue analizada mediante picadas de las mismas en placas de medio TSA sangre (ovina al 5%). La actividad se evidencia por la formación de halos traslúcidos alrededor de las picadas transcurridas 24hs de incubación a 37°C.

### III. 5. Extracción de DNA

Se utilizó el Kit Promega “Wizard” para la extracción de DNA genómico de bacterias gram-negativas.

### III. 6. Determinación del grupo filogenético

Las cepas de *E. coli* se clasifican en cuatro grupos filogenéticos principales: A, B1, B2 y D. Se empleó un método de triple PCR para la determinación del grupo filogenético de los aislamientos. Este método se basa en la amplificación de un fragmento de DNA anónimo, denominado TSPE4C.2, y de dos genes, *chuA*, receptor de hemo, e *yjaA*, cuya función no se conoce. La presencia combinada de los distintos fragmentos indica el grupo filogenético (Clermont et al., 2000). Los oligonucleótidos empleados se consignan en la Tabla 2.

### III. 7. Detección molecular de genes para las distintas HMMM

Se realizó mediante PCR usando oligonucleótidos diseñados en el laboratorio (Tabla 2). En el caso de los genes de actividad microcina, los oligonucleótidos se diseñaron para amplificar la secuencia codificante completa de *mcmA* (MccM), *mchB* (MccH47), *mciA* (MccI47), *mceA* (MccE492) y para amplificar la mayor parte del gen *cvaC* (ColV). Además, se amplificaron secuencias del gen *mchC* (maduración de microcinas catecol), y de la versión *iroBD* para producción de salmoquelinas relacionada con microcina.

### III. 8. Detección molecular de genes de virulencia

Los genes de virulencia a analizar fueron seleccionados por su gran asociación con cepas de *E. coli* uropatógeno. Su detección se realizó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos indicados en la Tabla 2.

**Genes para cápsulas.** Se amplificaron secuencias del gen *kpsM*-II para cápsulas de la familia II y de los genes para cápsula K1, *neuA* (sintetasa de ácido siálico) y *neuO* (acetiltransferasa de ácido siálico).

**Genes para adhesinas/fimbrias.** Se realizaron amplificaciones para detectar la presencia de los siguientes genes: i) para la adhesina de fimbrias tipo I (*fimH*), ii) para el gen estructural de fimbrias S (*sfaA*), iii) para el transportador de la subunidad estructural de fimbrias P (*papC*), iv) para las variantes de adhesinas de fimbrias P (*papG* alelos II y III), y v) para la invasina (*draD*) del sistema adhesina/invasina Dr/Afa.

**Genes para citotoxinas.** Se relevó la presencia de los determinantes para las siguientes citotoxinas: i) factor citotóxico necrotizante (*cnf*), ii) hemolisina alfa (*hlyA*), iii) colibactina (*clbB*) y iv) Sat (*sat*).

**Genes para sistemas reforzados de captación de hierro.** De los sistemas de sideróforos aerobactina y yersiniabactina se amplificaron secuencias de los genes que codifican para sus receptores, *iutA* y *fyuA*, respectivamente. Para el sistema salmoquelina se relevaron los genes del locus *iroA*, *iroN* (receptor) e *iroBC* (síntesis y exportación). También se analizó la presencia del gen *iha*, que codifica para la proteína Iha involucrada en fenómenos de adhesión y que actúa también como receptor de catecoles.

### III. 9. Secuenciación del DNA

La secuenciación de fragmentos de DNA fue realizada en la “Unidad de Biología Molecular” del Instituto Pasteur de Montevideo. Los productos amplificados por PCR de los genes de actividad microcina (*mcmA*, *mchB* y *cvaC*) se purificaron usando el Kit MinElute (Qiagen) y posteriormente se secuenciaron. El amplicón de *mchB* correspondió a toda su secuencia codificante, mientras que los amplicones para *mcmA* y *cvaC* contenían toda su secuencia codificante excepto el codón de terminación. Los genes *mchB* y *mcmA* se amplificaron empleando los mismos oligonucleótidos usados en el relevamiento de genes microcina. Para *cvaC* se usó el oligonucleótido *cvaC1* (empleado también en el relevamiento) y V-R103 (Azpiroz & Laviña, 2007). En

todos los casos se secuenciaron ambas cadenas de DNA. Las secuencias de DNA se depositaron en el GenBank con los siguientes números de acceso: JN701991-97 para *mcmA*, JN701998-2003 para *mchB*, y JN704073-082 para *cvaC*.

**Tabla 2. Oligonucleótidos empleados en las amplificaciones PCR**

|                                            | Genes     | Oligonucleótido             | Secuencia (5´ 3´)            | Extensión esperada del producto (pb) | Referencia            |
|--------------------------------------------|-----------|-----------------------------|------------------------------|--------------------------------------|-----------------------|
| Filogenia                                  | chuA      | ChuA.1                      | GACGAACCAACGGTCAGGAT         | 279                                  | Clermont et al., 2000 |
|                                            |           | ChuA.2                      | TGCCGCCAGTACCAAGACA          |                                      |                       |
|                                            | yjaA      | YjaA.1                      | TGAAGTGTCTAGGAGACGCTG        | 211                                  |                       |
|                                            |           | YjaA.2                      | ATGGAGAATGCGTTCTCTCAAC       |                                      |                       |
|                                            | tspE4C2   | TspE4C2.1                   | GAGTAATGTCTGGGGCATTCA        | 152                                  |                       |
|                                            | TspE4C2.2 | CGCGCCAACAAAGTATTACG        |                              |                                      |                       |
| microcina                                  | mcmA      | mcmA1                       | TAAC TTCCACTCCCCGCA          | 278                                  | Este trabajo          |
|                                            |           | mcmA2                       | ATGAGAAAATCTATGAAAATGAAAT    |                                      |                       |
|                                            | mchB      | mchB1                       | ATGCGAGAAATAACAGAATCACAG     | 228                                  |                       |
|                                            |           | mchB2                       | TTAGCTACCGCCACCAGCAGAAG      |                                      |                       |
|                                            | mciA      | mciA1                       | ATGAGAGAAATATCAGATAACATGCTTG | 234                                  |                       |
|                                            |           | mciA2                       | TTAACTGCCGCTGTTTGCACTG       |                                      |                       |
|                                            | mceA      | mceA1                       | ATGAGAGAAATTAGTCAAAAGGAC     | 300                                  |                       |
|                                            |           | mceA2                       | TTAACTACCACTACCGGAAC         |                                      |                       |
|                                            | cvaC      | cvaC1                       | ATGAGAACTCTGACTCTAAATGAAT    | 302                                  |                       |
|                                            |           | cvaC2                       | ACATCACTAAGATTATTTGGACT      |                                      |                       |
|                                            | mchC      | mchC1                       | AGTGGTATTACGCGTAATGG         | 551                                  |                       |
|                                            |           | mchC2                       | GTCAATCTCAGGAAACGTGT         |                                      |                       |
|                                            | iroBD     | iroBD1                      | GCTGAAATGGCTGAACAACCC        | 448                                  |                       |
|                                            |           | iroBD2                      | GCGCTCCGAAAGATGTAAA          |                                      |                       |
| sistemas reforzados de captación de hierro | iroN      | iroN1                       | ATGAGAATTAACAAAATCCTCTGGT    | 289                                  |                       |
|                                            |           | iroN2                       | TATCGATCTGGCGGTTATTA         |                                      |                       |
|                                            | iroBC     | iroB                        | CCCGGTAAATGCCCGGTTGTTG       | 474                                  |                       |
|                                            |           | iroC1                       | GTCAGCGCAGCCAGCAAAATAGT      |                                      |                       |
|                                            | fyuA      | fyuA1                       | TCAGCCTACGACATGCCGACA        | 324                                  |                       |
|                                            |           | fyuA2                       | CGCAGTAGGCACGATGTTGTA        |                                      |                       |
|                                            | iutA      | iutA1                       | TACGGGCTTAATCTCGGGAAGG       | 371                                  |                       |
|                                            |           | iutA2                       | TCGAAGAACATCTGGTTGGAGGTAAA   |                                      |                       |
| ihaI                                       | IhaI F    | CAGCCACGCGTATTCTTATCCC      | 648                          |                                      |                       |
|                                            | IhaI R    | TCACACCGCCTTTTCAGCGTCCA     |                              |                                      |                       |
| citotoxinas                                | hlyA      | hlyA1                       | CTGAAAGGTGGATATGGTAATGAT     | 230                                  |                       |
|                                            |           | hlyA2                       | TCTTTTTCAAACCAAGTTCCTGAATGT  |                                      |                       |
|                                            | cnf       | cnf1                        | TCCAGTATGGGGATCAGTTTTGATCA   | 385                                  |                       |
|                                            |           | cnf2                        | TGTCCACTTCATAGTAGATGCC       |                                      |                       |
|                                            | sat       | sat F                       | ACAGCCTGAAACTGAAACACCGAC     | 465                                  |                       |
|                                            | sat R     | ACATCACTGAAGCCAATACTCC      |                              |                                      |                       |
| clbB                                       | clbBF     | GATTTGGATACTGGCGATAACCG     | 579                          |                                      |                       |
|                                            | clbBR     | CCATTTCCCGTTTGAGCACAC       |                              |                                      |                       |
| adhesinas/ fimbrias                        | papC      | papC1                       | GGCGTGATAACGATTCTGCTTACCT    | 347                                  | Johnson, 1998         |
|                                            |           | papC2                       | GGACATTCCCCCTGCATGTAAC       |                                      |                       |
|                                            | papGII    | papGII.1                    | GGGATGAGCGGGCCTTTGAT         | 190                                  |                       |
|                                            |           | papGII.2                    | CGGGCCCCCAAGTAACTCG          |                                      |                       |
|                                            | papGIII   | papGIII.1                   | GGCCTGCAATGGATTTACCTGG       | 258                                  |                       |
|                                            |           | papGIII.2                   | CCACCAAATGACCATGCCAGAC       |                                      |                       |
|                                            | sfaA      | sfaA1                       | TTCATCTCCATGGCTGTATTTTC      | 546                                  | Este trabajo          |
|                                            | sfaA2     | TTACTGGTACTGAACTTTAAAGGTGGC |                              |                                      |                       |
| fimH                                       | fimH F    | TTTTGCGACAGACCAACAATAT      | 419                          |                                      |                       |
|                                            | fimH R    | TTGCACATTCCCTGCAGTCAC       |                              |                                      |                       |
| draD                                       | draD F    | ATGAACGGGAGTATAAGGAAGA      | 407                          |                                      |                       |
|                                            | draD R    | AACCGGTATTACCAAGGAGCAA      |                              |                                      |                       |
| cápsulas                                   | kpsM-II   | kpsM- F                     | GCGCATTTTGCTGATACTGTTGGG     | 454                                  |                       |
|                                            |           | kpsM- R                     | GAGGGAACATGATGCAGGAGATG      |                                      |                       |
|                                            | neuA      | neuA F                      | CTTCACCCTTTAGAGATTCGACCC     | 474                                  |                       |
|                                            |           | neuA R                      | CCCAATAATCAAACAGCGAGTGTCC    |                                      |                       |
| neuO                                       | neuO F    | GGCTGATTTGTATTGTTTCAGGG     | 742                          |                                      |                       |
|                                            | neuO R    | GGGATAATCGTCATAGCAAAGAAAGG  |                              |                                      |                       |

### III. 10. Análisis estadísticos

La distribución de las variables se describió en base a sus frecuencias de aparición absoluta y/o relativa (%). La asociación entre las variables en las tablas de contingencia se analizó con el test de Chi cuadrado ( $\chi^2$ ) de independencia de variables. Como test de bondad de ajuste, se aplicó el test de Chi cuadrado, suponiendo la hipótesis de categorías homogéneas (Zar, 1996). Se consideraron significativos los valores de  $p$  menores a 0.05.

Con el fin de evaluar las asociaciones entre las variables de virulencia, se empleó un análisis de correspondencia múltiple “Joint Correspondence Analysis” (JCA), aplicado a los datos de la CE y a los de la CN (Greenacre, 2007). Se organizaron los datos en una matriz cuyas variables correspondían a los factores de virulencia (columnas,  $N = 18$ ) y los aislamientos a las observaciones (filas,  $N = 230$ ). Las variables se codificaron en forma binaria, presencia = 1 y ausencia = 0. Los grupos filogenéticos fueron incluidos posteriormente como variables suplementarias. JCA es una herramienta de análisis factorial que evalúa la asociación entre variables en una tabla de contingencia de  $n$ -dimensiones. En particular, este método provee la mejor estimación de la inercia y, por tanto, el mayor porcentaje de varianza explicada por las dimensiones (Greenacre, 2007). Las dimensiones o factores que resultan de este análisis pueden ser representados gráficamente en un plano donde la proximidad entre las variables es una medida de la asociación entre las mismas.

Los test estadísticos fueron realizados usando el paquete de programas STATA 11.2 (StataCorp LP, College Station, TX, USA, Marzo 2011). Los análisis se llevaron a cabo gracias a la colaboración del M. Sc. Gustavo Saona, especialista en estadística.

## IV. RESULTADOS

### IV. 1. Análisis de las cepas de referencia y de la colección de referencia

Este conjunto de cepas se analizó para su fenotipo y genotipo según se explica en Materiales y Métodos.

#### IV. 1. 1. Caracterización fenotípica

##### Producción e identificación de microcinas de mayor masa molecular

La colección de referencia está constituida por 27 cepas de UPEC y una cepa de *K. pneumoniae*. Los estudios realizados en el marco de mi Tesis de Maestría indicaron que 18 de estas cepas (17 de *E. coli* y una de *K. pneumoniae*) producirían actividades de tipo microcinas catecol: requerían de la vía TonB y de cualquiera de los receptores de tipo catecol Cir, Fiu o FepA para su ingreso en las células susceptibles. Posteriormente, por el criterio de inmunidad, se identificaron dos de estas actividades, correspondiendo una de ellas a MccH47 y la otra, producida por la cepa de *K. pneumoniae*, a MccE492. Las restantes 16 actividades no pudieron ser identificadas en esa instancia. En el presente trabajo se incluyeron tres nuevas cepas indicadoras: MC4100(pMVDS3), inmune a MccI47; MC4100(pMI), inmune a MccM, y FGB099(pMI), resistente a MccH47 e inmune a MccM. Las 16 actividades no identificadas dejaron de generar halos de antibiosis en este último tapiz, indicando así que correspondían a la producción conjunta de dos microcinas, H47 y M. Por lo tanto, no aparecieron nuevas actividades de tipo microcina catecol en esta colección. Cabe mencionar que no se detectó la producción de MccI47 en ningún caso; esto puede deberse a que dicha producción es siempre muy escasa y tiene lugar en condiciones de privación de hierro, las que no se emplearon en estos ensayos. Los aislamientos productores de microcinas catecol fueron denominados del I-1 al I-18 (Tabla 3).

Se procedió a identificar las actividades antibióticas de las restantes 10 cepas de la colección. Estas actividades usaban la vía TonB y el receptor Cir para su captación, por lo que eran buenas candidatas a ser ColV. En efecto, las diez actividades antibióticas dejaron de producir halos sobre los tapices de cepas mutantes *tonB* y *cir*. Considerando que existen otras actividades antibióticas producidas por enterobacterias que emplean esta vía de captación, se procedió a la identificación de las actividades de

los diez aislamientos por el criterio de inmunidad. Para ello se picaron los mismos sobre un tapiz de una cepa inmune a ColV, MC4100(pUY272). Sobre este último no se observaron halos de antibiosis, por lo que las diez actividades correspondieron a ColV. Los aislamientos productores de ColV fueron nombrados de II-1 al II-10 (Tabla 3).

Cabe mencionar que el conjunto de cepas de referencia, presentadas en materiales y métodos, fueron incluidas en los análisis de producción e identificación de microcinas. La amplia mayoría de estas cepas había sido analizada previamente para dicha producción y se comportaron como era de esperar. Las cepas CFT073, ATCC25922 y ATCC35218 no habían sido analizadas con anterioridad para producción antibiótica. Nuestros estudios demostraron que CFT073 y ATCC25922 producen microcinas H47 y M conjuntamente, mientras que la cepa ATCC35218 no produce ninguna actividad.

#### **Análisis de la actividad hemolítica**

Todos los aislamientos coproductores de MccH47 y M, excepto dos (Nissle1917 y I-11), fueron hemolíticos (Tabla 3). En contraste con esto último, no se evidenció actividad hemolítica en los aislamientos productores de ColV, en los productores de MccH47, ni en los productores de MccE492 (Tabla 3).

### **IV. 1. 2. Caracterización genotípica**

#### **Determinación del grupo filogenético**

Todos los aislamientos coproductores de microcinas H47 y M así como la cepa ATCC35218 pertenecieron al grupo filogenético B2, a diferencia de los aislamientos productores de ColV, que se distribuyeron entre los cuatro grupos filogenéticos. Los aislamientos productores de MccH47 (H47 y I-17), y las cepas BZB1011 y PAP222 pertenecieron al grupo filogenético A (Tabla 3).

#### **Detección de genes microcina**

Todos los aislamientos productores de microcina presentaron los genes de actividad correspondientes a su producción antibiótica (Tabla 3). Los productores de MccH47 y MccM conjuntamente (CFT073, Nissle1917, ATCC25922, y I-1 a I-16) presentaron los genes de actividad correspondientes a ambas microcinas, *mcmA* y *mchB*, junto con el gen de maduración de las microcinas catecol, *mchC*. Estas cepas carecieron de los restantes genes microcina analizados. Las cepas productoras de MccH47 (H47 y I-17) presentaron el mismo contenido genético: los genes de actividad para las

microcinas H47 e I47, el gen de maduración *mchC* y la versión *iroBD* para producción de salmoquelina relacionada con microcina. Las cepas productoras de MccE492 (RYC492 y I-18) presentaron el gen de actividad para la MccE492, *mceA*, el gen *mchC* y la versión *iroBD* para salmoquelina. Todas las cepas productoras de ColV (PAP222 y II-1 a II-10) fueron positivas para el gen de actividad ColV, *cvaC*, y carecieron de los genes para microcinas catecol. La cepa ATCC35218, si bien no es productora, presentó el gen de actividad para la MccM, *mcmA*. Naturalmente, la cepa de *E. coli* K12 BZB1011 no evidenció ningún gen microcina (Tabla 3).

### **Detección de genes de urovirulencia**

La cepa BZB1011 careció de todos los genes analizados a excepción de *fimH*. De hecho, este marcador de fimbrias tipo I estuvo presente en todas las cepas de *E. coli* de esta colección. Los aislamientos coproductores de MccH47 y MccM (CFT073, Nissle1917, ATCC25922, I-1 a I-16) evidenciaron una alta riqueza en genes de urovirulencia. Siempre estuvieron presentes en estas cepas el locus *iroA*, representado por *iroN* e *iroBC*, el determinante para fimbria S, *sfaA*, y el gen que codifica para el receptor de yersiniabactina, *fyuA*. Por otro lado, *iutA*, *iha*, *kpsM*, y los genes para citotoxinas *hlyA*, *cnf*, *clbB* y *sat* fueron detectados en la mayoría de los aislamientos. Los determinantes para fimbrias P aparecieron también con alta frecuencia, incluyendo cepas portadoras de los dos alelos *papGII* y *papGIII*. La cepa de ATCC35218, pese a no ser productora de microcina, presentó un perfil de urovirulencia semejante al de las coproductoras de microcinas H47 y M. Todas las cepas productoras de microcinas H47 y M, junto con ATCC35218, carecieron del gen *draD*.

Las cepas productoras de MccH47 o MccE492 (H47, RYC492, I-17 y I-18) fueron pobres en genes de urovirulencia, siendo *fyuA* el único determinante presentado por las productoras de MccH47.

Las cepas productoras de ColV exhibieron un patrón de virulencia diferente a los observados anteriormente. En primer lugar, todas presentaron el locus *iroA*. Además, se caracterizaron por la ausencia de genes para microcinas catecol, citotoxinas, fimbrias S, invasina/adhesina de tipo Dr e Iha. El determinante *iutA* fue positivo en la mayor parte de los aislamientos. También con frecuencia aparecieron los genes para fimbrias P y para cápsula de tipo II. En la colección, un total de tres aislamientos fue positivo para cápsula K1, correspondiendo éstos a los productores de ColV pertenecientes al grupo filogenético B2 (Tabla 3).

**Tabla 3. Producción de microcinas, filogenia y virulencia de las cepas de referencia y de los aislamientos de la colección de referencia**

| Cepa <sup>(a)</sup> | Producción de HMMM | Filogenia | Cápsula |      |      | Citotoxinas |   |     |     | Adhesinas/fimbrias |      |        |         |      |      | Captación Fe |      |      |      |       | Microcinas |       |      |      |      |      |      |      |
|---------------------|--------------------|-----------|---------|------|------|-------------|---|-----|-----|--------------------|------|--------|---------|------|------|--------------|------|------|------|-------|------------|-------|------|------|------|------|------|------|
|                     |                    |           | kpsM    | K1   |      | Hly-h/yA    |   | cnf | clb | sat                | papC | papGII | papGIII | sfaA | draD | fimH         | fyuA | iutA | iroA |       | iha        | iroBD | mchC | mcmA | mchB | mciA | mceA | cvaC |
|                     |                    |           |         | neuA | neuO |             |   |     |     |                    |      |        |         |      |      |              |      |      | iroN | iroBC |            |       |      |      |      |      |      |      |
| BZB1011             | -                  | A         | -       | -    | -    | -           | - | -   | -   | -                  | -    | -      | -       | -    | +    | -            | -    | -    | -    | -     | -          | -     | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| Nissle              | H47 & M            | B2        | +       | -    | -    | -           | - | -   | +   | +                  | -    | -      | -       | +    | +    | +            | +    | +    | +    | +     | -          | +     | +    | +    | -    | -    | -    | -    |
| CFT073              | H47 & M            | B2        | +       | -    | -    | +           | + | -   | +   | +                  | +    | +      | -       | +    | +    | +            | +    | +    | +    | +     | -          | +     | +    | +    | -    | -    | -    | -    |
| ATCC25922           | H47 & M            | B2        | +       | -    | -    | +           | + | -   | +   | +                  | +    | +      | -       | +    | +    | +            | +    | +    | +    | +     | -          | +     | +    | +    | -    | -    | -    | -    |
| I-1                 | H47 & M            | B2        | +       | -    | -    | +           | + | +   | +   | +                  | +    | +      | -       | +    | +    | +            | +    | +    | +    | +     | -          | +     | +    | +    | -    | -    | -    | -    |
| I-2                 | H47 & M            | B2        | +       | -    | -    | +           | + | +   | +   | +                  | +    | +      | -       | +    | +    | +            | +    | +    | +    | +     | -          | +     | +    | +    | -    | -    | -    | -    |
| I-3                 | H47 & M            | B2        | -       | -    | -    | +           | + | +   | +   | -                  | +    | +      | +       | +    | +    | +            | +    | -    | +    | +     | -          | -     | +    | +    | +    | -    | -    | -    |
| I-4                 | H47 & M            | B2        | +       | -    | -    | +           | + | +   | +   | +                  | +    | +      | +       | +    | +    | +            | +    | +    | +    | +     | -          | +     | +    | +    | -    | -    | -    | -    |
| I-5                 | H47 & M            | B2        | -       | -    | -    | +           | + | +   | +   | +                  | +    | +      | +       | +    | +    | +            | +    | +    | +    | +     | -          | +     | +    | +    | -    | -    | -    | -    |
| I-6                 | H47 & M            | B2        | +       | -    | -    | +           | + | +   | +   | -                  | -    | -      | -       | +    | +    | +            | -    | +    | +    | -     | -          | +     | +    | +    | -    | -    | -    | -    |
| I-7                 | H47 & M            | B2        | +       | -    | -    | +           | + | +   | -   | +                  | +    | +      | -       | +    | +    | -            | +    | +    | +    | +     | +          | -     | +    | +    | +    | -    | -    | -    |
| I-8                 | H47 & M            | B2        | +       | -    | -    | +           | + | +   | +   | +                  | +    | +      | +       | +    | +    | -            | +    | +    | +    | +     | +          | -     | +    | +    | +    | -    | -    | -    |
| I-9                 | H47 & M            | B2        | +       | -    | -    | +           | + | +   | -   | +                  | +    | +      | +       | +    | +    | -            | +    | +    | +    | +     | +          | -     | +    | +    | +    | -    | -    | -    |
| I-10                | H47 & M            | B2        | +       | -    | -    | +           | + | +   | +   | +                  | +    | +      | +       | +    | +    | -            | +    | +    | +    | +     | +          | -     | +    | +    | +    | -    | -    | -    |
| I-11                | H47 & M            | B2        | +       | -    | -    | -           | + | +   | -   | +                  | +    | +      | +       | -    | +    | +            | +    | +    | +    | +     | -          | +     | +    | +    | -    | -    | -    | -    |
| I-12                | H47 & M            | B2        | +       | -    | -    | +           | + | +   | -   | +                  | +    | +      | +       | -    | +    | +            | +    | +    | +    | +     | +          | -     | +    | +    | +    | -    | -    | -    |
| I-13                | H47 & M            | B2        | -       | -    | -    | +           | + | +   | -   | +                  | +    | +      | +       | +    | +    | +            | +    | +    | +    | +     | -          | +     | +    | +    | -    | -    | -    | -    |
| I-14                | H47 & M            | B2        | +       | -    | -    | +           | + | +   | +   | +                  | +    | +      | +       | +    | +    | +            | +    | +    | -    | -     | -          | +     | +    | +    | -    | -    | -    | -    |
| I-15                | H47 & M            | B2        | +       | -    | -    | +           | + | +   | +   | +                  | +    | +      | +       | +    | +    | +            | +    | +    | +    | +     | -          | +     | +    | +    | -    | -    | -    | -    |
| I-16                | H47 & M            | B2        | +       | -    | -    | +           | + | +   | +   | -                  | -    | -      | -       | +    | +    | +            | -    | +    | +    | -     | -          | +     | +    | +    | -    | -    | -    | -    |
| ATCC35218           | -                  | B2        | +       | -    | -    | +           | + | +   | +   | +                  | +    | -      | +       | +    | -    | +            | +    | -    | +    | +     | -          | -     | -    | +    | -    | -    | -    | -    |
| H47                 | H47                | A         | -       | -    | -    | -           | - | -   | -   | -                  | -    | -      | -       | -    | +    | +            | -    | -    | -    | -     | -          | +     | +    | -(b) | +    | +    | -    | -    |
| I-17                | H47                | A         | -       | -    | -    | -           | - | -   | -   | -                  | -    | -      | -       | -    | +    | +            | -    | -    | -    | -     | -          | +     | +    | -(b) | +    | +    | -    | -    |
| RYC492              | E492               | -         | -       | -    | -    | -           | - | -   | -   | -                  | -    | -      | -       | -    | -    | -            | -    | -    | -    | -     | -          | +     | +    | -    | -    | -    | +    | -    |
| I-18                | E492               | -         | -       | -    | -    | -           | - | -   | -   | -                  | -    | -      | -       | -    | -    | -            | -    | -    | -    | -     | -          | +     | +    | -    | -    | -    | +    | -    |
| PAP222              | CoIV               | A         | -       | -    | -    | -           | - | -   | -   | -                  | -    | -      | -       | -    | +    | -            | +    | +    | +    | -     | -          | -     | -    | -    | -    | -    | -    | +    |
| II-1                | CoIV               | B2        | +       | +    | +    | -           | - | -   | -   | -                  | +    | +      | -       | -    | +    | +            | +    | +    | +    | +     | -          | -     | -    | -    | -    | -    | -    | +    |
| II-2                | CoIV               | B1        | +       | -    | -    | -           | - | -   | -   | -                  | -    | -      | -       | -    | +    | +            | +    | +    | +    | -     | -          | -     | -    | -    | -    | -    | -    | +    |
| II-3                | CoIV               | B2        | +       | +    | +    | -           | - | -   | -   | -                  | +    | +      | -       | -    | +    | +            | +    | +    | +    | +     | -          | -     | -    | -    | -    | -    | -    | +    |
| II-4                | CoIV               | B2        | +       | +    | +    | -           | - | -   | -   | -                  | +    | +      | -       | -    | +    | +            | +    | +    | +    | +     | -          | -     | -    | -    | -    | -    | -    | +    |
| II-5                | CoIV               | A         | -       | -    | -    | -           | - | -   | -   | -                  | +    | -      | +       | -    | +    | +            | +    | +    | +    | +     | -          | -     | -    | -    | -    | -    | -    | +    |
| II-6                | CoIV               | A         | -       | -    | -    | -           | - | -   | -   | -                  | +    | -      | +       | -    | +    | +            | +    | +    | +    | +     | -          | -     | -    | -    | -    | -    | -    | +    |
| II-7                | CoIV               | B1        | -       | -    | -    | -           | - | -   | -   | -                  | -    | -      | -       | -    | +    | -            | +    | +    | +    | -     | -          | -     | -    | -    | -    | -    | -    | +    |
| II-8                | CoIV               | A         | -       | -    | -    | -           | - | -   | -   | -                  | -    | -      | -       | -    | +    | +            | +    | +    | +    | -     | -          | -     | -    | -    | -    | -    | -    | +    |
| II-9                | CoIV               | B1        | -       | -    | -    | -           | - | -   | -   | -                  | -    | -      | -       | -    | +    | -            | +    | +    | +    | +     | -          | -     | -    | -    | -    | -    | -    | +    |
| II-10               | CoIV               | D         | -       | -    | -    | -           | - | -   | -   | -                  | -    | -      | -       | -    | +    | -            | -    | +    | +    | -     | -          | -     | -    | -    | -    | -    | -    | +    |

<sup>(a)</sup> En letra roja y celda gris se indican las cepas de referencia.

<sup>(b)</sup> Aunque dan amplificación positiva, se consigna negativo por contener un gen *mcmA* no funcional (no producen MccM).

En resumen, este análisis de epidemiología molecular reveló que existen distintos niveles de asociación de los factores de urovirulencia con el tipo de microcina producida.

#### **IV. 2. Análisis de los aislamientos de UPEC procedentes de mujeres embarazadas (CE) y de niños (CN)**

Una vez detectado que la producción de las distintas HMMM permitía predecir el contexto de urovirulencia de las cepas, se procedió a ampliar estos estudios con dos nuevas colecciones de UPEC. Considerando que los aislamientos de la colección de referencia presumiblemente procedían de una población heterogénea, compuesta por pacientes con distinto estado general de salud y de distintas edades y sexo, se apuntó ahora a estudiar aislamientos de UPEC procedentes de dos poblaciones bien definidas: mujeres embarazadas y niños con infecciones recurrentes del tracto urinario. En esta instancia se analizaron todos los aislamientos, produjeran o no microcina. El objetivo del análisis de estas nuevas colecciones era comprobar si se reproducían los patrones de urovirulencia previamente detectados así como identificar nuevas asociaciones entre los factores de virulencia que señalaran la existencia de nuevos contextos conservados. Además, era de interés ver la posible vinculación entre los patrones de urovirulencia y el tipo de hospedero de donde procedían los aislamientos, i.e. mujeres embarazadas o niños.

Los aislamientos de estas nuevas colecciones se analizaron, al igual que los de la colección de referencia, para su fenotipo y genotipo según se explica en Materiales y Métodos.

##### **IV. 2. 1. Caracterización fenotípica**

###### **Producción e identificación de microcinas de mayor masa molecular**

Para la detección e identificación de la producción de HMMM se procedió de igual manera que con la colección de referencia, según se explica en Materiales y Métodos.

Considerando en una primera instancia el total de 230 aislamientos, i.e. 112 procedentes de la CE más 118 procedentes de la CN, 34 (15%) produjeron HMMM. De éstos, 13 produjeron microcinas H47 y M conjuntamente, uno produjo sólo MccM, cinco produjeron MccH47, y 15 produjeron ColV. Cabe destacar que no existían

descripciones en la literatura de cepas productoras únicamente de microcina M. Ninguno de los aislamientos analizados produjo MccE492. En algunos casos, las cepas produjeron HMMM (ver más adelante confirmación genotípica) junto con una actividad antibiótica no determinada que denominamos genéricamente X. En las Figs. 3 y 4 se muestran como ejemplo la vía de captación empleada por las actividades antibióticas producidas por un subgrupo de aislamientos pertenecientes a la CE y la identificación de las actividades de tipo HMMM, respectivamente.

Se observó que, según la microcina producida, los aislamientos procedían mayoritariamente de distinto hospedero. Es así que 11 (85%) de los aislamientos coproductores de microcinas H47 y M, y todos los productores de MccH47 procedieron de urocultivos pertenecientes a la CE, mientras que 14 (93%) de los aislamientos productores de ColV procedieron de la CN. El aislamiento productor sólo de MccM procedió de la CN (Tabla 4, Anexo I).

#### **Análisis de la actividad hemolítica**

Del total de los 230 aislamientos, 30 (13%) presentaron actividad hemolítica, correspondiendo el 70% de los mismos a la CE (Anexo I).

### **IV. 2. 2. Caracterización genotípica**

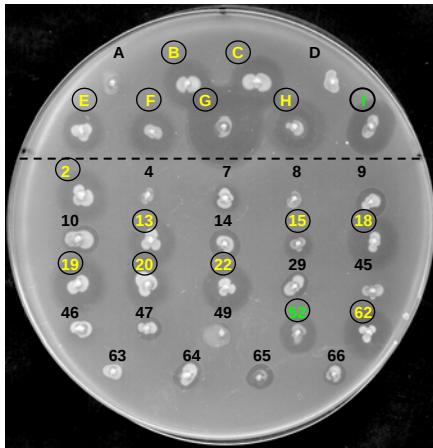
#### **Determinación del grupo filogenético**

Los 230 aislamientos se distribuyeron en los cuatro grupos filogenéticos con las siguientes frecuencias de aparición: 30% del grupo A, 30% del D, 25% del B2, y 15% del B1. No se observaron diferencias en la distribución de los grupos filogenéticos al compararse los aislamientos procedentes de la CE con los procedentes de la CN, siendo el grupo B1 el minoritario en ambas colecciones (Tabla 4).

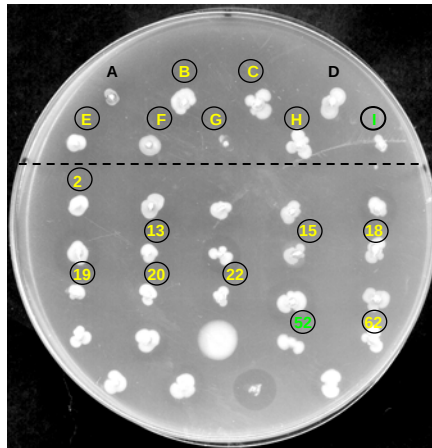
#### **Detección de genes microcina**

Todos los aislamientos productores de HMMM presentaron los genes de actividad correspondientes a las microcinas producidas. Los productores de microcinas catecol contuvieron también el gen de maduración para estas microcinas, *mchC*.

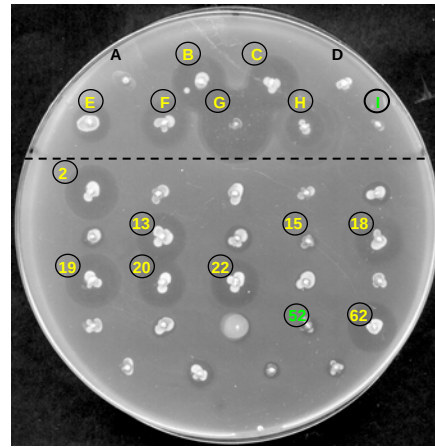
Además, se detectó la presencia de genes de actividad microcina en cepas no productoras. Estas cepas fueron: 11 (8 de la CE y 3 de la CN) positivas para el gen de actividad de la MccM, *mcmA*, y negativas para *mchC*; cinco (4 de la CE y 1 de la CN) positivas para el gen de actividad MccH47, *mchB*, faltando *mchC* en una de ellas, y cinco (todas de la CN) positivas para el gen de actividad ColV, *cvaC* (Anexo I).



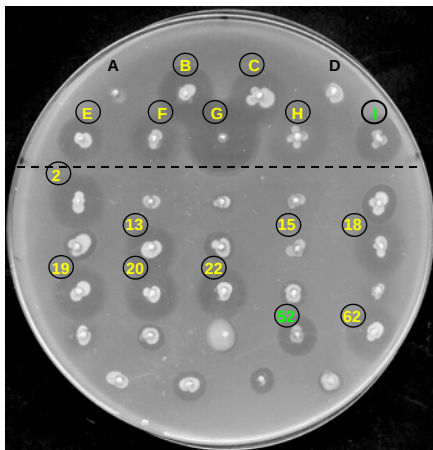
MC4100



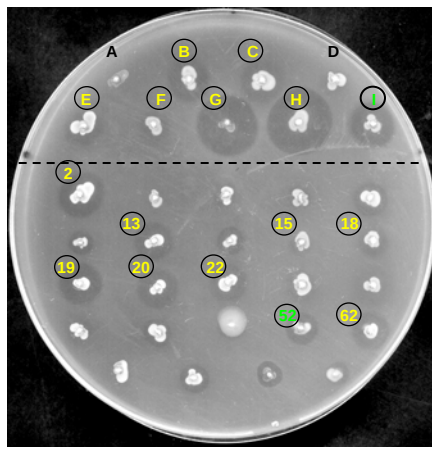
MC4100 *tonB*



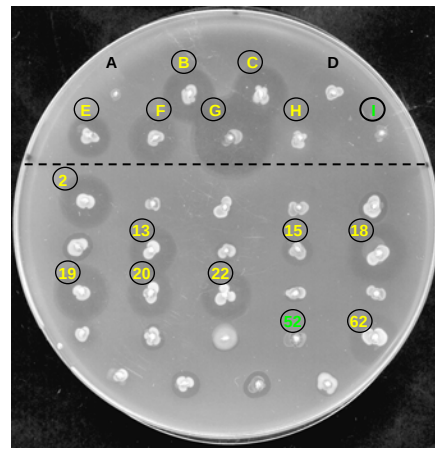
MC4100 *cir*



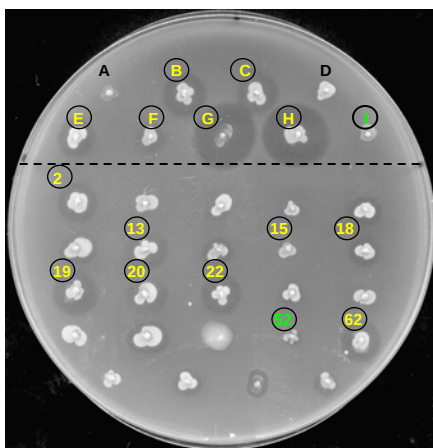
MC4100 *fiu*



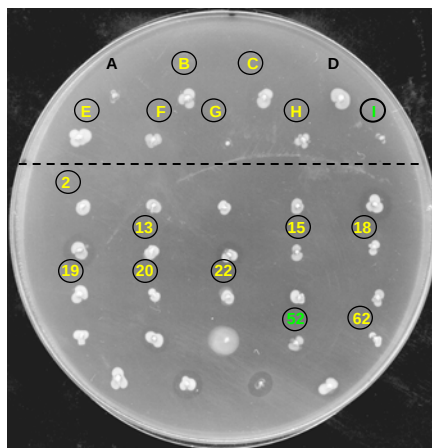
MC4100 *fepA*



MC4100 *cir fiu*

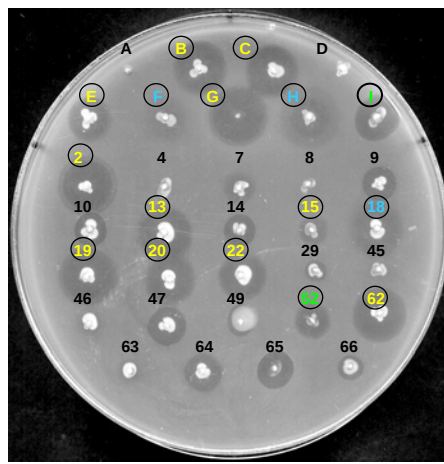


MC4100 *cir fepA*

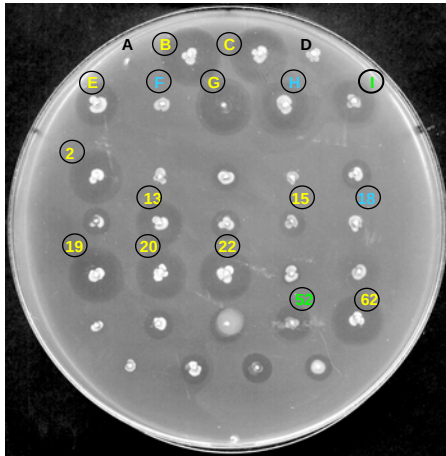


MC4100 *cir fiu fepA*

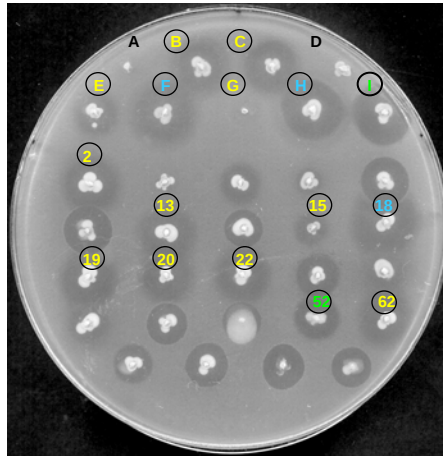
**Fig. 3. Análisis de la captación de las producciones antibióticas de un subconjunto de aislamientos de la CE.** Test de picada sobre tapices de las cepas indicadoras consignadas. Sólo se incluyen los aislamientos productores de actividad antibiótica comprendidos entre el 1 y el 66. El mismo orden de las picadas se mantiene en todas las placas. Se circulan los números de los aislamientos cuyas actividades emplean la vía de captación de las HMMM. En amarillo, actividades de tipo microcina catecol; en verde, actividades de tipo ColV. Con letras, las siguientes cepas de referencia: A, BZB1011; B, CFT073; C, ATCC25922; D, ATCC35218; E, Nissle1917; F, H47; G, RYC1000(pEX100::Tn5<sub>76</sub>, pMAI); H, RYC492; I, PAP222.



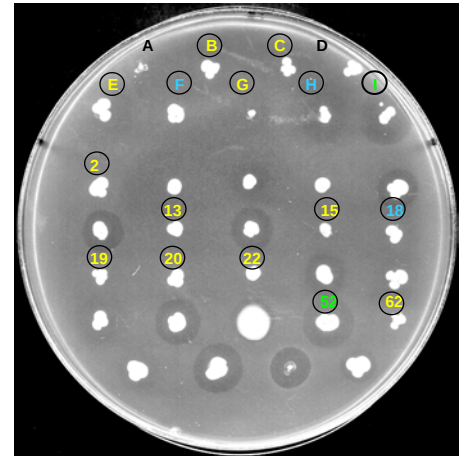
MC4100  
WT



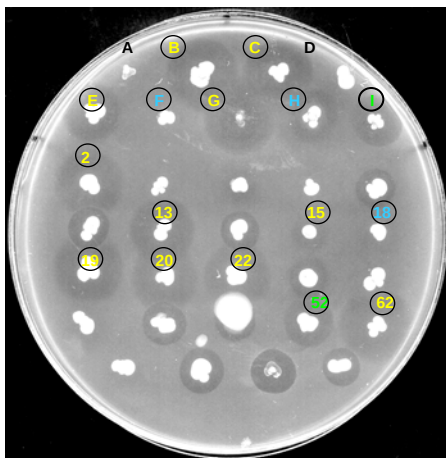
MC4100(pUY69)  
**MccH47<sup>I</sup>**



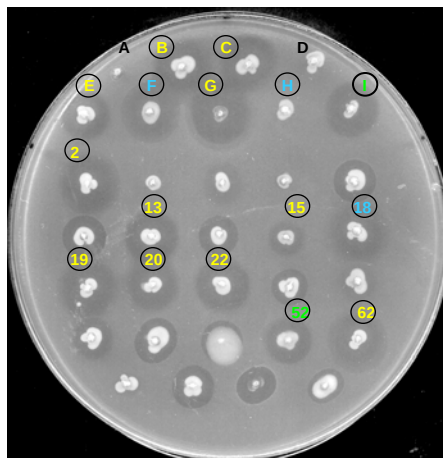
MC4100(pMI)  
**MccM<sup>I</sup>**



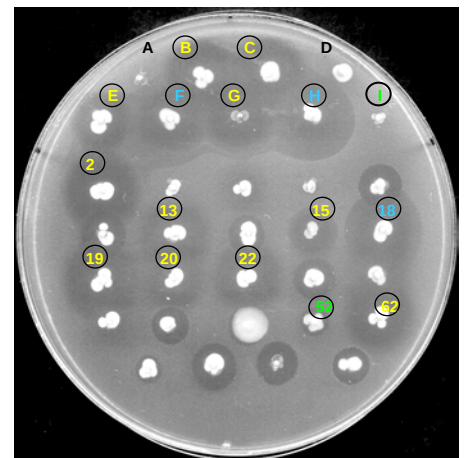
FGB099 (pMI)  
**MccH47<sup>R</sup> MccM<sup>I</sup>**



FGB099  
**MccH47<sup>R</sup>**



MC4100(pB492)  
**MccE492<sup>I</sup>**



MC4100 (pUY272)  
**ColV<sup>I</sup>**

**Fig. 4. Identificación de las producciones antibióticas de tipo HMMM de un subconjunto de aislamientos de la CE.** Test de picada sobre tapices de las cepas indicadoras consignadas. Se incluyen los mismos aislamientos que en la Fig. 3. El mismo orden de las picadas se mantiene en todas las placas. Se circulan los números de los aislamientos que producen HMMM. En amarillo, coproducción de MccH47 y M; en azul, producción de MccH47 o MccE492; en verde, producción de ColV. Las cepas de referencia se consignan como en la Fig. 3.

Todos los aislamientos productores de MccH47, al igual que los no productores de dicha actividad pero portadores de los genes *mchB* y *mchC*, presentaron el gen de actividad para la MccI47, *mciA*. Presumiblemente los aislamientos productores de MccH47 sean también capaces de producir MccI47; sin embargo, esta última actividad no fue detectada, seguramente porque no se trabajó en condiciones de privación de hierro.

En ningún caso estudiado se detectó la coexistencia de genes para microcinas catecol y para ColV (Anexo I).

Al comparar la presencia de genes microcina entre los aislamientos procedentes de la CE y los de la CN se observó una distribución significativamente diferente (Tabla 4, Anexo I). Los genes de actividad correspondientes a microcinas catecol (*mcmA*, *mchB* y *mciA*), junto con el gen de maduración de estas microcinas, *mchC*, y la versión *iroBD* para salmoquelinas se encontraron presentes en una mayor proporción en los aislamientos procedentes de la CE. Contrariamente, el gen para la microcina ColV, *cvaC*, estuvo presente, a excepción de un caso, sólo en los aislamientos procedentes de la CN. Cabe destacar que estos resultados fueron estadísticamente significativos (Tabla 4).

Ninguno de los 230 aislamientos presentó el gen de actividad para la MccE492, *mceA*.

**Tabla 4. Filogenia y distribución de genes/fenotipo de virulencia entre los aislamientos de las colecciones procedentes de mujeres embarazadas (CE) y de niños (CN)**

| Colección<br>(nº<br>aislamientos)<br><i>Ip</i> <sup>(a)</sup> | Filogenia |    |    |    | Cápsula                  |                          | Citotoxinas                                     |                         |                          |                         | Adhesinas<br>fimbrias/                 |                          |                          | Captación de<br>hierro   |                          |                                         |                         | Microcinas                |                          |                          |                          |                          |                          |                           |        |        |  |
|---------------------------------------------------------------|-----------|----|----|----|--------------------------|--------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|----------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|--------|--------|--|
|                                                               |           |    |    |    |                          |                          |                                                 |                         |                          |                         |                                        |                          |                          |                          |                          |                                         |                         | genes                     |                          |                          |                          |                          |                          | Producción <sup>(d)</sup> |        |        |  |
|                                                               | A         | B1 | D  | B2 | <i>kpsM</i> <sup>+</sup> | <i>neuA</i> <sup>+</sup> | <i>Hly</i> <sup>+</sup> <i>hly</i> <sup>+</sup> | <i>cnf</i> <sup>+</sup> | <i>clbB</i> <sup>+</sup> | <i>sat</i> <sup>+</sup> | <i>pap</i> <sup>+</sup> <sup>(b)</sup> | <i>sfaA</i> <sup>+</sup> | <i>draD</i> <sup>+</sup> | <i>fyuA</i> <sup>+</sup> | <i>iutA</i> <sup>+</sup> | <i>iroA</i> <sup>+</sup> <sup>(c)</sup> | <i>iha</i> <sup>+</sup> | <i>iroBD</i> <sup>+</sup> | <i>mchC</i> <sup>+</sup> | <i>mcmA</i> <sup>+</sup> | <i>mchB</i> <sup>+</sup> | <i>mciA</i> <sup>+</sup> | <i>cvaC</i> <sup>+</sup> | HM<br>o<br>M              | H      | V      |  |
| CE (112)                                                      | 29        | 14 | 35 | 34 | 66                       | 18                       | 21                                              | 14                      | 20                       | 40                      | 41                                     | 19                       | 18                       | 78                       | 65                       | 20                                      | 60                      | 9                         | 19                       | 19                       | 20                       | 8                        | 1                        | 11                        | 5      | 1      |  |
| CN (118)                                                      | 39        | 20 | 35 | 24 | 51                       | 6                        | 6                                               | 2                       | 4                        | 35                      | 17                                     | 5                        | 28                       | 71                       | 81                       | 26                                      | 55                      | 2                         | 5                        | 6                        | 4                        | 1                        | 19                       | 3                         | 0      | 14     |  |
| Total (230)                                                   | 68        | 34 | 70 | 58 | 117                      | 24                       | 27                                              | 16                      | 24                       | 75                      | 58                                     | 24                       | 46                       | 149                      | 146                      | 46                                      | 115                     | 11                        | 24                       | 25                       | 24                       | 9                        | 20                       | 14                        | 5      | 15     |  |
| <i>P</i>                                                      | n.s.      |    |    |    | 0.0172                   | 0.0064                   | 0.0013                                          | 0.0013                  | 0.0003                   | n.s.                    | 0.0001                                 | 0.0016                   | n.s.                     | n.s.                     | n.s.                     | n.s.                                    | n.s.                    | 0.0243                    | 0.0016                   | 0.0038                   | 0.0003                   | 0.0139                   | <0.0001                  | 0.0210                    | 0.0202 | 0.0008 |  |

<sup>(a)</sup> Los valores de *p* se refieren a las diferencias en la distribución de las variables entre las colecciones. Se determinaron empleando el test de  $\chi^2$  de independencia de las variables. Se muestran sólo los valores de *p* estadísticamente significativos; n.s., no significantes.

<sup>(b)</sup> *pap*<sup>+</sup> indica positivo para amplificación *papC* y para alguno de los alelos *papG* analizados.

<sup>(c)</sup> *iroA*<sup>+</sup> indica positivo para las amplificaciones *iroBC* e *iroN*.

<sup>(d)</sup> HM, co-producción de microcinas H47 and M; M, producción sólo de MccM; H, producción de MccH47; V, producción de ColV.

### Detección de genes de urovirulencia

El estudio de los diferentes factores de urovirulencia indicó una marcada diferencia en la presencia de los mismos según la procedencia de los aislamientos. Las diferencias se concentraron principalmente en las variables relacionadas con cápsulas, fimbrias y citotoxinas. La presencia de estos últimos factores predominó significativamente en los aislamientos procedentes de la CE. Cabe señalar que tres aislamientos de la CN fueron fenotípicamente hemolíticos pero no presentaron el gen *hlyA*, por lo que dicha actividad no correspondería a  $\alpha$  hemólisis. Es así entonces que de los 30 aislamientos hemolíticos se deduce que 27 fueron productores de  $\alpha$  hemolisina. El determinante *fimH* fue detectado en la mayoría de los aislamientos (88%), por lo que no fue incluido en los restantes análisis (Tabla 4, Anexo I).

### IV. 3. Identificación de perfiles de urovirulencia

El estudio de los aislamientos de la CE y de la CN permitió detectar los mismos tres contextos de urovirulencia vinculados a la producción de HMMM previamente caracterizados. Estos grupos se vieron ahora ampliados por la inclusión de aislamientos no productores de microcina pero portadores de ciertos genes de actividad microcina. En todos los casos de no producción antibiótica, dichos genes de actividad fueron secuenciados para evaluar su eventual capacidad funcional. De igual manera se procedió en aquellos aislamientos que produjeron microcina junto con otra actividad antibiótica no dilucidada (Fig. 5).

A continuación se indicarán las características de los tres patrones de urovirulencia redefinidos, los que pasaron a denominarse Perfiles I, II y III.

**Perfil I.** El perfil I (PI) fue exhibido por todos aquellos aislamientos productores de microcina M, incluidos los coproductores de microcinas H47 y M, junto con algunos no productores pero portadores del gen de actividad de la MccM, *mcmA*. En todos los casos dichos aislamientos fueron positivos para el locus *iroA* (*iroN* e *iroBC*), que codifica para la captación de hierro mediada por salmoquelinas, junto con el determinante *sfaA* para fimbrias S. La mayoría de los aislamientos portadores de *mcmA* presentaron este perfil. Es importante notar que el mismo grupo de cepas pudo ser seleccionado del total requiriendo la presencia de sólo dos loci, *mcmA* e *iroA* o *mcmA* y *sfaA*, redundancia que estaría indicando la cohesión de este perfil. La colección de referencia tuvo 16 aislamientos con PI (I-1 a I-16), mientras que dentro de los 230

aislamientos de las nuevas colecciones (CE+CN) un total de 21 presentó este perfil (Tablas 3 y 5, Anexo I).

Una vez identificados los genes que definen el PI, *mcmA*<sup>+</sup>-*iroA*<sup>+</sup>-*sfaA*<sup>+</sup>, otras características se asociaron con el mismo: el grupo filogenético B2 y el gen *fyuA* de la HPI. Asimismo, se observó la ausencia de los determinantes para cápsula K1, del gen *draD* del sistema adhesina/invasina Dr/Afa, de los genes de actividad para las microcinas I47 y ColV, y de la versión *iroBD* para salmoquelina. Además, ciertos determinantes que no fueron de definición de este perfil por no estar presentes en todos los aislamientos con PI aparecieron, sin embargo, en forma exclusiva o casi exclusiva en los aislamientos con este perfil. Esto sucedió con los genes para citotoxinas codificadas por los genes *cnf* y *clbB*. Por ejemplo, de un total de 16 aislamientos *cnf*<sup>+</sup>, 14 presentaron el perfil I (Tabla 5, Anexo I).

Posteriormente, se buscaron *in silico* las características del PI en cepas de *E. coli* cuyo genoma está totalmente secuenciado. Es así que las tres cepas de UPEC CFT073, ABU83972 y 536 (EMBL n° de acceso AE014075, CP001671 y CP000247, respectivamente) cumplieron con los requerimientos de dicho perfil (Tabla 5). Como se dijo con anterioridad, CFT073 coproduce microcinas H47 y M, mientras que ABU83972, que no ha sido ensayada para este fenotipo, también produciría ambas actividades antibióticas debido a que contiene la misma información genética microcina que CFT073. Por otro lado, *E. coli* 536, cuya producción tampoco ha sido analizada, sería un ejemplo de cepa no productora con PI debido a que carece de todos los genes microcina a excepción de los genes de inmunidad y de actividad para la MccM (Poey et al., 2006). El alelo *mcmA* en 536 posee seis nucleótidos diferentes en relación al presente en CFT073 y ABU83972. Cinco originan cambios sinónimos y el restante implica la sustitución de una alana por una valina. Este mismo alelo, presente en 536, fue el encontrado al secuenciar el gen *mcmA* en todos los aislamientos no productores con PI. Además, dichos aislamientos carecieron del gen de maduración *mchC* y del gen de actividad *mchB* para la MccH47 (Fig. 5A, Anexo I).

**Perfil II.** Los análisis de la colección de referencia sugirieron la posible existencia de un patrón de urovirulencia basado en la producción de MccH47 o de MccE492. Sin embargo, en dicha instancia se contó sólo con un aislamiento de cada tipo, siendo el productor de MccE492 una *K. pneumoniae*. El análisis de las nuevas colecciones, integradas sólo por cepas de *E. coli*, permitió dar mayor soporte a este patrón, el que fue redefinido como perfil II (PII). Debe notarse que, en *E. coli*, este perfil se asocia

exclusivamente a MccH47, puesto que la producción de MccE492 no ha sido encontrada en esta especie. El PII es exhibido por los aislamientos que portan dos loci: el gen de actividad de la MccH47, *mchB*, y la versión genética para producción de salmoquelina relacionada a microcina, *iroBD*. Algunos de estos aislamientos producen MccH47 (pero nunca MccM) mientras que otros no. Los aislamientos *mchB*<sup>+</sup> e *iroBD*<sup>+</sup> pertenecieron a los grupos filogenéticos A, B1 o D, carecieron del locus *iroA* así como de los genes para cápsula K1, fimbrias S, adhesina/invasina Dr/Afa, citotoxinas y ColV. La presencia del gen de actividad para la MccI47, *mciA*, estuvo presente en forma casi exclusiva en todos los aislamientos con PII; sólo un aislamiento con dicho perfil careció de *mciA*. El PII fue exhibido por 9 de los 230 aislamientos de CE+CN (Tabla 5, Anexo I).

La cepa H47 de *E. coli*, productora natural de MccH47, junto con la cepa 042, una *E. coli* enteroagregativa cuyo genoma fue recientemente secuenciado, son los referentes del PII (Tabla 5). Muy probablemente, la cepa 042 produzca MccH47 debido a que contiene el mismo sistema genético microcina que H47 (EMBL n° de acceso FN554766 y AJ009631, respectivamente). Ambas cepas carecen del gen de actividad de la MccM, *mcmA*, pero mantienen restos del mismo capaces de originar una amplificación positiva con los oligonucleótidos empleados. En este sentido, cabe señalar que los aislamientos con PII productores de MccH47 también dieron una reacción PCR positiva para *mcmA*. Debido a que ninguno de ellos produjo MccM, es de suponer que, al igual que H47 y 042, carecerían del gen *mcmA* salvaje. Por lo tanto, la ausencia del gen *mcmA* funcional sería un requerimiento adicional del PII. El gen *mchB* se secuenció en los seis casos en los que los aislamientos no produjeron MccH47 o la produjeron junto con otra actividad no identificada. Se evidenció el mismo alelo en todos los casos, portador de un único cambio nucleotídico que originó un codón sinónimo en relación al *mchB* portado por las cepas H47 y 042. Curiosamente, este alelo con dicho cambio sinónimo es el portado por la cepa CFT073, indicando su funcionalidad (Fig 5B, Anexo I).

**Perfil III.** El perfil III (PIII), previamente relacionado con la producción de ColV, fue detectado en todos los aislamientos portadores del gen de actividad para ColV, *cvaC*, independientemente de que los mismos fuesen o no productores. En todos los casos el locus *iroA* estuvo presente. Los aislamientos que exhibieron este perfil se distribuyeron en los cuatro grupos filogenéticos y carecieron de determinantes para fimbrias S, adhesina/invasina Dr/Afa, Iha, citotoxinas y microcinas catecol (Tabla 5, Anexo I). El

PIII fue el único relacionado con microcinas que mostró compatibilidad con los determinantes para cápsula K1. Más precisamente, las dos cepas que portaron dichos determinantes fueron las pertenecieron al grupo filogenético B2 con PIII. Esto mismo fue lo observado en los aislamientos ColV<sup>+</sup> B2 de la colección de referencia (Tabla 3). En todos los casos K1<sup>+</sup>, no sólo estuvieron presentes los genes esenciales para producir cápsula K1, *kpsM* y *neuA*, sino también el gen *neuO*, cuyo producto genera una variante acetilada de la cápsula. El PIII se observó en los aislamientos II-1 a II-10 de la colección de referencia y en 20 de los 230 aislamientos de CE+CN (Tabla 5, Anexo I).

Dos cepas totalmente secuenciadas exhiben las características del PIII: NRG857C, una “Adherent and Invasive E. coli” (AIEC) procedente de una lesión ileal de un paciente con enfermedad de Crohn, y *E. coli* S88, una cepa K1<sup>+</sup> procedente de un caso de meningitis neonatal (Tabla 5). Ambas cepas portan los determinantes *cvaC* e *iroA* en el plásmido ColV (EMBL n° de acceso CP001856 para el plásmido pO83\_CORR procedente de la cepa NRG857C y CU928146 para el plásmido pECOS88 procedente de la cepa S88). En principio, S88 sería capaz de producir ColV debido a que porta todo el sistema genético ColV, mientras que NRG857C no lo sería ya que su plásmido carece de los genes de secreción para ColV. En las colecciones CE y CN, 20 de los aislamientos exhibieron PIII. De éstos, 10 produjeron únicamente ColV, cinco produjeron ColV+X y cinco fueron no productores. Se secuenció el gen *cvaC* de estos últimos diez aislamientos. Tres de estas secuencias fueron idénticas a la portada por S88 y otras cepas descritas productoras de ColV. Por otro lado, los restantes siete aislamientos presentaron un alelo diferente, con dos cambios nucleotídicos sinónimos. Esta variante fue idéntica al alelo *cvaC* portado por la cepa NRG857C y por un grupo de cepas productoras de ColV procedentes de pollos (Pinou & Riley, 2001) (Fig. 5C, Anexo I).

La identificación de estos tres perfiles de urovirulencia vinculados a HMMM reveló la existencia de asociaciones no azarosas entre los distintos factores de virulencia. Estas asociaciones se detectaron como compatibilidades e incompatibilidades entre los factores. Considerando estos resultados, procedimos a la búsqueda de nuevos perfiles siguiendo este criterio de compatibilidad. Es así que se identificaron dos nuevos perfiles de urovirulencia no relacionados a microcina, que se denominaron perfil IV y perfil V.

**Tabla 5. Perfiles de urovirulencia en los aislamientos de CE y de CN y en cepas secuenciadas de *E. coli* <sup>(a)</sup>**

| Perfil /<br>Cepas<br>secuen-<br>ciadas <sup>(b)</sup> | Filogenia |    |    |    | Cápsula                  |                          | Citotoxinas                               |                         |                          |                         | Adhesinas/<br>Fimbrias     |                          |                          | Captación hierro         |                          |                             |                         | Microcina                 |                          |                          |                          |                          |                          |                           |      |                  |     | Total |
|-------------------------------------------------------|-----------|----|----|----|--------------------------|--------------------------|-------------------------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|------|------------------|-----|-------|
|                                                       | A         | B1 | D  | B2 | <i>kpsM</i> <sup>+</sup> | <i>neuA</i> <sup>+</sup> | Hly <sup>+</sup> <i>hlyA</i> <sup>+</sup> | <i>cnf</i> <sup>+</sup> | <i>clbB</i> <sup>+</sup> | <i>sat</i> <sup>+</sup> | <i>pap</i> <sup>+(d)</sup> | <i>sfaA</i> <sup>+</sup> | <i>draD</i> <sup>+</sup> | <i>fyuA</i> <sup>+</sup> | <i>iutA</i> <sup>+</sup> | <i>iroA</i> <sup>+(e)</sup> | <i>iha</i> <sup>+</sup> | <i>iroBD</i> <sup>+</sup> | <i>mchC</i> <sup>+</sup> | genes                    |                          |                          |                          | Producción <sup>(f)</sup> |      |                  |     |       |
|                                                       |           |    |    |    |                          |                          |                                           |                         |                          |                         |                            |                          |                          |                          |                          |                             |                         |                           |                          | <i>mcmA</i> <sup>+</sup> | <i>mchB</i> <sup>+</sup> | <i>mciA</i> <sup>+</sup> | <i>cvaC</i> <sup>+</sup> | HM<br>or<br>M             | H    | V                |     |       |
| I                                                     | 0         | 0  | 0  | 21 | 20                       | 0                        | 18                                        | 14                      | 20                       | 5                       | 19                         | 21                       | 0                        | 21                       | 9                        | 21                          | 10                      | 0                         | 14                       | 21                       | 14                       | 0                        | 0                        | 14                        | 0    | 0                | 21  |       |
| CFT073                                                | -         | -  | -  | +  | +                        | -                        | +                                         | -                       | +                        | +                       | +                          | +                        | -                        | +                        | +                        | +                           | +                       | -                         | +                        | +                        | +                        | -                        | -                        | +                         | -    | -                |     |       |
| ABU83972                                              | -         | -  | -  | +  | +                        | -                        | -                                         | +                       | +                        | +                       | +                          | +                        | -                        | +                        | +                        | +                           | +                       | -                         | +                        | +                        | +                        | -                        | -                        | +(g)                      | -    | -                |     |       |
| 536                                                   | -         | -  | -  | +  | +                        | -                        | +                                         | -                       | +                        | -                       | +                          | +                        | -                        | +                        | -                        | +                           | -                       | -                         | -                        | +                        | -                        | -                        | -                        | -                         | -    | -                |     |       |
| II                                                    | 5         | 3  | 1  | 0  | 1                        | 0                        | 0                                         | 0                       | 0                        | 0                       | 1                          | 0                        | 0                        | 3                        | 5                        | 0                           | 6                       | 9                         | 8                        | 0 <sup>(c)</sup>         | 9                        | 8                        | 0                        | 0                         | 5    | 0                | 9   |       |
| 042                                                   | -         | -  | +  | -  | +                        | -                        | -                                         | -                       | -                        | -                       | -                          | -                        | -                        | +                        | -                        | -                           | -                       | +                         | +                        | - <sup>(c)</sup>         | +                        | +                        | -                        | -                         | +(g) | -                |     |       |
| H47                                                   | +         | -  | -  | -  | -                        | -                        | -                                         | -                       | -                        | -                       | -                          | -                        | -                        | +                        | -                        | -                           | -                       | +                         | +                        | - <sup>(c)</sup>         | +                        | +                        | -                        | -                         | +    | -                |     |       |
| III                                                   | 8         | 6  | 4  | 2  | 4                        | 2                        | 0                                         | 0                       | 0                        | 0                       | 2                          | 0                        | 0                        | 10                       | 15                       | 20                          | 0                       | 0                         | 0                        | 0                        | 0                        | 0                        | 20                       | 0                         | 0    | 15               | 20  |       |
| S88                                                   | -         | -  | -  | +  | +                        | +                        | -                                         | -                       | -                        | -                       | +                          | -                        | -                        | +                        | +                        | +                           | -                       | -                         | -                        | -                        | -                        | -                        | +                        | -                         | -    | +(g)             |     |       |
| NRG 857C                                              | -         | -  | -  | +  | +                        | -                        | -                                         | -                       | -                        | -                       | -                          | -                        | -                        | +                        | +                        | +                           | -                       | -                         | -                        | -                        | -                        | -                        | +                        | -                         | -    | - <sup>(g)</sup> |     |       |
| IV                                                    | 13        | 0  | 18 | 15 | 36                       | 1                        | 1                                         | 0                       | 1                        | 18                      | 2                          | 0                        | 46                       | 43                       | 40                       | 0                           | 30                      | 0                         | 0                        | 0                        | 0                        | 0                        | 0                        | 0                         | 0    | 0                | 46  |       |
| V                                                     | 0         | 0  | 27 | 0  | 21                       | 11                       | 0                                         | 0                       | 0                        | 26                      | 27                         | 0                        | 0                        | 27                       | 27                       | 0                           | 26                      | 0                         | 0                        | 0                        | 0                        | 0                        | 0                        | 0                         | 0    | 0                | 27  |       |
| UMN026                                                | -         | -  | +  | -  | +                        | -                        | -                                         | -                       | -                        | +                       | +                          | -                        | -                        | +                        | +                        | -                           | +                       | -                         | -                        | -                        | -                        | -                        | -                        | -                         | -    | -                |     |       |
| IAI39                                                 | -         | -  | +  | -  | +                        | +                        | -                                         | -                       | -                        | -                       | +                          | -                        | -                        | +                        | +                        | -                           | -                       | -                         | -                        | -                        | -                        | -                        | -                        | -                         | -    | -                |     |       |
| No perfil                                             | 42        | 25 | 20 | 20 | 35                       | 10                       | 8                                         | 2                       | 3                        | 26                      | 7                          | 3                        | 0                        | 45                       | 50                       | 5                           | 43                      | 2                         | 2                        | 4                        | 1                        | 1                        | 0                        | 0                         | 0    | 0                | 107 |       |

<sup>(a)</sup> En filas grises se indican los perfiles con el número de aislamientos que cumplen la variable correspondiente. En celdas negras se indica las variables de presencia obligatoria en cada perfil.

<sup>(b)</sup> La presencia de las variables en las cepas secuenciadas se dedujo por análisis *in silico* de la capacidad de generar un producto de PCR del tamaño esperado usando los oligonucleótidos de este trabajo.

<sup>(c)</sup> Aunque algunos dan amplificación positiva, se consignan todos negativos por contener un gen *mcmA* no funcional (no producen MccM).

<sup>(d)</sup> *pap*<sup>+</sup> indica positivo para amplificación *papC* y para alguno de los alelos *papG* analizados.

<sup>(e)</sup> *iroA*<sup>+</sup> indica positivo para las amplificaciones *iroBC* e *iroN*.

<sup>(f)</sup> HM, co-producción de microcinas H47 y M; M, producción sólo de MccM; H, producción de MccH47; V, producción de ColV.

<sup>(g)</sup> Fenotipo deducido a partir de la secuencia de DNA; no analizado experimentalmente

**A) *mcmA*** (ABU83972, CFT073 y Nissle1917) [(536 y siete aislamientos no productores con perfil I (24, 44, 65, 92, 97, 144 y 4P)]

```

M R K L S E N E I K Q I S G G D G N D G Q A E L I A I G
atgagaaaactatctgaaaatgaaataaaacaaatctctggagggtgacgggaatgacgggcaggcagaattaattgctattggt
tactcttttgatagacttttactttattttgtttatagacctccactgcccttactgccgtccgtcttaattaacgataacca

S L A G T F I S P G F G S I A G A Y I G D K V H S W A T
tacttgctggttacgtttatttagCccgggatttggttctattgCaggggcttatataggtgataaagtacattcatgggcaacg
agtgaacgaccatgcaaataatCggccctaaaccaagataacGtccccgaatatatccactatttcatGtaagtaccggttgc

T A T V S P S M S P S G I G L S S Q F G S G R G T S S A
actgcGacgggttagtccctccatgtctccctcaggtataggattatcatcccagtttggtatCggcagagggtacatcaagtgcc
tgacGctgccaatcagggaggtacagagggagtcctatcctaatagtagggtcaaactagGccgtctccatgtagttcacgg

S S S A G S G S Stop
tcttcgtctgcggggagtggaagttaa 279 pb
agaagcagacgcccctcaccttcaatt

```

**B) *mchB*** (H47 y 042) [(ABU83972, CFT073, Nissle1917, y seis aislamientos con perfil II de las colecciones, cuatro no productores de MccH47 (16, 100, 4, 43P-2) y dos productores de MccH47+X (96 y 35)]

```

M R E I T E S Q L R Y I S G A G G A P A T S A N A A G A
atgcgagaaaataacagaatcacagttaagatatatttccggggcgggaggtgcgccagcgacttcagctaattgcCgcaggtgct
tacgctctttattgtcttagtgtaattctatataaaggccccgcctccacgggtcgctgaagtcgattacGgcgtccacga

A A I V G A L A G I P G G P L G V V V G A V S A G L T T
gcagctattgttggagctctcgccgaataacctggtggtccacttggggtttagttaggagccgtatctgcccgtttgacaaca
cgtcgataacaacctcgagagcggccttatggaccaccaggtgaacccaacatcaacctcggcatagacggccaactgttgt

A I G S T V G S G S A S S S A G G G S Stop
gcaattggctcgaccgtgggaagtggtagtgccagttcttctgctggtggcggtagctaa 228 pb
cgtaaccgagctggcacccttcaccatcacggtcaagaagacgaccaccgcatcgatt

```

**C) *cvaC*** [(pColV-K30, pAPEC-02-ColV, pECOS88, y tres aislamientos con perfil III de las colecciones, uno no productor (47P-1) y dos productores de ColV+X (52 y 65P-4) (pO83\_CORR, tres plásmidos ColV de cepas aviarias, pCOLVCA7V, y siete aislamientos con perfil III de la CN, cuatro no productores de ColV (12P, 21P, 57P-1 y 76P-1) y tres productores de ColV+X (27P, 29P y 45P-2)]

```

M R T L T L N E L D S V S G G A S G R D I A M A I G T L
atgagaactctgactcctaaatgaattagattctgtttctggtggtgcttcagggcgtgatattgcgatggctataggaacacta
tactcttgagactgagatttacttaattctaaagacaagaccaccagaagtcggcactataacgctaccgatatccttgtgat

S G Q F V A G G I G A A A G G V A G G A I Y D Y A S T H
tccggGcaatttgttgaggaggaattggagcagctgctgggggtgtggctggaggtgcaatatatgactatgcatccactcac
aggccGgttaacaacgtcctccttaacctcgtcgacgacccccacaccgacctccacgttatatactgatacgtaggtgagtg

K P N P A M S P S G L G G T I K Q K P E G I P S E A W N
aaacctaactcctgcaatgtctccatccggttttagGggaacaattaagcaaaaacccgaagggtaccttcagaagcatggaac
tttgattagtagcttacagaggtaggccaaatccCccctgttaattcggttttgggcttcctatggaagtccttgcaccttg

Y A A G R L C N W S P N N L S D V C L Stop
tatgctgcgggaagattgtgtaattggagtcctaaataatcttagtgatgtttgtttataa 312 pb
atacagcgccttctaacacattaacctcaggtttattagaatcactacaaacaaatatt

```

**Fig. 5. Secuencia nucleotídica de los genes de actividad microcina.** En negro, secuencia nucleotídica del alelo más caracterizado en la literatura con su secuencia aminoacídica deducida, y cepas o plásmidos que lo portan. En rojo, cambios en otros alelos y cepas o plásmidos que los portan. Se recuadran los nucleótidos que cambian.

**Perfil IV.** El perfil IV (PIV) se caracterizó por la presencia del gen *draD*, que codifica para la invasina del locus Dr/Afa dedicado a adhesión e invasión. Las cepas portadoras de este perfil fueron particularmente deficitarias para los factores de virulencia analizados. Es así que fueron negativas para los genes *sfaA*, *cnf*, *iroA* y microcina, y pertenecieron a los grupos filogenéticos A, B2 o D. Los genes que aparecieron más frecuentemente fueron los relacionados al ingreso de hierro, *iutA*, *fyuA* e *ihA*. Las funciones relacionadas a Dr/Afa caracterizan a un subgrupo de cepas clasificadas como DAEC, las que son responsables tanto de infecciones urinarias como intestinales (Servin, 2005). Este perfil fue exhibido por 46 de los 230 aislamientos CE+CN. Hasta la fecha, no se ha secuenciado el genoma completo de ninguna cepa de *E. coli* que represente a este perfil (Tabla 5, Anexo I).

**Perfil V.** El perfil V (PV) fue detectado en los aislamientos pertenecientes al grupo filogenético D que invariablemente presentaron los genes *fyuA* e *iutA* junto con los determinantes *papC* y *papGII* para fimbrias P. Los aislamientos con este perfil carecieron de los loci para fimbrias S, Dr/Afa, citotoxinas a excepción de *sat*, y para microcinas. Los determinantes *ihA* y *sat* estuvieron presentes en casi todos los aislamientos con PV. Este perfil presentó el genotipo K1<sup>+</sup> con una considerable frecuencia, siendo los aislamientos positivos para *kpsM* y *neuA* y generalmente negativos para *neuO*. Este perfil apareció en 27 de los 230 aislamientos CE+CN. Dos cepas de UPEC con el genoma totalmente secuenciado exhiben este perfil: UMN026 (EMBL n° de acceso CU928163) e IAI39 (EMBL n° de acceso CU928164) (Tabla 5, Anexo I).

En resumen, del total de los 230 aislamientos (CE+CN), 123 (53%) pudieron ser asignados a uno de los cinco perfiles. Dichos aislamientos se distribuyeron con distintas frecuencias entre los perfiles: 9% (PI), 4% (PII), 9% (PIII), 20% (PIV) y 12% (PV). Es de notar que el 71% de los aislamientos pertenecientes al grupo filogenético D y el 66% de los pertenecientes al B2 se ajustaron a alguno de los perfiles, mientras que la mayoría de los aislamientos pertenecientes a los grupos A y B1, 62% y 74%, respectivamente, no pudieron ser asignados a ninguno. Es importante destacar que el 14% del total de los aislamientos carecieron de todos los genes de virulencia, a excepción de fim o fenotipos analizados, perteneciendo en su amplia mayoría a los grupos A o B1.

#### IV. 4. Especificidad de hospedero de las cepas de UPEC con diferentes perfiles de virulencia

Este análisis se realizó exclusivamente con los datos de las colecciones CE y CN. En efecto, una vez observado que los factores de urovirulencia se distribuyeron en forma distinta según la procedencia de los aislamientos, fue relevante comparar la frecuencia de aparición de los cinco perfiles de urovirulencia en cada una de dichas colecciones (Tablas 4 y 6). Es importante notar que dentro de cada una de las colecciones hubo una proporción similar de aislamientos con un perfil adjudicado, 53.6% (CE) y 53.4% (CN), de modo que ambas colecciones contribuyeron de forma equitativa al total de los 123 aislamientos con perfil. Los perfiles I, IV y V predominaron dentro de la CE, mientras que dentro de la CN el PIV fue particularmente abundante seguido por el PIII.

Al comparar las dos colecciones, CE y CN, se observaron diferencias significativas en la aparición de los perfiles relacionados con microcinas. Es así que los perfiles I y II predominaron en los aislamientos de la CE mientras que el PIII fue casi exclusivo de los aislamientos de la CN. Asimismo, en lo que respecta a los perfiles no relacionados con microcinas, el PIV presentó cierta predominancia en la CN mientras que el PV estuvo representado en forma similar en ambas colecciones (Tabla 6). Por lo tanto, se observaron diferencias significativas e importantes entre las poblaciones de UPEC procedentes de mujeres embarazadas y las procedentes de niños.

**Tabla 6. Distribución de los aislamientos con perfil asignado de las colecciones procedentes de mujeres embarazadas (CE) y de niños (CN) <sup>(a)</sup>**

| Perfil /colección | Total      | CE        | CN        | <i>p</i>          |
|-------------------|------------|-----------|-----------|-------------------|
| <b>PI</b>         | <b>21</b>  | <b>17</b> | <b>4</b>  | <b>0.0007</b>     |
| <b>PII</b>        | <b>9</b>   | <b>8</b>  | <b>1</b>  | <b>0.0062</b>     |
| <b>PIII</b>       | <b>20</b>  | <b>1</b>  | <b>19</b> | <b>&lt;0.0001</b> |
| <b>PIV</b>        | <b>46</b>  | <b>18</b> | <b>28</b> | <b>0.0446</b>     |
| <b>PV</b>         | <b>27</b>  | <b>16</b> | <b>11</b> | <b>n.s.</b>       |
| <b>Total</b>      | <b>123</b> | <b>60</b> | <b>63</b> |                   |

<sup>(a)</sup> La significación global fue  $p < 0.0001$ . El valor de  $p$  se calculó mediante el test  $\chi^2$  de bondad de ajuste. n.s. no significativo.

#### IV. 5. Análisis estadísticos de los datos de virulencia

Se realizó un análisis de correspondencia múltiple denominado “Joint Correspondence Analysis” (JCA) sobre los datos de los 230 aislamientos (CE+CN) con el objetivo de detectar asociaciones entre los factores de virulencia que pudiesen dar soporte estadístico a los perfiles presentados con anterioridad. Para dicho estudio, se empleó la mayoría de los datos de urovirulencia, incluyendo las presencias y las ausencias. Considerando que la información esencial para los perfiles relacionados con microcinas reside en la presencia de los genes de actividad, se excluyeron del análisis los datos de producción de microcina así como los relativos al gen *mchC*. Primero, los análisis se aplicaron a los 230 aislamientos (CE+CN) y, posteriormente, a ambas colecciones por separado. En los tres casos, la interpretación se restringió a los primeros tres factores o dimensiones (F1, F2 y F3) debido a que los mismos explicaron más del 90% del total de la varianza de los datos. Considerando que la mayoría de los datos de ausencia presentaron una distribución azarosa cercana al centro del eje de los factores, sólo se muestran las presencias en las representaciones gráficas para su mayor claridad. En los gráficos, se incluyeron los grupos filogenéticos como variables suplementarias (Figs. 6, 7 y 8, Anexo II).

En base a nuestras observaciones previas, algunos factores de virulencia aparecieron casi exclusivamente en aislamientos con un determinado perfil, mientras que otros fueron compartidos por aislamientos con diferentes perfiles o incluso sin perfil. Aquellos factores que se concentraron en más de un 80% en aislamientos con un determinado perfil se consideraron específicos (exclusivos o casi exclusivos) de ese perfil. Es importante notar que estos factores incluyen, entre otros, algunos de los involucrados en la definición de los perfiles. De esta forma, los factores específicos de cada perfil fueron: *mcmA*, *sfaA*, *cnf*, *clbB* (PI); *iroBD* y *mciA* (PII); *cvaC* (PIII), y *draD* (PIV). El PV careció de este tipo de factores. Este acercamiento, basado en marcadores específicos, facilitó la identificación en los gráficos de aquellas asociaciones que estaban vinculadas a los perfiles.

En el análisis JCA realizado sobre los datos de los 230 aislamientos (CE+CN), los primeros tres factores explicaron el 95.31% del total de la varianza. En términos generales, la descripción brindó soporte estadístico a la existencia de asociaciones no azarosas entre los factores de virulencia que darían cuenta de los perfiles propuestos (Fig. 6, Anexo II).

Las variables específicas del PI hicieron la mayor contribución negativa al eje F1, formando un grupo claramente separado del resto de las variables en ambos planos, F1/F2 y F1/F3. Las variables específicas del PII se agruparon separadamente en F1/F3, contribuyendo fuertemente al lado negativo del eje F3. Los factores de virulencia que integran más de un perfil se distribuyeron de acuerdo a su condición. Es así que *iroA*, compartido por los aislamientos con PI y PIII, se encontró en la mitad de camino entre el agrupamiento PI y el marcador de PIII, *cvaC*. Un patrón similar fue el exhibido por *mchB*, presente en algunos de los aislamientos con PI y en todos los aislamientos con PII. Otras variables, ampliamente distribuidas entre los perfiles y los aislamientos sin perfil, tendieron a estar juntas en un área específica. Este grupo incluyó *fyuA*, *iutA*, *kpsM*, *neu*, *sat* e *ihlA*, contribuyendo al lado negativo del eje F2. La posición de estas variables en los gráficos fue determinada por los numerosos aislamientos que los presentaron, y su cercanía indicó que tienden a asociarse. El único grupo de aislamientos que está ampliamente enriquecido en esta combinación de genes es precisamente el que presenta PV, razón por la cual se vinculó este agrupamiento a dicho perfil. Más aún, *pap*, fundamentalmente presente en aislamientos con perfil I y V, se localizó entre los agrupamientos asignados a estos perfiles.

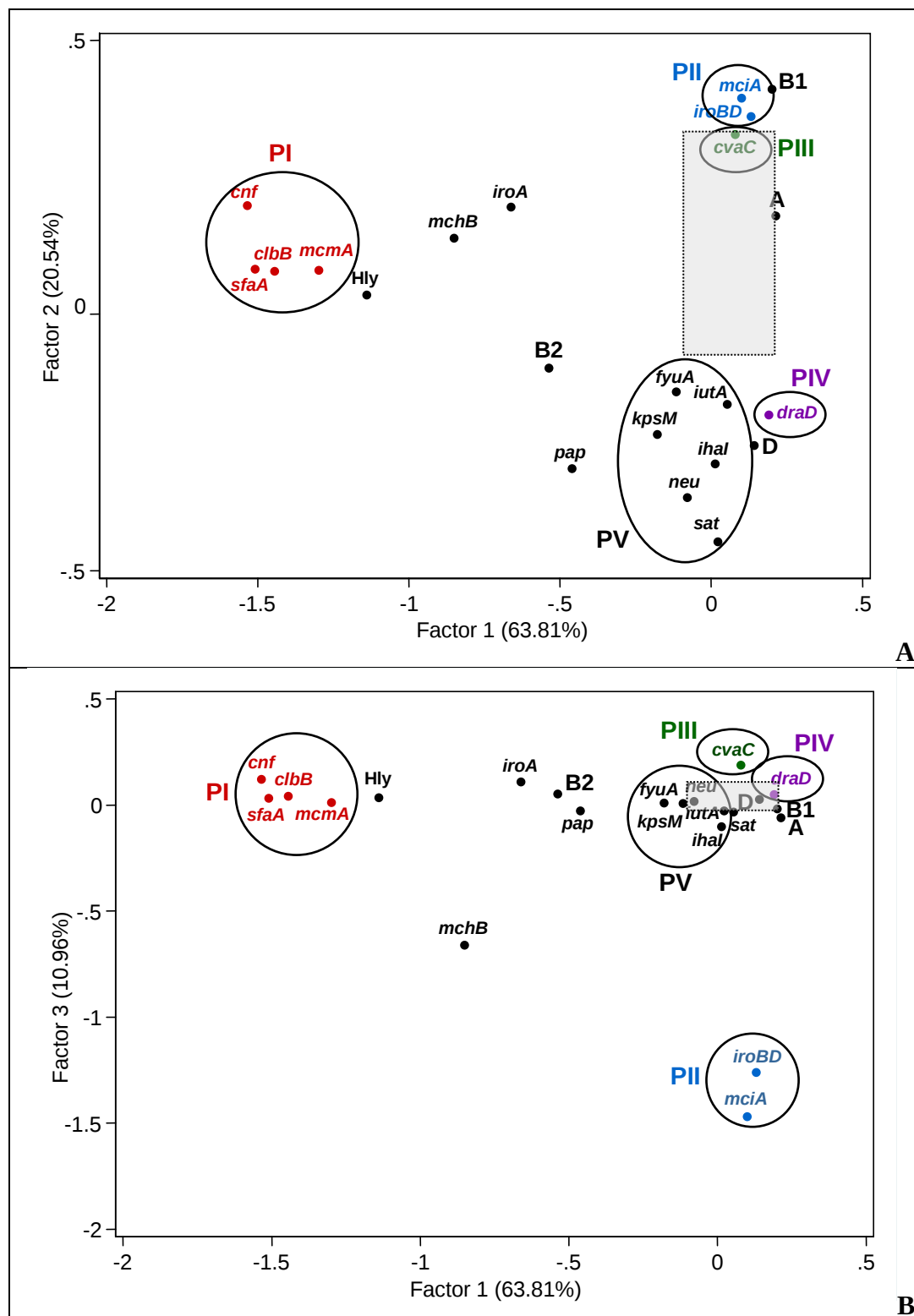
El marcador del PIV, *draD*, apareció en la periferia del grupo adjudicado al PV en ambos planos, F1/F2 y F1/F3. Esta localización era esperable debido a que los aislamientos con PIV y PV comparten, con alta frecuencia, varios factores de virulencia.

En los análisis aplicados a los datos de la CE, los tres primeros factores explicaron el 97.76% del total de la varianza. En este caso, se observaron algunas peculiaridades, las que podrían estar vinculadas a la distribución de los perfiles en esta colección (Fig. 7, Anexo II). En este sentido, cabe recordar que la mayoría de los aislamientos con PI y PII pertenecieron a la CE mientras que el PIII estuvo casi ausente (Tabla 6). Es así que las variables de PI y PII formaron dos agrupamientos bien definidos, e *iroA* integró, en esta instancia, el agrupamiento PI. Las restantes variables se distribuyeron en forma similar a la observada en los gráficos correspondientes al análisis de los aislamientos de ambas colecciones (CE+CN).

En los estudios realizados sobre los datos de la CN, los tres primeros factores explicaron el 92.12% de la varianza (Fig. 8, Anexo II). Cabe recordar que en esta colección los PI y PII prácticamente no estaban representados mientras que el PIII fue uno de los que predominó (Tabla 6). Aún así, las variables del PI se mantuvieron considerablemente agrupadas mientras que las del PII se distribuyeron en forma

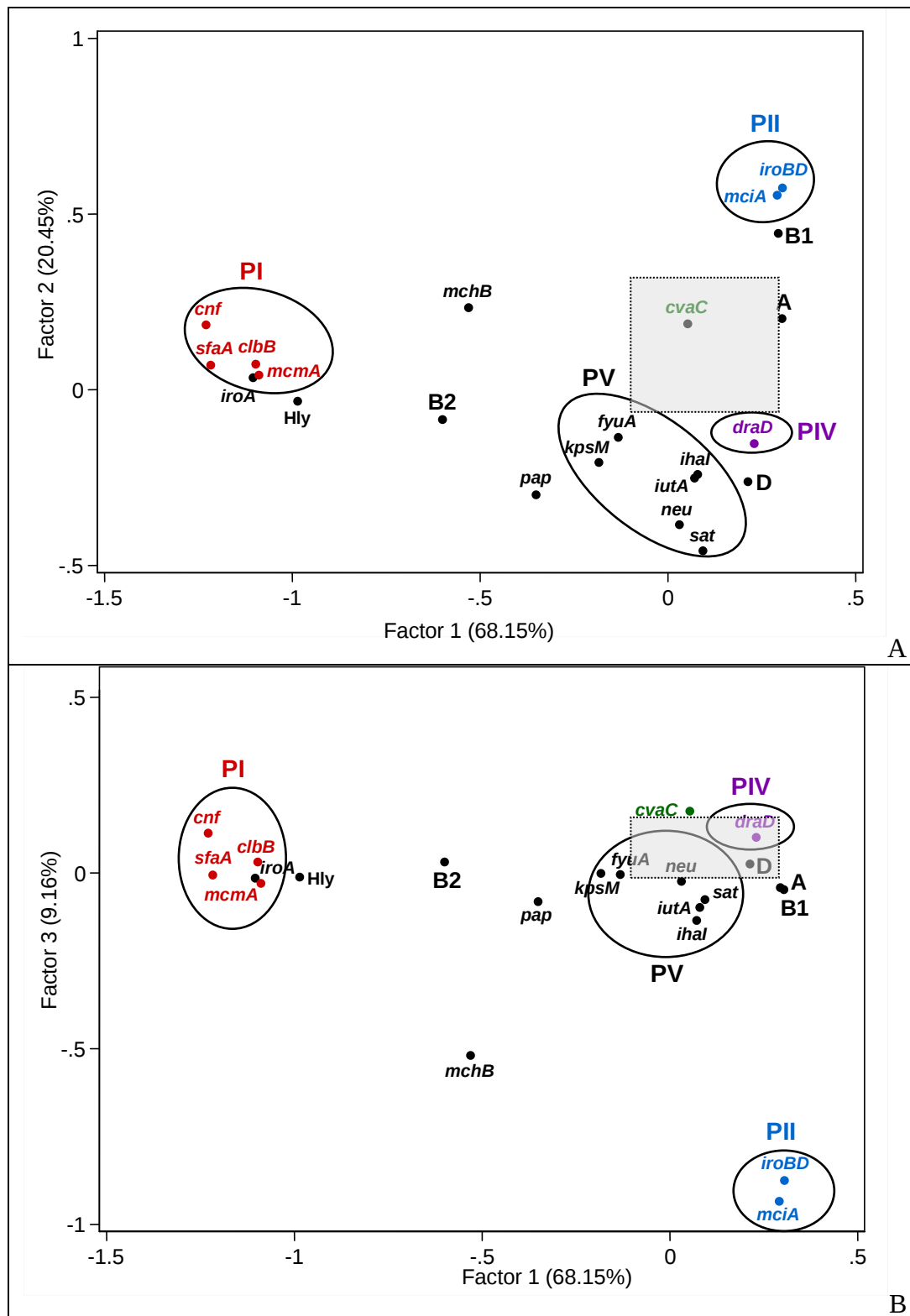
bastante dispersa. Dada la predominancia del PIII en esta colección, el locus *iroA* apareció ahora cerca de *cvaC*. El par *iroA-cvaC* se encontró claramente apartado en F1/F2, contribuyendo al lado negativo del eje F2. Las variables relacionadas con el PV y el marcador *draD* del PIV contribuyeron positivamente al eje F2. En esta colección las variables de algunos perfiles no aparecieron como claros agrupamientos.

Considerando que el objetivo fundamental de este análisis era evaluar las asociaciones entre las variables de virulencia, los grupos filogenéticos no fueron inicialmente incluidos en el análisis JCA, pero sí posteriormente como variables suplementarias. En términos generales, no se evidenciaron asociaciones particulares entre virulencia y filogenia, a excepción del grupo filogenético D, que se encontró adyacente a los agrupamientos asignados a los perfiles IV y V (Figs. 6, 7 y 8).



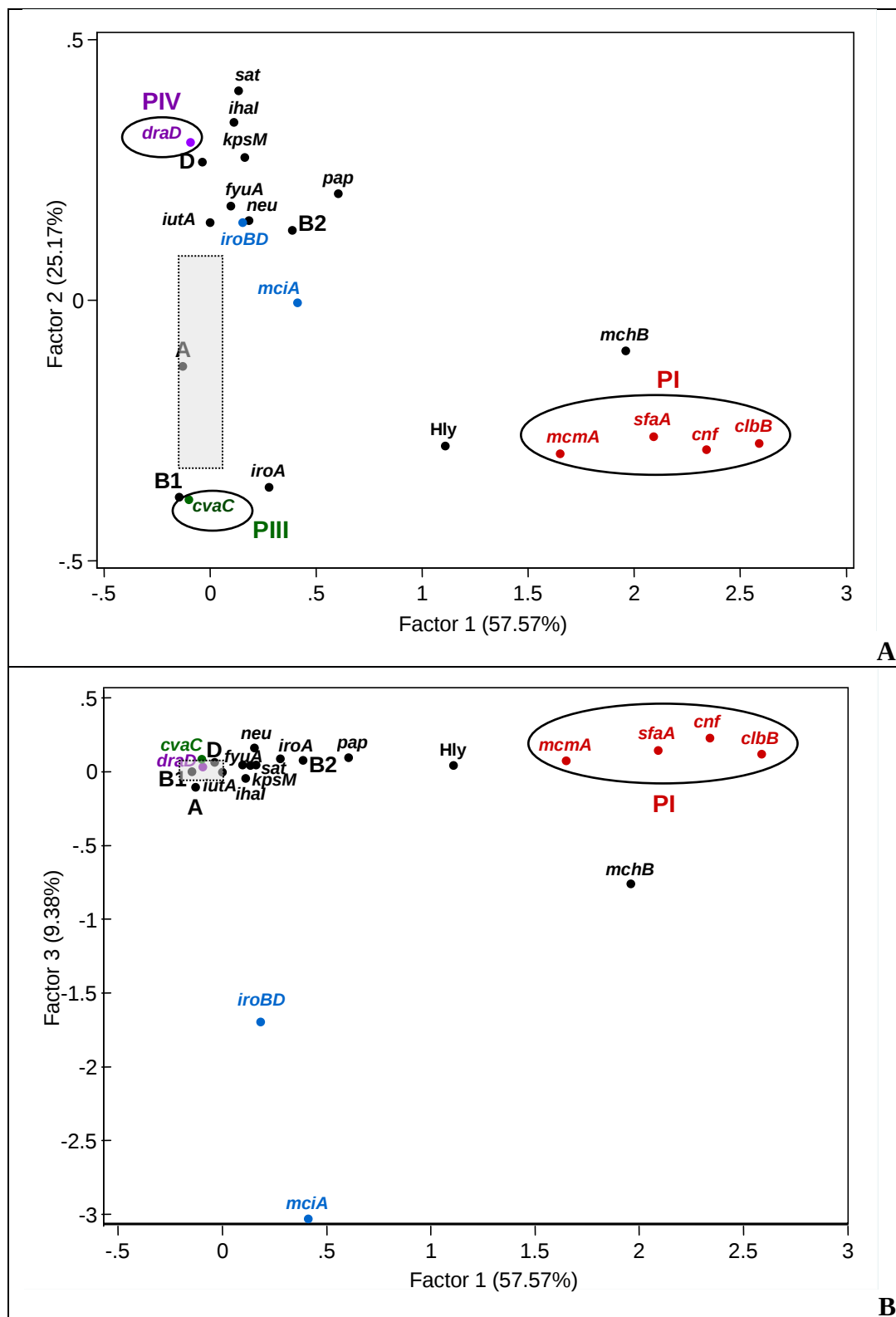
**Fig. 6. Análisis JCA de las variables de virulencia de los 230 aislamientos procedentes de mujeres embarazadas y de niños (CE+CN). A) Plano F1/F2; B) plano F1/F3. Se muestran las presencias de las variables indicadas y, en rectángulos grises, el área donde se localizan las ausencias. Los genes/factores de virulencia específicos de perfiles y los puntos correspondientes están codificados en colores: rojo, PI; azul, PII; verde, PIII; violeta, PIV. En negro, el resto de las variables. Los agrupamientos relacionados a los perfiles están circulados. Hly, fenotipo Hly<sup>+</sup> y genotipo *hlyA*<sup>+</sup> conjuntamente; *pap*, *papC*<sup>+</sup> y *papGII*<sup>+</sup> y/o *papGIII*<sup>+</sup>; *iroA*, *iroN*<sup>+</sup> e *iroBC*<sup>+</sup>.**

|                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>PI</b><br><i>mcmA</i> (actividad MccM)<br><i>sfaA</i> (fimbrias S)<br><i>clbB</i> (colibactina)<br><i>cnf</i> (factor citotóxico necrotizante) | <b>PII</b><br><i>mciA</i> (actividad MccI47)<br><i>iroBD</i> (síntesis salmoquelina)<br><b>PIII</b><br><i>cvaC</i> (actividad ColV)<br><b>PIV</b><br><i>draD</i> (invasina del sistema Dr/Afa) | <b>PV</b><br><i>fyuA</i> (receptor yersiniabactina)<br><i>iutA</i> (receptor aerobactina)<br><i>ihaA</i> (adhesión/receptor catecoles)<br><i>kpsM</i> (cápsula familia II)<br><i>neu</i> (cápsula K1)<br><i>sat</i> (citotoxina Sat) |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|



**Fig. 7. Análisis JCA de las variables de virulencia de los 112 aislamientos procedentes de mujeres embarazadas (CE). A) Plano F1/F2; B) plano F1/F3.** Se muestran las presencias de las variables indicadas y, en rectángulos grises, el área donde se localizan las ausencias. Los genes/factores de virulencia específicos de perfiles y los puntos correspondientes están codificados en colores: rojo, PI; azul, PII; verde, PIII; violeta, PIV. En negro, el resto de las variables. Los agrupamientos relacionados a los perfiles están circulados. Hly, fenotipo Hly<sup>+</sup> y genotipo *hlyA*<sup>+</sup> conjuntamente; *pap*, *papC*<sup>+</sup> y *papGII*<sup>+</sup> y/o *papGIII*<sup>+</sup>; *iroA*, *iroN*<sup>+</sup> e *iroBC*<sup>+</sup>.

|                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>PI</b><br><i>mcmA</i> (actividad MccM)<br><i>sfaA</i> (fimbrias S)<br><i>clbB</i> (colibactina)<br><i>cnf</i> (factor citotóxico necrotizante) | <b>PII</b><br><i>mciA</i> (actividad MccI47)<br><i>iroBD</i> (síntesis salmoquelina)<br><b>PIII</b><br><i>cvaC</i> (actividad ColV)<br><b>PIV</b><br><i>draD</i> (invasina del sistema Dr/Afa) | <b>PV</b><br><i>fyuA</i> (receptor yersiniabactina)<br><i>iutA</i> (receptor aerobactina)<br><i>ihaA</i> (adhesión/receptor catecoles)<br><i>kpsM</i> (cápsula familia II)<br><i>neu</i> (cápsula K1)<br><i>sat</i> (citotoxina Sat) |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|



**Fig. 8. Análisis JCA de las variables de virulencia de los 118 aislamientos procedentes de niños (CN).** A) Plano F1/F2; B) plano F1/F3. Se muestran las presencias de las variables indicadas y, en rectángulos grises, el área donde se localizan las ausencias. Los genes/factores de virulencia específicos de perfiles y los puntos correspondientes están codificados en colores: rojo, PI; azul, PII; verde, PIII; violeta, PIV. En negro, el resto de las variables. Los agrupamientos relacionados a los perfiles están circulados. Hly, fenotipo Hly<sup>+</sup> y genotipo *hlyA*<sup>+</sup> conjuntamente; *pap*, *papC*<sup>+</sup> y *papGII*<sup>+</sup> y/o *papGIII*<sup>+</sup>; *iroA*, *iroN*<sup>+</sup> e *iroBC*<sup>+</sup>.

#### PI

*mcmA* (actividad MccM)  
*sfaA* (fimbrias S)  
*clbB* (colibactina)  
*cnf* (factor citotóxico necrotizante)

#### PII

*mciA* (actividad MccI47)  
*iroBD* (síntesis salmoquelina)

#### PIII

*cvaC* (actividad ColV)

#### PIV

*draD* (invasina del sistema Dr/Afa)

#### PV

*fyuA* (receptor yersiniabactina)  
*iutA* (receptor aerobactina)  
*ihaA* (adhesión/receptor catecoles)  
*kpsM* (cápsula familia II)  
*neu* (cápsula K1)  
*sat* (citotoxina Sat)

## V. DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo brindaron un importante soporte a nuestra hipótesis de que las microcinas de mayor masa molecular estarían vinculadas a la virulencia de cepas de *E. coli* uropatógeno. En efecto, la producción de microcinas o la simple presencia de sus genes estuvieron sistemáticamente acompañadas de un contexto de virulencia. Más aún, la presencia de determinados genes microcina condicionó todo un repertorio de virulencia, conduciendo a la idea más general de que la asociación entre los distintos factores de virulencia no sería azarosa. A partir de estos hallazgos y consideraciones, los estudios se ampliaron y condujeron a la identificación de cinco perfiles de urovirulencia en *E. coli*, cuya existencia fue apoyada por análisis estadísticos.

En una primera instancia, el estudio de los aislamientos de la colección de referencia permitió identificar tres contextos de urovirulencia según el tipo de microcina de mayor masa molecular producida: i) el presentado por las cepas productoras de MccH47 y MccM, muy rico en factores de virulencia; ii) el de las cepas productoras de MccH47 o MccE492, particularmente pobre en dichos factores, y iii) el de las cepas productoras de ColV, con un nivel intermedio de virulencia.

Todas las cepas productoras de microcina pertenecieron a la especie *E. coli* a excepción del aislamiento I-18 de la colección de referencia, productor de MccE492, que perteneció a la especie *K. pneumoniae*. Dicha especie es naturalmente patógena, con frecuencia responsable de infecciones nosocomiales del tracto urinario, de partes blandas y también de neumonías. El aislamiento I-18, junto con la cepa de referencia RYC492, carecieron de todos los factores de urovirulencia ensayados -a excepción de los genes microcina-. Sin embargo, hay que tener en cuenta que se conoce muy poco sobre la genética de la virulencia en *K. pneumoniae*. De todas formas, algunas parejas de oligonucleótidos usadas en ese trabajo hibridarían con secuencias de algunos ejemplares de este género, las que corresponderían a homólogos de genes para la captación de hierro en *E. coli* (Azpiroz et al., 2009). Por lo tanto, la ausencia de los genes de virulencia analizados en estas cepas sería en parte informativa. En cuanto a las cepas de *E. coli*, cabe destacar que en ninguna de las colecciones analizadas se encontró una nueva actividad de tipo HMMM, por lo que parecería que esta familia de antibióticos ha tenido márgenes muy estrechos para su diversificación. La única

producción novedosa correspondió a un aislamiento de la CN que produjo únicamente MccM, siendo ésta la primera descripción de una cepa con este fenotipo.

Resultó en cierta medida sorprendente observar una correlación total entre la capacidad de producir microcina y la de producir el sideróforo salmoquelina, es decir que todos los aislamientos productores de microcina de nuestras colecciones (un total de 62) más las cepas de referencia productoras tuvieron los determinantes para producir salmoquelina. Esta presencia era esperada en las cepas productoras de microcinas catecol puesto que se requiere de salmoquelina para la síntesis antibiótica. Según el tipo de microcina catecol producida se observaron dos versiones genéticas para salmoquelina: *iroA* e *iroBD*. Los aislamientos productores de MccH47 y M conjuntamente (o sólo de MccM) presentaron el locus *iroA*, que comprende genes para la síntesis, secreción y captación de salmoquelinas. En el contexto de estos aislamientos, este locus también debe proveer de dicho sideróforo para la síntesis de las microcinas producidas. Por otro lado, los aislamientos productores de MccH47 o MccE942 presentaron la versión reducida *iroBD*, que sólo incluye información para la síntesis de salmoquelina, careciendo de los genes para su secreción y captación. Por lo tanto, estas cepas estarían en una situación de gran desventaja en cuanto a la captación de hierro mediada por salmoquelina. Cabe presumir entonces que las células portadoras de la versión *iroBD* no emplearían las salmoquelinas como sideróforo sino sólo para la síntesis de microcina. Esta posibilidad se ve reforzada por el hecho que los genes *iroBD* están siempre integrados a un sistema microcina a diferencia del locus *iroA* que no está ligado a genes microcina (Poey et al., 2006). No ha sido descrita ninguna cepa que posea conjuntamente el locus *iroA* y los genes *iroBD*, ni tampoco hemos detectado tal coexistencia en nuestro relevamiento.

Si bien la síntesis de salmoquelina es imprescindible para la producción de microcinas catecol, ésta no es necesaria para la producción de ColV. Sin embargo, todas las cepas productoras de ColV también contuvieron genes para salmoquelina en la versión *iroA*. Cabe destacar que han sido secuenciados dos plásmidos ColV, pAPEC-O2-ColV y pECOS88, y ambos resultaron contener el locus *iroA* (Johnson et al., 2006; Peigne et al., 2009). En este sentido, se pudo transferir por conjugación el plásmido ColV de seis de las diez cepas productoras de ColV de la colección de referencia (II-1, II-3, II-4, II-6, II-8 y II-10) a una cepa de *E. coli* K12. Todos los transconjugantes fueron productores de ColV, *cvaC*<sup>+</sup> e *iroA*<sup>+</sup>, comprobándose así la co-localización plasmídica de ambos loci (Azpiroz et al., 2009). La estricta asociación evidenciada entre

los determinantes para ColV y el locus *iroA* resultó sorprendente y parecería indicar una coordinación funcional aún desconocida entre ambos loci.

A partir de la detección de los tres diferentes contextos de urovirulencia de las cepas según el tipo de HMMM producida, se observó que existiría una correlación entre los distintos factores de urovirulencia de las cepas. Es así que los loci de virulencia presentaron niveles variables de asociación con cada fenotipo microcina: algunos parecieron necesarios, otros simplemente compatibles y otros nunca estuvieron presentes, indicando la posible existencia de incompatibilidades. Por lo tanto, las HMMM aparecieron como marcadores de contextos de virulencia, lo que sugiere fuertemente su vinculación con la patogenicidad.

A consecuencia de este análisis surgieron dos hipótesis: i) que existiría una coordinación entre los factores de virulencia que cumpliría con reglas de compatibilidad e incompatibilidad entre los mismos y ii) que algunos de estos factores actuarían como marcadores de determinados contextos de virulencia. A la luz de estas hipótesis se analizaron todos los aislamientos, productores o no de microcina, procedentes de dos poblaciones bien definidas: mujeres embarazadas y niños. Uno de los objetivos de este análisis era evaluar la especificidad de asociación entre las microcinas y los diferentes perfiles de urovirulencia identificados. Además, en este contexto amplio de estudio, nos dirigimos a detectar asociaciones entre factores que pudiesen dar cuenta de la existencia de perfiles conservados de virulencia, estuviesen o no vinculados a microcinas. Finalmente, nos interesaba ver la posible vinculación entre los diferentes contextos de urovirulencia y el tipo de hospedero de donde procedían los aislamientos.

El estudio de estas dos nuevas colecciones no sólo permitió detectar los mismos tres perfiles de urovirulencia previamente definidos sino también comprobar que no era la producción de microcina el verdadero marcador de los mismos sino la presencia de determinados genes microcina. Es así que estos contextos aparecieron en cepas tanto productoras como no productoras de microcina, pero todas ellas portadoras de ciertos genes microcina. Además, se identificaron dos nuevos contextos o perfiles de urovirulencia no relacionados con estas actividades antibióticas.

En términos generales, el análisis de todos los aislamientos de UPEC de las colecciones CE y CN reveló una gran heterogeneidad en su contenido de virulencia así como en su filogenia. Los tres grupos filogenéticos A, D y B2 estuvieron igualmente representados mientras que el grupo B1 fue minoritario. Al igual que las descripciones de otros autores, se encontraron desde aislamientos muy ricos en factores de virulencia

hasta otros que carecieron por completo de los mismos. Sin embargo, algo más de la mitad de los aislamientos se adjudicó a alguno de los cinco perfiles de urovirulencia. Considerando las dificultades señaladas por los distintos autores que trabajan en el tema para identificar agrupamientos bien definidos de cepas de UPEC, la presente propuesta, que clasifica el 53% de los aislamientos, parece un aporte novedoso en la dirección de descifrar el proceso patogénico que desarrollan estas cepas. Además, es importante señalar que, en estudios realizados por otros autores en los que se incluyeron algunas variables empleadas en este trabajo, se describen asociaciones entre las variables compatibles con nuestros resultados (Marrs et al., 2005; Moreno et al., 2005).

El perfil I fue el más rico en los factores de virulencia analizados. Presumiblemente, todos los determinantes característicos de este perfil son de localización cromosómica. En particular, el agrupamiento *mcmA-iroA-sfaA* integra una isla de patogenicidad (PAI, de “Pathogenicity-Associated Island”) en la cepa CFT073 conocida como PAI<sub>serX</sub>. Esta última está presente, con características semejantes, en las otras dos cepas de referencia, ABU83972 y 536. Si bien otros autores han reportado asociaciones entre algunos de los factores de virulencia de este perfil, en ningún caso incluyeron el gen *mcmA*. La no inclusión del mismo deriva en la pérdida de coherencia del contexto debido a que los restantes loci que definen el PI no aparecen necesariamente juntos (Marrs et al., 2005; Moreno et al., 2005; Jauregui et al., 2008).

El perfil II se caracterizó por la presencia del gen de actividad para la MccH47 junto con los genes *iroBD* para la producción de salmoquelina. Ambos loci son cromosómicos y están localizados en el sistema genético microcina. Considerando los pocos aislamientos que presentaron el PII y que la cepa con este perfil, de genoma totalmente secuenciado, *E. coli* enteroagregativa 042, procede de un paciente con infección intestinal, se podría suponer que dichas cepas sean más propensas a ocasionar enfermedades entéricas que urinarias. Además, la cepa H47, que presenta PII y cuyo genoma está parcialmente secuenciado, también procede del intestino (Laviña et al., 1990; Poey et al., 2006; Chaudhuri et al., 2010).

El perfil III se caracterizó por la presencia del gen de actividad para ColV, *cvaC*, y el locus *iroA*. En todos los casos se ha reportado la presencia conjunta de dichos genes en los plásmidos denominados ColV, los que con frecuencia son conjugativos o movilizables. Los determinantes ColV han sido decisivos para la identificación de este perfil debido a que si no se tomaran en cuenta el contenido de virulencia de las cepas no exhibiría suficientes peculiaridades para formar un grupo separado. Aparentemente, los

plásmidos ColV son capaces de instalarse en cepas pertenecientes a cualquier grupo filogenético pero no con cualquier contexto de virulencia. Es así que las cepas con este perfil carecen de citotoxinas y de otras funciones de virulencia. Esto último indicaría que la presencia de un plásmido ColV en la célula requiere de un contexto genético específico para poder mantenerse.

La identificación de tres perfiles de urovirulencia a partir de la presencia de determinados genes de actividad microcina, independientemente de que las cepas fueran productoras o no de microcina, nos resultó sorprendente. En principio, las HMMM están involucradas en relaciones antagónicas entre bacterias. Sin embargo, la presencia de estos genes en aislamientos no productores parece sugerir que estos péptidos podrían cumplir otro tipo de función adicional. En este sentido, la secuenciación de los genes de actividad microcina portados por los aislamientos no productores indicó que los mismos están conservados. La secuencia del gen *mcmA* procedente de los aislamientos con PI correspondió a la del mismo alelo presente en la cepa no productora con PI, *E. coli* 536. Es de presumir que dicho alelo es funcional ya que codifica para un péptido que difiere en sólo un aminoácido (Val por Ala) del producto McmA en cepas productoras con PI como CFT073. En estos casos, el defecto en la producción de microcina podría explicarse por la carencia de genes accesorios de maduración y/o secreción, como ocurre en 536. Más aún, todos los aislamientos no productores con PI carecieron del gen de maduración *mchC*. En cuanto a los genes de actividad presentes en cepas no productoras con PII o PIII, su secuencia reveló que eran salvajes. El alelo *mchB* de los aislamientos con PII no productores es exactamente el mismo que se encuentra en varias cepas productoras de McCH47 como CFT073. Por otro lado, se observaron dos alelos *cvaC* en los aislamientos no productores con PIII. Una de estas variantes alélicas es la contenida en el plásmido de la cepa de *E. coli* S88 así como en otros plásmidos ColV que determinan la producción ColV, e.g. pColV-K30 (Gilson et al., 1990; Peigne et al., 2009). El otro alelo *cvaC* encontrado es el presentado por la cepa no productora de *E. coli* NRG857C, que carece de los determinantes de secreción ColV. Esta misma variante alélica ha sido también descrita en varias cepas de *E. coli* productoras de ColV procedentes de pollos (Pinou & Riley., 2001; Nash et al., 2010). Es importante notar que estas dos variantes alélicas de *cvaC*, compartidas por cepas productoras y no productoras, han sido descritas hace ya varias décadas. Cabe preguntarse por qué dichos alelos están perfectamente preservados en cepas no productoras de antibiótico. Es de pensar entonces que el péptido ColV podría cumplir alguna otra función, no vinculada a

la antibiosis, que condicionaría su mantenimiento en tales contextos. Quizás sea esa posible segunda función la responsable de la estrecha relación de ColV con el locus *iroA*. La pregunta planteada para los alelos *cvaC* puede extenderse a los de *mcmA* y de *mchB*, que también aparecen conservados en cepas no productoras.

Los otros dos perfiles definidos en este trabajo no están relacionados con microcinas. El perfil IV se definió por la presencia del gen *draD*, que pertenece al locus Dr/Afa. Dicho locus, de localización cromosómica o plasmídica, está relacionado a funciones de adhesión a células eucariotas e invasión de las mismas. Las cepas Dr/Afa<sup>+</sup> se han clasificado como un subgrupo de “diffusely adhering” *E. coli* (DAEC), asociadas a infecciones entéricas y urinarias (Servin, 2005). Otros autores han descrito un perfil similar en cepas de UPEC portadoras del locus Dr/Afa (Marrs et al., 2005). Por el contrario, el perfil V careció de marcadores específicos. Dicho perfil se propuso en base a la frecuente asociación de ciertos determinantes en varios aislamientos pertenecientes al grupo filogenético D. Presumimos que el PV, al igual que los restantes perfiles, debe poseer marcadores aún no identificados que lo definan.

Desde un punto de vista genómico, es importante notar que los determinantes que definen los perfiles se localizan en regiones específicas del cromosoma o en plásmidos. Esto se concluye en base a los conocimientos que se tienen de los genomas totalmente secuenciados, incluyendo cromosoma y plásmidos (Fig. 9). Los marcadores de definición del PI (*mcmA*, *iroA*, *sfaA*) están concentrados en la PAI<sub>serX</sub> de CFT073 y en islas similares de ABU83972 y de 536; los del PII (*mchB* e *iroBD*) en la isla genómica 2 de 042; el del PIII (*cvaC*) en plásmidos ColV, y el del PIV (*draD*) en plásmidos o en una localización cromosómica aún desconocida (Dobrindt et al., 2001; Johnson et al., 2006; Lloyd et al., 2007; Peigne et al., 2009; Zdziarski et al., 2010; Chaudhuri et al., 2010). Resulta sorprendente comprobar que estos determinantes, que se restringen a porciones tan discretas del genoma, permitan predecir el contexto de virulencia de la bacteria, i.e. la presencia o ausencia de otros loci no ligados que pueden estar en el cromosoma o en plásmidos. Por ejemplo, los marcadores del PI, localizados en una isla de tipo PAI<sub>serX</sub>, determinan que esté la HPI (*fyuA*) y, con una alta frecuencia, que estén otras islas como la PAI<sub>asnW</sub> (portadora del locus *clb* para colibactina), la PAI<sub>pheV</sub> (portadora de genes para cápsula tipo II, citotoxinas y fimbrias P), la PAI<sub>pheU</sub> (fimbrias P) y una PAI presente en ABU83972 (portadora de los genes para Cnf, hemólisis y fimbrias P). Asimismo, estos marcadores del PI aseguran la ausencia de la isla genómica 2 (que caracteriza al PII), del locus *neu* (para cápsula K1), de plásmidos

ColV, y del locus Dr/Afa (*draD*) tanto en su versión cromosómica como plasmídica. Este mismo tipo de análisis se puede aplicar en los casos de los perfiles II-IV, como se deduce de la Fig. 9 teniendo en cuenta los datos brindados en la Tabla 5. En cuanto al PV, si bien no se han detectado marcadores específicos del mismo, dentro del grupo filogenético D lo definen los determinantes *fyuA*, *iutA* y *pap*. Éstos no se localizan conjuntamente en un sitio discreto del genoma de las cepas totalmente secuenciadas, IAI39 y UMN026, sino que se distribuyen en distintas PAIs: *fyuA* está en la HPI, *iutA* en PAI<sub>pheV</sub>, y *pap* en PAI<sub>pheV</sub> o en PAI<sub>pheU</sub> (Fig. 9).

Estas observaciones indicarían que el contenido de virulencia de las cepas de UPEC seguiría reglas estrictas de compatibilidad e incompatibilidad entre los diferentes factores de urovirulencia. Muy probablemente, el cumplimiento de dichas reglas sea de suma importancia en la estrategia de patogenicidad desarrollada por la bacteria, asegurando la coherencia funcional del patógeno en el proceso infeccioso. Siguiendo esta línea de razonamiento, nos podríamos preguntar cómo cepas que carecen de todos estos marcadores analizados son igualmente capaces de desarrollar infecciones urinarias indistinguibles de las ocasionadas por cepas portadoras de estos factores de virulencia. Una explicación muy probable es que aún se desconoce la función de muchos genes, en general localizados en islas genómicas, que podrían estar vinculados a la virulencia. Basta con observar los genomas totalmente secuenciados de cepas de UPEC/ExPEC para constatar el gran número de genes que codificarían para proteínas hipotéticas, i.e. de función desconocida. Presumiblemente es entre estos genes que se irán encontrando nuevas funciones de virulencia. Se puede pensar entonces que ésta sea la razón por la que el 47% de nuestros aislamientos de las colecciones CE y CN no pudieron ser adjudicados a ningún perfil de urovirulencia.

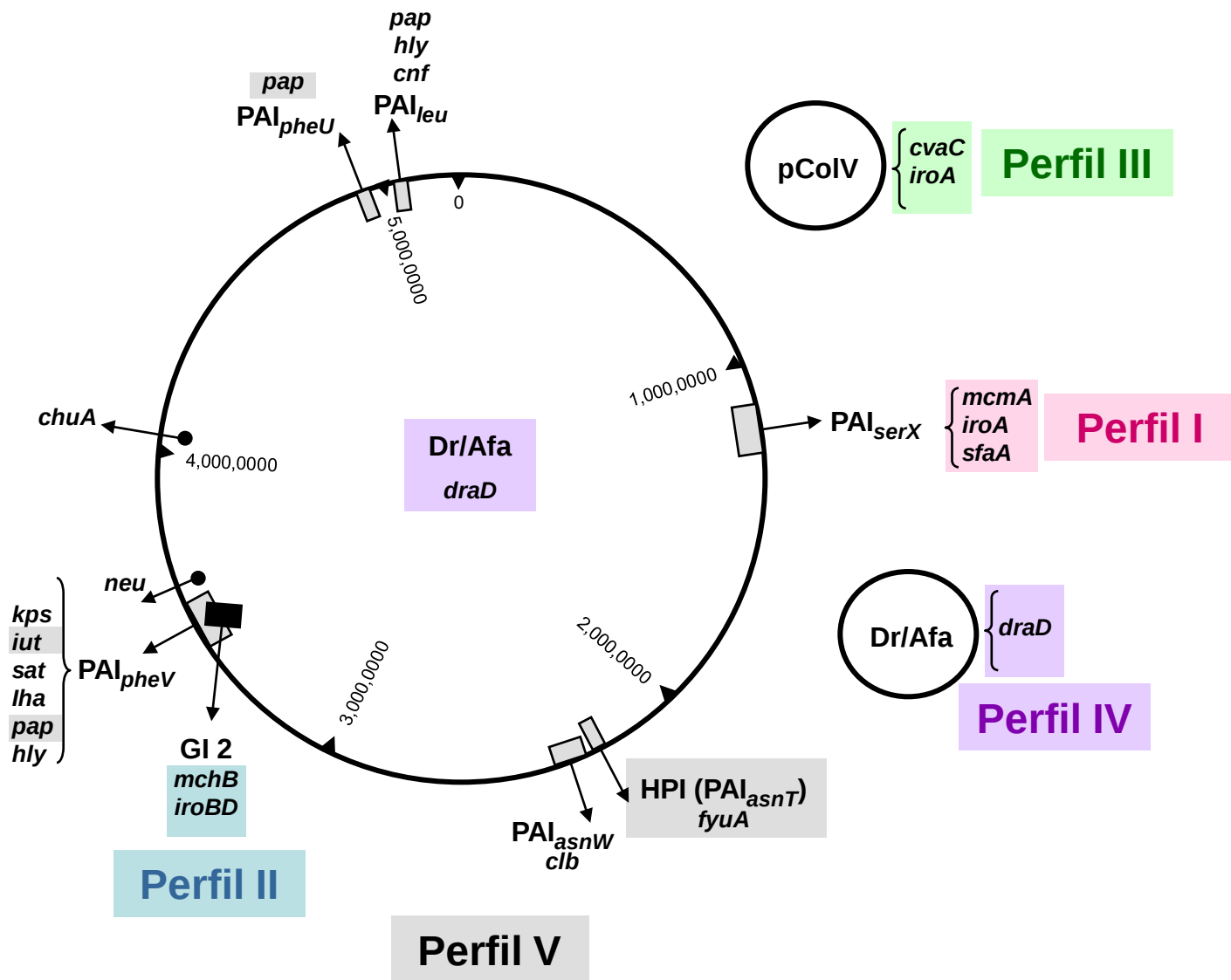
Si bien los factores de virulencia mantendrían claras asociaciones entre sí, su vinculación con la filogenia fue muy variable. Los PI y PV se asociaron estrictamente a los grupos B2 y D, respectivamente, mientras que los aislamientos con los otros perfiles se distribuyeron en varios grupos filogenéticos. Cabe concluir entonces que la relación entre genoma básico, deducido de la filogenia, y el genoma flexible, deducido de la virulencia, no es necesariamente estricta. Sería del mayor interés estudiar la filogenia a un nivel más fino, e.g. determinando el secuenciotipo de los aislamientos, para evaluar con mayor precisión la relación entre genoma básico y virulencia.

Otro aspecto a tener en cuenta es que los perfiles mostraron distintas frecuencias de aparición dependiendo del hospedero de donde procedían los aislamientos. La

mayoría de los aislamientos con PI y II procedieron de mujeres embarazadas, el PIV fue algo más abundante en la colección de niños, pero el mayor contraste se evidenció con el PIII, que fue casi exclusivo de los aislamientos procedentes de niños. En relación al PIII, es importante recordar que los plásmidos ColV se han relacionado con cepas de *E. coli* patógenas extraintestinales (ExPEC), un grupo de cepas que ocasionan diferentes infecciones en animales y humanos (Waters & Crosa, 1991). Algunos genes marcadores de estos plásmidos ColV, e.g. *cvaC*, han sido encontrados con una alta frecuencia (>70%) en cepas de *E. coli* que infectan aves (APEC). Los mismos también aparecen, aunque con menor frecuencia, en cepas de *E. coli* que ocasionan sepsis y meningitis neonatal (NMEC) y también, con un porcentaje aún menor, en cepas de UPEC. Estos datos indicarían que existe una relación cercana entre cepas ColV<sup>+</sup> de APEC, NMEC y UPEC, conduciendo a la hipótesis de que quizás los pollos pudiesen ser un reservorio de cepas de ExPEC humanas, i.e. que las cepas de APEC relacionadas con ColV podrían tener un potencial zoonótico (Johnson et al., 2006; Ewers et al., 2007). Además, hemos observado que las cepas de APEC relacionadas a ColV resultan indistinguibles de los aislamientos de UPEC con PIII de nuestras colecciones. Nos preguntamos entonces si las cepas ColV<sup>+</sup>/PIII, tanto APEC como UPEC, constituirían un único conjunto de cepas de ExPEC capaces de infectar distintos tipos de hospedero. Teniendo en cuenta que, según nuestros resultados, las cepas con PIII infectan preferentemente a niños, consideramos la hipótesis que este tipo de *E. coli* patógeno sería igualmente capaz de infectar aves y niños, siendo poco eficiente para infectar humanos adultos, al menos a mujeres embarazadas. Si esto fuera así, el espectro de hospedero de las cepas de UPEC con PIII no estaría determinado por las barreras de especie sino por alguna otra característica de sus hospederos aún no conocida.

Por otro lado, los aislamientos con PI y PII predominaron claramente en la colección de embarazadas. En particular, llama la atención que las cepas con PI tengan dificultades para infectar niños, considerando que éste es el perfil más rico en los factores de urovirulencia conocidos. Otra vez entonces proponemos que ciertas características aún no dilucidadas del hospedero serían las determinantes del tipo de patógeno capaz de infectar.

En vista de estos resultados, consideramos que sería interesante realizar este tipo de análisis en aislamientos de UPEC procedentes de otras poblaciones humanas y también animales.



**Fig. 9. Representación del pangenoma de las cepas de *E. coli* cuyos genomas están totalmente secuenciados y que presentan los perfiles de urovirulencia.** El círculo mayor representa el cromosoma, con un tamaño tipo para estas cepas algo mayor a 5 millones de pares de bases. Los círculos menores representan plásmidos. Se indican los determinantes de virulencia analizados según su localización en las cepas referentes de cada perfil. En rectángulo gris, PAIs. Cuando correspondió, se denominaron las PAIs según el gen para tRNA en que se encuentran insertadas. En círculo negro, loci de virulencia no incluidos en PAIs. En recuadros con color se indica la localización de los determinantes de definición de los perfiles: rosado, PI según CFT073, ABU83972 y 536; celeste, PII según 042; verde, PIII según S88 y NRG857C; gris, PV según UMN026 e IA139. El PIV carece de cepa referente secuenciada y se representan en violeta las dos posibles localizaciones del marcador *draD*, en plásmido o en cromosoma. En rectángulo negro se indica la GI2 de 042, que se localiza en el gen para tRNA *pheV*, sustituyendo casi totalmente la *PAI<sub>pheV</sub>* de otras cepas pero manteniendo el locus *kps*.

## VI. CONCLUSIÓN

La principal conclusión que emerge de este trabajo es que el contenido de virulencia de las cepas de *E. coli* uropatógeno obedece a reglas de compatibilidad entre los factores de virulencia. Es así que se han detectado agrupamientos conservados de dichos factores que se denominaron perfiles de urovirulencia. Indudablemente, esta organización del genoma flexible dedicado a la virulencia debe garantizar una coherencia funcional que asegure el desarrollo exitoso del proceso patogénico. Asimismo, estos contextos de virulencia condicionarían el espectro de hospedero del patógeno.

## VII. REFERENCIAS

1. **Azpiroz, M.F., Rodríguez E., y Laviña M. 2001.** The structure, function, and origin of the microcin H47 ATP-binding cassette exporter indicate its relatedness to that of colicin V. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 969-972.
2. **Azpiroz, M.F. & Laviña M. 2004.** Involvement of enterobactin synthesis pathway in production of microcin H47. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 1235-1241.
3. **Azpiroz, M.F. & Laviña M. 2007.** Modular structure of microcin H47 and colicin V. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51: 2412-2419.
4. **Azpiroz, M.F., Poey M.E., y Laviña M. 2009.** Microcins and urovirulence in *Escherichia coli*. *Microb. Pathog.* 47: 274-280.
5. **Bergsten, G., Wullt B., y Svanborg C. 2005.** *Escherichia coli*, fimbriae, bacterial persistence and host response induction in human urinary tract. *Int.J.Med.Microbiol.* 295:487-502.
6. **Beutin, L. 1991.** The different hemolysins of *Escherichia coli*. *Med. Microbiol Immunol.* 180: 167-182.
7. **Bingen, E., Denamur E., Brahimi N., y Elion J. 1996.** Genotyping may provide rapid identification of *Escherichia coli* K1 organisms that cause neonatal meningitis. *Clin. Infect. Dis.* 22: 152-156.
8. **Chaudhuri, R.R., Sebaihia M., Hobman J.L., Webber M.A., Leyton D.L., Goldberg M.D., Cunningham A.F., Scott-Tucker A., Ferguson P.R., Thomas C.M., Frankel G., Tang C.M., Dudley E.G., Roberts I.S., Rasko D.A., Pallen M.J., Parkhill J., Nataro J.P., Thomson N.R., y Henderson I.R. 2010.** Complete genome sequence and comparative metabolic profiling of the prototypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain 042. *PLoS One.* 5: e8801.

9. **Clermont, O., Bonacorsi S., y Bingen E. 2000.** Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. Appl. Environ. Microbiol. 66:4555-4558.
10. **Connell, H., Agace W., Klemm P., Schembri M., Márild S., y Svanborg C. 1996.** Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 9827-9832.
11. **Crosa, J.H. & Walsh C.T. 2002.** Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66: 223-249.
12. **Das, M., Tassell A.H., Urvil P.T., Lea S., Pettigrew D., Anderson K.L., Samet A., Kur J., Matthews S., Nowicki S., Popov V., Goluszko P., y Nowicki B.J. 2005.** Hydrophilic domain II of *Escherichia coli* Dr fimbriae facilitates cell invasion. Infect. Immun. 73: 6119-6126.
13. **Deszo, E.L., Steenbergen S.M., Freedberg D.I., y Vimr E.R. 2005.** *Escherichia coli* K1 polysialic acid O-acetyltransferase gene, *neuO*, and the mechanism of capsule from variation involving a mobile contingency locus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 5564-5569.
14. **Dobrindt, U., Blum-Oehler G., Hartsch T., Gottschalk G., Ron E.Z., Fünfstück R., y Hacker J. 2001.** S-fimbriae-encoding determinant *sfa<sub>I</sub>* is located on pathogenicity island III<sub>536</sub> of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. Infect. Immun. 69: 4248-4256.
15. **Dubois, D., Baron O., Cougnoux A., Delmas J., Pradel N., Boury M., Bouchon B., Bringer M., Nougayrède J., Oswald E., y Bonnet R. 2011.** ClbP is the prototype of a peptidase subgroup involved in the biosynthesis of nonribosomal peptides. J.Biol. Chem., en prensa.

16. **Dutta, P.R., Cappello R., Navarro-García F., y Nataro J.P. 2002.** Functional comparison of serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae*. *Infect. Immun.* 70: 7105-7113.
17. **Earhart, C.F. 1996.** Uptake and metabolism of iron and molybdenum, p. 1075-1090. *In* F.C. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*, cellular and molecular biology. ASM Press, Washington, DC.
18. **Ewers, C., Li G., Wilking H., Kiessling S., Alt K., Antão E.M., Laternus C., Diehl I., Glodde S., Homeier T., Böhnke U., Steinrück H., Philipp H.C., y Wieler L.H. 2007.** Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? *Int. J. Med. Microbiol.* 297: 163-176.
19. **Escobar-Páramo, P., Clermont O., Banc-Potard A., Bui H., Le Bouguénec C., y Denamur E. 2004.** A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Mol. Biol. Evol.* 21: 1085-1094.
20. **Fischbach, M.A., Hening L., Liu D.R., y Walsh C.T. 2005.** *In vitro* characterization of IroB, a pathogen-associated C-glycosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102: 571-576.
21. **Gaggero, C., Moreno F., y Laviña M. 1993.** Genetic analysis of microcin H47 antibiotic system. *J. Bacteriol.* 175: 5420-5427.
22. **Gilson, L., Mahanty H.K., y Kolter R. 1990.** Genetic analysis of an MDR-like export system: the secretion of colicin V. *EMBO Journal.* 9: 3875-3884.
23. **Greenacre, M.J. 2007.** Correspondence analysis in practice. Second edition. Boca Raton: Chapman & Hall/ CRC.

24. **Grozdanov, L., Raasch C., Schulze J., Sonnenborn U., Gottschalk G., Hacker J., y Dobrindt U. 2004.** Analysis of the genome structure of the non-pathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. J. Bacteriol. 186: 5432-5441.
25. **Guyer, D.M., Henderson I.R., Nataro J.P., y Mobley H.L.T. 2000.** Identification of Sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 38: 53-66.
26. **Guyer, D.M., Radulovic S., Jones F., y Mobley H.L.T. 2002.** Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells. Infect. Immun. 70: 4539-4546.
27. **Hantke, K., Nicholson G., Rabsch W., y Winkelmann G. 2003.** Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor IroN. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100: 3677-3682.
28. **Hayashi, K., Morooka N., Yamamoto Y., Fujita K., Isono K., Choi S., Ohtsubo E., Baba T., Wanner B.L., Mori H., y Horiuchi T. 2006.** Highly accurate genome sequences of the *Escherichia coli* K-12 strains MG1655 and W3110. Mol. Syst. Biol. doi: 10.1038/msb4100049.
29. **Homburg, S., Oswald E., Hacker J., y Dobrindt U. 2007.** Expression analysis of the colibactin gene cluster coding for a novel polyketide in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett. 275: 255-262.
30. **Jantunen, M.E., Siitonen A., Koskimies O., Wikström S., Kärkkäinen U.M., Salo E., y Saxén H. 2000.** Predominance of class II *papG* allele of *Escherichia coli* in pyelonephritis in infants with urinary tract anatomy. J. Infect. Dis. 181: 1822-1824.

31. **Jauregui, F., Landraud L., Passet V., Diancourt L., Frapy E., Guigon G., Carbonnelle E., Lortholary O., Clermont O., Denamur E., Picard B., Nassif X., y Brisse S. 2008.** Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics* 9: 560-574.
32. **Johnson, J.R. 1991.** Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 4: 80-128.
33. **Johnson, J.R. 1998.** *papG* alleles among *Escherichia coli* strains causing urosepsis : associations with other bacterial characteristics and host compromise. *Infect. Immun.* 66: 4568-4571.
34. **Johnson, T.J., Siek K.E., Johnson S.J., y Nolan L.K. 2006.** DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. *J. Bacteriol.* 188: 745-758.
35. **Johnson, J.R., Johnson B., Kuskowski M.A., Nougayrede J., y Oswald E. 2008.** Molecular epidemiology and phylogenetic distribution of the *Escherichia coli* *pks* genomic island. *J. Clin. Microbiol.* 46:3906-3911.
36. **Lagos, R., Baeza M., Corsini G., Hetz C., Strahsburger E., Castillo J.A., Vergara C., y Monasterio O. 2001.** Structure, organization and characterization of the gene cluster involved in the production of microcin E492, a channel-forming bacteriocin. *Mol. Microbiol.* 42: 229-244.
37. **Laviña, M., Gaggero C., y Moreno F. 1990.** Microcin H47, a chromosome-encoded microcin antibiotic of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172: 6585-6588.
38. **Léveillé, S., Caza M., Johnson J.R., Clabots C., Sabri M., y Dozois C.M. 2006.** Iha from an *Escherichia coli* urinary tract infection outbreak clonal group A strain is expressed in vivo in the mouse urinary tract and functions as a catecholate siderophore receptor. *Infect. Immun.* 74: 3427-3436.

39. **Lloyd A.L., Rasko D.A., y Mobley H.L.T. 2007.** Defining genomics island and uropathogen-specific genes in uropathogenic *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 189: 3532-3546.
40. **Marrs, C.F., Zhang L., y Foxman B. 2005.** *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes? FEMS Microbiol. Lett. 252:183-189.
41. **Miller, J.H. 1992.** A short course in bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
42. **Moreno, E., Planells I., Prats G., Planes A.M., Moreno G., y Andreu A. 2005.** Comparative study of *Escherichia coli* virulence determinants in strains causing urinary tract bacteremia versus strains causing pyelonephritis and other sources of bacteremia. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 53: 93-99.
43. **Nash, J.H.E., Villegas A., Kropinski A.M., Aguilar-Valenzuela R., Konczy P., Mascarenhas M., Ziebell K., Torres A.G., Karmali M.A., y Coobes B.K. 2010.** Genome sequence of adherent-invasive *Escherichia coli* and comparative genomic analysis with other *E. coli* pathotypes. BCM Genomics 11:667-682.
44. **Nolan, E.M., Fischbach M.A., Koglin A., y Walsh C.T. 2007.** Biosynthetic tailoring of microcin E492m: post-translational modification affords an antibacterial siderophore-peptide conjugate. J. Am. Chem. Soc. 129: 14336-14347.
45. **Nowicki, B., Selvarangan R., y Nowicki S. 2001.** Family of *Escherichia coli* Dr adhesins: decay-accelerating factors receptor recognition and invasiveness. J. Infect. Dis. 183 (suppl 1): S24-27.
46. **Patzer, S.I., Baquero M.R., Bravo D., Moreno F., y Hantke K. 2003.** The colicin G, H and X determinants encode microcins M and H47, which might utilize the

- catecholate siderophore receptors FepA, Cir, Fiu and IroN. Microbiology 149: 2557-2570.
47. **Peigne, C., Bidet P., Mahjoub-Messai F., Plainvert C., Barbe V., Médigue C., Frapy E., Nassif X., Denamur E., Bingen E., y Bonacorsi S. 2009.** The plasmid of *Escherichia coli* strain S88 (O45:K1:H7) that causes neonatal meningitis is closely related to avian pathogenic *E. coli* plasmid and is associated with high-level bacteremia in a neonatal rat meningitis model. Infect. Immun. 77: 2272-2284.
  48. **Picard, B., Sevali García J., Gouriou S., Duriez P., Brahimi N., Bingen E., Elion J., y Denamur E. 1999.** The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. Infect. Immun. 67:546-553.
  49. **Pinou, T. & Riley M.A. 2001.** Nucleotide polymorphism in microcin V plasmids. Plasmid 46: 1-9.
  50. **Poey, M.E., Azpiroz M.F., y Laviña M. 2006.** Chromosome-encoded microcins: a comparative analysis. Antimicrob. Agents Chemother. 50:1411-1418.
  51. **Pugsley, A.P. 1985.** *Escherichia coli* K12 strains for use in the identification and characterization of colicins. J. Gen. Microbiol. 135:369-376.
  52. **Putze, J., Hennequin C., Nougayrède J., Zhang W., Homburg S., Karch H., Bringer M., Fayolle C., Carniel E., Rabsch W., Oelshlaeger T.A., Oswald E., Forestier C., Hacker J., y Dobrindt U. 2009.** Genetic structure and distribution of the colibactin genomic island among members of the family *Enterobacteriaceae*. Infect. Immun. 77: 4696-4703.
  53. **Reese & Betts. 2004.** Enfermedades infecciosas. Eds.: R. F. Betts, S. W. Chapman, R. L. Penn. Marbán Libros, S. L., Madrid, España.

54. **Rick, P.D. & Silver R.P. 1996.** Enterobacterial common antigen and capsular polysaccharides, p. 104-122. In F.C. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*, cellular and molecular biology. ASM Press, Washington, D. C.
55. **Rippere-Lampe, K.E., O'Brien A.D., Conran R., y Lockman H.A. 2001.** Mutation of the gene encoding cytotoxic necrotizing factors type 1 (*cnf*<sub>1</sub>) attenuates the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. 69: 3954-3964.
56. **Roberts, I., Mountford R., High N., Bitter-Suermann D., Jann K., Timmis K., y Boulnois G. 1986.** Molecular cloning and analysis of genes for production of K5, K7, K12, and K92 capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 168: 1228-1233.
57. **Rodríguez, E. & Laviña M. 1998.** Genetic analysis of microcin H47 immunity. Can. J. Microbiol. 44: 692-697.
58. **Rodríguez, E., Gaggero C., y Laviña M. 1999.** The structural gene for microcin H47 encodes a peptide precursor with antibiotic activity. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 2176-2182.
59. **Russo, T.A. & Johnson J.R. 2000.** Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. J. Infect. Dis. 181: 1753-1754.
60. **Selander, R.K., Caugant D.A., Ochman H., Musser J.M., Gilmour M.N., y Whittam T.S. 1986.** Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetic and systematics. Appl. Environ. Microbiol. 51: 873-884.
61. **Selander, R.K., Caugant D.A., y Whittam T.S. 1987.** Genetic structure and variation in natural populations of *Escherichia coli*, p. 1625-1648. In F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H. E.

- Umbarger (ed), *Escherichia coli* and *Salmonella*, cellular and molecular biology. ASM Press, Washington, D. C.
62. **Servin, A.L. 2005.** Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 18 : 264-292.
  63. **Tarr, P.I., Bilge S.S., Vary J.C, Jelacic S., Habeeb R.L., Ward T.R., Baylor M.R., y Besser T.E. 2000.** Iha: a novel *Escherichia coli* O157: H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. Infect. Immun. 68: 1400-1407
  64. **Thomas, X., Destoumieux-Garzon D., Peduzzi J., Afonso C., Blond A., Birlirakis N., Goulard C., Dubost L., Thai R., Tabet J.C., y Rebuffat S. 2004.** Siderophore peptide, a new type of post-translationally modified antibacterial peptide with potent activity. J. Biol. Chem. 279: 28233-28242.
  65. **Trujillo, M., Rodríguez E., y Laviña M. 2001.** ATP synthase is necessary for microcin H47 antibiotic action. Antimicrob. Agents Chemoter. 45:3128-3131.
  66. **Valdebenito, M., Bister B., Reissbrodt R., Hantke K., y Winkelmann G. 2005.** The detection of salmochelin and yersiniabactin in uropathogenic *Escherichia coli* strains by a novel hydrolysis-fluorescence-detection (HFD) method. Int. J. Med. Microbiol. 295: 99-107.
  67. **Wandersman, C. & Delepelaire P. 2004.** Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. Annu. Rev. Microbiol. 58: 611-664
  68. **Waters, V.L. & Crosa, J.H. 1991.** Colicin V virulence plasmids. Microbiol. Rev. 55: 437-450.
  69. **Welch, R.A., Burland V., Plunkett III G., Redford P., Roesch P., Rasko D., Buckles, E.L., Liou S.R., Boutin A., Hackett J., Stroud D., Mayhew G.F., Rose D.J., Zhou S., Schwartz D.C., Perna N.T., Mobley H.L.T., Donnenberg M.S., y**

- Blattner F.R. 2002.** Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99: 17020-17024.
70. **Zar, J.H. 1996.** *Biostatistical Analysis*. Third Edition, New Jersey, Prentice Hall.
71. **Zhang, L. & Foxman B. 2003.** Molecular epidemiology of *Escherichia coli* mediated urinary tract infections. Front. Biosci. 8:e235-244.
72. **Zdziarski, J., Brzuszkiewicz E., Wullt B., Liesegang H., Biran D., Voigt B., Grönberg-Hernández J., Ragnarsdóttir B., Hecker M., Ron E.Z., Daniel R., Gottschalk G., Hacker J., Svanborg C., y Dobrindt U. 2010.** Host imprints on bacterial genomes-rapid, divergent evolution in individual patients. PloS Pathog 6: e1001078.

## **VIII. ANEXO I**

# AISLAMIENTOS CON PERFIL I (21 aislamientos 17CE+4CN)

| Cepa (a) | Prod. Mcc | Filo-genis | Cápsula           |                  |                  | Citotoxinas |     |     |     | Adhesinas/ fimbrias |                  |   |   |                  | Captación de hierro |                  |                  |                   |     | Microcinas  |                   |                  |                  |                  |                  |                  |
|----------|-----------|------------|-------------------|------------------|------------------|-------------|-----|-----|-----|---------------------|------------------|---|---|------------------|---------------------|------------------|------------------|-------------------|-----|-------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|          |           |            |                   |                  |                  |             |     |     |     |                     |                  |   |   |                  |                     |                  |                  |                   |     | Mcc catecol |                   |                  |                  |                  | ColV             |                  |
|          |           |            | kps <sub>II</sub> | neu <sub>A</sub> | neu <sub>O</sub> | hly         | cnf | clb | sat | fimI                | pap              |   |   | sfa <sub>A</sub> | dra <sub>D</sub>    | fyu <sub>A</sub> | iut <sub>A</sub> | iro <sub>A</sub>  |     |             | iro <sub>BD</sub> | mch <sub>C</sub> | mcm <sub>A</sub> | mch <sub>B</sub> | mci <sub>A</sub> | cva <sub>C</sub> |
|          |           |            |                   |                  |                  |             |     |     | C   | G <sub>II</sub>     | G <sub>III</sub> |   |   |                  |                     |                  | iro <sub>N</sub> | iro <sub>BC</sub> | ihl |             |                   |                  |                  |                  |                  |                  |
| 2        | H y M     | B2         | -                 | -                | -                | +           | +   | +   | -   | +                   | +                | + | + | -                | +                   | -                | +                | +                 | -   | -           | +                 | +                | +                | -                | -                |                  |
| 13       | H y M     | B2         | +                 | -                | -                | +           | -   | +   | -   | +                   | +                | + | - | +                | -                   | +                | +                | +                 | +   | -           | +                 | +                | +                | -                | -                |                  |
| 15       | H y M     | B2         | +                 | -                | -                | +           | -   | -   | +   | +                   | +                | + | - | +                | -                   | +                | +                | +                 | +   | -           | +                 | +                | +                | -                | -                |                  |
| 19       | H y M     | B2         | +                 | -                | -                | +           | +   | +   | -   | +                   | +                | - | + | +                | -                   | +                | -                | +                 | +   | -           | -                 | +                | +                | +                | -                | -                |
| 20       | H y M     | B2         | +                 | -                | -                | +           | +   | +   | -   | +                   | +                | - | + | +                | -                   | +                | -                | +                 | +   | -           | -                 | +                | +                | +                | -                | -                |
| 22       | H y M     | B2         | +                 | -                | -                | +           | +   | +   | -   | +                   | +                | + | - | +                | -                   | +                | +                | +                 | +   | +           | -                 | +                | +                | +                | -                | -                |
| 62       | H y M     | B2         | +                 | -                | -                | +           | +   | +   | -   | +                   | -                | - | - | +                | -                   | +                | -                | +                 | +   | -           | -                 | +                | +                | +                | -                | -                |
| 70       | H y M     | B2         | +                 | -                | -                | +           | -   | +   | +   | +                   | +                | + | - | +                | -                   | +                | +                | +                 | +   | +           | -                 | +                | +                | +                | -                | -                |
| 107      | H y M     | B2         | +                 | -                | -                | +           | +   | +   | -   | +                   | +                | - | + | +                | -                   | +                | +                | +                 | +   | -           | -                 | +                | +                | +                | -                | -                |
| 108      | H y M     | B2         | +                 | -                | -                | +           | -   | +   | +   | +                   | +                | + | - | +                | -                   | +                | +                | +                 | +   | +           | -                 | +                | +                | +                | -                | -                |
| 118      | H y M     | B2         | +                 | -                | -                | +           | -   | +   | -   | +                   | +                | + | - | +                | -                   | +                | +                | +                 | +   | +           | -                 | +                | +                | +                | -                | -                |
| 24       | -         | B2         | +                 | -                | -                | +           | +   | +   | -   | +                   | +                | - | + | +                | -                   | +                | -                | +                 | +   | +           | -                 | -                | +                | -                | -                | -                |
| 44       | -         | B2         | +                 | -                | -                | +           | +   | +   | -   | +                   | +                | - | + | +                | -                   | +                | -                | +                 | +   | -           | -                 | -                | +                | -                | -                | -                |
| 65       | -         | B2         | +                 | -                | -                | +           | +   | +   | -   | +                   | -                | - | - | +                | -                   | +                | -                | +                 | +   | -           | -                 | -                | +                | -                | -                | -                |
| 92       | -         | B2         | +                 | -                | -                | +           | +   | +   | -   | +                   | +                | - | + | +                | -                   | +                | -                | +                 | +   | -           | -                 | -                | +                | -                | -                | -                |
| 97       | -         | B2         | +                 | -                | -                | +           | +   | +   | -   | +                   | +                | - | + | +                | -                   | +                | -                | +                 | +   | -           | -                 | -                | +                | -                | -                | -                |
| 144      | -         | B2         | +                 | -                | -                | +           | +   | +   | -   | +                   | +                | - | + | +                | -                   | +                | -                | +                 | +   | -           | -                 | -                | +                | -                | -                | -                |
| 4P       | -         | B2         | +                 | -                | -                | +           | +   | +   | -   | +                   | +                | - | + | +                | -                   | +                | -                | +                 | +   | -           | -                 | -                | +                | -                | -                | -                |
| 9P       | H y M     | B2         | +                 | -                | -                | +           | -   | +   | -   | +                   | +                | + | - | +                | -                   | +                | +                | +                 | +   | +           | -                 | +                | +                | +                | -                | -                |
| 16P      | M         | B2         | +                 | -                | -                | +           | +   | +   | +   | +                   | +                | - | + | +                | -                   | +                | +                | +                 | +   | +           | -                 | +                | +                | +                | -                | -                |
| 44P-1    | HyM+X     | B2         | +                 | -                | -                | +           | -   | +   | +   | +                   | +                | - | + | -                | +                   | -                | +                | +                 | +   | +           | -                 | +                | +                | +                | -                | -                |

(a) En números seguidos de la letra P se indican los aislamientos procedentes de la colección de niños. El número después de la letra P indica aislamientos procedentes de un mismo paciente. En rojo, aislamientos hemolíticos Hly<sup>+</sup>.

# **AISLAMIENTOS CON PERFIL II (9 aislamientos 8CE+1CN)**

| Cepa (a) | Prod. Mcc | Filo-genia | Cápsula          |                 |                 | Citotoxinas |            |            |            | Adhesinas/ fimbrias |            |   |   |                 |                 | Captación de hierro |                 |             |   |            |                  | Microcinas      |                 |                 |                 |                 |      |
|----------|-----------|------------|------------------|-----------------|-----------------|-------------|------------|------------|------------|---------------------|------------|---|---|-----------------|-----------------|---------------------|-----------------|-------------|---|------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------|
|          |           |            |                  |                 |                 |             |            |            |            |                     |            |   |   |                 |                 |                     |                 |             |   |            |                  | Mcc catecol     |                 |                 |                 |                 | ColV |
|          |           |            | <i>kps</i><br>II | <i>neu</i><br>A | <i>neu</i><br>O | <i>hly</i>  | <i>cnf</i> | <i>clb</i> | <i>sat</i> | <i>fimI</i>         | <i>pap</i> |   |   | <i>sfa</i><br>A | <i>dra</i><br>D | <i>fyu</i><br>A     | <i>iut</i><br>A | <i>iroA</i> |   | <i>ihf</i> | <i>iro</i><br>BD | <i>mch</i><br>C | <i>mcm</i><br>A | <i>mch</i><br>B | <i>mci</i><br>A | <i>cva</i><br>C |      |
|          |           |            |                  |                 |                 |             |            | C          | GII        | GIII                |            |   |   |                 | <i>iro</i><br>N | <i>iro</i><br>BC    |                 |             |   |            |                  |                 |                 |                 |                 |                 |      |
| 16       | -         | A          | -                | -               | -               | -           | -          | -          | -          | +                   | -          | - | - | -               | -               | +                   | -               | -           | - | +          | +                | +               | -               | +               | +               | -               |      |
| 96       | H+X       | B1         | -                | -               | -               | -           | -          | -          | -          | +                   | -          | - | - | -               | -               | +                   | +               | -           | - | +          | +                | +               | -               | +               | +               | -               |      |
| 100      | -         | A          | -                | -               | -               | -           | -          | -          | -          | +                   | -          | - | - | -               | -               | +                   | +               | -           | - | +          | +                | -               | -               | +               | -               | -               |      |
| 4        | -         | A          | -                | -               | -               | -           | -          | -          | -          | +                   | -          | - | - | -               | -               | -                   | +               | -           | - | +          | +                | +               | -               | +               | +               | -               |      |
| 35       | H+X       | A          | -                | -               | -               | -           | -          | -          | -          | +                   | +          | + | - | -               | -               | -                   | +               | -           | - | +          | +                | +               | -               | +               | +               | -               |      |
| 18       | H         | B1         | -                | -               | -               | -           | -          | -          | -          | +                   | -          | - | - | -               | -               | -                   | -               | -           | - | -          | +                | +               | -(b)            | +               | +               | -               |      |
| 87       | H         | D          | +                | -               | -               | -           | -          | -          | -          | +                   | -          | - | - | -               | -               | -                   | -               | -           | - | -          | +                | +               | -(b)            | +               | +               | -               |      |
| 119      | H         | B1         | -                | -               | -               | -           | -          | -          | -          | +                   | -          | - | - | -               | -               | -                   | -               | -           | - | -          | +                | +               | -(b)            | +               | +               | -               |      |
| 43P-2    | -         | A          | -                | -               | -               | +           | -          | -          | -          | -                   | -          | - | - | -               | -               | -                   | +               | -           | - | +          | +                | +               | -               | +               | +               | -               |      |

- (a) En números seguidos de la letra P se indican los aislamientos procedentes de la colección de niños. El número después de la letra P indica aislamientos procedentes de un mismo paciente.
- (b) Aunque dan amplificación positiva, se consigna negativo por contener un gen *mcmA* no funcional (no producen MccM).

# **AISLAMIENTOS CON PERFIL III (20 aislamientos 1CE+19CN)**

| Cepa (a) | Prod. Mcc | Filo-<br>genia | Cápsula                 |                        |                        | Citotoxinas |            |            |                       | Adhesinas/fimbrias     |            |   |   |                        |                        | Captación de hierro     |                        |             |   |            |                         | Microcinas             |                        |                        |                        |                        |  |       |
|----------|-----------|----------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-------------|------------|------------|-----------------------|------------------------|------------|---|---|------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|-------------|---|------------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|--|-------|
|          |           |                |                         |                        |                        |             |            |            |                       |                        |            |   |   |                        |                        |                         |                        |             |   |            |                         | Mcc catecol            |                        |                        |                        |                        |  | Col V |
|          |           |                | <i>kps</i><br><i>II</i> | <i>neu</i><br><i>A</i> | <i>neu</i><br><i>O</i> | <i>hly</i>  | <i>cnf</i> | <i>clb</i> | <i>sat</i>            | <i>fimI</i>            | <i>pap</i> |   |   | <i>sfa</i><br><i>A</i> | <i>dra</i><br><i>D</i> | <i>fyu</i><br><i>A</i>  | <i>iut</i><br><i>A</i> | <i>iroA</i> |   | <i>ihl</i> | <i>iro</i><br><i>BD</i> | <i>mch</i><br><i>C</i> | <i>mcm</i><br><i>A</i> | <i>mch</i><br><i>B</i> | <i>mci</i><br><i>A</i> | <i>cva</i><br><i>C</i> |  |       |
|          |           |                |                         |                        |                        |             |            | <i>C</i>   | <i>G<sub>II</sub></i> | <i>G<sub>III</sub></i> |            |   |   |                        | <i>iro</i><br><i>N</i> | <i>iro</i><br><i>BC</i> |                        |             |   |            |                         |                        |                        |                        |                        |                        |  |       |
| 52       | ColV+X    | B1             | -                       | -                      | -                      | -           | -          | -          | -                     | +                      | -          | - | - | -                      | -                      | +                       | +                      | +           | + | -          | -                       | -                      | -                      | -                      | -                      | +                      |  |       |
| 7P       | ColIV     | A              | -                       | -                      | -                      | -           | -          | -          | -                     | +                      | -          | - | - | -                      | -                      | +                       | +                      | +           | + | -          | -                       | -                      | -                      | -                      | -                      | +                      |  |       |
| 24P      | ColIV     | B2             | +                       | +                      | +                      | -           | -          | -          | -                     | +                      | +          | + | - | -                      | -                      | +                       | +                      | +           | + | -          | -                       | -                      | -                      | -                      | -                      | +                      |  |       |
| 39P-6    | ColIV     | A              | -                       | -                      | -                      | -           | -          | -          | -                     | +                      | -          | - | - | -                      | -                      | -                       | +                      | +           | + | -          | -                       | -                      | -                      | -                      | -                      | +                      |  |       |
| 31P-2    | ColIV     | A              | +                       | -                      | -                      | -           | -          | -          | -                     | -                      | -          | - | - | -                      | -                      | -                       | +                      | +           | + | -          | -                       | -                      | -                      | -                      | -                      | +                      |  |       |
| 35P-1    | ColIV     | A              | -                       | -                      | -                      | -           | -          | -          | -                     | +                      | -          | - | - | -                      | -                      | +                       | +                      | +           | + | -          | -                       | -                      | -                      | -                      | -                      | +                      |  |       |
| 39P-5    | ColIV     | A              | -                       | -                      | -                      | -           | -          | -          | -                     | +                      | -          | - | - | -                      | -                      | -                       | +                      | +           | + | -          | -                       | -                      | -                      | -                      | -                      | +                      |  |       |
| 63P-1    | ColIV     | A              | -                       | -                      | -                      | -           | -          | -          | -                     | +                      | -          | - | - | -                      | -                      | -                       | -                      | +           | + | -          | -                       | -                      | -                      | -                      | -                      | +                      |  |       |
| 65P-6    | ColIV     | D              | +                       | -                      | -                      | -           | -          | -          | -                     | +                      | -          | - | - | -                      | -                      | +                       | +                      | +           | + | -          | -                       | -                      | -                      | -                      | -                      | +                      |  |       |
| 58P-2    | ColIV     | B1             | -                       | -                      | -                      | -           | -          | -          | -                     | +                      | -          | - | - | -                      | -                      | +                       | +                      | +           | + | -          | -                       | -                      | -                      | -                      | -                      | +                      |  |       |
| 77P-1    | ColIV     | B1             | -                       | -                      | -                      | -           | -          | -          | -                     | +                      | -          | - | - | -                      | -                      | +                       | +                      | +           | + | -          | -                       | -                      | -                      | -                      | -                      | +                      |  |       |
| 47P-1    | -         | B2             | +                       | +                      | +                      | -           | -          | -          | -                     | +                      | +          | + | - | -                      | -                      | +                       | +                      | +           | + | -          | -                       | -                      | -                      | -                      | -                      | +                      |  |       |
| 76P-1    | -         | D              | -                       | -                      | -                      | -           | -          | -          | -                     | +                      | -          | - | - | -                      | -                      | -                       | -                      | +           | + | -          | -                       | -                      | -                      | -                      | -                      | +                      |  |       |
| 12P      | -         | D              | -                       | -                      | -                      | -           | -          | -          | -                     | +                      | -          | - | - | -                      | -                      | +                       | -                      | +           | + | -          | -                       | -                      | -                      | -                      | -                      | +                      |  |       |
| 21P      | -         | D              | -                       | -                      | -                      | -           | -          | -          | -                     | +                      | -          | - | - | -                      | -                      | +                       | -                      | +           | + | -          | -                       | -                      | -                      | -                      | -                      | +                      |  |       |
| 57P-1    | -         | B1             | -                       | -                      | -                      | -           | -          | -          | -                     | +                      | -          | - | - | -                      | -                      | -                       | -                      | +           | + | -          | -                       | -                      | -                      | -                      | -                      | +                      |  |       |
| 65P-4    | ColV+X    | A              | -                       | -                      | -                      | -           | -          | -          | -                     | +                      | -          | - | - | -                      | -                      | -                       | +                      | +           | + | -          | -                       | -                      | -                      | -                      | -                      | +                      |  |       |
| 45P-2    | ColV+X    | A              | -                       | -                      | -                      | -           | -          | -          | -                     | +                      | -          | - | - | -                      | -                      | -                       | +                      | +           | + | -          | -                       | -                      | -                      | -                      | -                      | +                      |  |       |
| 27P      | ColV+X    | B1             | -                       | -                      | -                      | -           | -          | -          | -                     | +                      | -          | - | - | -                      | -                      | -                       | +                      | +           | + | -          | -                       | -                      | -                      | -                      | -                      | +                      |  |       |
| 29P      | ColV+X    | B1             | -                       | -                      | -                      | -           | -          | -          | -                     | +                      | -          | - | - | -                      | -                      | -                       | +                      | +           | + | -          | -                       | -                      | -                      | -                      | -                      | +                      |  |       |

- (a) En números seguidos de la letra P se indican los aislamientos procedentes de la colección de niños. El número después de la letra P indica aislamientos procedentes de un mismo paciente.

# **AISLAMIENTOS CON PERFIL IV (46 aislamientos 18CE+28CN)**

| Cepa (a) | Prod. Mcc | Filo-genia | Cápsula          |                 |                 | Citotoxinas |            |            |            | Adhesinas/ fimbrias |            |   |   |                 | Captación de hierro |                 |                  |             |   | Microcinas  |                  |                 |                 |                 |                 |
|----------|-----------|------------|------------------|-----------------|-----------------|-------------|------------|------------|------------|---------------------|------------|---|---|-----------------|---------------------|-----------------|------------------|-------------|---|-------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|          |           |            |                  |                 |                 |             |            |            |            |                     |            |   |   |                 |                     |                 |                  |             |   | Mcc catecol |                  |                 |                 |                 | ColV            |
|          |           |            | <i>kps</i><br>II | <i>neu</i><br>A | <i>neu</i><br>O | <i>hly</i>  | <i>cnf</i> | <i>clb</i> | <i>sat</i> | <i>fimI</i>         | <i>pap</i> |   |   | <i>sfa</i><br>A | <i>dra</i><br>D     | <i>fyu</i><br>A | <i>iut</i><br>A  | <i>iroA</i> |   | <i>ihl</i>  | <i>iro</i><br>BD | <i>mch</i><br>C | <i>mcm</i><br>A | <i>mch</i><br>B | <i>mci</i><br>A |
|          |           |            |                  |                 |                 |             |            |            | C          | GII                 | GII<br>I   |   |   |                 |                     | <i>iro</i><br>N | <i>iro</i><br>BC |             |   |             |                  |                 |                 |                 |                 |
| 5        | -         | B2         | -                | -               | -               | -           | -          | -          | -          | -                   | -          | - | - | +               | +                   | +               | -                | -           | - | -           | -                | -               | -               | -               | -               |
| 34       | -         | B2         | -                | -               | -               | -           | -          | -          | -          | -                   | -          | - | - | +               | +                   | +               | -                | -           | - | -           | -                | -               | -               | -               | -               |
| 17       | -         | B2         | +                | -               | -               | -           | -          | -          | +          | -                   | -          | - | - | +               | +                   | -               | -                | -           | - | -           | -                | -               | -               | -               | -               |
| 23       | -         | B2         | +                | -               | -               | -           | -          | +          | +          | +                   | -          | - | - | +               | +                   | +               | -                | -           | + | -           | -                | -               | -               | -               | -               |
| 28       | -         | B2         | +                | -               | -               | -           | -          | -          | +          | +                   | -          | - | - | +               | +                   | +               | -                | -           | + | -           | -                | -               | -               | -               | -               |
| 40       | -         | B2         | +                | -               | -               | -           | -          | -          | +          | +                   | +          | + | - | +               | +                   | +               | -                | -           | + | -           | -                | -               | -               | -               | -               |
| 63       | -         | D          | +                | +               | -               | -           | -          | -          | +          | +                   | +          | - | - | +               | +                   | +               | -                | -           | + | -           | -                | -               | -               | -               | -               |
| 110      | -         | B2         | +                | -               | -               | -           | -          | -          | +          | +                   | -          | - | - | +               | +                   | +               | -                | -           | + | -           | -                | -               | -               | -               | -               |
| 6        | -         | D          | +                | -               | -               | -           | -          | -          | -          | +                   | -          | - | - | +               | +                   | -               | -                | -           | - | -           | -                | -               | -               | -               | -               |
| 99       | -         | D          | +                | -               | -               | -           | -          | -          | -          | +                   | -          | - | - | +               | +                   | +               | -                | -           | - | -           | -                | -               | -               | -               | -               |
| 126      | -         | D          | +                | -               | -               | -           | -          | -          | -          | +                   | -          | - | - | +               | +                   | +               | -                | -           | + | -           | -                | -               | -               | -               | -               |
| 46       | -         | D          | -                | -               | -               | -           | -          | -          | +          | +                   | +          | - | - | +               | +                   | -               | -                | -           | - | -           | -                | -               | -               | -               | -               |
| 90       | -         | D          | -                | -               | -               | -           | -          | -          | -          | +                   | +          | - | - | +               | +                   | -               | -                | -           | - | -           | -                | -               | -               | -               | -               |
| 26       | -         | A          | +                | -               | -               | -           | -          | -          | -          | -                   | -          | - | - | +               | +                   | +               | -                | -           | + | -           | -                | -               | -               | -               | -               |
| 38       | -         | A          | +                | -               | -               | -           | -          | -          | +          | +                   | -          | - | - | +               | +                   | +               | -                | -           | + | -           | -                | -               | -               | -               | -               |
| 48       | -         | A          | +                | -               | -               | -           | -          | -          | -          | -                   | -          | - | - | +               | -                   | +               | -                | -           | + | -           | -                | -               | -               | -               | -               |
| 55       | -         | A          | +                | -               | -               | -           | -          | -          | -          | -                   | -          | - | - | +               | +                   | +               | -                | -           | + | -           | -                | -               | -               | -               | -               |
| 89       | -         | A          | +                | -               | -               | +           | -          | -          | +          | +                   | +          | + | - | +               | +                   | +               | -                | -           | + | -           | -                | -               | -               | -               | -               |
| 2P       | -         | A          | +                | -               | -               | -           | -          | -          | -          | -                   | -          | - | - | +               | +                   | +               | -                | -           | + | -           | -                | -               | -               | -               | -               |
| 31P-1    | -         | A          | +                | -               | -               | -           | -          | -          | -          | -                   | -          | - | - | +               | -                   | +               | -                | -           | + | -           | -                | -               | -               | -               | -               |
| 35P-2    | -         | D          | +                | -               | -               | -           | -          | -          | -          | +                   | -          | - | - | +               | +                   | +               | -                | -           | + | -           | -                | -               | -               | -               | -               |
| 36P-1    | -         | B2         | +                | -               | -               | -           | -          | -          | -          | +                   | -          | - | - | +               | +                   | +               | -                | -           | + | -           | -                | -               | -               | -               | -               |
| 36P-2    | -         | B2         | +                | -               | -               | -           | -          | -          | +          | +                   | -          | - | - | +               | +                   | +               | -                | -           | + | -           | -                | -               | -               | -               | -               |
| 37P-1    | -         | A          | +                | -               | -               | -           | -          | -          | +          | -                   | -          | - | - | +               | +                   | +               | -                | -           | + | -           | -                | -               | -               | -               | -               |
| 38P-1    | -         | D          | +                | -               | -               | -           | -          | -          | +          | +                   | -          | - | - | +               | +                   | +               | -                | -           | + | -           | -                | -               | -               | -               | -               |
| 38P-2    | -         | D          | +                | -               | -               | -           | -          | -          | +          | +                   | -          | - | - | +               | +                   | +               | -                | -           | + | -           | -                | -               | -               | -               | -               |
| 39P-3    | -         | A          | +                | -               | -               | -           | -          | -          | -          | -                   | -          | - | - | +               | +                   | +               | -                | -           | + | -           | -                | -               | -               | -               | -               |

|       |   |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-------|---|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 40P-1 | - | B2 | + | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | + | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 42P-1 | - | D  | + | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 42P-2 | - | D  | + | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 42P-3 | - | D  | + | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 53P-1 | - | D  | + | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | + | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 54P-1 | - | D  | + | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | + | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 56P-1 | - | D  | + | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 65P-1 | - | B2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 66P-1 | - | D  | + | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 67P-1 | - | A  | + | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | + | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 69P-1 | - | A  | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 70P-1 | - | A  | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | + | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 71P-1 | - | B2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 74P-2 | - | B2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 74P-3 | - | B2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 79P-1 | - | D  | + | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | + | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 80P-1 | - | B2 | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 80P-2 | - | A  | + | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | + | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 86P-1 | - | D  | + | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | + | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - |

- (a) En números seguidos de la letra P se indican los aislamientos procedentes de la colección de niños. El número después de la letra P indica aislamientos procedentes de un mismo paciente.

# **AISLAMIENTOS CON PERFIL V (27 aislamientos 16CE+11CN)**

| Cepa (a) | Prod. Mcc | Filo-genia | Cápsula          |                 |                 | Citotoxinas |            |            |            | Adhesinas/ fimbrias |            |   |   |                 |                 | Captación de hierro |                 |             |   |            |                  | Microcinas      |                 |                 |                 |                 |       |
|----------|-----------|------------|------------------|-----------------|-----------------|-------------|------------|------------|------------|---------------------|------------|---|---|-----------------|-----------------|---------------------|-----------------|-------------|---|------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------|
|          |           |            |                  |                 |                 |             |            |            |            |                     |            |   |   |                 |                 |                     |                 |             |   |            |                  | Mcc catecol     |                 |                 |                 |                 | Col V |
|          |           |            | <i>kps</i><br>II | <i>neu</i><br>A | <i>neu</i><br>O | <i>hly</i>  | <i>cnf</i> | <i>clb</i> | <i>sat</i> | <i>fimI</i>         | <i>pap</i> |   |   | <i>sfa</i><br>A | <i>dra</i><br>D | <i>fyu</i><br>A     | <i>iut</i><br>A | <i>iroA</i> |   | <i>ihl</i> | <i>iro</i><br>BD | <i>mch</i><br>C | <i>mcm</i><br>A | <i>mch</i><br>B | <i>mci</i><br>A | <i>cva</i><br>C |       |
| C        | GII       | GIII       |                  |                 |                 |             |            |            |            |                     |            |   |   |                 |                 |                     |                 |             |   |            |                  |                 |                 |                 |                 |                 |       |
| 27       | -         | D          | +                | -               | -               | -           | -          | -          | +          | +                   | +          | + | - | -               | -               | +                   | +               | -           | - | +          | -                | -               | -               | -               | -               | -               |       |
| 32       | -         | D          | +                | -               | -               | -           | -          | -          | +          | +                   | +          | + | - | -               | -               | +                   | +               | -           | - | +          | -                | -               | -               | -               | -               | -               |       |
| 39       | -         | D          | +                | -               | -               | -           | -          | -          | +          | +                   | +          | + | - | -               | -               | +                   | +               | -           | - | +          | -                | -               | -               | -               | -               | -               |       |
| 60       | -         | D          | +                | -               | -               | -           | -          | -          | +          | +                   | +          | + | - | -               | -               | +                   | +               | -           | - | +          | -                | -               | -               | -               | -               | -               |       |
| 71       | -         | D          | +                | -               | -               | -           | -          | -          | +          | +                   | +          | + | - | -               | -               | +                   | +               | -           | - | +          | -                | -               | -               | -               | -               | -               |       |
| 77       | -         | D          | +                | -               | -               | -           | -          | -          | +          | +                   | +          | + | - | -               | -               | +                   | +               | -           | - | +          | -                | -               | -               | -               | -               | -               |       |
| 67       | -         | D          | -                | -               | -               | -           | -          | -          | +          | +                   | +          | + | - | -               | -               | +                   | +               | -           | - | +          | -                | -               | -               | -               | -               | -               |       |
| 9        | -         | D          | +                | +               | -               | -           | -          | -          | +          | +                   | +          | + | - | -               | -               | +                   | +               | -           | - | +          | -                | -               | -               | -               | -               | -               |       |
| 45       | -         | D          | +                | +               | -               | -           | -          | -          | +          | +                   | +          | + | - | -               | -               | +                   | +               | -           | - | +          | -                | -               | -               | -               | -               | -               |       |
| 47       | -         | D          | +                | +               | -               | -           | -          | -          | +          | +                   | +          | + | - | -               | -               | +                   | +               | -           | - | +          | -                | -               | -               | -               | -               | -               |       |
| 49       | -         | D          | +                | +               | -               | -           | -          | -          | +          | +                   | +          | + | - | -               | -               | +                   | +               | -           | - | +          | -                | -               | -               | -               | -               | -               |       |
| 64       | -         | D          | +                | +               | -               | -           | -          | -          | +          | +                   | +          | + | - | -               | -               | +                   | +               | -           | - | +          | -                | -               | -               | -               | -               | -               |       |
| 75       | -         | D          | +                | +               | -               | -           | -          | -          | +          | -                   | +          | + | - | -               | -               | +                   | +               | -           | - | -          | -                | -               | -               | -               | -               | -               |       |
| 91       | -         | D          | +                | +               | -               | -           | -          | -          | +          | +                   | +          | + | - | -               | -               | +                   | +               | -           | - | +          | -                | -               | -               | -               | -               | -               |       |
| 95       | -         | D          | +                | +               | -               | -           | -          | -          | +          | +                   | +          | + | - | -               | -               | +                   | +               | -           | - | +          | -                | -               | -               | -               | -               | -               |       |
| 102      | -         | D          | +                | +               | -               | -           | -          | -          | +          | +                   | +          | + | - | -               | -               | +                   | +               | -           | - | +          | -                | -               | -               | -               | -               | -               |       |
| 5P       | -         | D          | +                | -               | -               | -           | -          | -          | +          | +                   | +          | + | - | -               | -               | +                   | +               | -           | - | +          | -                | -               | -               | -               | -               | -               |       |
| 6P       | -         | D          | -                | -               | -               | -           | -          | -          | +          | +                   | +          | + | - | -               | -               | +                   | +               | -           | - | +          | -                | -               | -               | -               | -               | -               |       |
| 10P      | -         | D          | +                | -               | -               | -           | -          | -          | -          | +                   | +          | + | + | -               | -               | -                   | +               | +           | - | -          | +                | -               | -               | -               | -               | -               |       |
| 15P      | -         | D          | -                | -               | -               | -           | -          | -          | +          | +                   | +          | + | - | -               | -               | +                   | +               | -           | - | +          | -                | -               | -               | -               | -               | -               |       |
| 51P-1    | -         | D          | -                | -               | -               | -           | -          | -          | +          | +                   | +          | + | - | -               | -               | +                   | +               | -           | - | +          | -                | -               | -               | -               | -               | -               |       |
| 65P-2    | -         | D          | +                | -               | -               | -           | -          | -          | +          | +                   | +          | + | - | -               | -               | +                   | +               | -           | - | +          | -                | -               | -               | -               | -               | -               |       |
| 65P-5    | -         | D          | +                | -               | -               | -           | -          | -          | +          | +                   | +          | + | - | -               | -               | +                   | +               | -           | - | +          | -                | -               | -               | -               | -               | -               |       |
| 89P-2    | -         | D          | -                | -               | -               | -           | -          | -          | +          | +                   | +          | + | - | -               | -               | +                   | +               | -           | - | +          | -                | -               | -               | -               | -               | -               |       |
| 72P-1    | -         | D          | +                | +               | +               | -           | -          | -          | +          | +                   | +          | + | - | -               | -               | +                   | +               | -           | - | +          | -                | -               | -               | -               | -               | -               |       |
| 82P-1    | -         | D          | +                | -               | -               | -           | -          | -          | +          | +                   | +          | + | - | -               | -               | +                   | +               | -           | - | +          | -                | -               | -               | -               | -               | -               |       |

|       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 84P-1 | - | D | - | + | - | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
|-------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|

- (a) En números seguidos de la letra P se indican los aislamientos procedentes de la colección de niños. El número después de la letra P indica aislamientos procedentes de un mismo paciente.

### Aislamientos pertenecientes a la CE sin perfil de urovirulencia adjudicado (Nº=52)

| Cepa (a) | Prod. Mcc | Filo-<br>genia | Cápsula                  |                         |                         | Citotoxinas |            |            |            | Adhesinas/ fimbrias |                              |   |   |                         |                         | Captación de hierro     |                         |                          |   |            |                          | Microcinas              |                         |                         |                         |                         |  |
|----------|-----------|----------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------|------------|------------|------------|---------------------|------------------------------|---|---|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|---|------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--|
|          |           |                |                          |                         |                         |             |            |            |            |                     |                              |   |   |                         |                         |                         |                         |                          |   |            |                          | Mcc catecol             |                         |                         |                         |                         |  |
|          |           |                | <i>kps</i> <sub>II</sub> | <i>neu</i> <sub>A</sub> | <i>neu</i> <sub>O</sub> | <i>hly</i>  | <i>cnf</i> | <i>clb</i> | <i>sat</i> | <i>fimI</i>         | <i>pap</i>                   |   |   | <i>sfa</i> <sub>A</sub> | <i>dra</i> <sub>D</sub> | <i>fyu</i> <sub>A</sub> | <i>iut</i> <sub>A</sub> | <i>iroA</i>              |   | <i>ihl</i> | <i>iro</i> <sub>BD</sub> | <i>mch</i> <sub>C</sub> | <i>mcm</i> <sub>A</sub> | <i>mch</i> <sub>B</sub> | <i>mci</i> <sub>A</sub> | <i>cva</i> <sub>C</sub> |  |
|          |           |                |                          |                         |                         |             |            |            | C          | G <sub>II</sub>     | G <sub>II</sub> <sub>I</sub> |   |   |                         |                         |                         | <i>iro</i> <sub>N</sub> | <i>iro</i> <sub>BC</sub> |   |            |                          |                         |                         |                         |                         |                         |  |
| 79       | -         | A              | -                        | -                       | -                       | -           | -          | -          | -          | +                   | -                            | - | - | -                       | -                       | +                       | -                       | -                        | - | -          | -                        | -                       | -                       | -                       | -                       | -                       |  |
| 80       | -         | A              | -                        | -                       | -                       | -           | -          | -          | -          | -                   | -                            | - | - | -                       | -                       | +                       | -                       | -                        | - | -          | -                        | -                       | -                       | -                       | -                       | -                       |  |
| 86       | -         | A              | -                        | -                       | -                       | -           | -          | -          | -          | +                   | -                            | - | - | -                       | -                       | +                       | -                       | -                        | - | -          | -                        | -                       | -                       | -                       | -                       | -                       |  |
| 25       | -         | D              | +                        | -                       | -                       | -           | -          | -          | -          | -                   | -                            | - | - | -                       | -                       | +                       | +                       | -                        | - | -          | -                        | -                       | -                       | -                       | -                       | -                       |  |
| 33       | -         | D              | +                        | -                       | -                       | -           | -          | -          | -          | +                   | -                            | - | - | -                       | -                       | +                       | -                       | -                        | - | -          | -                        | -                       | -                       | -                       | -                       | -                       |  |
| 106      | -         | D              | -                        | -                       | -                       | -           | -          | -          | -          | +                   | -                            | - | - | -                       | -                       | -                       | +                       | -                        | - | -          | -                        | -                       | -                       | -                       | -                       | -                       |  |
| 8        | -         | D              | +                        | -                       | -                       | -           | -          | -          | -          | +                   | -                            | - | - | -                       | -                       | -                       | -                       | -                        | - | -          | -                        | -                       | -                       | -                       | -                       | -                       |  |
| 76       | -         | D              | +                        | -                       | -                       | -           | -          | -          | -          | +                   | -                            | - | - | -                       | -                       | -                       | -                       | -                        | - | -          | -                        | -                       | -                       | -                       | -                       | -                       |  |
| 41       | -         | B1             | -                        | -                       | -                       | -           | -          | -          | -          | +                   | -                            | - | - | -                       | -                       | +                       | -                       | -                        | - | -          | -                        | -                       | -                       | -                       | -                       | -                       |  |
| 111      | -         | B2             | +                        | +                       | +                       | -           | -          | -          | -          | +                   | +                            | + | - | -                       | -                       | +                       | -                       | -                        | - | -          | -                        | -                       | -                       | -                       | -                       | -                       |  |
| 21       | -         | B1             | -                        | -                       | -                       | -           | -          | -          | -          | +                   | +                            | - | - | -                       | -                       | +                       | -                       | -                        | - | -          | -                        | -                       | +                       | -                       | -                       | -                       |  |
| 10       | -         | A              | -                        | -                       | -                       | -           | -          | -          | -          | +                   | -                            | - | - | -                       | -                       | -                       | +                       | -                        | - | +          | -                        | -                       | -                       | -                       | -                       | -                       |  |
| 29       | -         | A              | +                        | +                       | +                       | -           | -          | -          | +          | +                   | -                            | - | - | -                       | -                       | +                       | +                       | -                        | - | +          | -                        | +                       | -                       | +                       | +                       | -                       |  |
| 56       | -         | A              | +                        | -                       | -                       | +           | -          | -          | +          | +                   | +                            | + | - | -                       | -                       | +                       | +                       | -                        | - | +          | -                        | -                       | -                       | -                       | -                       | -                       |  |
| 66       | -         | A              | -                        | -                       | -                       | +           | -          | -          | -          | +                   | -                            | - | - | -                       | -                       | -                       | +                       | -                        | - | +          | -                        | -                       | -                       | -                       | -                       | -                       |  |
| 68       | -         | A              | -                        | -                       | -                       | -           | -          | -          | +          | -                   | -                            | - | - | -                       | -                       | -                       | +                       | -                        | - | +          | -                        | -                       | -                       | -                       | -                       | -                       |  |
| 88       | -         | A              | -                        | -                       | -                       | +           | -          | -          | -          | +                   | -                            | - | - | -                       | -                       | -                       | -                       | -                        | - | +          | -                        | -                       | -                       | -                       | -                       | -                       |  |
| 104      | -         | A              | -                        | -                       | -                       | -           | -          | -          | -          | +                   | -                            | - | - | -                       | -                       | +                       | +                       | -                        | - | +          | +                        | -                       | -                       | -                       | -                       | -                       |  |
| 98       | -         | A              | -                        | -                       | -                       | -           | -          | -          | +          | +                   | -                            | - | - | -                       | -                       | -                       | +                       | -                        | - | +          | -                        | -                       | -                       | -                       | -                       | -                       |  |
| 94       | -         | D              | +                        | -                       | -                       | -           | -          | -          | +          | +                   | -                            | - | - | -                       | -                       | +                       | +                       | -                        | - | +          | -                        | -                       | -                       | -                       | -                       | -                       |  |
| 117      | -         | D              | +                        | -                       | -                       | -           | -          | -          | +          | -                   | -                            | - | - | -                       | -                       | +                       | +                       | -                        | - | +          | -                        | -                       | -                       | -                       | -                       | -                       |  |

|     |   |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-----|---|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 81  | - | D  | + | - | - | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | + | + | - | - | + | - | - | + | - | - | - |
| 3   | - | D  | + | - | - | + | - | - | + | + | + | + | - | - | - | - | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 72  | - | D  | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 31  | - | D  | + | + | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 85  | - | B1 | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 69  | - | B1 | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 7   | - | B1 | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 14  | - | B2 | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 109 | - | B2 | + | + | - | + | - | - | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| 103 | - | B2 | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 36  | - | B2 | + | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 93  | - | B2 | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 137 | - | B2 | + | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 42  | - | B2 | + | + | + | + | + | + | - | + | - | - | - | + | - | + | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| 113 | - | B2 | + | + | + | + | + | + | - | + | - | - | - | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 11  | - | B2 | + | - | - | - | - | + | - | + | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 1   | - | A  | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 12  | - | A  | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 30  | - | A  | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 50  | - | A  | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 51  | - | A  | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 78  | - | A  | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 83  | - | A  | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 54  | - | A  | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 74  | - | A  | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 105 | - | D  | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 43  | - | B1 | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 112 | - | B1 | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 53  | - | B1 | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 116 | - | B1 | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| 120 | - | B1 | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

(a) En rojo, aislamientos hemolíticos Hly<sup>+</sup>.

Aislamientos pertenecientes a la CN sin perfil de urovirulencia adjudicado (Nº=55)

| Cepa (a) | Prod. Mcc | Filo-genia | Cápsula |       |       | Citotoxinas |     |     |     | Adhesinas/ fimbrias |     |      |   |       | Captación de hierro |       |       |        |   | Microcinas  |        |       |       |       |       |
|----------|-----------|------------|---------|-------|-------|-------------|-----|-----|-----|---------------------|-----|------|---|-------|---------------------|-------|-------|--------|---|-------------|--------|-------|-------|-------|-------|
|          |           |            |         |       |       |             |     |     |     |                     |     |      |   |       |                     |       |       |        |   | Mcc catecol |        |       |       |       | Col V |
|          |           |            | kps II  | neu A | neu O | hly         | cnf | clb | sat | fimI                | pap |      |   | sfa A | dra D               | fyu A | iut A | iroA   |   | ihal        | iro BD | mch C | mcm A | mch B | mci A |
|          |           |            |         |       |       |             |     |     |     | C                   | GII | GIII |   |       |                     |       | iro N | iro BC |   |             |        |       |       |       |       |
| 14P      | -         | A          |         |       |       | -           | -   | -   | -   | -                   | -   | -    | - | -     | +                   | +     | -     | -      | - | -           | -      | -     | -     | -     |       |
| 34P-2    | -         | A          | -       | -     | -     | -           | -   | -   | -   | +                   | -   | -    | - | -     | -                   | +     | +     | -      | - | -           | -      | -     | -     | -     |       |
| 43P-1    | -         | A          | -       | -     | -     | -           | -   | -   | -   | -                   | -   | -    | - | -     | +                   | -     | -     | -      | - | -           | -      | -     | -     | -     |       |
| 20P      | -         | B1         | -       | -     | -     | -           | -   | -   | -   | +                   | -   | -    | - | -     | -                   | +     | -     | -      | - | -           | -      | -     | -     | -     |       |
| 28P      | -         | B1         | -       | -     | -     | -           | -   | -   | -   | +                   | -   | -    | - | -     | -                   | +     | -     | -      | - | -           | -      | -     | -     | -     |       |
| 78P-1    | -         | B1         | -       | -     | -     | -           | -   | -   | -   | +                   | -   | -    | - | -     | -                   | +     | +     | -      | - | -           | -      | -     | -     | -     |       |
| 17P      | -         | D          | +       | -     | -     | -           | -   | -   | -   | +                   | -   | -    | - | -     | -                   | -     | -     | -      | - | -           | -      | -     | -     | -     |       |
| 8P       | -         | D          | +       | -     | -     | -           | -   | -   | -   | -                   | -   | -    | - | -     | -                   | +     | +     | -      | - | -           | -      | -     | -     | -     |       |
| 89P-1    | -         | B1         | -       | -     | -     | +           | -   | -   | -   | +                   | -   | -    | - | -     | +                   | -     | -     | -      | - | -           | -      | -     | -     | -     |       |
| 22P      | -         | A          | -       | -     | -     | -           | -   | -   | +   | +                   | -   | -    | - | -     | -                   | +     | -     | -      | + | -           | -      | -     | -     | -     |       |
| 50P-1    | -         | A          | -       | -     | -     | +           | -   | -   | -   | +                   | -   | -    | - | -     | -                   | -     | -     | -      | - | -           | -      | -     | -     | -     |       |
| 44P-3    | -         | A          | +       | -     | -     | -           | -   | -   | -   | +                   | -   | -    | - | -     | +                   | +     | -     | -      | + | +           | -      | -     | -     | -     |       |
| 39P-1    | -         | A          | +       | -     | -     | -           | -   | -   | +   | -                   | -   | -    | - | -     | -                   | +     | -     | -      | + | -           | -      | -     | -     | -     |       |
| 55P-1    | -         | A          | -       | -     | -     | -           | -   | -   | +   | +                   | -   | -    | - | -     | -                   | +     | -     | -      | + | -           | -      | -     | -     | -     |       |
| 59P-1    | -         | A          | +       | +     | +     | -           | -   | -   | +   | +                   | -   | -    | - | -     | +                   | +     | -     | -      | + | -           | -      | -     | -     | -     |       |
| 90P-1    | -         | A          | -       | -     | -     | +           | -   | -   | -   | +                   | -   | -    | - | -     | -                   | +     | -     | -      | + | -           | -      | -     | -     | -     |       |
| 81P-1    | -         | A          | -       | -     | -     | -           | -   | -   | -   | +                   | -   | -    | - | -     | -                   | +     | +     | +      | + | -           | -      | -     | -     | -     |       |
| 1P       | -         | A          | -       | -     | -     | -           | -   | -   | -   | -                   | -   | -    | - | -     | -                   | -     | -     | -      | - | -           | -      | -     | -     | -     |       |
| 25P      | -         | A          | -       | -     | -     | -           | -   | -   | -   | +                   | -   | -    | - | -     | -                   | -     | +     | +      | - | -           | +      | -     | -     | -     |       |
| 3P       | -         | B1         | -       | -     | -     | +           | -   | -   | +   | +                   | -   | -    | - | -     | -                   | +     | -     | -      | - | -           | -      | -     | -     | -     |       |
| 46P-1    | -         | B1         | -       | -     | -     | -           | -   | -   | -   | +                   | +   | -    | - | -     | +                   | -     | -     | -      | - | -           | -      | +     | -     | -     |       |
| 83P-1    | -         | B1         | -       | -     | -     | -           | -   | -   | -   | +                   | -   | -    | - | -     | +                   | -     | -     | -      | + | -           | -      | -     | -     | -     |       |
| 74P-1    | -         | B1         | -       | -     | -     | -           | -   | -   | -   | +                   | +   | -    | - | -     | -                   | -     | -     | -      | - | -           | -      | +     | -     | -     |       |
| 11P      | -         | D          | +       | -     | -     | -           | -   | -   | -   | +                   | +   | -    | - | -     | +                   | +     | -     | -      | + | -           | -      | -     | -     | -     |       |
| 26P      | -         | D          | +       | -     | -     | -           | -   | -   | -   | +                   | -   | -    | - | -     | +                   | +     | -     | -      | + | -           | -      | -     | -     | -     |       |
| 41P-1    | -         | D          | -       | -     | -     | -           | -   | -   | -   | +                   | -   | -    | - | -     | -                   | +     | -     | -      | + | -           | -      | -     | -     | -     |       |

|       |   |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-------|---|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 58P-1 | - | D  | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 61P-1 | - | D  | + | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 75P-1 | - | D  | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 13P   | - | B2 | + | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 19P   | - | B2 | + | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 33P-2 | - | B2 | + | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 33P-3 | - | B2 | + | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 33P-4 | - | B2 | + | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 49P-1 | - | B2 | + | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 85P-1 | - | B2 | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 37P-2 | - | B2 | + | + | + | + | - | - | - | + | + | - | - | + | - | + | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| 18P   | - | A  | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 32P-3 | - | A  | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 45P-1 | - | A  | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 52P-1 | - | A  | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 60P-1 | - | A  | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 64P-1 | - | A  | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 68P-1 | - | A  | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 32P-1 | - | A  | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 32P-2 | - | A  | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 23P   | - | B1 | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 30P   | - | B1 | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 38P-3 | - | B1 | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 48P-1 | - | B1 | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 73P-1 | - | B1 | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 73P-2 | - | B1 | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 87P-1 | - | B1 | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 62P-1 | - | B2 | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 33P-1 | - | B2 | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

(a) En números seguidos de la letra P se indican los aislamientos procedentes de la colección de niños. El número después de la letra P indica aislamientos procedentes de un mismo paciente. En rojo, aislamientos hemolíticos Hly<sup>+</sup>.

## **IX. ANEXO II**

## Análisis de correspondencia múltiple sobre los datos de los 230 aislamientos pertenecientes a las colecciones de embarazadas y de niños (CE+CN)

```
. mca iroa-sat, supplementary(b2 a d b1) method(joint) normalize(principal)
dimensions(3)
```

Multiple/Joint correspondence analysis      Number of obs      =      **230**  
                                                                                  Total inertia      =      .1221347  
                                                                                  Number of axes      =      3

Method: Joint (JCA)

| Dimension | principal<br>inertia | percent | cumul<br>percent |
|-----------|----------------------|---------|------------------|
| dim 1     | .0779281             | 63.81   | 63.81            |
| dim 2     | .0250809             | 20.54   | 84.34            |
| dim 3     | .0133818             | 10.96   | <b>95.30</b>     |
| Total     | .1221347             | 100.00  |                  |

Statistics for column categories in principal normalization

| Categories   |   | mass  | overall<br>quality | %inert | dimension_1 |        |              |
|--------------|---|-------|--------------------|--------|-------------|--------|--------------|
|              |   |       |                    |        | coord       | sqcorr | contrib      |
| iroa         |   |       |                    |        |             |        |              |
|              | 0 | 0.044 | 0.856              | 0.013  | 0.165       | 0.774  | 0.016        |
|              | 1 | 0.011 | 0.856              | 0.051  | -0.662      | 0.774  | 0.062        |
| <b>sfaa</b>  |   |       |                    |        |             |        |              |
|              | 0 | 0.050 | 0.998              | 0.013  | 0.176       | 0.995  | 0.020        |
|              | 1 | 0.006 | 0.998              | 0.109  | -1.509      | 0.995  | <b>0.169</b> |
| <b>irobd</b> |   |       |                    |        |             |        |              |
|              | 0 | 0.053 | 0.992              | 0.002  | -0.007      | 0.010  | 0.000        |
|              | 1 | 0.003 | 0.992              | 0.038  | 0.131       | 0.010  | 0.001        |
| iuta         |   |       |                    |        |             |        |              |
|              | 0 | 0.020 | 0.903              | 0.022  | -0.094      | 0.068  | 0.002        |
|              | 1 | 0.035 | 0.903              | 0.012  | 0.054       | 0.068  | 0.001        |
| fyua         |   |       |                    |        |             |        |              |
|              | 0 | 0.020 | 0.942              | 0.023  | 0.213       | 0.316  | 0.011        |
|              | 1 | 0.036 | 0.942              | 0.013  | -0.116      | 0.316  | 0.006        |
| <b>cnf</b>   |   |       |                    |        |             |        |              |
|              | 0 | 0.052 | 0.990              | 0.006  | 0.115       | 0.969  | 0.009        |
|              | 1 | 0.004 | 0.990              | 0.077  | -1.535      | 0.969  | <b>0.117</b> |
| neu          |   |       |                    |        |             |        |              |
|              | 0 | 0.050 | 0.649              | 0.001  | 0.009       | 0.029  | 0.000        |
|              | 1 | 0.006 | 0.649              | 0.010  | -0.079      | 0.029  | 0.000        |
| kpsm         |   |       |                    |        |             |        |              |
|              | 0 | 0.027 | 0.964              | 0.023  | 0.185       | 0.338  | 0.012        |
|              | 1 | 0.028 | 0.964              | 0.022  | -0.179      | 0.338  | 0.012        |
| ihai         |   |       |                    |        |             |        |              |
|              | 0 | 0.028 | 0.968              | 0.024  | -0.014      | 0.002  | 0.000        |
|              | 1 | 0.028 | 0.968              | 0.024  | 0.014       | 0.002  | 0.000        |
| <b>clbb</b>  |   |       |                    |        |             |        |              |
|              | 0 | 0.050 | 0.995              | 0.012  | 0.168       | 0.993  | 0.018        |
|              | 1 | 0.006 | 0.995              | 0.100  | -1.444      | 0.993  | <b>0.155</b> |
| <b>drad</b>  |   |       |                    |        |             |        |              |
|              | 0 | 0.044 | 0.613              | 0.003  | -0.047      | 0.272  | 0.001        |
|              | 1 | 0.011 | 0.613              | 0.012  | 0.190       | 0.272  | 0.005        |

|                   |   |             |        |         |             |        |              |
|-------------------|---|-------------|--------|---------|-------------|--------|--------------|
| -----+-----+----- |   |             |        |         |             |        |              |
| hly               | 0 | 0.049       | 0.996  | 0.009   | 0.151       | 0.994  | 0.014        |
|                   | 1 | 0.007       | 0.996  | 0.070   | -1.139      | 0.994  | <b>0.108</b> |
| -----+-----+----- |   |             |        |         |             |        |              |
| pap               | 0 | 0.042       | 0.936  | 0.013   | 0.156       | 0.646  | 0.013        |
|                   | 1 | 0.014       | 0.936  | 0.038   | -0.461      | 0.646  | 0.038        |
| -----+-----+----- |   |             |        |         |             |        |              |
| mcma              | 0 | 0.050       | 0.990  | 0.010   | 0.158       | 0.987  | 0.016        |
|                   | 1 | 0.006       | 0.990  | 0.085   | -1.299      | 0.987  | <b>0.131</b> |
| -----+-----+----- |   |             |        |         |             |        |              |
| mchb              | 0 | 0.050       | 0.991  | 0.007   | 0.099       | 0.609  | 0.006        |
|                   | 1 | 0.006       | 0.991  | 0.056   | -0.850      | 0.609  | 0.054        |
| -----+-----+----- |   |             |        |         |             |        |              |
| mcia              | 0 | 0.053       | 0.989  | 0.002   | -0.004      | 0.004  | 0.000        |
|                   | 1 | 0.002       | 0.989  | 0.042   | 0.100       | 0.004  | 0.000        |
| -----+-----+----- |   |             |        |         |             |        |              |
| cvac              | 0 | 0.051       | 0.364  | 0.002   | -0.008      | 0.016  | 0.000        |
|                   | 1 | 0.005       | 0.364  | 0.016   | 0.080       | 0.016  | 0.000        |
| -----+-----+----- |   |             |        |         |             |        |              |
| sat               | 0 | 0.037       | 0.979  | 0.015   | -0.010      | 0.002  | 0.000        |
|                   | 1 | 0.018       | 0.979  | 0.030   | 0.022       | 0.002  | 0.000        |
| -----+-----+----- |   |             |        |         |             |        |              |
| b2                | 0 | 0.748       | 0.601  | 0.355   | 0.181       | 0.568  |              |
|                   | 1 | 0.252       | 2.122  | 0.298   | -0.538      | 2.007  |              |
| -----+-----+----- |   |             |        |         |             |        |              |
| a                 | 0 | 0.704       | 0.244  | 0.323   | -0.089      | 0.142  |              |
|                   | 1 | 0.296       | 0.518  | 0.363   | 0.213       | 0.301  |              |
| -----+-----+----- |   |             |        |         |             |        |              |
| d                 | 0 | 0.696       | 0.307  | 0.322   | -0.062      | 0.068  |              |
|                   | 1 | 0.304       | 0.615  | 0.367   | 0.142       | 0.137  |              |
| -----+-----+----- |   |             |        |         |             |        |              |
| b1                | 0 | 0.852       | 0.133  | 0.326   | -0.035      | 0.026  |              |
|                   | 1 | 0.148       | 0.639  | 0.392   | 0.201       | 0.124  |              |
| -----+-----+----- |   |             |        |         |             |        |              |
| Categories        |   | dimension_2 |        |         | dimension_3 |        |              |
|                   |   | coord       | sqcorr | contrib | coord       | sqcorr | contrib      |
| -----+-----+----- |   |             |        |         |             |        |              |
| iroa              | 0 | -0.046      | 0.061  | 0.004   | -0.027      | 0.021  | 0.002        |
|                   | 1 | 0.186       | 0.061  | 0.015   | 0.108       | 0.021  | 0.010        |
| -----+-----+----- |   |             |        |         |             |        |              |
| sfaa              | 0 | -0.008      | 0.002  | 0.000   | -0.004      | 0.000  | 0.000        |
|                   | 1 | 0.068       | 0.002  | 0.001   | 0.031       | 0.000  | 0.000        |
| -----+-----+----- |   |             |        |         |             |        |              |
| iroid             | 0 | -0.018      | 0.073  | 0.001   | 0.063       | 0.910  | 0.016        |
|                   | 1 | 0.356       | 0.073  | 0.013   | -1.262      | 0.910  | <b>0.316</b> |
| -----+-----+----- |   |             |        |         |             |        |              |
| iuta              | 0 | 0.324       | 0.810  | 0.085   | 0.056       | 0.024  | 0.005        |
|                   | 1 | -0.187      | 0.810  | 0.049   | -0.032      | 0.024  | 0.003        |
| -----+-----+----- |   |             |        |         |             |        |              |
| fyua              | 0 | 0.300       | 0.624  | 0.070   | -0.016      | 0.002  | 0.000        |
|                   | 1 | -0.163      | 0.624  | 0.038   | 0.008       | 0.002  | 0.000        |
| -----+-----+----- |   |             |        |         |             |        |              |
| cnf               | 0 | -0.014      | 0.015  | 0.000   | -0.009      | 0.006  | 0.000        |
|                   | 1 |             |        |         |             |        |              |



## Análisis de correspondencia múltiple sobre los datos de los 112 aislamientos pertenecientes a la colección de embarazadas (CE)

```
. mca iroa-sat, supplementary(b2 a d b1) method(joint) normalize(principal)
dimensions(3)
```

Multiple/Joint correspondence analysis      Number of obs      =      **112**  
                                                                                  Total inertia      =      .1447989  
                                                                                  Number of axes      =      3

Method: Joint (JCA)

| Dimension | principal<br>inertia | percent | cumul<br>percent |
|-----------|----------------------|---------|------------------|
| dim 1     | .0986846             | 68.15   | 68.15            |
| dim 2     | .0296051             | 20.45   | 88.60            |
| dim 3     | .0132692             | 9.16    | <b>97.76</b>     |
| Total     | .1447989             | 100.00  |                  |

Statistics for column categories in principal normalization

| Categories |   | mass  | overall<br>quality | %inert | dimension_1 |        |              |
|------------|---|-------|--------------------|--------|-------------|--------|--------------|
|            |   |       |                    |        | coord       | sqcorr | contrib      |
| iroa       |   |       |                    |        |             |        |              |
|            | 0 | 0.046 | 0.988              | 0.018  | 0.240       | 0.987  | 0.027        |
|            | 1 | 0.010 | 0.988              | 0.085  | -1.105      | 0.987  | <b>0.123</b> |
| sfaa       |   |       |                    |        |             |        |              |
|            | 0 | 0.046 | 0.999              | 0.020  | 0.249       | 0.996  | 0.029        |
|            | 1 | 0.009 | 0.999              | 0.097  | -1.217      | 0.996  | <b>0.142</b> |
| iroad      |   |       |                    |        |             |        |              |
|            | 0 | 0.051 | 0.991              | 0.003  | -0.027      | 0.078  | 0.000        |
|            | 1 | 0.004 | 0.991              | 0.037  | 0.306       | 0.078  | 0.004        |
| iuta       |   |       |                    |        |             |        |              |
|            | 0 | 0.023 | 0.952              | 0.024  | -0.111      | 0.082  | 0.003        |
|            | 1 | 0.032 | 0.952              | 0.017  | 0.080       | 0.082  | 0.002        |
| fyua       |   |       |                    |        |             |        |              |
|            | 0 | 0.017 | 0.937              | 0.024  | 0.302       | 0.451  | 0.016        |
|            | 1 | 0.039 | 0.937              | 0.010  | -0.132      | 0.451  | 0.007        |
| cnf        |   |       |                    |        |             |        |              |
|            | 0 | 0.049 | 0.993              | 0.011  | 0.176       | 0.963  | 0.015        |
|            | 1 | 0.007 | 0.993              | 0.075  | -1.229      | 0.963  | <b>0.106</b> |
| neu        |   |       |                    |        |             |        |              |
|            | 0 | 0.047 | 0.777              | 0.002  | -0.006      | 0.005  | 0.000        |
|            | 1 | 0.009 | 0.777              | 0.012  | 0.031       | 0.005  | 0.000        |
| kpsm       |   |       |                    |        |             |        |              |
|            | 0 | 0.023 | 0.962              | 0.026  | 0.263       | 0.419  | 0.016        |
|            | 1 | 0.033 | 0.962              | 0.018  | -0.183      | 0.419  | 0.011        |
| ihai       |   |       |                    |        |             |        |              |
|            | 0 | 0.026 | 0.961              | 0.022  | -0.083      | 0.057  | 0.002        |
|            | 1 | 0.030 | 0.961              | 0.019  | 0.072       | 0.057  | 0.002        |
| clbb       |   |       |                    |        |             |        |              |
|            | 0 | 0.046 | 0.998              | 0.018  | 0.239       | 0.992  | 0.026        |
|            | 1 | 0.010 | 0.998              | 0.083  | -1.097      | 0.992  | <b>0.121</b> |
| drad       |   |       |                    |        |             |        |              |
|            | 0 | 0.047 | 0.644              | 0.002  | -0.044      | 0.394  | 0.001        |
|            | 1 | 0.009 | 0.644              | 0.008  | 0.230       | 0.394  | 0.005        |
| hly        |   |       |                    |        |             |        |              |
|            | 0 | 0.045 | 0.998              | 0.016  | 0.227       | 0.996  | 0.024        |

|             |   |             |        |         |             |        |              |
|-------------|---|-------------|--------|---------|-------------|--------|--------------|
|             | 1 | 0.010       | 0.998  | 0.070   | -0.986      | 0.996  | <b>0.103</b> |
| -----+----- |   |             |        |         |             |        |              |
| pap         |   |             |        |         |             |        |              |
|             | 0 | 0.035       | 0.970  | 0.018   | 0.202       | 0.543  | 0.015        |
|             | 1 | 0.020       | 0.970  | 0.032   | -0.350      | 0.543  | 0.025        |
| -----+----- |   |             |        |         |             |        |              |
| mcma        |   |             |        |         |             |        |              |
|             | 0 | 0.046       | 0.990  | 0.016   | 0.222       | 0.988  | 0.023        |
|             | 1 | 0.009       | 0.990  | 0.078   | -1.089      | 0.988  | <b>0.113</b> |
| -----+----- |   |             |        |         |             |        |              |
| mchb        |   |             |        |         |             |        |              |
|             | 0 | 0.046       | 0.994  | 0.009   | 0.115       | 0.462  | 0.006        |
|             | 1 | 0.010       | 0.994  | 0.042   | -0.530      | 0.462  | 0.028        |
| -----+----- |   |             |        |         |             |        |              |
| mcia        |   |             |        |         |             |        |              |
|             | 0 | 0.052       | 0.980  | 0.003   | -0.022      | 0.066  | 0.000        |
|             | 1 | 0.004       | 0.980  | 0.035   | 0.291       | 0.066  | 0.003        |
| -----+----- |   |             |        |         |             |        |              |
| cvac        |   |             |        |         |             |        |              |
|             | 0 | 0.055       | 0.110  | 0.000   | -0.000      | 0.005  | 0.000        |
|             | 1 | 0.000       | 0.110  | 0.002   | 0.054       | 0.005  | 0.000        |
| -----+----- |   |             |        |         |             |        |              |
| sat         |   |             |        |         |             |        |              |
|             | 0 | 0.036       | 0.994  | 0.017   | -0.052      | 0.039  | 0.001        |
|             | 1 | 0.020       | 0.994  | 0.031   | 0.094       | 0.039  | 0.002        |
| -----+----- |   |             |        |         |             |        |              |
| b2          |   |             |        |         |             |        |              |
|             | 0 | 0.696       | 1.135  | 0.297   | 0.262       | 1.109  |              |
|             | 1 | 0.304       | 3.071  | 0.251   | -0.600      | 3.002  |              |
| -----+----- |   |             |        |         |             |        |              |
| a           |   |             |        |         |             |        |              |
|             | 0 | 0.741       | 0.327  | 0.259   | -0.106      | 0.223  |              |
|             | 1 | 0.259       | 0.792  | 0.306   | 0.304       | 0.540  |              |
| -----+----- |   |             |        |         |             |        |              |
| d           |   |             |        |         |             |        |              |
|             | 0 | 0.688       | 0.446  | 0.254   | -0.097      | 0.176  |              |
|             | 1 | 0.313       | 0.800  | 0.311   | 0.213       | 0.316  |              |
| -----+----- |   |             |        |         |             |        |              |
| b1          |   |             |        |         |             |        |              |
|             | 0 | 0.875       | 0.135  | 0.263   | -0.042      | 0.041  |              |
|             | 1 | 0.125       | 0.760  | 0.325   | 0.294       | 0.229  |              |
| -----+----- |   |             |        |         |             |        |              |
| Categories  |   | dimension_2 |        |         | dimension_3 |        |              |
|             |   | coord       | sqcorr | contrib | coord       | sqcorr | contrib      |
| -----+----- |   |             |        |         |             |        |              |
| iroa        |   |             |        |         |             |        |              |
|             | 0 | -0.007      | 0.001  | 0.000   | 0.003       | 0.000  | 0.000        |
|             | 1 | 0.034       | 0.001  | 0.000   | -0.015      | 0.000  | 0.000        |
| -----+----- |   |             |        |         |             |        |              |
| sfaa        |   |             |        |         |             |        |              |
|             | 0 | -0.014      | 0.003  | 0.000   | 0.001       | 0.000  | 0.000        |
|             | 1 | 0.069       | 0.003  | 0.002   | -0.006      | 0.000  | 0.000        |
| -----+----- |   |             |        |         |             |        |              |
| iroid       |   |             |        |         |             |        |              |
|             | 0 | -0.050      | 0.275  | 0.004   | 0.076       | 0.638  | 0.022        |
|             | 1 | 0.574       | 0.275  | 0.050   | -0.875      | 0.638  | <b>0.257</b> |
| -----+----- |   |             |        |         |             |        |              |
| iuta        |   |             |        |         |             |        |              |
|             | 0 | 0.333       | 0.747  | 0.087   | 0.135       | 0.122  | 0.032        |
|             | 1 | -0.241      | 0.747  | 0.063   | -0.098      | 0.122  | 0.023        |
| -----+----- |   |             |        |         |             |        |              |
| fyua        |   |             |        |         |             |        |              |
|             | 0 | 0.313       | 0.485  | 0.056   | 0.013       | 0.001  | 0.000        |
|             | 1 | -0.136      | 0.485  | 0.024   | -0.005      | 0.001  | 0.000        |
| -----+----- |   |             |        |         |             |        |              |
| cnf         |   |             |        |         |             |        |              |
|             | 0 | -0.026      | 0.022  | 0.001   | -0.016      | 0.008  | 0.001        |
|             | 1 | 0.185       | 0.022  | 0.008   | 0.113       | 0.008  | 0.007        |
| -----+----- |   |             |        |         |             |        |              |
| neu         |   |             |        |         |             |        |              |

|                                    |   |        |       |              |        |       |              |
|------------------------------------|---|--------|-------|--------------|--------|-------|--------------|
|                                    | 0 | 0.074  | 0.769 | 0.009        | 0.004  | 0.003 | 0.000        |
|                                    | 1 | -0.385 | 0.769 | 0.045        | -0.023 | 0.003 | 0.000        |
| kpsm                               | 0 | 0.299  | 0.542 | 0.069        | 0.003  | 0.000 | 0.000        |
|                                    | 1 | -0.208 | 0.542 | 0.048        | -0.002 | 0.000 | 0.000        |
| ihai                               | 0 | 0.291  | 0.702 | 0.074        | 0.157  | 0.203 | 0.048        |
|                                    | 1 | -0.252 | 0.702 | 0.064        | -0.136 | 0.203 | 0.041        |
| c1bb                               | 0 | -0.016 | 0.004 | 0.000        | -0.007 | 0.001 | 0.000        |
|                                    | 1 | 0.073  | 0.004 | 0.002        | 0.031  | 0.001 | 0.001        |
| drad                               | 0 | 0.029  | 0.174 | 0.001        | -0.020 | 0.077 | 0.001        |
|                                    | 1 | -0.153 | 0.174 | 0.007        | 0.102  | 0.077 | 0.007        |
| hly                                | 0 | 0.008  | 0.001 | 0.000        | 0.003  | 0.000 | 0.000        |
|                                    | 1 | -0.033 | 0.001 | 0.000        | -0.012 | 0.000 | 0.000        |
| pap                                | 0 | 0.173  | 0.397 | 0.036        | 0.047  | 0.029 | 0.006        |
|                                    | 1 | -0.299 | 0.397 | 0.062        | -0.082 | 0.029 | 0.010        |
| mcma                               | 0 | -0.008 | 0.001 | 0.000        | 0.006  | 0.001 | 0.000        |
|                                    | 1 | 0.041  | 0.001 | 0.001        | -0.030 | 0.001 | 0.001        |
| mchb                               | 0 | -0.051 | 0.089 | 0.004        | 0.113  | 0.443 | 0.044        |
|                                    | 1 | 0.233  | 0.089 | 0.018        | -0.519 | 0.443 | <b>0.201</b> |
| mcia                               | 0 | -0.043 | 0.237 | 0.003        | 0.072  | 0.678 | 0.020        |
|                                    | 1 | 0.553  | 0.237 | 0.041        | -0.935 | 0.678 | <b>0.262</b> |
| cvac                               | 0 | -0.002 | 0.056 | 0.000        | -0.002 | 0.050 | 0.000        |
|                                    | 1 | 0.187  | 0.056 | 0.001        | 0.176  | 0.050 | 0.001        |
| sat                                | 0 | 0.255  | 0.930 | 0.079        | 0.042  | 0.025 | 0.005        |
|                                    | 1 | -0.459 | 0.930 | <b>0.141</b> | -0.076 | 0.025 | 0.009        |
| b2                                 | 0 | 0.037  | 0.022 |              | -0.014 | 0.003 |              |
|                                    | 1 | -0.085 | 0.060 |              | 0.032  | 0.009 |              |
| a                                  | 0 | -0.071 | 0.099 |              | 0.017  | 0.006 |              |
|                                    | 1 | 0.202  | 0.238 |              | -0.048 | 0.013 |              |
| d                                  | 0 | 0.120  | 0.267 |              | -0.012 | 0.003 |              |
|                                    | 1 | -0.263 | 0.480 |              | 0.025  | 0.005 |              |
| b1                                 | 0 | -0.064 | 0.093 |              | 0.006  | 0.001 |              |
|                                    | 1 | 0.445  | 0.526 |              | -0.042 | 0.005 |              |
| supplementary variables: b2 a d b1 |   |        |       |              |        |       |              |

## **Análisis de correspondencia múltiple sobre los datos de los 118 aislamientos pertenecientes a la colección de niños (CN)**

```
. mca iroa-sat, supplementary(b2 a d b1) method(joint) normalize(principal)
dimensions(3)
```

## Multiple/Joint correspondence analysis

Number of obs = 118

Total inertia = .0977939

Number of axes = 3

Method: Joint (JCA)

| Dimension | principal<br>inertia | percent | cumul<br>percent |
|-----------|----------------------|---------|------------------|
| dim 1     | .056299              | 57.57   | 57.57            |
| dim 2     | .0246122             | 25.17   | 82.74            |
| dim 3     | .0091703             | 9.38    | <b>92.11</b>     |
| Total     | .0977939             | 100.00  |                  |

### Statistics for column categories in principal normalization

| Categories |   | mass  | overall | %inert | dimension_1 |        |         |
|------------|---|-------|---------|--------|-------------|--------|---------|
|            |   |       | quality |        | coord       | sqcorr | contrib |
| iroa       | 0 | 0.043 | 0.673   | 0.011  | -0.078      | 0.243  | 0.005   |
|            | 1 | 0.012 | 0.673   | 0.040  | 0.277       | 0.243  | 0.017   |
| sfaa       | 0 | 0.053 | 0.992   | 0.005  | -0.093      | 0.972  | 0.008   |
|            | 1 | 0.002 | 0.992   | 0.108  | 2.092       | 0.972  | 0.183   |
| iroad      | 0 | 0.055 | 0.967   | 0.001  | -0.003      | 0.011  | 0.000   |
|            | 1 | 0.001 | 0.967   | 0.029  | 0.183       | 0.011  | 0.001   |
| iuta       | 0 | 0.017 | 0.826   | 0.023  | -0.002      | 0.000  | 0.000   |
|            | 1 | 0.038 | 0.826   | 0.011  | 0.001       | 0.000  | 0.000   |
| fyua       | 0 | 0.022 | 0.921   | 0.025  | -0.147      | 0.196  | 0.008   |
|            | 1 | 0.033 | 0.921   | 0.017  | 0.097       | 0.196  | 0.006   |
| cnf        | 0 | 0.055 | 0.980   | 0.001  | -0.040      | 0.956  | 0.002   |
|            | 1 | 0.001 | 0.980   | 0.055  | 2.340       | 0.956  | 0.092   |
| neu        | 0 | 0.053 | 0.237   | 0.000  | -0.008      | 0.078  | 0.000   |
|            | 1 | 0.003 | 0.237   | 0.009  | 0.154       | 0.078  | 0.001   |
| kpsm       | 0 | 0.032 | 0.947   | 0.020  | -0.123      | 0.239  | 0.008   |
|            | 1 | 0.024 | 0.947   | 0.027  | 0.162       | 0.239  | 0.011   |
| ihai       | 0 | 0.030 | 0.980   | 0.031  | -0.098      | 0.094  | 0.005   |
|            | 1 | 0.026 | 0.980   | 0.035  | 0.112       | 0.094  | 0.006   |
| clbb       | 0 | 0.054 | 0.993   | 0.005  | -0.091      | 0.980  | 0.008   |
|            | 1 | 0.002 | 0.993   | 0.132  | 2.588       | 0.980  | 0.224   |
| drad       | 0 | 0.042 | 0.724   | 0.006  | 0.029       | 0.062  | 0.001   |

|            |   |             |        |         |             |        |              |
|------------|---|-------------|--------|---------|-------------|--------|--------------|
|            | 1 | 0.013       | 0.724  | 0.019   | -0.093      | 0.062  | 0.002        |
| hly        | 0 | 0.053       | 0.958  | 0.002   | -0.059      | 0.899  | 0.003        |
|            | 1 | 0.003       | 0.958  | 0.039   | 1.108       | 0.899  | 0.062        |
| pap        | 0 | 0.048       | 0.869  | 0.007   | -0.102      | 0.763  | 0.009        |
|            | 1 | 0.008       | 0.869  | 0.039   | 0.605       | 0.763  | 0.052        |
| mcma       | 0 | 0.053       | 0.984  | 0.004   | -0.088      | 0.952  | 0.007        |
|            | 1 | 0.003       | 0.984  | 0.083   | 1.650       | 0.952  | <b>0.137</b> |
| mchb       | 0 | 0.054       | 0.993  | 0.003   | -0.069      | 0.861  | 0.005        |
|            | 1 | 0.002       | 0.993  | 0.086   | 1.959       | 0.861  | <b>0.128</b> |
| mcia       | 0 | 0.055       | 0.980  | 0.000   | -0.004      | 0.018  | 0.000        |
|            | 1 | 0.000       | 0.980  | 0.046   | 0.411       | 0.018  | 0.001        |
| cvac       | 0 | 0.047       | 0.494  | 0.006   | 0.019       | 0.030  | 0.000        |
|            | 1 | 0.009       | 0.494  | 0.030   | -0.100      | 0.030  | 0.002        |
| sat        | 0 | 0.039       | 0.946  | 0.014   | -0.057      | 0.096  | 0.002        |
|            | 1 | 0.016       | 0.946  | 0.032   | 0.135       | 0.096  | 0.005        |
| b2         | 0 | 0.797       | 0.204  | 0.451   | -0.099      | 0.176  |              |
|            | 1 | 0.203       | 0.880  | 0.411   | 0.387       | 0.758  |              |
| a          | 0 | 0.669       | 0.169  | 0.435   | 0.064       | 0.064  |              |
|            | 1 | 0.331       | 0.324  | 0.459   | -0.129      | 0.123  |              |
| d          | 0 | 0.703       | 0.222  | 0.438   | 0.016       | 0.004  |              |
|            | 1 | 0.297       | 0.495  | 0.465   | -0.037      | 0.009  |              |
| b1         | 0 | 0.831       | 0.134  | 0.436   | 0.030       | 0.018  |              |
|            | 1 | 0.169       | 0.569  | 0.501   | -0.147      | 0.075  |              |
|            |   |             |        |         |             |        |              |
|            |   | dimension_2 |        |         | dimension_3 |        |              |
| Categories |   | coord       | sqcorr | contrib | coord       | sqcorr | contrib      |
| iroa       | 0 | 0.101       | 0.406  | 0.018   | -0.025      | 0.024  | 0.003        |
|            | 1 | -0.359      | 0.406  | 0.064   | 0.088       | 0.024  | 0.010        |
| sfaa       | 0 | 0.012       | 0.015  | 0.000   | -0.006      | 0.005  | 0.000        |
|            | 1 | -0.262      | 0.015  | 0.007   | 0.144       | 0.005  | 0.005        |
| irobd      | 0 | -0.003      | 0.008  | 0.000   | 0.029       | 0.949  | 0.005        |
|            | 1 | 0.153       | 0.008  | 0.001   | -1.695      | 0.949  | <b>0.295</b> |
| iuta       | 0 | -0.327      | 0.825  | 0.076   | 0.010       | 0.001  | 0.000        |
|            | 1 | 0.149       | 0.825  | 0.035   | -0.004      | 0.001  | 0.000        |
| fyua       | 0 | -0.274      | 0.679  | 0.067   | -0.071      | 0.046  | 0.012        |
|            | 1 | 0.181       | 0.679  | 0.045   | 0.047       | 0.046  | 0.008        |
| cnf        |   |             |        |         |             |        |              |

|                                    |   |        |       |              |        |       |              |
|------------------------------------|---|--------|-------|--------------|--------|-------|--------------|
|                                    | 0 | 0.005  | 0.014 | 0.000        | -0.004 | 0.009 | 0.000        |
|                                    | 1 | -0.287 | 0.014 | 0.003        | 0.227  | 0.009 | 0.005        |
| -----                              |   |        |       |              |        |       |              |
| neu                                | 0 | -0.008 | 0.074 | 0.000        | -0.009 | 0.085 | 0.000        |
|                                    | 1 | 0.149  | 0.074 | 0.003        | 0.160  | 0.085 | 0.008        |
| -----                              |   |        |       |              |        |       |              |
| kpsm                               | 0 | -0.209 | 0.688 | 0.056        | -0.035 | 0.020 | 0.004        |
|                                    | 1 | 0.274  | 0.688 | 0.073        | 0.046  | 0.020 | 0.006        |
| -----                              |   |        |       |              |        |       |              |
| ihai                               | 0 | -0.298 | 0.871 | 0.107        | 0.038  | 0.014 | 0.005        |
|                                    | 1 | 0.341  | 0.871 | <b>0.122</b> | -0.044 | 0.014 | 0.005        |
| -----                              |   |        |       |              |        |       |              |
| clbb                               | 0 | 0.010  | 0.011 | 0.000        | -0.004 | 0.002 | 0.000        |
|                                    | 1 | -0.275 | 0.011 | 0.006        | 0.118  | 0.002 | 0.003        |
| -----                              |   |        |       |              |        |       |              |
| drad                               | 0 | -0.094 | 0.656 | 0.015        | -0.009 | 0.006 | 0.000        |
|                                    | 1 | 0.303  | 0.656 | 0.049        | 0.030  | 0.006 | 0.001        |
| -----                              |   |        |       |              |        |       |              |
| hly                                | 0 | 0.015  | 0.057 | 0.000        | -0.002 | 0.001 | 0.000        |
|                                    | 1 | -0.280 | 0.057 | 0.009        | 0.041  | 0.001 | 0.001        |
| -----                              |   |        |       |              |        |       |              |
| pap                                | 0 | -0.034 | 0.087 | 0.002        | -0.016 | 0.019 | 0.001        |
|                                    | 1 | 0.204  | 0.087 | 0.014        | 0.095  | 0.019 | 0.008        |
| -----                              |   |        |       |              |        |       |              |
| mcma                               | 0 | 0.016  | 0.030 | 0.001        | -0.004 | 0.002 | 0.000        |
|                                    | 1 | -0.295 | 0.030 | 0.010        | 0.072  | 0.002 | 0.002        |
| -----                              |   |        |       |              |        |       |              |
| mchb                               | 0 | 0.003  | 0.002 | 0.000        | 0.027  | 0.129 | 0.004        |
|                                    | 1 | -0.097 | 0.002 | 0.001        | -0.759 | 0.129 | <b>0.118</b> |
| -----                              |   |        |       |              |        |       |              |
| mcia                               | 0 | 0.000  | 0.000 | 0.000        | 0.026  | 0.962 | 0.004        |
|                                    | 1 | -0.005 | 0.000 | 0.000        | -3.030 | 0.962 | <b>0.471</b> |
| -----                              |   |        |       |              |        |       |              |
| cvac                               | 0 | 0.074  | 0.442 | 0.010        | -0.016 | 0.022 | 0.001        |
|                                    | 1 | -0.383 | 0.442 | 0.053        | 0.086  | 0.022 | 0.007        |
| -----                              |   |        |       |              |        |       |              |
| sat                                | 0 | -0.169 | 0.841 | 0.046        | -0.018 | 0.009 | 0.001        |
|                                    | 1 | 0.402  | 0.841 | <b>0.108</b> | 0.042  | 0.009 | 0.003        |
| -----                              |   |        |       |              |        |       |              |
| b2                                 | 0 | -0.034 | 0.021 |              | -0.020 | 0.007 |              |
|                                    | 1 | 0.134  | 0.091 |              | 0.078  | 0.031 |              |
| -----                              |   |        |       |              |        |       |              |
| a                                  | 0 | 0.063  | 0.062 |              | 0.052  | 0.043 |              |
|                                    | 1 | -0.127 | 0.119 |              | -0.106 | 0.082 |              |
| -----                              |   |        |       |              |        |       |              |
| d                                  | 0 | -0.112 | 0.206 |              | -0.027 | 0.012 |              |
|                                    | 1 | 0.265  | 0.460 |              | 0.063  | 0.026 |              |
| -----                              |   |        |       |              |        |       |              |
| b1                                 | 0 | 0.077  | 0.116 |              | -0.000 | 0.000 |              |
|                                    | 1 | -0.378 | 0.494 |              | 0.001  | 0.000 |              |
| -----                              |   |        |       |              |        |       |              |
| supplementary variables: b2 a d b1 |   |        |       |              |        |       |              |