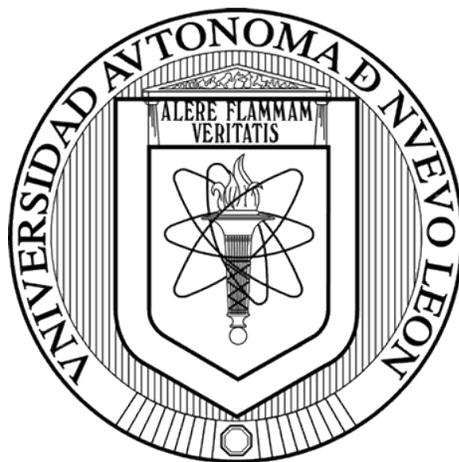


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



“Análisis transcriptómico de la formación de biopelícula en cepas de *Clostridioides difficile* asociadas a infección recurrente y no recurrente”.

Por:

L.M. Daira Guadalajara Rubio Mendoza.

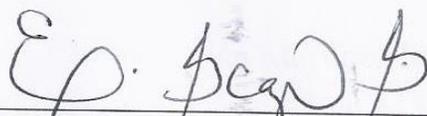
Como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias con orientación en
Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Monterrey, N. L.

Junio 2022

“Análisis transcriptómico de la formación de biopelícula en cepas de *Clostridioides difficile* asociadas a infección recurrente y no recurrente”.

Aprobación de la Tesis:



Dra. en C. Elvira Garza González
Directora de Tesis



Dr. en C. Carlos Córdova Fletes
Codirector de Tesis



Dra. Marisela García Hernández
Miembro de la Comisión



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

COLABORADORES

Dr. en C. Julio Adrián Martínez Meléndez

Facultad de Ciencias Químicas

Dra. en C. María del Rayo Morfín Otero

Hospital Civil de Guadalajara Fray Antonio Alcalde

Dr. Héctor Jesús Maldonado Garza

Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González

PROYECTO APROBADO

Comité de Ética en Investigación del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio
González de la Universidad Autónoma de Nuevo León.
Con el número de registro BI22-00003

DEDICATORIA

Para mi padre, por hacer lo imposible para darme las herramientas necesarias de estar aquí.

Para mi madre, por siempre confiar en mí y darme el valor de hacer cualquier cosa.

Para mi hermana, por ser siempre un gran ejemplo por seguir.

Para mi hermano, por siempre ver el lado positivo de las situaciones.

Para Ana, por creer y convencerme de que soy capaz.

Para Lucia, por las incontables risas aun en los peores momentos.

Para Daniela, por siempre pensar que saldremos adelante.

Para Margot, por siempre entenderme.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermanos por todo el apoyo incondicional otorgado durante estos dos años.

A la Dra. en C. Elvira Garza González, al Dr. en C. Julio Adrián Martínez Meléndez y al Dr. en C. Carlos Córdova Fletes, agradezco enormemente sus consejos, explicaciones, correcciones y enseñanzas otorgadas durante la Maestría, así como el espacio brindado en sus laboratorios.

A la Técnico Lucy y a las pasantes de Servicio Social Itzel, Alexandra y Lesslie por las enseñanzas recibidas y los buenos momentos, jamás olvidaré los días de envié de material, ni las pruebas bioquímicas.

A mis mejores amigos del Norte, Jesús y Karen, muchas gracias por explicarme pacientemente las dudas de genética y bioinformática, por las risas, los dramas y las desveladas, por darme ánimos y escucharme todo el tiempo, sin ustedes como compañeros ningún Posgrado será igual. Los quiero mucho.

A mis mejores amigas del Centro Ana, Lucia, Daniela y Margot, gracias por animarme a seguir estudiando y creer en mí, para todas, estos dos años han sido especialmente complicados y quiero que sepan que gracias a su apoyo y sus palabras de aliento pude iniciar, continuar y terminar esta tesis.

A los profesores y personal administrativo del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular que, pese a la pandemia, siempre se interesaron en la educación de la Generación de Maestría 2020-2022.

Gracias a ustedes esta tesis fue posible.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABLAS	VI
LISTA DE TABLAS DE LOS ANEXOS	IX
NOMENCLATURAS Y SÍMBOLOS	XI
RESUMEN	XIII
ABSTRACT	XIV
INTRODUCCIÓN	1
1. Aspectos históricos	2
2. Características microbiológicas	2
3. Características genómicas	3
3.1. Epidemiología molecular	4
3.2. Ribotipos	5
3.2.1. Ribotipo 027	6
3.2.2. Ribotipo 001	6
3.2.3. Ribotipo 002	7
4. Enfermedad clínica	8
5. Patogénesis y factores de virulencia de <i>C. difficile</i>	9
5.1. Locus de patogenicidad	10
5.2. Biopelícula de <i>C. difficile</i>	11
5.2.1. Composición de la biopelícula	12
5.2.2. Etapas de la formación de biopelícula en <i>C. difficile</i>	13
5.2.2.1. Adhesión bacteriana	13
5.2.2.2. Maduración	13

5.2.2.3. Separación y dispersión.....	14
5.3. Reguladores de la formación de biopelícula.....	14
5.4. Factores de virulencia asociados a la producción de biopelícula de <i>C. difficile</i> ...	15
5.4.1. Proteínas de adhesión	15
5.4.2. <i>Quorum sensing</i>	16
5.4.3. Sistema toxina-antitoxina	17
5.4.4. Esporulación	18
5.4.5. Germinación	19
ANTECEDENTES	21
1. Infección recurrente por <i>C. difficile</i>	21
1.2. Cambios en el genoma de las cepas de <i>C. difficile</i> asociadas a recurrencia.....	22
1.3. Las esporas y la infección por <i>C. difficile</i> recurrente	22
1.4. La biopelícula en la infección recurrente por <i>C. difficile</i>	22
JUSTIFICACIÓN.....	24
HIPÓTESIS	25
OBJETIVOS.....	26
Objetivo general	26
Objetivos específicos.....	26
ESTRATEGIA GENERAL.....	27
MATERIAL Y MÉTODOS	28
1. Selección y activación de las cepas	28
2. Identificación mediante espectrometría de masas	28
3. Extracción de ADN para ribotipificación.....	28
3.1. Ribotipificación de <i>C. difficile</i>	29
4. Modelo de biopelícula de <i>C. difficile</i>	30

5. Determinación de la transcriptómica mediante microarreglos	31
5.1. Extracción de ARN a partir de un modelo de biopelícula.....	31
5.2. Etiquetado del ARN para los microarreglos de expresión de <i>C. difficile</i>	32
5.2.1. Mezclas de ARNc.....	35
5.2.2. Hibridación	36
5.2.3. Lavado de los microarreglos hibridados.....	37
5.2.4. Lectura de los datos de los microarreglos de expresión	37
6. Validación de los resultados obtenidos de los microarreglos mediante qRT-PCR	38
6.1. Diseño de los cebadores	38
6.2. Estandarización de PCR en tiempo real	38
6.3. Cuantificación de genes diferencialmente expresados mediante RT-qPCR	40
7. Análisis estadístico	40
RESULTADOS	42
8. Análisis previo.....	42
8.1. Cepas	42
8.2. Confirmación de la identidad	42
8.3. Confirmación del ribotipo	43
9. Producción de biopelícula	44
9.1. Clasificación de la producción de biopelícula.....	44
9.2. Producción de biopelícula a distintos tiempos de crecimiento.....	45
9.3. Producción de biopelícula en las cepas asociadas a ICD-R e ICD-NR.....	47
10. Determinación de la transcriptómica mediante microarreglos.....	49
10.1. Análisis global de los genes expresados diferencialmente en la biopelícula de <i>C. difficile</i> a los 3 días de incubación.....	53
10.2. Subanálisis.....	56

10.2.1. Genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días de cepas asociadas a ICD-NR e ICD-R, independientemente de ribotipo	57
10.2.2. Genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días de cepas asociadas a ICD-NR, independientemente de ribotipo	57
10.2.3. Genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días de cepas asociadas a ICD-R, independientemente de ribotipo	59
10.3. Genes diferencialmente expresados en las células planctónicas en cepas asociadas a ICD-NR e ICD-R	64
10.3.1. Genes diferencialmente expresados en las células planctónicas del ribotipo 001 en cepas asociadas a ICD-R	64
10.3.2. Genes diferencialmente expresados en las células planctónicas del ribotipo 027 en cepas asociadas a ICD-R	67
10.4.1. Genes que se expresan diferencialmente en la biopelícula de 3 días en cepas asociadas a ICD- NR e ICD-R en el RT001	72
10.4.1.1. Genes que se expresan diferencialmente en la biopelícula de 3 días en cepas asociadas a ICD- NR en el RT001	72
10.4.1.2. Genes que se expresan diferencialmente en la biopelícula de 3 días en cepas asociadas a ICD- R en el RT001	75
10.4.2. Genes que se expresan diferencialmente en la biopelícula de 3 días en cepas asociadas a ICD- NR e ICD-R en el RT027	82
10.4.2.1. Genes que se expresan diferencialmente en la biopelícula de 3 días en cepas asociadas a ICD- NR en el RT027	82
10.4.2.2. Genes que se expresan diferencialmente en la biopelícula de 3 días en cepas asociadas a ICD- R en el RT027	85
10.4.3. Genes únicos diferencialmente expresados en común en la biopelícula de 3 días del RT001 y 027 en cepas asociadas a ICD-R	90
11. Validación de los resultados de los microarreglos mediante RTqPCR	91
11.1. Selección de genes	91

11.1.1. Diseños de cebadores	92
11.2. qPCR de los genes de interés.....	93
DISCUSIÓN.....	96
12. Producción de biopelícula	96
13.2. Genes expresados en las células planctónicas asociados a ICD-R.....	98
13.3. Genes expresados en la biopelícula asociados a ICD-NR e ICD-R	99
CONCLUSIONES.....	103
APORTACIONES.....	104
PERSPECTIVAS	105
BIBLIOGRAFÍA.....	106
ANEXOS	121
ANEXO 1	121
ANEXO II	136
ANEXO IV	142
ANEXO V	147
ANEXO VI.....	169

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Circular del cromosoma de 4,3 Mb de la cepa 630 de <i>C. difficile</i>	4
Figura 2. Fisiopatología de la infección por <i>Clostridioides difficile</i>	9
Figura 3. Estrategia general. Resumen de la metodología principal realizada en el presente proyecto.	27
Figura 4. Ribotipado de las cepas de <i>Clostridioides difficile</i> . El primer carril corresponde al peso molecular (PM), los carriles correspondientes a las cepas control para cada ribotipo están señalados con letras de color azul.	43
Figura 5. Producción de biopelícula de <i>C. difficile</i> ribotipos 001 y 027 a distintos días de crecimiento.	46
Figura 6. Producción de biopelícula de <i>C. difficile</i> ribotipos 001 y 027 en cepas asociadas a ICD-NR e ICD-R a los días 1 y 3 de incubación.....	49
Figura 7. Figura representativa de la distribución de los 8 pools en la laminilla de los microarreglos, después de ser escaneadas por el SureScan Microarray.....	51
Figura 8. Figura representativa del reporte de control de calidad de microarreglos de expresión génica generado por el software Future Extraction (Agilent Technologies).	51
Figura 9. Genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días sin corrección de Benjamini-Hochberg. Los puntos rojos corresponden a los genes sobreexpresados y los puntos azules a los subexpresados. $FC_{log} \geq 1.5$	53
Figura 10. Interacción de proteínas y agrupamiento por clúster en String de los genes expresados diferencialmente en la biopelícula de <i>C. difficile</i> a los 3 días de incubación sin corrección de Benjamini-Hochberg.....	54
Figura 11. Genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días. Los puntos rojos corresponden a los genes sobreexpresados y los puntos azules a los subexpresados. En gris se muestran los genes estadísticamente significativos después de la corrección de Benjamini-Hochberg. $FC_{log} \geq 1.5$	55
Figura 12. Interacción de proteínas y agrupamiento por clúster en String de los genes expresados diferencialmente en la biopelícula de <i>C. difficile</i> a los 3 días de incubación con corrección de Benjamini-Hochberg.....	55

Figura 13. Genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días en cepas asociadas a ICD-NR, independiente de ribotipo, sin la corrección de Benjamini-Hochberg. Los puntos rojos corresponden a los genes sobreexpresados y los puntos azules a los subexpresados. $FC \geq 1.5$ 57

Figura 14. Interacción de proteínas y agrupamiento por clúster en String de los genes expresados diferencialmente en la biopelícula de *C. difficile* a los 3 días en cepas asociadas a ICD-NR, independiente de ribotipo, sin la corrección de Benjamini-Hochberg. 58

Figura 15. Genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días en cepas asociadas a ICD-R, independiente de ribotipo, sin la corrección de Benjamini-Hochberg. Los puntos rojos corresponden a los genes sobreexpresados y los puntos azules a los subexpresados. $FC \geq 1.5$ 59

Figura 16. Genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días en cepas asociadas a ICD-R, independiente de ribotipo, con la corrección de Benjamini-Hochberg. Los puntos rojos corresponden a los genes sobreexpresados y los puntos azules a los subexpresados. $FC \geq 1.5$ 60

Figura 17. Interacción de proteínas y agrupamiento por clúster en String de los genes expresados diferencialmente en la biopelícula de *C. difficile* a los 3 días en cepas asociadas a ICD-R, independiente de ribotipo, sin la corrección de Benjamini-Hochberg. 60

Figura 18. Diagrama de Venn. Los grupos comparados se muestran en los laterales. 61

Figura 19. Genes únicos diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días en cepas asociadas a ICD-R, independiente de ribotipo. Los puntos rojos corresponden a los genes sobreexpresados y los puntos azules a los subexpresados, los genes que estadísticamente significativos después de la corrección de Benjamini-Hochberg se muestran sombreados en gris. 62

Figura 20. Interacción de proteínas y agrupamiento por clúster en String de los genes únicos expresados diferencialmente en la biopelícula de *C. difficile* a los 3 días en cepas asociadas a ICD-R, independiente de ribotipo, sin la corrección de Benjamini-Hochberg. 62

Figura 21. Genes diferencialmente expresados en las células planctónicas de 1 día en cepas asociadas a ICD-R del RT001. Los puntos rojos corresponden a los genes sobreexpresados y los puntos azules a los subexpresados. $FC_{log} \geq 1.5$ 65

Figura 22. Interacción de proteínas y agrupamiento por clúster en String de los genes expresados diferencialmente en las células planctónicas de <i>C. difficile</i> al día 1 en cepas asociadas a ICD-R.	66
Figura 23. Vías enriquecidas en la ontología de genes de los genes expresados diferencialmente en las células planctónicas de <i>C. difficile</i> al día 1 en cepas asociadas a ICD-R.	67
Figura 24. Genes diferencialmente expresados en las células planctónicas de 1 día en cepas asociadas a ICD-R del RT027. Los puntos rojos corresponden a los genes sobreexpresados y los puntos azules a los subexpresados. $FC_{log} = \geq 1.5$	68
Figura 25. Interacción de proteínas y agrupamiento por clúster en String de los genes expresados diferencialmente en las células planctónicas de <i>C. difficile</i> al día 1 en cepas asociadas a ICD-R del RT027.	69
Figura 26. Diagrama de Venn. Los grupos comparados se muestran en los laterales.	70
Figura 27. Interacción de proteínas y agrupamiento por clúster en String de los genes expresados diferencialmente en las células planctónicas de <i>C. difficile</i> al día 1 en cepas asociadas a ICD-R del RT027.	71
Figura 28. Genes diferencialmente expresados en biopelícula de 3 días en cepas asociadas a ICD-NR del RT001. Los puntos rojos corresponden a los genes sobreexpresados y los puntos azules a los subexpresados. $FC_{log} = \geq 1.5$	73
Figura 29. Interacción de proteínas y agrupamiento por clúster en String de los genes expresados diferencialmente en la biopelícula de <i>C. difficile</i> al día 3 en cepas asociadas a ICD-NR del RT001.	74
Figura 30. Vías enriquecidas en la ontología de los genes expresados diferencialmente en la biopelícula de <i>C. difficile</i> al día 3 en cepas asociadas a ICD-NR. $FDR = \leq 0.05$	75
Figura 31. Genes diferencialmente expresados en biopelícula de 3 días en cepas asociadas a ICD-R del RT001. Los puntos rojos corresponden a los genes sobreexpresados y los puntos azules a los subexpresados. $FC_{log} = \geq 1.5$	76
Figura 32. Interacción de proteínas y agrupamiento por clúster en String de los genes expresados diferencialmente en la biopelícula de <i>C. difficile</i> al día 3 en cepas asociadas a ICD-R del RT001.	77

Figura 33. Vías enriquecidas en la ontología de los genes expresados diferencialmente en la biopelícula de <i>C. difficile</i> al día 3 en cepas asociadas a ICD-R. $FDR = \leq 0.05$	78
Figura 34. Diagrama de Venn. Los grupos comparados se muestran en los laterales.	78
Figura 35. Genes únicos diferencialmente expresados en biopelícula de 3 días en cepas asociadas a ICD-R del RT001. Los puntos rojos corresponden a los genes sobreexpresados y los puntos azules a los subexpresados. $FClog = \geq 1.5$	79
Figura 36. Interacción de proteínas y agrupamiento por clúster en String de los genes únicos expresados diferencialmente en la biopelícula de <i>C. difficile</i> al día 3 en cepas asociadas a ICD-R del RT001.	80
Figura 37. Vías enriquecidas en la ontología de los genes únicos expresados diferencialmente en la biopelícula de <i>C. difficile</i> al día 3 en cepas asociadas a ICD-R. $FDR = \leq 0.05$	81
Figura 38. Genes diferencialmente expresados en biopelícula de 3 días en cepas asociadas a ICD-NR del RT027. Los puntos rojos corresponden a los genes sobreexpresados y los puntos azules a los subexpresados. $FClog = \geq 1.5$	83
Figura 39. Interacción de proteínas y agrupamiento por clúster en String de los genes expresados diferencialmente en la biopelícula de <i>C. difficile</i> al día 3 en cepas asociadas a ICD-NR del RT027.	85
Figura 40. Genes diferencialmente expresados en biopelícula de 3 días en cepas asociadas a ICD-R del RT027. Los puntos rojos corresponden a los genes sobreexpresados y los puntos azules a los subexpresados. $FClog = \geq 1.5$	86
Figura 41. Interacción de proteínas y agrupamiento por clúster en String de los genes expresados diferencialmente en la biopelícula de <i>C. difficile</i> al día 3 en cepas asociadas a ICD-R del RT027.	87
Figura 42. Diagrama de Venn. Los grupos comparados se muestran en los laterales.	88
Figura 43. Genes únicos diferencialmente expresados en biopelícula de 3 días en cepas asociadas a ICD-R del RT027. Los puntos rojos corresponden a los genes sobreexpresados y los puntos azules a los subexpresados. $FClog = \geq 1.5$	89
Figura 44. Interacción de proteínas y agrupamiento por clúster en String de los genes únicos expresados diferencialmente en la biopelícula de <i>C. difficile</i> al día 3 en cepas asociadas a ICD-R del RT027.	89

Figura 45. Diagrama de Venn. Los grupos comparados se muestran en los laterales	90
Figura 46. Interacción de proteínas de los genes seleccionados para la validación de los microarreglos.....	92
Figura 47. Curva de ADNc. Figura representativa de la curva de ADNc obtenida por cada gen para el cálculo de la eficiencia de la reacción.....	93
Figura 48. Grafica de expresión relativa de los 8 pools de interés.....	94

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos para la amplificación de la región espaciadora intergénica entre los genes 16S y 23S rRNA.	30
Tabla 2. Formulas utilizadas para la clasificación de las cepas según la formación de biopelícula.	31
Tabla 3. Diluciones del Spike Mix para el etiquetado con Cy3.	33
Tabla 4. Reactivos para la preparación del MasterMix WT Primer.	33
Tabla 5. Reactivos para la preparación del cDNA Master Mix.	33
Tabla 6. Reactivos para la preparación Transcription Master Mix.	34
Tabla 7. Mezclas de ARNc purificado por cada condición.	35
Tabla 8. Mezcla de fragmentación para formatos de 8 microarreglos por laminilla.	36
Tabla 9. Temperatura de alineamiento y concentración de cebadores para cada gen de interés.	39
Tabla 10. Identificación de <i>C. difficile</i> mediante MALDI-TOF, clasificación por ribotipo y tipo de infección.	42
Tabla 11. Valores de DO _{650 nm} utilizados en la clasificación de la producción de biopelícula.	44
Tabla 12. Clasificación de la producción de biopelícula en <i>C. difficile</i> a los 3 días de incubación.	45
Tabla 13. Significancia de la prueba de normalidad para los grupos de cepas de <i>C. difficile</i>	47
Tabla 14. Significancia de la comparación de los grupos de cepas de <i>C. difficile</i>	48
Tabla 15. Nomenclatura de los pools de ARNc.	50
Tabla 16. Calidad de las muestras a hibridar.	50
Tabla 17. Comparaciones realizadas y genes determinados.	52
Tabla 18. Vías enriquecidas en la ontología de los genes expresados diferencialmente en la biopelícula de <i>C. difficile</i> a los 3 días de incubación sin corrección de Benjamini-Hochberg.	54
Tabla 19. Lista de los genes expresados diferencialmente en la biopelícula de <i>C. difficile</i> a los 3 días de incubación con corrección de Benjamini-Hochberg.	56

Tabla 20. Comparativos de los genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días de cepas asociadas a ICD-NR e ICD-R, independientemente de ribotipo.	57
Tabla 21. Vías enriquecidas de los genes expresados diferencialmente en la biopelícula de <i>C. difficile</i> a los 3 días de incubación en cepas asociadas a ICD-R, sin corrección de Benjamini-Hochberg.	61
Tabla 22. Vías enriquecidas de los genes únicos expresados diferencialmente en la biopelícula de <i>C. difficile</i> a los 3 días de incubación en cepas asociadas a ICD-R, sin corrección de Benjamini-Hochberg.....	63
Tabla 23. Identificación mediante blastp de las proteínas únicas no identificadas en la biopelícula de <i>C. difficile</i> a los 3 días de incubación en cepas asociadas a ICD-R, sin corrección de Benjamini-Hochberg.....	63
Tabla 24. Identificación mediante blastp de las proteínas únicas no identificadas y significativas después de la corrección de Benjamini-Hochberg en la biopelícula de <i>C. difficile</i> a los 3 días de incubación en cepas asociadas a ICD-R.	64
Tabla 25. Vías enriquecidas de los genes expresados diferencialmente en las células planctónicas de <i>C. difficile</i> a los 3 días de incubación en cepas asociadas a ICD-R del RT027. FDR = ≤ 0.05	69
Tabla 26. Genes en común de las células planctónicas del ribotipo 027 y 001 asociadas a ICD-R.	70
Tabla 27. Vías enriquecidas de los genes en común expresados diferencialmente en las células planctónicas de <i>C. difficile</i> al día 1 de incubación en cepas asociadas a ICD-R de los RT001 y 027. FDR = ≤ 0.05	71
Tabla 28. Identificación mediante blastp de las proteínas únicas no identificadas en la biopelícula de <i>C. difficile</i> a los 3 días de incubación en cepas asociadas a ICD-R del RT001.	82
Tabla 29. Vías enriquecidas de los genes expresados diferencialmente en la biopelícula de <i>C. difficile</i> al día 3 de incubación en cepas asociadas a ICD-NR de los RT027. FDR = ≤ 0.05	85
Tabla 30. Vías enriquecidas de los genes expresados diferencialmente en la biopelícula de <i>C. difficile</i> al día 3 de incubación en cepas asociadas a ICD-R de los RT027. FDR = ≤ 0.05	88

Tabla 31. Identificación mediante blastp de las proteínas únicas no identificadas en la biopelícula de <i>C. difficile</i> a los 3 días de incubación en cepas asociadas a ICD-R del RT027.	90
Tabla 32. Características de los genes seleccionados para realizar la validación de los microarreglos.	91
Tabla 33. Cebadores y concentraciones utilizadas para la qPCR.	92
Tabla 34. Resultados de la eficiencia de la reacción para cada gen.	93
Tabla 35. Valores de la significancia estadística de cada gen en la biopelícula asociada a ICD-R de 3 días de cada ribotipo.	95

LISTA DE TABLAS DE LOS ANEXOS

Anexo. Tabla 1. Genes en común entre las cepas <i>C. difficile</i> R20291, 630 y 9689 agregados al diseño del microarreglo.	121
Anexo. Tabla 2. Genes únicos de la cepa <i>C. difficile</i> ATCC9689 agregados al diseño del microarreglo.....	134
Anexo. Tabla 3. Genes únicos de la cepa <i>C. difficile</i> R20291 agregados al diseño del microarreglo.....	135
Anexo. Tabla 4. Genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días, sin corrección de Benjamini – Hochberg.	136
Anexo. Tabla 5. Genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días de cepas asociadas a ICD-NR, independientemente de ribotipo sin corrección de Benjamini – Hochberg.	137
Anexo. Tabla 6. Genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días de cepas asociadas a ICD-R, independientemente de ribotipo sin corrección de Benjamini – Hochberg.	138
Anexo. Tabla 7. Genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días de cepas asociadas a ICD-R, independientemente de ribotipo con corrección de Benjamini – Hochberg.	140
Anexo. Tabla 8. Diagrama de Venn.	140
Anexo. Tabla 9. Genes únicos diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días de cepas asociadas a ICD-R, independientemente de ribotipo sin corrección de Benjamini – Hochberg.	140
Anexo. Tabla 10. Genes únicos diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días de cepas asociadas a ICD-R, independientemente de ribotipo con corrección de Benjamini – Hochberg.	141
Anexo. Tabla 11. Genes únicos de las células planctónicas del ribotipo 001 asociadas a ICD-R.	142
Anexo. Tabla 12. Genes únicos de las células planctónicas del ribotipo 027 asociadas a ICD-R.	145
Anexo. Tabla 13. Genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días de cepas asociadas a ICD-NR ribotipo 001.....	147

Anexo. Tabla 14. Genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días de cepas asociadas a ICD-R ribotipo 001.....	152
Anexo. Tabla 15. Genes únicos diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días de cepas asociadas a ICD-R ribotipo 001.....	154
Anexo. Tabla 16. Diagrama de Venn de genes únicos diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días de cepas asociadas a ICD-R e ICD-NR ribotipo 001.	156
Anexo. Tabla 17. Genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días de cepas asociadas a ICD-NR ribotipo 027.....	162
Anexo. Tabla 18. Genes únicos diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días de cepas asociadas a ICD-R ribotipo 027.....	166
Anexo. Tabla 19. Diagrama de Venn de genes únicos diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días de cepas asociadas a ICD-R e ICD-NR ribotipo 027.	166
Anexo. Tabla 20. Rutas enriquecidas en la ontología génica (GO) y Enciclopedia de genes y genomas de Kioto (KEGG).	169

NOMENCLATURAS Y SÍMBOLOS

Adj. P. Val	Valor de significancia corregido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNc	Ácido ribonucleico complementario
ASHD	Agar Schaedler
ATCC	American Type Culture Collection
Ave. Expr	Average expression (Expresión promedio)
BHIS	Medio de infusión cerebro corazón suplementado con extracto de levadura) y L-cisteína
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridioides difficile</i>
ct	Threshold cycles
CTn	Transposon conjugativo
CV	Cristal violeta
dNTP	Desoxinucleotido trifosfato
DO	Densidad óptica
<i>et. al.</i>	Y colaboradores
FC	Fold Change
FDR	False Discovery Rate (Tasa de descubrimiento falso)
g	Gramos
GDL	Guadalajara
h	Horas
HU	Hospital Universitario
ICD	Infección por <i>Clostridioides difficile</i>
ICD-NR	Infección por <i>Clostridioides difficile</i> no recurrente
ICD-R	Infección por <i>Clostridioides difficile</i> recurrente
ID	Identificación
kb	Kilobases
KEGG	Enciclopedia de genes y genomas de Kioto
L	Litros
LogFC	Logaritmo del fold change
M	Molar
Mbp	Millones de pares de bases
mg	Miligramos
µg	Microgramos
min	Minutos
mL	Mililitros
µL	Microlitros
mM	Milimolar
ng	Nanogramos

nm	Nanómetros
NR	No recurrente
OR	Odds Ratio
P. Value	Valor de significancia
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PM	Peso molecular
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
QS	Quorum sensing
R	Recurrente
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Ribotipo
RTqPCR	Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
s	Segundos
Tn	Transposón
U	Unidad
UV	Ultravioleta

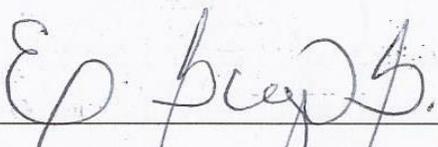
RESUMEN

Introducción: La infección recurrente por *C. difficile* (ICD-R) se presenta del 10 al 30% de los pacientes. La ICD se ha asociado a la formación de biopelícula por *Clostridioides difficile*. Se cuantificó la producción de biopelícula y se analizó el perfil transcriptómico en un modelo de biopelícula de los ribotipos (RT) 001 y 027 asociados a ICD-R y a infección por *C. difficile* no recurrente (ICD-NR).

Metodología: Se estudiaron 5 cepas de cada ribotipo asociadas a ICD-R e ICD-NR. La biopelícula se cuantificó mediante el método de cristal violeta en una microplaca de 96 pocillos. Se realizaron mezclas de los 5 ARN de cada condición según día-ribotipo-recurrencia: mezcla 1 (1-1-NR), 2 (1-1-R), 3 (1-27-NR), 4 (1-27-R), 5 (3-1-NR), 6 (3-1-R), 7 (3-27-NR), 8 (3-27-R). Se diseñó un microarreglo basado en el transcriptoma de *C. difficile* 630, R20291 y ATCC9689. Se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney en el análisis de la producción de biopelícula y la prueba T para muestras independientes con corrección de Benjamini-Hochberg para las micromatrices. Los resultados se validaron mediante RTqPCR.

Resultados: Las cepas asociadas a ICD-R de ambos ribotipos producen mayor biopelícula a los 3 días que las cepas asociadas a ICD-NR ($p = <0,01$). En la biopelícula de las cepas asociadas a ICD-R del RT001 50 genes se sobreexpresaron y 14 se subexpresaron. Algunas de las vías enriquecidas fueron: transporte de carbohidratos y sustancias orgánicas, así como el sistema fosfotransferasa. En la biopelícula de las cepas asociadas a ICD-R del RT027 7 genes se sobreexpresaron y 19 se subexpresaron. No se encontró ninguna vía enriquecida.

Conclusiones: Las cepas asociadas a ICD-R de ambos ribotipos producen mayor biopelícula al día 3 que las cepas asociadas a ICD-NR. Las cepas asociadas a ICD-R del RT001 presentaron cambios en la expresión de genes relacionados con el metabolismo y la esporulación.



Dra. en C. Elvira Garza González

Directora de Tesis

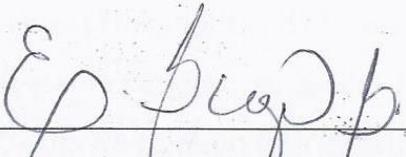
ABSTRACT

Introduction: Recurrent *C. difficile* infection (R-CDI) occurs in 10 to 30% of patients. The R-CDI has been associated with biofilm formation. Biofilm production was quantified, and transcriptomic profile was analyzed in a biofilm model of ribotypes (RT) 001 and 027 associated with R-CDI and non-recurrent *C. difficile* infection (NR-CDI).

Methodology: 5 strains of each ribotype associated with R-CDI and NR-CDI were studied. The biofilm was quantified by the crystal violet method in a 96-well microplate. Mixtures of 5 RNAs of each condition were made according to day-ribotype-recurrence: mixture 1 (1-1-NR), 2 (1-1-R), 3 (1-27-NR), 4 (1-27 -R), 5 (3-1-NR), 6 (3-1-R), 7 (3-27-NR), 8 (3-27-R). A microarray-based on the transcriptome of *C. difficile* 630, R20291 and ATCC9689 was designed. The Mann-Whitney U test was used to analyze biofilm production and the T-test for independent samples with Benjamini-Hochberg correction for the microarrays. The results were validated by qRT-PCR.

Results: R-CDI-associated strains of both ribotypes produced greater biofilm at 3 days than NR-CDI strains ($p = <0.01$). In the biofilm of R-CDI strains of RT001, 50 genes were overexpressed, and 14 were underexpressed. Some of the pathways enriched were the transport of carbohydrates and organic substances, as well as the phosphotransferase system. In the biofilm of R-CDI-associated strains of RT027, 7 genes were overexpressed, and 19 were underexpressed. No enriched pathway was found.

Conclusions: R-ICD associated strains of both ribotypes produce greater biofilm at day 3 than NR-CDI associated strains. R-CDI associated strains of RT001 showed changes in the expression of genes related to metabolism and sporulation.



Dra. en C. Elvira Garza González
Directora de Tesis

INTRODUCCIÓN

Clostridioides difficile es una bacteria Gram positiva anaerobia estricta (De Vos et al., 2009). Es el agente etiológico de la primera causa de diarrea nosocomial en todo el mundo (Álvarez-Hernández et al., 2018). Se han descrito diversas presentaciones clínicas de infección causadas por esta especie bacteriana que van desde un estado de portador asintomático, colitis simple o recurrente, colitis asociada a los cuidados de la salud, colitis pseudomembranosa hasta la forma más grave llamada colitis fulminante (McDonald et al., 2018).

La prevalencia de colonización por *C. difficile* en individuos sanos varía del 0 al 15% de la población adulta en general, del 18 al 90% en neonatos y lactantes, del 0 al 45% en adultos mayores en asilos, y del 0 al 13% en trabajadores de la salud (Furuya-Kanamori et al., 2015). La infección de *C. difficile* (ICD) se puede desencadenar a partir de la alteración de la microbiota por el consumo de antibióticos, en pacientes colonizados o por la ingesta de las esporas de *C. difficile* (Francis et al., 2013), adquiridas en la comunidad o en el ámbito intrahospitalario. Según los datos del Programa de Infecciones Emergentes del Centro de Prevención y Control de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés, Centers for Disease Control and Prevention), la carga nacional estimada de ICD en Estados Unidos (E.U.) fue de 476,400 casos en 2011 y 462,100 casos en 2017 (Guh et al., 2020) y cerca de 223,900 de los infectados requirieron cuidados hospitalarios, de los cuales 128, 000 fallecieron (C.D.C, 2019).

En México se reportó un incremento en la incidencia de ICD del 2012 al año 2015, con predominio de la cepa hipervirulenta de *C. difficile* NAP1/BI/027 (ribotipo 027) (Dávila et al., 2017). En un estudio realizado en el Hospital Civil de Guadalajara se reportó que el 53% de los casos de ICD en los servicios quirúrgicos se asoció a la cepa hipervirulenta de *C. difficile* 027 seguido de la cepa *C. difficile* ribotipo 001 (Martínez-Meléndez et al., 2018).

1. Aspectos históricos

C. difficile fue aislada en 1935 por Ivan C. Hall y Elizabeth O'Toole a partir de heces de neonatos sanos de 10 días y recibió el nombre de *Bacillus difficilis* debido a su dificultad para cultivar y aislar, posteriormente se clasificó como *Clostridium difficile* (Lawson et al., 2016).

Los primeros casos de colitis grave con presencia de placas pseudomembranosas se reportaron en año de 1970. Estas infecciones se asociaron con el uso de clindamicina, por lo que se denominó “colitis por clindamicina”. En 1978, Bartlett *et al.* demostraron que la administración de clindamicina causaba un aumento en el crecimiento de *C. difficile* en un modelo de infección en hámsteres, además realizaron estudios a partir de heces de pacientes diagnosticados con colitis pseudomembranosa y demostraron que tanto las bacterias como el filtrado acelular eran capaces de producir efectos citotóxicos, lo cual sugirió que la colitis pseudomembranosa era causada por un sobrecrecimiento de clostridios liberadores de toxinas (Bartlett et al., 1978).

En 2016, se reclasificaron las especies del género *Clostridium* con base en estudios filogenéticos de los genes de la subunidad β de la ARN polimerasa (*rpoB*), de la ADN girasa (*gyrB*) y del ARNr 16S. En esta reclasificación, *C. difficile* se ubicó en la familia *Peptostreptococcaceae*, en el nuevo género *Peptoclostridium* (Yutin, Natalya, Galperin, 2013). Por las dificultades asociadas al cambio de nombre, se propuso la modificación del nombre a *Clostridioides difficile*. (Lawson et al., 2016)

2. Características microbiológicas

C. difficile es una bacteria Gram positiva, anaerobia estricta, generalmente móvil, capaz de producir esporas subterminales ovaladas o esféricas. Esta especie bacteriana forma colonias de 2-5mm, circulares, ocasionalmente rizoides, convexas, opacas, grisáceas o blanquecinas con superficie mate a brillante. Todas las cepas producen fluorescencia verde pálido bajo luz ultravioleta a longitud de onda larga después de 48 horas de incubación en agar sangre *Brucella* suplementado con hemina y vitamina K (De Vos et al., 2009).

C. difficile crece en el rango de temperatura de 25 a 45 °C, con una temperatura óptima de crecimiento de 30 a 37 °C. Es capaz de utilizar prolina, ácido aspártico, serina, leucina, alanina, treonina, valina, fenilalanina, metionina, isoleucina, fructosa, galactosa, glucógeno, inositol, inulina, lactosa, maltosa, almidón y sacarosa. Además, es una de las pocas especies que produce ácidos isocaproico y valérico (De Vos et al., 2009).

3. Características genómicas

El tamaño del genoma de *C. difficile* oscila entre 4.1 y 4.3 Mpb (4.26 Mpb en promedio) y en promedio codifica para 3832 genes (3654–4248) (Kulecka et al., 2021; Sebahia et al., 2006; Stabler et al., 2009), con un porcentaje de GC de 28.26–29.46% (28.64%) (Kulecka et al., 2021).

El pangenoma se compone de un genoma central (los genes presentes en todos los aislamientos) y un genoma accesorio o adaptativo (genes ausentes de una o más cepas o exclusivos de una cepa en particular) (Knight et al., 2015; Kulecka et al., 2021). Se estimó que el pangenoma de *C. difficile* está compuesto por 9640 secuencias codificantes (Knight et al., 2015), y en el genoma central se han reportado desde 600 a 3000 genes los cuales están distribuidos en funciones del metabolismo y transporte de aminoácidos, carbohidratos, iones inorgánicos y nucleótidos, biogénesis de la membrana y pared celular, transcripción, traducción, motilidad de las células bacterianas, metabolismo de cofactores y vitaminas (Knight et al., 2017; Kulecka et al., 2021), además de 208 genes que codifican para proteínas con funciones mal caracterizadas (Kulecka et al., 2021).

La cantidad de genoma central compartido de *C. difficile* podría ser tan baja como el 16 %, este nivel muy bajo de conservación es inusual en las bacterias y es un claro signo de la notable diversidad genética en el genoma de *C. difficile* y refleja la amplia variedad de adaptaciones que requieren las bacterias para subsistir en el intestino humano (Knight et al., 2015).

La alta plasticidad en el genoma de *C. difficile* podría ser debida a mecanismos de flujo lateral de genes, como la recombinación homóloga y la transferencia horizontal de genes, ya

que se ha determinado que en el caso de *C. difficile* 630 (RT012) existe una proporción inusualmente alta (11%) de elemento móviles en su genoma, como transposones conjugativos (CTn) y móviles (Tn), así como profagos (Figura 1) (Sebahia et al., 2006), pero también puede deberse a mutaciones puntuales e inversiones, como se ha evidenciado al comparar las cepas de *C. difficile* 630 (RT012), R20291 (RT027) y CD196 (RT027) (Stabler et al., 2009). En consecuencia, existe la posibilidad de que *C. difficile* adquiera ADN nuevo del metagenoma intestinal y contribuya a su virulencia (Knight et al., 2015).

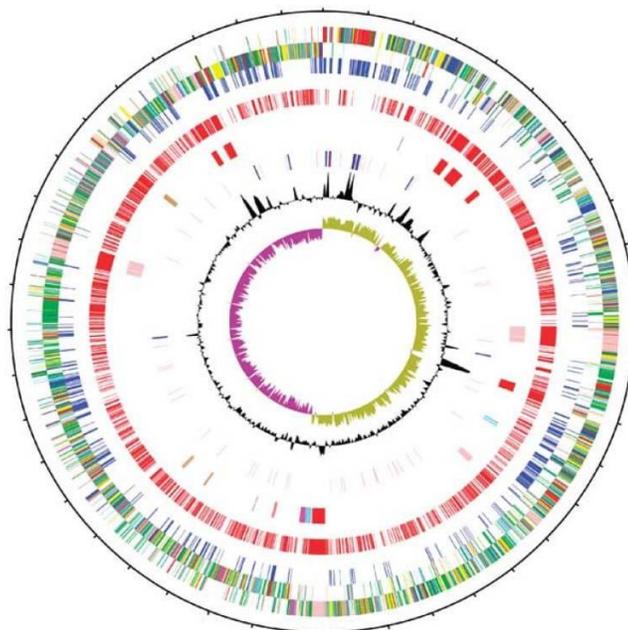


Figura 1. Circular del cromosoma de 4,3 Mb de la cepa 630 de *C. difficile*. Los círculos concéntricos representan lo siguiente (de afuera hacia adentro): 1 y 2, todos los CDS (transcritos en sentido horario y antihorario); 3, CDS compartidos con otros clostridios (azul); 4, CDS exclusivos de *C. difficile* (rojo); 5, elementos móviles (rojo: CTns, rosa: profago, azul: elemento skin y otro elemento móvil desconocido, magenta: isla genómica portadora de genes de degradación de etanolamina, rojo pálido: Tn5398, marrón: profago parcial y CTns); 6, genes de ARN (azul: ARNr, rojo: ARNt, púrpura: ARN estable); 7, contenido G+C (graficado usando una ventana de 10 kb); 8, desviación de GC ((G-C)/(G+C)) trazada usando una ventana de 10 kb; el caqui indica valores >1, púrpura <1). Codificación de colores para genes: azul oscuro; patogenicidad/adaptación, negro; metabolismo energético, rojo; transferencia de información, verde oscuro; asociado a la superficie, cian; degradación de moléculas grandes, magenta; degradación de moléculas pequeñas, amarillo; metabolismo central/intermedio, verde pálido; desconocido, azul pálido; reguladores, naranja; conservado hipotético, marrón; pseudogenes, rosa; fago, gris; misceláneas (Tomada de (Sebahia et al., 2006))

3.1. Epidemiología molecular

Las cepas de *C. difficile* se pueden tipificar mediante ribotipado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE, por sus siglas en inglés), análisis de restricción por endonucleasa (REA, por sus siglas

en inglés) y toxinotipos. De acuerdo con estas clasificaciones, la cepa de *C. difficile* NAP1/BI/027, NAP1 corresponde a cepa norteamericana pulsotipo 1, BI corresponde al REA y 027 al ribotipo (RT) (Martínez-Meléndez et al., 2020).

La ribotipificación por PCR es el método más utilizado en Europa. Esta técnica es discriminatoria, reproducible, sencilla y rápida comparada con los otros métodos de tipificación (Stubbs et al., 1999). Fue descrita por primera vez por Gürtler (Stubbs et al., 1999), posteriormente fue modificado por Bidet *et al.*, al diseñar nuevos cebadores que producían tamaños de amplicón más pequeños (Bidet & Petit, 1999).

El método se basa en la amplificación de la región espaciadora intergénica (ISR) entre los genes 16S y 23S rRNA (Stubbs et al., 1999) (las regiones entre el extremo 3' del gen de rRNA 16S y el extremo 5' del RNA del gen de rRNA 23S (Martínez-Meléndez et al., 2020)), ya que el tamaño de las regiones ISR varía entre las cepas de *C. difficile*, al realizar la separación mediante electroforesis se genera un patrón de bandas único para cada ribotipo que permite la clasificación (Roberts & Mullany, 2016).

Las cepas de *C. difficile* de diferente ubicación geográfica, hospedero y fuente ambiental están clasificadas en cuatro grupos filogenéticos, PG (PG1-PG4) mediante un análisis filogenético de máxima verosimilitud basada en 1,322 genes. El PG1 alberga los ribotipos RT001, RT002, RT014; el PG2 alberga los ribotipos RT027 y RT244; el PG3 alberga RT023 y RT017; y PG4 alberga RT078, RT045 y RT033 (Kumar et al., 2019).

3.2. Ribotipos

La incidencia y gravedad de esta enfermedad bacteriana ha aumentado en todo el mundo en los últimos años debido a la propagación de la cepa hipervirulenta y epidémica conocida como NAP1/BI/027. No obstante, varios estudios han demostrado el cambio en la epidemiología de *C. difficile* en Europa y América del Norte con el aumento y detección de los ribotipos 014/020, 014, 001, 001/072 y 078 (Salazar et al., 2018).

3.2.1. Ribotipo 027

La cepa hipervirulenta de *C. difficile* NAP1/B1/027 también llamada RT027 fue reportada en el 2002 como responsable del incremento de la incidencia y mortalidad de la ICD en hospitales canadienses. Posteriormente se diseminó a otras áreas geográficas como el Reino Unido, Países Bajos, Australia Occidental, Corea del Sur, Hong Kong, Costa Rica y México (Clements, et al. 2010).

El aumento de la virulencia de *C. difficile* se ha asociado a mutaciones genéticas en el gen regulador de toxinas (*tcdC*) que resulta en el aumento de la producción de la toxina A (TcdA, 16 veces) y de la toxina B (TcdB, 23 veces) (Clements, et al. 2010). Además, también se ha asociado a mayor tasa de esporulación (Fatima & Aziz, 2019). *C. difficile* NAP1/B1/027 presenta resistencia a distintos antibióticos como metronidazol, rifampicina, moxifloxacino, clindamicina, imipenem, ceftriaxona, cloranfenicol, vancomicina y fidaxomicina. Algunos de los cuales son utilizados como tratamiento para la ICD (Fatima & Aziz, 2019).

3.2.2. Ribotipo 001

El ribotipo 001 (RT001) está ampliamente distribuido en algunas regiones europeas. Se reportó como el segundo ribotipo más frecuente (11%, n=134) en un estudio europeo multicéntrico en 2011-2013 en Europa Occidental y Oriental (Arvand et al., 2009), como el más frecuente (33.5 %, n=490) en 28 hospitales en el 2015 en la República Checa (Arvand et al., 2009) y en Irán (Azimirad et al., 2020; Baghani et al., 2020) (12.9%, n=75) con aislamientos resistentes a más de 4 antibióticos, incluyendo vancomicina, metronidazol, ciprofloxacino, moxifloxacino (Krutova et al., 2017) y tetraciclina (Baghani et al., 2020). En México es el segundo ribotipo más frecuente, después de la cepa RT027 (Martínez-Meléndez et al., 2018).

Se han encontrado genes involucrados en la resistencia a distintos antibióticos en el genoma de *C. difficile* RT 001, por ejemplo, el gen *vanA* asociado a resistencia a vancomicina, el gen *gyrB* asociado a la resistencia a las fluoroquinolonas y *tetM* asociado a la resistencia a las tetraciclinas (Baghani et al., 2020).

La infección por *C. difficile* RT001 se ha asociado con el uso previo de fluoroquinolonas y un cuadro severo o letal de ICD (Arvand et al., 2009; Krutova et al., 2017), probablemente debido a la mayor producción de esporas (Fawley et al., 2007).

3.2.3. Ribotipo 002

El RT 002 circula frecuentemente en los hospitales de Australia, es el tercer ribotipo más común en Colombia (Salazar et al., 2018), y el primero en Hong Kong (Cheng et al., 2011), seguido de los ribotipos 012, 014 y 046 (Salazar et al., 2018). La aparición de *C. difficile* RT002 con aumento de la esporulación y el mayor uso de antibióticos de amplio espectro (Luk et al., 2018) se ha asociado en Asia a un aumento de la incidencia de ICD. En Hong Kong, el RT002 se asoció con un aumento de la mortalidad a los 30 días (47,6%) en pacientes con ICD (Kong et al., 2020).

Se ha demostrado que las cepas *C. difficile* RT002 presentan una fase de crecimiento estacionaria extendida, mayor producción de toxinas, mayor tasa de germinación, aun en condiciones no favorables (Kong et al., 2020) comparado con los ribotipos og39, 012 y 014 y otros 53 ribotipos y aumento del 20.2 % en la frecuencia de esporulación (Herbert et al., 2019) esta última se asoció con mayor propagación y persistencia en el ámbito hospitalario (Salazar et al., 2018).

En un modelo murino de infección por *C. difficile*, el RT002 causó significativamente mayor pérdida de peso y daño histológico en colón que otros ribotipos comunes (Salazar et al., 2018).

Al igual que los otros ribotipos emergentes de *C. difficile*, las cepas del RT002 se han asociado a la resistencia a las fluoroquinolonas, en especial al ciprofloxacino (MIC > 32 µg/ml) (Luk et al., 2018). Dadas estas características *C. difficile* RT002 podría, por tanto, convertirse en una cepa epidémica y contribuir a brotes hospitalarios (Luk et al., 2018).

4. Enfermedad clínica

La manifestación más frecuente de la ICD es la diarrea con evacuaciones abundantes líquidas acompañadas con moco y sangre ².

La clasificación de la gravedad de la ICD según el Colegio Americano de Gastroenterología (ACG, por sus siglas en inglés), la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (IDSA, por sus siglas en inglés) y la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas (ESCMID, por sus siglas en inglés), se divide en leve-moderada, severa y fulminante (Cho et al., 2020; McDonald et al., 2018).

La ICD leve-moderada se caracteriza por diarrea, leucocitosis ($< 15 \times 10^9$ cel/ml) y creatinina menor a 1.5 mg/dl (C.D.C, 2019). La ICD severa se presenta con fiebre, dolor abdominal, inestabilidad hemodinámica, leucocitosis ($\geq 15 \times 10^9$ cel/ml), y creatinina en suero mayor a 1.5 mg/dl (C.D.C, 2019).

La ICD fulminante se caracteriza por hipotensión, fiebre, íleo, deterioro neurológico, hiperlactatemia, megacolon, signos de irritación peritoneal, leucocitosis ($\geq 15 \times 10^9$ cel/ml o $\geq 35 \times 10^9$ cel/ml dependiendo de la clasificación) y falla orgánica (Cho et al., 2020; McDonald et al., 2018).

El factor de riesgo más importante para el desarrollo de ICD es el uso previo de antibióticos tales como las cefalosporinas de tercera y cuarta generación, fluoroquinolonas, carbapenémicos y clindamicina (McDonald et al., 2018) ya que producen disbiosis de la microbiota permitiendo la proliferación de *C. difficile*.

Otros factores de riesgo importantes para la ICD es la edad (>65 años), el número de días de estancia hospitalaria, exposición antibióticos, la quimioterapia y las comorbilidades como infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, enfermedad renal y pulmonar crónica, diabetes mellitus, enfermedad inflamatoria intestinal, la cirugía gastrointestinal o la manipulación del tracto gastrointestinal, los antiácidos y el tipo de cepa, mientras que los

factores de riesgo de mortalidad por ICD incluyen además la hipoalbuminemia, leucocitosis e infección por *C. difficile* ribotipo 027 (Abou Chakra et al., 2014; McDonald et al., 2018).

5. Patogénesis y factores de virulencia de *C. difficile*

Una vez ingeridas las esporas, llegan al intestino y germinan debido a la interacción con los ácidos biliares primarios como el ácido cólico y ácido quenodesoxicólico (Francis et al., 2013) (Figura 2). Posteriormente la bacteria es capaz de liberar enzimas como colagenasa, hialuronidasa, condroitin sulfatasa y toxinas como la enterotoxina A (TcdA) y la citotoxina (TcdB) que dañan el citoesqueleto de las células intestinales, rompiendo las uniones estrechas produciendo pérdida de líquidos y esfacelación de las células, así como inflamación local y finalmente, la ruptura de la integridad de la barrera intestinal (Sun et al., 2010).

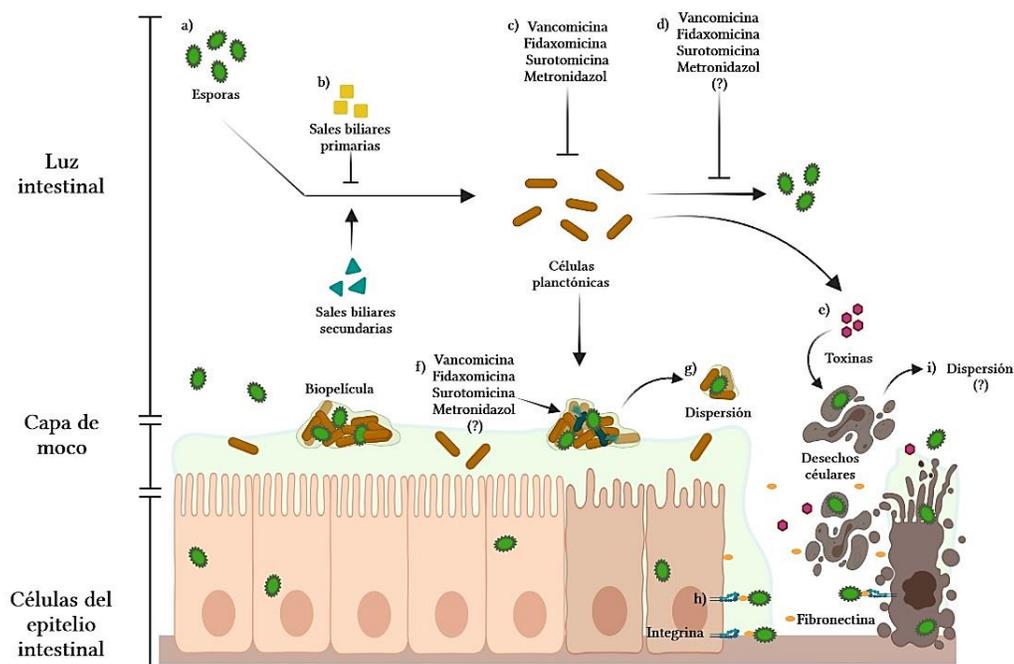


Figura 2. Fisiopatología de la infección por *Clostridioides difficile*.

a) La infección comienza con el consumo de esporas; b) Las esporas en el intestino pueden interactuar con sales biliares primarias que impiden su germinación o con sales biliares secundarias que favorecen su germinación; c) Los antibióticos matan a las células planctónicas de *C. difficile*; d) Los antibióticos pueden inhibir la formación de esporas; e) Las células planctónicas secretan toxinas que afectan el citoesqueleto de la célula intestinal y se adhieren a la capa mucosa del colon; f) las células planctónicas pueden formar una estructura similar a una biopelícula, lo que dificulta la acción de los antibióticos sobre las células incrustadas en la biopelícula; g) La biopelícula se puede dispersar a otros sitios y colonizar; h) Las esporas se pueden internalizar a través de la interacción de la proteína integrina-fibronectina-BclA3 en las células epiteliales intestinales; i) Se ha sugerido que las esporas pueden dispersarse a otros sitios para colonizar. (Adaptado de “Estructura de la barrera mucosa”, de BioRender.com (2022). Obtenido de <https://app.biorender.com/biorender-templates>)

5.1. Locus de patogenicidad

Las cepas toxigénicas de *C. difficile* tienen una región cromosómica de 19.6 kb que se conoce como el locus de patogenicidad (PaLoc), el cual contiene los genes que codifican a la toxina A o TcdA (gen *tcdA*) y la toxina B o TcdB (gen *tcdB*) y tres genes accesorios *tcdR* y *tcdC*, que codifican a las proteínas TcdR y TcdC, implicadas en la regulación transcripcional de los genes de la toxina (Dupuy et al., 2008; Mani & Dupuy, 2001; Martin-Verstraete et al., 2016) y *tcdE*, cuya proteína (TcdE) es necesaria para la secreción eficiente de TcdA y TcdB (Martin-Verstraete et al., 2016). En las cepas no toxigénicas se reemplaza por una región no codificante de 115/75 pb altamente conservada (Braun et al., 1996; Martin-Verstraete et al., 2016).

La proteína de 22 kDa que codifica el gen *tcdR* es necesaria para el inicio de la transcripción de los genes de las toxinas como factor σ de la ARN polimerasa (RNAP). Dirige a la RNAP para que reconozca específicamente los promotores y transcriba los genes de las toxinas (Mani & Dupuy, 2001; Martin-Verstraete et al., 2016).

Se ha sugerido que la proteína TcdC podría desempeñar un papel negativo en la expresión de las toxinas, ya que secuestra la proteína TcdR e interactúa directamente con RNAP, lo que sugiere que TcdC puede interferir con la transcripción dependiente de TcdR sin embargo las evidencias de su posible regulación son contradictorias (Dupuy et al., 2008; Martin-Verstraete et al., 2016).

Una vez en el citoplasma de las células intestinales, las toxinas inactivan a las Rho-GTPasas (Rho, Rac y Cdc42), que participan en la polimerización de actina y en la estabilidad del citoesqueleto celular. Las toxinas producen desorganización completa del patrón de actina y aglutinación dentro de las células (Riegler et al., 1995), produciendo inflamación, infiltración en la submucosa de neutrófilos mediada por citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleucina-1 β (IL-1 β), los leucotrienos liberados por los macrófagos residentes (Rocha et al., 1997), la activación de mastocitos, la producción de especies reactivas de oxígeno, la producción de sustancia P y esfacelación del epitelio

intestinal (Sun et al., 2010) con el posterior desarrollo de microulceraciones en la superficie de la mucosa intestinal cubiertas por una pseudomembrana constituida de neutrófilos, fibrina, mucina y detritos celulares (Sun et al., 2010). La extensión del daño colónico está relacionada con las concentraciones de toxina y la duración de la exposición antes del diagnóstico (Riegler et al., 1995).

Se ha propuesto que algunas señales ambientales como las nutricionales influyen en la producción de toxinas, ya que la expresión de todos los genes en el PaLoc está reprimida por el regulador transcripcional global CodY (*codY*) que participa en la respuesta adaptativa a la presencia de nutrientes en el medio ambiente. Además CodY se une a *tcdR* en distintas regiones cambiando la afinidad por el sustrato (Dineen et al., 2007). Los objetivos de CodY están asociados con una variedad de comportamientos adaptativos, como el transporte de azúcar y aminoácidos, la movilidad y la esporulación (Martin-Verstraete et al., 2016; Poquet et al., 2018).

Aproximadamente el 20% de los aislados de *C. difficile* obtenidos en situaciones sin brotes también producen una tercera toxina que se denomina toxina binaria (CDT) (Martin-Verstraete et al., 2016) codificada por dos genes, *cdtA* y *cdtB* que se encuentran en una región de 6.2 kb conocido como el locus de CDT (CdtLoc) separado de PaLoc. CDT es capaz de actuar sobre los microtúbulos de las células intestinales y crear protuberancias en los bordes superiores facilitando la adhesión bacteriana (Sun et al., 2010).

CdtLoc contiene al gen regulador de respuesta *cdtR* cuya proteína CdtR se une a la región promotora de *cdtA* regulando directamente la formación de CDT (Carter et al., 2007).

5.2. Biopelícula de *C. difficile*

Las biopelículas son la principal forma de crecimiento bacteriano en la naturaleza (Davey & O'toole, 2000). Estas consisten en comunidades organizadas de bacterias de una o de múltiples especies creciendo sobre una superficie abiótica o biótica, envueltas en una matriz extracelular (Davey & O'toole, 2000; Maldarelli et al., 2016; Martínez & Vadyvaloo, 2014; Pantaléon, Véronique, Bouttier et al., 2014). Las células bacterianas dentro de la biopelícula

(sésiles) exhiben tienen una tasa de crecimiento y transcripción de genes diferente a las células libres (planctónicas) (Maldarelli et al., 2016; Soto, 2014). Los mecanismos de la formación de biopelícula varían de especie a especie (Martínez & Vadyvaloo, 2014).

La transición de células plantónicas a sésiles es desencadenada por algunos cambios ambientales. En la célula bacteriana cambia la expresión de moléculas de superficie, de factores de virulencia y el estado metabólico, permitiendo que las células adquieran propiedades que les permitan sobrevivir en condiciones desfavorables (Soto, 2014).

Se ha demostrado que *C. difficile* produce biopelícula *in vitro* (Dawson et al., 2012), y que la formación de biopelícula es variable según la cepa (Monot et al., 2018). Se ha reportado que de 37 cepas estudiadas, 48.5% fueron productoras débiles, 21.5% productoras moderadas y 30% productoras fuertes (Monot et al., 2018).

C. difficile es capaz de formar biopelícula monoespecie o con otras especies de la microbiota. En un modelo de infección en murino monoespecie se evidenció que las células bacterianas se distribuyen heterogéneamente en el tejido intestinal predominando en colon y ciego, formando estructuras 3-D dentro o fuera de la capa de moco sin entrar en contacto con las células epiteliales. En la biopelícula de la cepa *C. difficile* R20291, se detectó la presencia del polisacárido, el cual es un componente esencial de la biopelícula formada *in vitro* (Soavelomandroso et al., 2017). También se encontró que no hay correlación entre la cepa, la sintomatología durante la infección y la habilidad de formación de biopelícula (Monot et al., 2018).

5.2.1. Composición de la biopelícula

La biopelícula de *C. difficile* está conformada por varias capas. Las células plantónicas están encerradas en una matriz gruesa compuesta de proteínas bacterianas (Véronique Pantaléon et al., 2015), ADN extracelular (eDNA) y polisacárido ; sin embargo (Đapa et al., 2013; Frost et al., 2021), es bien sabido que la composición y estructura de las biopelículas son dependientes del tiempo (Dawson et al., 2012), la cepa (Dawson et al., 2012; Monot et al., 2018) y el medio (Semenyuk et al., 2014; Timmaraju et al., 2013).

Luego de un día de incubación, se identifican regiones con alta proliferación bacteriana y detritus celulares en la biopelícula, así como colonias pequeñas distantes. A los 3 días, se observan células en forma de bastón, restos celulares y células ovoides compatibles por microscopia de contraste de fases con esporas (Semenyuk et al., 2014). A los 6 días, la mayoría de las células se han convertido en esporas y se encuentran regiones aisladas de células vegetativas (Semenyuk et al., 2014). El grosor de la biopelícula aumenta cada día y el contenido de la matriz aumenta proporcionalmente. (Timmaraju et al., 2013)

5.2.2. Etapas de la formación de biopelícula en *C. difficile*

5.2.2.1. Adhesión bacteriana

El primer paso para la formación de biopelícula consiste en la adhesión bacteriana reversible o irreversible a una superficie y posteriormente adhesión entre las células planctónicas. Este proceso requiere la participación de múltiples factores como el flagelo, pili tipo IV (T4P), las fimbrias y las proteínas de superficie. La importancia de estos factores en la producción de biopelícula varía según la especie bacteriana (Schulze et al., 2021).

Después de la unión inicial, las bacterias se multiplican para formar agregados microcoloniales y se comunican entre ellas mediante el *quorum sensing*, el cual es clave para la formación de biopelícula (Martínez & Vadyvaloo, 2014). La transición a esta etapa coincide con la disminución en la expresión del gen del flagelo (*fliC*) y la producción de componentes de matriz extracelular (Rumbaugh & Sauer, 2020).

5.2.2.2. Maduración

En la etapa de maduración, las células crecen en capas y producen una matriz externa compuesta por sustancias poliméricas extracelulares (EPS) (Martínez & Vadyvaloo, 2014) como polisacáridos, eDNA, lípidos y proteínas (Beitelshees et al., 2018; Poquet et al., 2018). La presencia de EPS es un marcador de madurez estructural (Martínez & Vadyvaloo, 2014) y forma los microcanales por los cuales el fluido y los nutrientes pueden moverse y distribuirse a lo largo de la estructura 3-D de la biopelícula.

Esta estructura provoca que las células estén expuestas a diferentes concentraciones de nutrientes, gases y antibióticos, dependiendo de su ubicación dentro de la biopelícula, lo que

favorece la presencia de diferentes fenotipos (Beitelshees et al., 2018; Stewart & Franklin, 2008) y es responsable de la especialización en tareas de las células en la biopelícula (Stewart & Franklin, 2008).

5.2.2.3. Separación y dispersión

El ciclo de vida de las biopelículas se completa cuando las biopelículas se dispersan (Rumbaugh & Sauer, 2020). En esta etapa, algunas de las células planctónicas de la comunidad sésil pueden liberarse, multiplicarse y se dispersan para colonizar nuevas superficies. El incremento o disminución de los nutrientes en el medio, la concentración de oxígeno, el *quorum sensing* y los niveles del monofosfato dimérico cíclico de la guanosina (c-di-GMP) funcionan como determinantes para el cambio de fenotipo (Martínez & Vadyvaloo, 2014).

Entre los factores que influyen en el desprendimiento de la biopelícula se encuentran la síntesis de enzimas que degradan exopolisacárido (EPS) y las proteínas de unión a la superficie de la matriz de la biopelícula, el aumento de expresión de genes encargados de la inducción de la motilidad, la producción de surfactante, la lisis celular, el cizallamiento hidráulico, el desprendimiento y la erosión (Martínez & Vadyvaloo, 2014).

5.3. Reguladores de la formación de biopelícula

Existen varios reguladores de la formación de biopelículas, como el diguanilato cíclico (c-di-GMP), un segundo mensajero utilizado en la transducción de señales (Dawson et al., 2021; Garrett et al., 2019; Mckee et al., 2018), la chaperona Hfq (Frost et al., 2021), y la proteína represora de la transcripción LexA (Vuotto et al., 2018a).

c-di-GMP. c-di-GMP está implicado en el control de diversas funciones celulares, incluida la virulencia, la motilidad y la adhesión. Además, es el elemento central en la regulación postranscripcional de la formación de biopelícula al controlar el cambio del estilo de vida planctónico móvil al estado de formación de biopelícula sésil. Los niveles intracelulares elevados de c-di-GMP promueven la síntesis de exopolisacáridos y mejoran la

autoagregación y la adhesión a la superficie que conduce a la formación de biopelícula (Vuotto et al., 2018a).

La expresión homóloga o heteróloga de CD1420 (*dccA*) que codifica para la enzima diguanilato ciclasa A, en la cepa *C. difficile* 630 aumenta los niveles de c-di-GMP e induce la formación de la biopelícula (Poquet et al., 2018). En algunas especies bacterianas, c-di-GMP controla la transcripción y la traducción de muchos genes uniéndose a mRNA (riboswiches) (Poquet et al., 2018).

Hfq. Hfq es una proteína chaperona que ayuda a la unión de sRNA a los mRNA. En bacterias mutantes tiene efectos pleiotrópicos incrementando la sensibilidad a agentes estresores, incrementando la formación de biopelícula o reduciendo la virulencia (Martínez & Vadyvaloo, 2014). Se ha observado que la disminución de Hfq en *C. difficile* se asocia al incremento de la producción de biopelícula, lo que sugiere que es un regulador negativo de su formación (Martínez & Vadyvaloo, 2014).

LexA. LexA es la proteína reguladora del sistema SOS de respuesta a daño en el ADN, presenta actividad de represor transcripcional, y requiere activación de la proteína recombinasa RecA⁴⁵ (Vuotto et al., 2018a). La cepa de *C. difficile* 630 mutante al gen *lexA* presenta disminución en la esporulación, en la motilidad natatoria, mayor sensibilidad al metronidazol y formación de biopelícula disminuida (Vuotto et al., 2018a), por lo que se considera un regulador negativo de la producción de biopelícula (Martin-Verstraete et al., 2016; Vuotto et al., 2018a).

5.4. Factores de virulencia asociados a la producción de biopelícula de *C. difficile*

5.4.1. Proteínas de adhesión

C. difficile tiene proteínas que median la adhesión bacteriana a las células huésped y ayudan a la colonización y formación de la biopelícula (Pantaléon et al., 2015). La mayoría están dentro de la familia de proteínas de la pared celular (Cwp) que comprende 29 miembros como las proteínas SlpA, las adhesinas Cwp2 y Cwp66 y la proteasa Cwp84 (Timmaraju et al., 2013).

La proteína precursora de SlpA es escindida por la proteasa Cwp84 en dos subunidades, una de alto peso molecular (HMW-SLP o P47) y otro de bajo peso molecular (LMW-SLP o P36). Posteriormente se ensamblan para formar una capa paracrística (capa- S) que envuelve la superficie bacteriana y sirve como ancla para otras 28 proteínas a través de los dominios de la proteína CWB2 (Vuotto et al., 2018b).

slpA es un gen esencial, por lo que no es posible la construcción de mutantes para el gen *slpA*. Para elucidar su participación en la formación de biopelícula, se han construido cepas que expresan diferentes alelos de *slpA*, y se ha encontrado que la capacidad para producir biopelículas no se afecta con los diferentes alelos (Pantaléon et al., 2015).

La proteasa Cwp84 presenta una región catalítica compuesta por tres aminoácidos, el remplazo de los aminoácidos C116 (cisteína) y H262 (histidina) por alanina que elimina su actividad de proteasa (Pantaléon et al., 2015). Además de escindir a SlpA (Đapa et al., 2013) puede escindir a la fibronectina, laminina y vitronectina, componentes de la matriz extracelular en los eucariotas (Pantaléon et al., 2015) ayudando a la colonización del intestino grueso.

En las cepas mutantes del gen *cwp84*, SlpA es incapaz de anclarse a la pared celular, lo que ocasiona retención deficiente de otras proteínas (Vuotto et al., 2018b). Los efectos en la biopelícula dependen de la cepa, en el caso de la cepa de *C. difficile* R20291, mutante hay reducción en la formación de biopelícula (Timmaraju et al., 2013), mientras que para la cepa de *C. difficile* 630Δerm mutante hay un aumento en dos órdenes de magnitud en la cantidad de biomasa comparada con la cepa no mutante, además la biopelícula formada es densa y gruesa. (Pantaléon et al., 2015).

5.4.2. Quorum sensing

El *quorum sensing* regula la densidad celular mediante la producción de moléculas de señalización llamadas autoinductores (AI) que activan la maduración y el ensamblaje de la biopelícula de manera coordinada. La célula bacteriana detecta el aumento del AI y activa

una cascada de señalización que altera la expresión de genes. La AI-2 es sintetizada por LuxS, y esta vía de señalización puede funcionar como comunicación intra e interespecie (Martínez & Vadyvaloo, 2014).

C. difficile codifica a un homólogo de luxS y produce una molécula activa de AI-2 (Lee & Song, 2005). Se desconoce la vía mediante la cual AI-2 induce la formación de biopelícula (Timmaraju et al., 2013).

Otra vía de síntesis de AI es mediante el péptido precursor AgrD, y AgrB, que es una endopeptidasa transmembranal involucrada en el procesamiento y exportación de AI. La acumulación de concentraciones extracelulares de AI activa un sistema de dos componentes, al unirse al sensor histidina quinasa AgrC, que a su vez modula la actividad del regulador de respuesta AgrA. La mayoría de las cepas de *C. difficile* contienen un locus *agr* incompleto que contiene *agrDB* y se denomina locus *agr1*, además de *agr1*, está presente un operón *agrACBD* completo (locus *agr2*) en el genoma de *C. difficile* R20291 y en el genoma de algunas cepas clínicas (Martin-Verstraete et al., 2016).

5.4.3. Sistema toxina-antitoxina

Una forma de explicar la presencia de ADN y detritos celulares, en la matriz de la biopelícula es la expresión diferencial de los sistemas toxina-antitoxina (TA). Estos sistemas comprenden una toxina estable que es intracelular, que solo afecta a procesos esenciales y una toxina inestable que secuestra el efecto de la toxina. (Wen et al., 2014). Se ha sugerido que los sistemas de TA podrían regular la muerte celular y la formación de células persistentes (Gil et al., 2015).

En los sistemas TA de tipo I, la antitoxina es un pequeño ARN antisentido que se empareja con el ARNm que codifica la toxina, alterando su estabilidad y / o traducción (Maikova et al., 2018). Recientemente se han identificado más de diez módulos TA funcionales de tipo I en la cepa 630, algunos módulos TA están asociados con matrices CRISPR- Cas para la defensa contra ácidos nucleicos extraños y otros están ubicados dentro de regiones profago (Maikova et al., 2018). Además, los sistemas TA de tipo 1 que se han asociado a la replicación, la transcripción y la traducción pueden inhibirse lo que podría

conducir a la estasis del crecimiento, la persistencia o incluso la muerte celular (Maikova et al., 2018).

El único sistema TA tipo II identificado en *C. difficile* es MazEF (Rothenbacher et al., 2012). Este sistema está bajo el control del factor sigma E (SigE), el cual es fundamental en los estados iniciales de la esporulación (Gil et al., 2015). La detención del crecimiento causado por MazF (gen CD3461), se limita por la expresión de su antitoxina MazE (gen CD3462) (Rothenbacher et al., 2012). MazF es una endoribonucleasa que solo escinde moléculas de ARNm que presentan secuencias UACAU, ya que en *E. coli* los genes *lon* y *clpC* (Rothenbacher et al., 2012), que codifican la proteasa Lon ATP dependiente y la subunidad ATPasa de la serina proteasa Clp, regulan a MazF. Se ha propuesto que podría funcionar de la misma forma para *C. difficile* (Rothenbacher et al., 2012). La mutación de mazEF en *E. coli* resultó en una disminución prominente en la formación de biopelículas (Wen et al., 2014).

5.4.4. Esporulación

El regulador maestro de la esporulación de *C. difficile* es *spo0A*, el cual codifica para la proteína Spo0A y podría actuar como regulador de vías producción de toxinas, formación de matriz, canibalismo y producción de biopelícula (Dapa & Unnikrishnan, 2013; Deakin et al., 2012). La esporulación se coordina mediante la fosforilación postraduccional de Spo0A (Spo0A-P) (Dawson et al., 2012) y regula los factores sigma de la ARN polimerasa específicos de la esporulación, especialmente para σE , σF , σG y σK (Zhu et al., 2018). Algunos estímulos ambientales e.g., la privación de nutrientes o la detección de *quorum sensing*, podrían desencadenar la esporulación de *C. difficile*.

Por otro lado, las proteínas censoras a nutrientes CodY y CcpA son reguladores negativos de la esporulación (Edwards et al., 2014). Entre los genes que regula CodY se encuentran los genes involucrados en la formación de esporas como *spo0A*, *rapA*, *rapC*, *rapE* (Edwards et al., 2014). La variabilidad de la regulación dependiente de CodY es un factor importante que contribuye a la virulencia y la esporulación en los aislados epidémicos actuales (Edwards et al., 2014; Zhu et al., 2018).

5.4.5. Germinación

Para que las esporas de *C. difficile* pasen del estado de espora al estado de célula plantónica se requiere la hidrólisis de la capa de peptidoglicano que envuelve a la espora, para restaurar el contenido de agua, expandir el núcleo y activar el metabolismo (Burns et al., 2010). El primer paso es la unión de germinantes a las proteínas tipo serina proteasa similar a subtilina (Csp) codificadas en el locus *cspBAC*, Donde se encuentran los genes *cspBA* y *cspC* que codifican para las proteínas CspBA y CspC que son reguladores clave de la transducción de señales de la germinación (Lawler et al., 2020).

CspBA es una proteína que requiere la división interdominio por la proteasa YabG durante la formación de esporas. Se ha propuesto que CspBA estabiliza a CspC durante la esporulación y maduración de la espora (Lawler et al., 2020).

Una vez dividida CspBA, la proteína CspA funciona como receptor a aminoácidos y calcio mientras CspC funciona como receptor a sales biliares, además de activar y regular, transmite la señal a través de interacciones proteína-proteína a CspB. Ésta es la única Csp que tiene actividad catalítica (Lawler et al., 2020).

CspA activada escinde la región N-terminal de la proteína proSleC para producir la enzima lítica de la corteza SleC, la cual degrada el peptidoglucano especializado de la corteza, liberando el almacén de calcio-ácido dipicolínico y produciendo la rehidratación del núcleo de la espora. Además, YabG regula y procesa a preproSleC a proSleC (Lawler et al., 2020).

GerG regula la incorporación de CspA, CspB, CspC en las esporas maduras para la germinación, en su ausencia se inhibe la hidrólisis del peptidoglicano y bajan los niveles de Csp (Lawler et al., 2020).

GerS modifica al peptidoglucano de la pared regulando la unión de SleC, las cepas mutantes a *gerS* son incapaces de degradar la corteza y completar la germinación además de

que son incapaces de producir la enfermedad en un modelo de infección de hámster (Lawler et al., 2020).

ANTECEDENTES

1. Infección recurrente por *C. difficile*

Dentro de las primeras 8 semanas de la resolución de los síntomas de la ICD, del 10-30% de los pacientes desarrollan nuevamente el cuadro clínico de infección, a lo que se conoce como ICD recurrente (ICD- R) (Cho et al., 2020). El riesgo de recurrencia aumenta con cada recurrencia sucesiva del 40 al 65% (McDonald et al., 2018; Surawicz et al., 2013).

Los episodios clínicos recurrentes pueden clasificarse como recaída, cuando se debe a la cepa original, o reinfección, cuando es causada por una cepa recién adquirida. La secuenciación de genoma completo en pacientes con ICD-R demostró que el 70 al 81% se debe a la misma cepa y el 15 al 30% se debe a una cepa distinta (Eyre et al., 2014; Mac Aogáin et al., 2015).

Los factores de riesgo de la ICD-R son la edad (>65 años), enfermedad grave o fulminante, el uso de antibioticoterapia después de completar la terapia para ICD, antiácidos (Allegretti et al., 2020; Garey et al., 2008; Hu et al., 2009), inmunosupresión (Rounds & Strain, 2017) infección por *C. difficile* con RT012 (Krutova et al., 2017), RT078 o RT244 (Rounds & Strain, 2017), niveles de albúmina sérica <2.5 g/dL (Abou Chakra et al., 2014; Shakov et al., 2011) y algunas comorbilidades como insuficiencia renal crónica, diabetes y cirugía abdominal previa (Abou Chakra et al., 2014; McFarland et al., 2002). La infección con RT027 es un factor independiente predictor de ICD-R (OR, 2,17; IC 95%; P = 0,002) (Abou et al., 2014; Marsh et al., 2012; Krishna, Higgins, 2018). Es probable que otros ribotipos recurran RT001 (Magnusson et al., 2013), RT106 (Neely et al., 2017), RT017 and 018 (Hung et al., 2016), pero no existe una asociación clara.

La esporulación y el crecimiento de biopelículas se han asociado a ICD-R (Castro-Córdova et al., 2021; Normington et al., 2021), y recientemente se han reportado cambios en el genoma de *C. difficile* de cepas asociadas a recurrencia (Kulecka et al., 2021).

1.2. Cambios en el genoma de las cepas de *C. difficile* asociadas a recurrencia

A partir de secuenciación de genoma completo de 36 aislamientos asociados a ICD-NR y 98 asociados a ICD-R de pacientes oncológicos se encontró en el análisis de enriquecimiento de conjunto de genes 7 grupos enriquecidos que funcionaron como predictores de la recurrencia, estos grupos pertenecen a las vías asociadas al metabolismo como fosforilación oxidativa, metabolismo del carbono, metabolismo microbiano en diversos ambientes y ácido 2- oxocarboxílico (Kulecka et al., 2021), por lo que la recurrencia podría estar relacionada con un metabolismo alterado y el uso de vías alternativas de producción de energía por *C. difficile* (Janoir et al., 2013; Kulecka et al., 2021).

1.3. Las esporas y la infección por *C. difficile* recurrente

En el caso de la esporulación, las cepas mutantes 630 $\Delta spo0A$ y R20291 $\Delta spo0A$ muestran un fenotipo asporógeno (Deakin et al., 2012). Los ratones infectados con cepas mutantes *spo0A* tratados con vancomicina oral no presentaron ICD-R durante los 100 días de seguimiento, mientras que los ratones tratados con cepas no mutantes desarrollaron ICD-R a los 3 días de suspensión antibiótica, por lo que las esporas actúan como factor de persistencia, permitiendo que *C. difficile* permanezca en el ambiente y generan un reservorio de infección cuando se suspende la antibioticoterapia (Deakin et al., 2012). Recientemente, se descubrió que la proteína BclA3 del exosporium de las esporas que forma las estructuras similares a cabellos (Tipo hair-like) de *C. difficile* R20291 se une a la fibronectina y vitronectina del huésped para ser internalizadas en los colonocitos a través de la unión a las subunidades de las integrinas a fibronectina- $\alpha 5\beta 1$ y vitronectina- $\alpha v\beta 1$ (Castro-Córdova et al., 2021). La administración de un inhibidor de la internalización de esporas de *C. difficile* como la nistatina durante el tratamiento con vancomicina retrasa la aparición de ICD-R (Castro-Córdova et al., 2021).

Una de las posibles explicaciones del mayor riesgo de desarrollar ICD-R con la infección por *C. difficile* BI/NAP1/027 (Marsh et al., 2012) se debe a la mayor tasa de esporulación (Merrigan et al., 2010), sin embargo, existen evidencias contradictorias sobre su mayor capacidad de esporulación (Burns et al., 2011).

1.4. La biopelícula en la infección recurrente por *C. difficile*

Diversos factores de virulencia como la producción de biopelícula, esporulación, *quórum sensing* y las proteínas de adhesión se ha propuesto que tienen un papel en la ICD-R. Existen

pocos estudios acerca de la implicación de la biopelícula de *C. difficile* en la ICD- R, en un modelo *in vitro* de biopelícula en un triple quimiostato, se observó que la biopelícula de *C. difficile* protege a las esporas del tratamiento con vancomicina y su germinación es la responsable de la recurrencia o el establecimiento de un cuadro de ICD en un modelo sano (Normington et al., 2021). Otra forma en la que la biopelícula de *C. difficile* favorece el establecimiento de un reservorio de esporas y células vegetativas es brindando protección contra los antibióticos aumentando de 100 y 20 veces el CMI de vancomicina y linezolid (Tijerina-Rodríguez et al., 2019). Además la protección que brinda la estructura de la biopelícula dificulta la entrada de antibióticos y favorece la formación de células persistentes (Fisher et al., 2017), así como el intercambio de genes de resistencia terapéutica a través de plásmidos, además actúa por sí mismo como fuente de recurrencia (Normington et al., 2021).

Se han encontrado en muestras aisladas de pacientes con ICD-R en un modelo de biopelícula de 7 días, de varios ribotipos, aumentó de la expresión de los genes de la vía de esporulación (*sigH*, *spo0A*), detección de quórum (*agrDI*) y genes asociados a la adhesión (*cwp84*) (Tijerina-Rodríguez et al., 2019), así como mayor esporulación en la cepa asociada a ICD-R en comparación con la cepa asociada ICD-NR (5 log₁₀ CFU/biopelícula frente a 3,85 log₁₀ CFU/biopelícula; p = 0,015) (Tijerina-Rodríguez et al., 2019).

En este trabajo se cuantificó la producción de biopelícula y se analizó el perfil transcriptómico en un modelo de biopelícula en las cepas de los ribotipos más comunes en México, RT001 y 027 asociadas a ICD-NR e ICD-R con el fin de determinar las diferencias en la producción de biopelícula y en la expresión de genes en las cepas asociadas a ICD-R.

JUSTIFICACIÓN

La infección por *C. difficile* (ICD) es la causa más común de diarrea nosocomial en todo el mundo y su recurrencia se presenta en el 30% de los casos, con un aumento al 65% de los casos en la segunda y tercera recurrencia. Además, la recurrencia de la infección aumenta el riesgo de severidad.

Varios factores de virulencia de *C. difficile* se han asociado a la recurrencia de la infección, tales como la producción de toxinas, la esporulación y especialmente la formación de biopelícula. Sin embargo, se desconocen los cambios en la expresión genética que ocurren en la biopelícula en cepas de *C. difficile* asociadas a recurrencia que pudieran ayudar a la prevención, pronóstico, diagnóstico y tratamiento de la recurrencia.

HIPÓTESIS

La expresión genética en la producción de biopelícula difiere entre las cepas de *Clostridioides difficile* asociadas y no asociadas a infección recurrente en los ribotipos 027 y 001.

OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar el perfil transcriptómico en un modelo de biopelícula *in vitro* de *C. difficile* en los ribotipos 027 y 001 asociados a infección recurrente.

Objetivos específicos

1. Determinar la producción de biopelícula de cepas de *C. difficile* asociadas a infección recurrente en los ribotipos 027 y 001 a los días 1 y 3 de crecimiento.
2. Analizar el transcriptoma de un modelo de biopelícula *in vitro* de *C. difficile* al día 1 y 3 de crecimiento.
3. Validar genes expresados diferencialmente en la biopelícula de cepas asociadas y no asociadas a recurrencia en los ribotipos 027 y 001.

ESTRATEGIA GENERAL

Estrategia General

- Análisis previo**
- **Confirmación de la identificación**
 - MALDI- TOFF
 - **Confirmación del ribotipo**
 - Extracción del ADN
 - PCR punto final
 - Electroforesis en gel de agarosa al 3%

- Modelo de biopelícula**
- Biopelícula de 1 día
 - Tinción con cristal violeta
 - DO_{595nm}
 - Clasificación de la producción de biopelícula
 - **Biopelícula de 3 días**
 - Tinción con cristal violeta
 - DO_{595nm}
 - Clasificación de la producción de biopelícula

- Transcriptómica a partir de un modelo de biopelícula**
- Diseño del microarreglo
 - Extracción de ARN
 - Ligamiento a Cy3, amplificación y síntesis del ARNc
 - Purificación del ARNc y mezcla de las cepas
 - Hibridación y lavado de los microarreglos
 - Análisis bioinformático
 - Análisis estadístico

- Validación de los resultados por RTqPCR**
- Diseño de cebadores
 - Retrotranscripción de los pools
 - Estandarización de la qPCR
 - Cálculo de la expresión relativa
 - Análisis estadístico

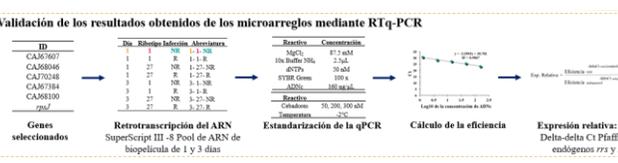
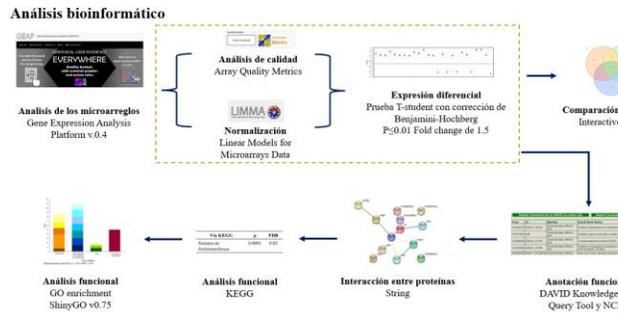
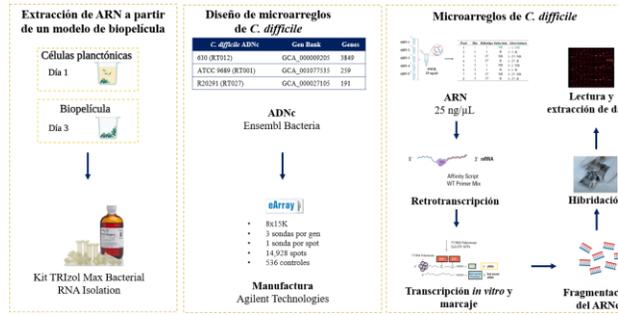
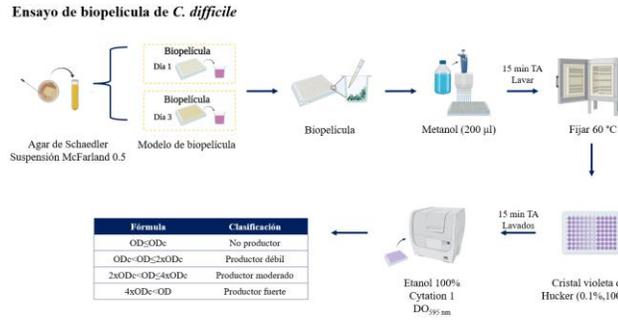
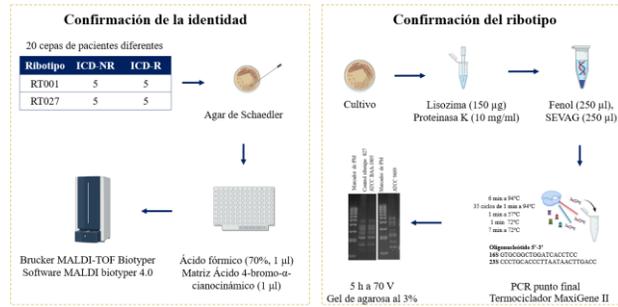


Figura 3. Estrategia general. Resumen de la metodología principal realizada en el presente proyecto.

MATERIAL Y MÉTODO

1. Selección y activación de las cepas

A partir del cepario del laboratorio se seleccionaron cinco cepas asociadas y cinco no asociada a infección recurrente de cada uno de los siguientes ribotipos 001 y 027. Las cepas se inocularon en medio de infusión cerebro corazón (MCD LAB, Oaxaca, México) suplementado con extracto de levadura (0.5%) (MCD LAB, Edo. De México, México) y L-cisteína (0.1%) (Sigma Aldrich, Misuri, E. U. A.) (BHIS) a 37 °C en anaerobiosis con bolsas GasPak EZ Anaerobe Gas Generating Pouch System with Indicator (Becton, Dickinson and Company, Dublin, Irlanda) (Roberts & Mullany, 2016).

2. Identificación mediante espectrometría de masas

De cada cepa, a partir de un cultivo en placa de agar Schaedler (ASHD) (Becton, Dickinson and Company, Francia) de 48 h a 37°C en anaerobiosis, se tomó 1 colonia y se colocó con un aplicador de madera en un pocillo de una placa de acero inoxidable del equipo. Posteriormente se añadió 1 µl de ácido fórmico al 70% (v/v) a cada pocillo y se dejó secar completamente a temperatura ambiente. Una vez seco, se adiciono 1 µl de la matriz HCCA (ácido 4-bromo- α -cianocinámico) y se dejó secar a temperatura ambiente. La placa se introdujo en el equipo Bruker MALDI-TOF Biotyper (Bruker Daltonics GmbH & Co. KG, Bremen, Alemania), se controló mediante el software flexControl 3.4 y se analizó mediante el software MALDI biotyper 4.0 y se compararon los espectros de proteínas de los aislamientos con la base de datos del equipo, únicamente se tomó en cuenta las identificaciones con puntuación mayor a ≥ 2.000 (Almogbel, 2016; Li et al., 2019).

3. Extracción de ADN para ribotipificación

Los aislamientos se sembraron en placas de ASHD y se incubaron a 37°C por 48 h. Posteriormente se realizó una suspensión bacteriana en un microtubo con 200 µl de Tris-HCl 100 mM (Bio Basic, Nuevo León, México) más 150 µg de lisozima (Biotech, Bio Basic, Inc., Ontario, Canadá). La suspensión se incubó en baño de agua a 37°C durante al menos 16 h. Posteriormente se añadieron 6 µl de proteinasa K (10 mg/ml) (Bioline, Londres, UK), 200 µl de TE y sodio dodecilsulfato (SDS) al 1% (Sigma Aldrich, Misuri, E. U. A.) y se incubó a

55°C por 3 h. Para la extracción de ADN se añadió 250 µl de fenol saturado, 250 µl de SEVAG y 100 µl de TE 1X; se agitó vigorosamente por 5 min. La fase acuosa y la fase orgánica fueron separadas mediante centrifugación durante 8 min a 14000 rpm; una vez separadas, la fase acuosa fue transferida a un nuevo vial y se midió el volumen recuperado para añadir 2.33 volúmenes de etanol absoluto a 4°C. Para la precipitación del ADN se incubó a -20°C por una hora. Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm por 5 min y se decantó el sobrenadante cuidando de no desprender la pastilla de ADN. Se realizaron dos lavados de la pastilla con etanol al 70 %; finalmente, se dejaron secar a temperatura ambiente durante 1 h. Una vez seco, se disolvió en 50 µl de TE 1X y se calentó a 65°C por 15 min en baño de agua antes de utilizarse.

3.1. Ribotipificación de *C. difficile*

A partir del ADN genómico obtenido mediante lisis enzimática, se realizó la amplificación de los genes 23S y 16S del RNAr mediante la técnica de PCR. Las reacciones de amplificación fueron realizadas de acuerdo con el método descrito por Bidet (Bidet & Petit, 1999). El volumen total fue de 25 µL constituido por 100 ng/µL de DNA, 3mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, buffer 1X (NH₄ 1X pH 8.8), 1U de Taq polimerasa (Bioline, USA Inc., Boston, MA, E.U.A.) y 0.1 µM para cada uno de los oligonucleótidos para las subunidades 16S y 23S (Tabla 1) del RNA ribosomal, se utilizó el termociclador MaxiGene II (Applied Biosystems, California, E.U.A) con las siguientes condiciones: 6 min a 94°C, 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 57°C, 1 min a 72°C y una extensión final de 7 min a 72°C. Los productos obtenidos de la amplificación fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa de 3% teñido con SYBR safe DNA gel stain 10,000 X con 5 µL por cada 50 mL (Thermo Fisher Scientific, E.U.A.) durante 8 h a 70 V. Posteriormente fueron analizados en el fotodocumentador ChemiDoc XRS+ (BioRad, E.U.A), con el software Image Lab., el ribotipo para cada uno de los aislamientos de determinó mediante por coincidencia con el patrón de bandas de los ribotipos de las cepas control *C. difficile* ATCC BAA-1805 (ribotipo 027) y *C. difficile* ATCC 9689 (ribotipo 001).

Tabla 1. Oligonucleótidos para la amplificación de la región espaciadora intergénica entre los genes 16S y 23S rRNA.

Oligonucleótido	5'-3'	Referencia
16S	GTGCGGCTGGATCACCTCCT	(Bidet & Petit, 1999)
23S	CCCTGCACCCTTAATAACTTGACC	(Bidet & Petit, 1999)

4. Modelo de biopelícula de *C. difficile*

Los ensayos de biopelícula fueron realizados de acuerdo a lo reportado anteriormente por Dawson *et al.* con algunas modificaciones (Dawson et al., 2012). Se evaluó la biopelícula a 1 y 3 días de crecimiento.

A partir de crecimiento en placas de ASHD de 1 y 3 días de incubación, se prepararon suspensiones con turbidez ajustada al tubo 0.5 del nefelómetro de McFarland en solución salina al 0.9%. Se usó un nefelómetro PhoenixSpec (Becton, Dickinson and Company, E. U. A.) para la medición.

A continuación, se realizó una dilución 1:10 en caldo BHIS fresco. Cada pocillo fue inoculado por 200 µl de la dilución final en una microplaca de 96 pocillos (Sarstedt, Nübrecht, Alemania), hasta obtener ocho réplicas por cepa, incluyendo 8 pocillos de caldo BHIS estéril como blanco. Después de la incubación, se tomó el sobrenadante cuidadosamente de cada pocillo, posteriormente la biopelícula fue fijada con 200 µl de metanol y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el metanol con una pipeta multicanal y se realizaron tres lavados con 200 µl de agua destilada estéril. Finalmente, la biopelícula se fijó y seco durante 1 hora en un horno a 60 °C. Las biopelículas se tiñeron con 100 µl de cristal violeta de Hucker al 0.1% (CTR scientific, Nuevo León, México) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el colorante, se realizaron tres lavados con 200 µl de agua destilada estéril y se dejó secar a temperatura ambiente durante toda la noche. Para remover el exceso de cristal violeta, se agregaron 100 µl etanol al 99% (Sigma Aldrich, Francia) por 30 min. Finalmente, se midió la densidad óptica a longitud de onda de

595 nm (DO₅₉₅) en un Lector Multi-Modal con Captura de Imágenes Celulares Cytation 1 (BioTek Instruments, Inc., Vermont, E. U. A.).

Se utilizaron las fórmulas señaladas en la Tabla 2, la producción de biopelícula de las bacterias se clasificó como productores fuertes, moderados, débiles y no productores de biopelícula (Vukovic et al., 2007). Las cepas *C. difficile* ATCC BAA-1805 (ribotipo 027 y fuerte productor de biopelícula) y *C. difficile* ATCC 9689 (ribotipo 001 y débil productor de biopelícula) se usaron como controles.

Tabla 2. Formulas utilizadas para la clasificación de las cepas según la formación de biopelícula.

Fórmula	Clasificación
$OD \leq OD_c$	No productor
$OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$	Productor débil
$2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$	Productor moderado
$4 \times OD_c < OD$	Productor fuerte

5. Determinación de la transcriptómica mediante microarreglos

5.1. Extracción de ARN a partir de un modelo de biopelícula

Para los días 1 y 3, se realizaron suspensiones al 0.5 McFarland con un nefelómetro PhoenixSpec (Becton, Dickinson and Company, E. U. A.) en solución salina al 0.9% a partir de placas de ASHD de 7 días de incubación. A continuación, se realizó una dilución 1:10 en caldo BHIS fresco. Cada pocillo fue inoculado por 200 μ L de la dilución final en una microplaca de 96 pocillos, hasta obtener ocho replicas por cepa, incluyendo 8 pocillos de caldo BHIS estéril como blanco. Las placas fueron selladas con parafilm y se incubaron durante 1 y 3 días a 37°C en atmósfera de anaerobiosis para realizar la extracción de RNA del modelo de biopelícula. Para el día 1, únicamente se tomaron las células planctónicas, se centrifugaron 800 μ L de medio con células planctónicas a 14000 rpm a 4 °C durante 5 min y posteriormente se realizó la extracción de ARN.

Después de la incubación en microplaca durante 3 días, se retiraron las células planctónicas y se realizó un lavado con agua Milli-Q, posteriormente la biopelícula se recuperó agregando 100 μ L de Tris-HCl 10 mM pH 8 a cada pocillo, se resuspendió mezclando suavemente, y posteriormente el total se centrifugó 14000 rpm durante 5 min.

Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 200 μL de buffer Tris-HCl 10 mM pH 8 más 4 μL de una solución de lisozima a 50 mg/L, se agitó en vórtex y se incubó durante 1 hora en baño de agua a 37°C; después de la incubación, se agregaron 6 μL de proteinasa K a 10 mg/L y se incubó a 55°C por una hora. Se decantó el sobrenadante y se adicionaron 200 μL de Max Bacterial Enhancement Reagent a 95 °C del kit Trizol Max Bacterial RNA Isolation (Thermo Fisher Scientific, MA, E. U. A) y se incubó a 4°C. Posteriormente se agregó 1 mL de Trizol (Invitrogen, E. U. A.) y se agito vigorosamente, se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Para realizar la separación de las fases se adiciono 0.2 mL de cloroformo (Sigma Aldrich, Misuri, E. U. A.) y se agitó vigorosamente durante 15 segundos, se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos. Se centrifugaron a 14,000 rpm x 15 minutos a 4 °C. Se transfirieron 400 μL de la fase acuosa a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y se adicionaron 500 μL de isopropanol a 4 °C, se mezcló invirtiendo el tubo y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se centrifugó a 14,000 rpm por 10 minutos a 4 °C, se removió el sobrenadante y se conservó el botón de ARN. Se lavo con 1 mL de etanol al 75% y se mezcló con vórtex. Finalmente se centrifugo a 10,000 rpm por 5 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente. Se resuspendió el botón en 50 μL de agua libre de ARNasas y se incubo a 60 °C por 10 minutos.

Se determinó la cantidad y calidad del ARN total por espectrofotometría en el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU.) midiendo la relación de absorbancias a 260/280 y empleando la siguiente fórmula:

$$[\text{ARN}] = A_{260} \times \text{factor de dilución} \times 40 \mu\text{g/mL para establecer el rendimiento}$$

5.2. Etiquetado del ARN para los microarreglos de expresión de *C. difficile*

Se realizó la extracción de ARN como se describió previamente y diluyo hasta obtener una concentración de 50 ng/ μL .

Para preparar el Spike Mix se siguieron las instrucciones del protocolo para RNA Spike-In Kit, One-Color (Agilent Technologies, Inc., E. U. A). La solución Spike Mix se mezcló en

vórtex, se calentó a 37 ° C por 5 minutos. Se centrifugo brevemente para evitar la pérdida de reactivo en las paredes. Posteriormente se realizaron las diluciones especificadas en la Tabla 3, se utilizó el buffer de dilución, se mezcló y centrifugó brevemente en cada dilución.

Tabla 3. Diluciones del Spike Mix para el etiquetado con Cy3.

Total ARN (ng)	Diluciones seriadas				Volumen de Spike Mix para cada reacción (µL)
	1	2	3	4	
50	1:20	1:25	1:20	1:2	2

Para la reacción de etiquetado con Cyanina 3 (Cy3), se agregó 50 ng de ARN total a tubos de microcentrífuga con un volumen final máximo de 2.3 µL.

Se preparó el WT Primer MasterMix (Agilent Technologies, Inc., E. U. A) como se muestra en la Tabla 4 y se adicionaron 3 µL a la muestra de ARN, para tener un volumen final de 5.3 µL, posteriormente se desnaturalizó el templado y el cebador incubando por 10 minutos a 65 °C, todas las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador SureCycler 8800 (Agilent Technologies, Inc., E. U. A), se enfrió en hielo durante 5 minutos.

Tabla 4. Reactivos para la preparación del MasterMix WT Primer.

Componente	Volumen por reacción (µL)	Volumen para 5 reacciones (µL)	Volumen para 10 reacciones (µL)
Primer WT	1	5	10
Spike Mix diluido	2	10	20
Volumen total	3	15	30

Se precalentó el 5x First Strand Buffer (Agilent Technologies, Inc., E. U. A) a 80 ° C por 4 minutos y se agito con vórtex, se dejó a temperatura ambiente hasta su uso.

Se preparó el cDNA Master Mix (Agilent Technologies, Inc., E. U. A) antes de su uso adicionando los reactivos enlistados en la Tabla 5 y se mezclaron pipeteando suavemente, la Affinity Script RNase Block Mix (Agilent Technologies, Inc., E. U. A) se mantuvo en hielo y se agregó antes de su uso al cDNA Master Mix.

Tabla 5. Reactivos para la preparación del cDNA Master Mix.

Componente	Volumen por reacción (µL)	Volumen para 5 reacciones (µL)	Volumen para 10 reacciones (µL)
5 x First Strand Buffer	2	10	20

0.1 M DTT	1	5	10
10 mM dNTP Mix	0.5	2.5	5
Affinity Script RNase	1.2	6	12
Block Mix			
Volumen total	4.7	23.5	47

Se agregaron 4.7 μL del cDNA Master Mix a cada tubo con la muestra y el WT Primer MasterMix, para obtener un volumen final de 10 μL . Se incubó a 40 ° C por 2 horas y a 70 ° C por 15 minutos, posteriormente se incubó en hielo por 5 minutos.

El Transcription Master Mix (Agilent Technologies, Inc., E. U. A) se preparó inmediatamente antes de su uso, mezclando los componentes de la Tabla 6, pipeteando gentilmente, el reactivo T7 RNA Polymerase Blend (Agilent Technologies, Inc., E. U. A) se mantuvo en hielo y se agregó inmediatamente antes de su uso, a la mezcla.

Tabla 6. Reactivos para la preparación Transcription Master Mix.

Componente	Volumen por reacción (μL)	Volumen para 5 reacciones (μL)	Volumen para 10 reacciones (μL)
Agua libre de nucleasas	0.75	3.75	7.5
5x Transcription Buffer	3.2	16	32
0.1 M DDT	0.6	3	6
NPT Mix	1	5	10
T7 RNA Polymerase Blend	0.21	1.05	2.1
Cianina 3-CTP	0.24	1.2	2.4

Se adicionaron 6 μL del Transcription Master Mix a cada tubo con muestra y se incubaron a 40 ° C por 2 horas.

Para purificar el ARN amplificado y etiquetado se utilizó el RNeasy Mini Kit (Qiagen, Alemania). A las muestras de ARNc se adicionaron 84 μL de agua libre de nucleasas, 350 μL de Buffer RLT y 250 μL de etanol al 99% y se mezcló, posteriormente se transfirieron 700 μL de la mezcla a una columna RNeasy Mini Spin (Qiagen, Alemania) en un tubo de colección de 2 ml. Se centrifugó a 4 ° C por 30 segundos a 13,000 rpm. Se descartó el sobrenadante y posteriormente se utilizó un nuevo tubo de colección, se adicionó a la columna 500 μL de Buffer RPE (Qiagen, Alemania) y se centrifugó a 4 ° C por 60 segundos a 13,000 rpm, se descartó el filtrado. El ARNc se eluyó de la columna en un nuevo tubo de

colección con 30 µL de agua libre de Rnasas (Qiagen, Alemania) y posterior centrifugación a 4 ° C por 30 segundos a 13,000 rpm.

La cuantificación del ARNc se realizó en un Nanodrop ND- 1000 UV-VIS, en la opción de medición de microarreglos y se seleccionó ARN- 40, se obtuvieron los siguientes datos: concentración de Cy3 (pmol/µL), proporción ARN 260 nm/280 nm y la concentración del ARNc (ng/µL). Se determinó el rendimiento y la actividad específica de cada reacción con las siguientes formulas:

$$\begin{aligned} \mu\text{g de ARNc} &= (\text{Concentración de ARNc}) \times 30 \mu\text{L}(\text{Volumen de elución})/1000 \\ \text{pmol Cy3 por } \mu\text{g de ARNc} &= (\text{Concentración de Cy3})/(\text{Concentración de ARNc}) \times 1000 \end{aligned}$$

El rendimiento esperado fue de 0.825 µg y la actividad específica (pmol Cy3 por µg de ARNc) de 15, las muestras que no cumplieron con los parámetros se procesaron nuevamente.

5.2.1. Mezclas de ARNc

A partir del ARNc purificado se tomaron concentraciones iguales de cada cepa, de cada ribotipo asociadas y no asociadas a ICD-R, para obtener mezclas con la concentración final de 600 ng. En la Tabla 7 se resumen las mezclas y la nomenclatura utilizada.

Tabla 7. Mezclas de ARNc purificado por cada condición.

Mezcla	Día	Ribotipo	Infección	Abreviatura
1	1	1	NR	1- 1- NR
2	1	1	R	1- 1- R
3	1	27	NR	1- 27- NR
4	1	27	R	1- 27- R
5	3	1	NR	3- 1- NR
6	3	1	R	3- 1- R
7	3	27	NR	3- 27- NR
8	3	27	R	3- 27- R

5.2.2. Hibridación

Se utilizó el Gene Expression Hybridation Kit (Agilent Technologies, Inc., E. U. A) para la hibridación. Se adicionaron 500 μL de agua libre de nucleasas al liofilizado 10x Gene Expression Blocking Agent (Agilent Technologies, Inc., E. U. A) y se mezcló en vórtex. Para realizar la fragmentación del ARNc en cada microarreglo se agregaron los componentes de la Tabla 8 a un tubo de microcentrífuga.

Tabla 8. Mezcla de fragmentación para formatos de 8 microarreglos por laminilla.

Componentes	Volumen/Masa microarreglo
ARNc amplificado linealmente marcado con Cy3	600 ng
10× Gene Expression Blocking Agent	5 μL
Agua libre de nucleasas	Lo requerido para un total de 24 μL
25× Fragmentation Buffer	1 μL
Volumen total	25 μL

Se incubó la mezcla en un baño de agua a 60°C por 30 minutos exactos, posteriormente se colocó en hielo durante 1 minuto y se adicionaron 25 μL de 2x Hi RPM Hybridation Buffer (Agilent Technologies, Inc., E. U. A) para detener la fragmentación. Se mezcló pipeteando hacia arriba y abajo evitando la formación de burbujas. Se centrifugó 1 minuto a 13,000 rpm para recuperar el líquido adherido a las paredes del tubo. Se colocó en hielo y se usó inmediatamente en los microarreglos.

Se colocó un gasket (Gaskets Slides 8 arreglos por laminilla) (Agilent Technologies, Inc., E. U. A) limpio en la base de la cámara Agilent SureHyb (Agilent Technologies, Inc., E. U. A) con la etiqueta hacia arriba y alineada con la sección rectangular de la base de la cámara posteriormente, se adicionó en el centro 40 μL de la mezcla preparada en forma de arrastre y disperse, sin tocar la junta o la superficie del gasket. Posteriormente se colocó lentamente el portaobjetos con los microarreglos con el lado activo hacia abajo sin formar burbujas. Se colocó la tapa de la cámara SureHyb y se apretó la abrazadera de la cámara, posteriormente se ensambló en la rejilla giratoria del horno (Agilent Technologies, Inc., E. U. A) y se incubó a 65 ° C durante 17 horas.

5.2.3. Lavado de los microarreglos hibridados

Se adicionaron 2 ml de Triton X-102 al 0,005% (10%) (Agilent Technologies, Inc., E. U. A) al tampón de lavado de expresión genética 1 y 2. El tampón de lavado 2 se precalentó 12 horas antes en un recipiente estéril a 37 °C. Se realizó el desmontaje de la laminilla de la cámara de hibridación, posteriormente se transfirió al recipiente N.1 con el Gene Expression Wash Buffer 1 (Agilent Technologies, Inc., E. U. A) a temperatura ambiente y una vez sumergido se separó el sándwich con ayuda del extremo romo de una pinza. Se transfirió la laminilla con los microarreglos al recipiente N.2 con el Gene Expression Wash Buffer 1 a temperatura ambiente y se agitó con ayuda de un agitador magnético por 1 minuto. Posteriormente se transfirió la laminilla al recipiente N. 3 con el Gene Expression Wash Buffer 2 (Agilent Technologies, Inc., E. U. A) a 37 ° C y se agitó e incubó durante 1 minuto. Se retiró la laminilla lentamente, evitando el exceso de agua.

5.2.4. Lectura de los datos de los microarreglos de expresión

Para la lectura de las muestras se utilizó el SureScan microarray scanner (Agilent Technologies, Inc., E. U. A). Posteriormente los datos en formato “.txt” se obtuvieron utilizando el software Agilent Feature Extraction Software (Agilent Technologies, Inc., E. U. A).

Los datos se procesaron en el software Gene expression análisis platform v.0.4 (Recamonde-mendoza, 2022), se realizó la normalización tipo cuantiles con la herramienta Linear Models for Microarrays Data (LIMMA) y el análisis de calidad con Array Quality Metrics. Las comparaciones entre cada uno de los grupos se realizaron con LIMMA mediante la prueba de T-student con y sin corrección de Benjamini-Hochberg con la significancia estadística ≤ 0.01 y fold change de 1.5.

Las listas de genes expresados diferencialmente de cada grupo fueron comparados con diagramas de Venn (Heberle et al., 2015). La anotación funcional se realizó con DAVID Knowledgebase Query Tool y NCBI (Sherman et al., 2007), se evaluó la interacción de proteínas y las vías enriquecidas en la ontología de genes y la Enciclopedia de Genes y

Genomas de Kioto (KEGG) con la herramienta online String y ShinyGO v0.75 (Ge et al., 2020).

6. Validación de los resultados obtenidos de los microarreglos mediante qRT-PCR

Se realizaron qRT-PCR para confirmar los resultados de los microarreglos, utilizando cebadores correspondientes a los genes expresados diferencialmente seleccionados de los resultados.

6.1. Diseño de los cebadores

De los genes diferencialmente expresados en alguna de las comparaciones de los microarreglos se seleccionaron 5. La secuencia de cada transcrito se descargó de NCBI y Ensemble bacteria de las cepas de *C. difficile* 630, R20291 y ATCC9689, posteriormente se visualizaron en el software Jalview v.2.11.1.4 y se alinearon con los parámetros establecidos en MAFFT (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform) de donde se obtuvo la secuencia consenso, de la cual se diseñaron los cebadores específicos para cada gen con el método de la Temperature Melting (TM) $2\Sigma (A+T) + 4\Sigma (G+C)$ y en primer BLAST, se verificaron en el software Oligo primer análisis v.7 y se realizó la PCR *in silico* en insilico.ehu.eus.

6.2. Estandarización de PCR en tiempo real

Se utilizaron las mismas mezclas de ARN de cada grupo que se utilizaron en los microarreglos y se realizó la retrotranscripción utilizando la enzima SuperScript III 200U/ μ L (1 μ L) (Invitrogen, E.E.U.U.) 0.1 M DTT (1 μ L) (Invitrogen), 5X First Buffer (4 μ L) (Invitrogen, E.E.U.U.), 100 ng random primers (1 μ L) (Invitrogen, E.E.U.U.), 10 mM dNTP Mix (1 μ L), 25 ng/ μ L de ARN (5 μ L) y agua para PCR (12 μ L) para un volumen final de 25 μ L, se incubó durante 5 minutos a 65°C, el ARN, los random primers y los dNTP's, posteriormente se agregó el resto de los reactivos y las reacciones se llevaron a cabo con el siguiente programa 5 minutos a 25°C, 60 minutos a 50°C, 15 minutos a 70 °C, posteriormente se cuantificó y congeló a -80°C hasta su uso.

Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo utilizando un termociclador CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-rad, Corea). Para cada gen, las mezclas de la amplificación por qPCR (25 µL) incluyeron: 1 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen, E.E.U.U.), 10 mM de dNTP Mix, 50 nM de MgCl₂, 4x Buffer (2.5 µL), 100x de SYBR Green, la concentración utilizada para cada cebador de cada gen se muestra en la Tabla 9, ADNc 160 ng totales (3.125 µL) y agua para PCR (12.3 µL). Para la amplificación se llevó a cabo un paso inicial de 1 ciclo de activación de la polimerasa a 95°C por 2 min; posteriormente se incluyeron 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 s, la temperatura de alineamiento utilizada en cada cebador se muestra en la Tabla 9. En caso de la presencia de dímeros se realizó un gradiente de concentración desde 50, 100, 200 y 300 nM.

Tabla 9. Temperatura de alineamiento y concentración de cebadores para cada gen de interés.

Gen	Temperatura de alineamiento	Concentración de cebadores F	Concentración de cebadores R
CAJ67607	62 °C	200 nM	200 nM
CAL68046	62 °C	200 nM	200 nM
CAJ70248	60 °C	200 nM	200 nM
CAJ67384	60 °C	200 nM	200 nM
CAJ68100	62 °C	200 nM	200 nM
<i>rpsJ</i>	60 °C	200 nM	200 nM
<i>rrs</i>	60 °C	50 nM	50 nM

Una vez establecida la concentración de trabajo de los cebadores, se construyeron curvas de ADNc para los genes blancos y los 2 genes endógenos *rrs* y *rpsJ* con las concentraciones de 160, 48, 14.4, 4.32 y 1.29 ng/µL. Únicamente para el gen CAJ67384 se utilizaron diluciones seriadas 1:2, que correspondieron a 160, 80, 40, 20, 10, 5 ng/µL. Cada punto de la curva estándar fue incluido por triplicado.

Los Ct obtenidos para cada punto de la curva serán promediados y utilizados para graficar el logaritmo de la cantidad de ADNc utilizado contra Ct; se obtendrá la R² y se determinará la ecuación de la gráfica ($y = mx + b$) mediante regresión lineal. La eficiencia (E) de la reacción será determinada mediante la fórmula:

$$E = \left(10 \left(-\frac{1}{m} \right) - 1 \right) \times 100$$

Donde m es la pendiente obtenida de la ecuación de la gráfica. Las curvas estándar son válidas cuando la eficiencia de la reacción alcancé del 90% al 110% y la R^2 fue de al menos 0.85.

6.3. Cuantificación de genes diferencialmente expresados mediante RT-qPCR

Las reacciones fueron realizadas por triplicado por cada pool de ADNc y para cada gen. La amplificación se llevó a cabo con las mismas condiciones utilizadas en la estandarización, únicamente utilizando la concentración de 160 ng/ μ L de ADNc.

Los resultados obtenidos para cada pool y por gen fueron normalizados utilizando los niveles de expresión de los genes endógenos *rrs* y *rpsJ* del pool 1 que se utilizó como control para los pools 2,5 y 6, y para los pools 4,7 y 8, se utilizó el pool 3 como control. Se utilizó el método de cuantificación relativa Delta-delta Ct Pfaff para determinar el cambio de expresión de un gen blanco, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Exp. Relativa} = \frac{\text{Eficiencia}_{\text{GOI}} \cdot \text{deltaCt}_{\text{GOI}}(\text{control-muestra})}{\text{Eficiencia}_{\text{endógenoref}} \cdot \text{deltaCt}_{\text{endógeno}}(\text{control-muestra})}$$

Los resultados se expresarán como expresión relativa media \pm desviación estándar.

7. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados con la prueba de distribución normal de Shapiro o Kolmogórov-Smirnov, debido al número de datos obtenidos.

Las diferencias entre la producción de biopelícula entre cepas asociadas y no asociadas a recurrencia se calcularon mediante U de Mann-Whitney.

Para el análisis de la expresión relativa de genes a distintas etapas del crecimiento de la biopelícula en la misma cepa se realizó la prueba de normalidad y se analizó mediante Prueba de ANOVA y post hoc Bonferroni.

Todos los análisis serán realizados mediante el programa estadístico SPSS. Los valores de $p < 0.05$ serán considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

8. Análisis previo

8.1. Cepas

Se seleccionaron 20 aislamientos de *C. difficile* correspondientes a 5 cepas no asociadas a infección recurrente (ICD-NR) y 5 asociadas a ICD-R de los RT001 y RT027, a partir de un cepario del grupo de investigación, recolectado de aislamientos de pacientes con diagnóstico confirmatorio de ICD-R e ICD-NR, provenientes del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González y el Hospital Civil de Guadalajara (Tabla 10).

8.2. Confirmación de la identidad

Para comprobar la identificación realizada por el grupo de investigación, se sembraron las cepas a partir de criotubos en ASHD, sin embargo, debido a que se encontró contaminación con otras especies bacterianas, los viales fueron centrifugados y posterior incubados por 3 horas en 1 ml de etanol al 100%, para eliminar cualquier célula planctónica y obtener únicamente esporas de *C. difficile* capaces de resistir el tratamiento con etanol. Se sembraron y, las colonias morfológicamente compatibles con *C. difficile* fueron seleccionadas para la identificación por MALDI-TOF y solo se consideraron las puntuaciones mayores a ≥ 2.000 para la identificación a nivel de especie. (Tabla 10).

Tabla 10. Identificación de *C. difficile* mediante MALDI-TOF, clasificación por ribotipo y tipo de infección.

Cepa	MALDI score	Ribotipo	Infección
ATCC 9689	2.066	1	Control
GDL 15-50	2.004	1	NR
GDL- 39	2.243	1	NR
GDL- 82	2.002	1	NR
GDL- 57	2.275	1	NR
GDL 15-15	2.267	1	NR
GDL 15-72	2.302	1	R
GDL- 61	2.111	1	R
GDL- 76	2.301	1	R
GDL- 84	2.126	1	R
GDL 16-198	2.203	1	R
ATCC BAA-1805	2.174	27	Control
HU- 17	2.020	27	NR
HU- 52	2.082	27	NR
GDL- 2	2.090	27	NR
GDL 16- 204	2.196	27	NR

GDL- 77	2.120	27	NR
GDL 15-49	2.161	27	R
GDL- 100	2.117	27	R
GDL- A5	2.219	27	R
GDL 15-04	2.187	27	R
HU- 6	2.090	27	R

NR: No recurrente; R: Recurrente, GDL: cepa proveniente del Hospital Civil de Guadalajara, HU: cepa proveniente del Hospital Universitario.

8.3. Confirmación del ribotipo

Posteriormente se realizó la extracción de ADN por el método fenol-cloroformo-alcohol isoamílico a partir de un cultivo puro y se confirmó el ribotipo mediante PCR de punto final (Figura 4), mediante la amplificación de la región espaciadora intergénica entre los genes 16S y 23S ARNr. El patrón de bandas de las cepas en estudio fue idéntico al patrón de bandas de las cepas control para cada ribotipo, por lo que se confirmó el ribotipo.

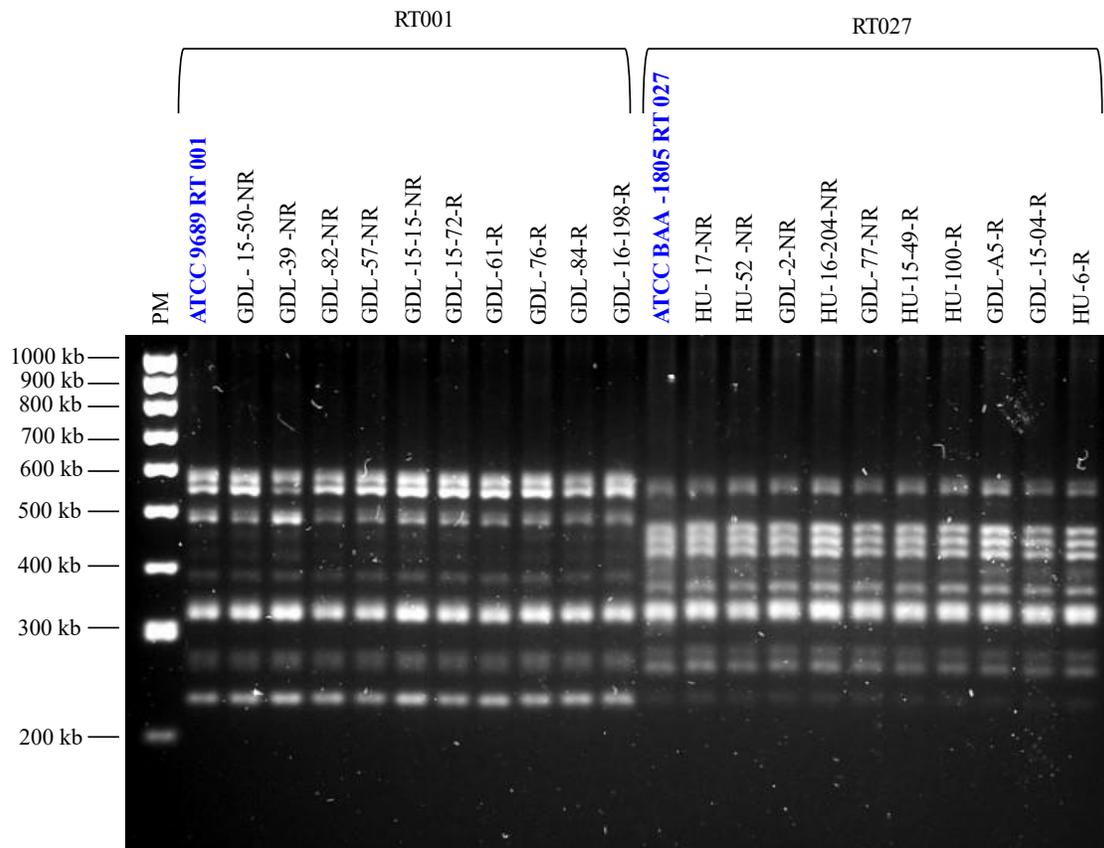


Figura 4. Ribotipado de las cepas de *Clostridioides difficile*. El primer carril corresponde al peso molecular (PM), los carriles correspondientes a las cepas control para cada ribotipo están señalados con letras de color azul.

9. Producción de biopelícula

9.1. Clasificación de la producción de biopelícula

Para determinar la producción de biopelícula de las cepas seleccionadas, se sembraron microplacas de 96 pocillos con 20 μ L de una solución de McFarland al 0.5 de cada una de las cepas y posteriormente se adiciono 180 μ L de medio BHIS y se incubo en anaerobios a 37 °C, en condiciones estáticas, durante 1 y 3 días. Posteriormente se retiraron las células planctónicas y se realizaron los lavados y pasos de fijación correspondientes, se tiñó con cristal violeta de Hucker al 0.1%, para medir la densidad óptica a DO_{595nm} se adiciono etanol al 100%.

Una vez obtenida la densidad óptica se calculó el rango de valores con las fórmulas de la Tabla 2 y se obtuvieron los valores representados en la Tabla 11, con los cuales se clasificó la producción de biopelícula a los 1 y 3 días de crecimiento de ambos ribotipos Tabla 12.

Tabla 11. Valores de DO_{650 nm} utilizados en la clasificación de la producción de biopelícula.

Clasificación	Tiempo de crecimiento	Valores de DO en el RT001	Valores de DO en el RT027
No productor	1	<0.19	<0.41
	3	<0.28	<0.14
Productor débil	1	0.19-0.38	0.41-0.83
	3	0.28- 0.56	0.14-0.28
Productor moderado	1	0.38 - 0.76	0.83 - 1.66
	3	0.56 - 1.13	0.28 - 0.57
Productor fuerte	1	> 0.76	>1.66
	3	>1.13	>0.57

Todas las cepas de los grupos 1-1-NR y 1-1-R fueron no productoras de biopelícula, contrario a lo encontrado a mayor tiempo de incubación ya que dos cepas del grupo 3-1-NR fueron productores moderados y débiles, mientras que solo uno fue productor fuerte de biopelícula, en el caso del grupo 1-3-R, 4 de las cepas fueron productores fuertes y solo uno productor moderado de biopelícula.

Las cepas del RT001 no producen biopelícula en el día 1, sin embargo, la mayoría de los aislamientos de las cepas asociadas a ICD-R del RT001 fueron productores fuertes de biopelícula al día 3 de incubación (Tabla 12).

Dos cepas del grupo 1-27-NR fueron productoras moderadas y dos productoras débiles, solo una cepa no formo biopelícula, en el caso del grupo 1-27-R 4 cepas fueron productoras débiles y una productora moderada de biopelícula, estos resultados difieren a mayor tiempo de incubación ya que en los grupos 3-27-NR y 3-27-R todos los aislamientos fueron productores fuertes de biopelícula (Tabla 12).

Tabla 12. Clasificación de la producción de biopelícula en *C. difficile* a los 3 días de incubación.

Ribotipo	Infección asociada	Clasificación	Día 1 (n)	Día 3 (n)
1	No recurrente (NR)	Productor fuerte		1
		Productor moderado		2
		Productor débil		
		No productor	5	2
1	Recurrente (R)	Productor fuerte		4
		Productor moderado		1
		Productor débil		
		No productor	5	
27	No recurrente (NR)	Productor fuerte		5
		Productor moderado	2	
		Productor débil	2	
		No productor	1	
27	Recurrente (R)	Productor fuerte		5
		Productor moderado	1	
		Productor débil	4	
		No productor		

9.2. Producción de biopelícula a distintos tiempos de crecimiento

Se realizó la prueba de normalidad de Kolmogorov- Smirnov con resultado de $p= 3.2 \times 10^{-29}$ para los datos de 1 día y 6.7×10^{-12} para los datos de 3 días por lo que se analizaron como datos no paramétricos con la prueba de U de Mann-Whitney.

C. difficile tuvo mayor producción de biopelícula el día 3 (DO_{595nm} 1.577, DE 0.438) comparado con el día 1 (DO_{595nm} 0.697, DE 0.192) con una de $p=3.87 \times 10^{-12}$.

Para evaluar la producción de biopelícula por ribotipo se realizó la prueba de normalidad de Kolmogorov- Smirnov, $p=1.6 \times 10^{-10}$ para el cultivo del día 1 del RT001 (datos no

normales), $p=0.088$ para el cultivo del día 3 del RT001 (datos normales), $p=0.00013$ para el cultivo del día 1 del RT027 (datos no normales), $p=2.67 \times 10^{-10}$ para el cultivo del día 3 del RT027 (datos no normales) y se analizaron con la prueba de U de Mann-Whitney y T de muestras independientes.

Las cepas de *C. difficile* del ribotipo 001 presentaron mayor crecimiento el día 3 (DO_{595nm} 1.187, DE 0.663) comparado con el día 1 (DO_{595nm} 0.013, DE 0.013), en donde no hubo producción de biopelícula ($p=1.97 \times 10^{-16}$) (Figura 5).

Las cepas de *C. difficile* del ribotipo 027 presentaron mayor crecimiento el día 1 (DO_{595nm} 0.683, DE 0.410) comparado con el día 3 (DO_{595nm} 0.389, DE 0.475) ($p=4.58 \times 10^{-6}$) (Figura 5).

Las cepas de *C. difficile* del ribotipo 027 presentaron mayor crecimiento el día 1 (DO_{595nm} 0.683, DE 0.410) comparado con las cepas de *C. difficile* del ribotipo 001 del día 1 de crecimiento (DO_{595nm} 0.013, DE 0.013) ($p=5.81 \times 10^{-23}$) (Figura 5).

Las cepas de *C. difficile* del ribotipo 001 presentaron mayor crecimiento el día 3 (DO_{595nm} 0.389, DE 0.475) comparado con las cepas de *C. difficile* del ribotipo 027 del día 3 de crecimiento 3 (DO_{595nm} 0.389, DE 0.475) ($p=6.14 \times 10^{-8}$) (Figura 5).

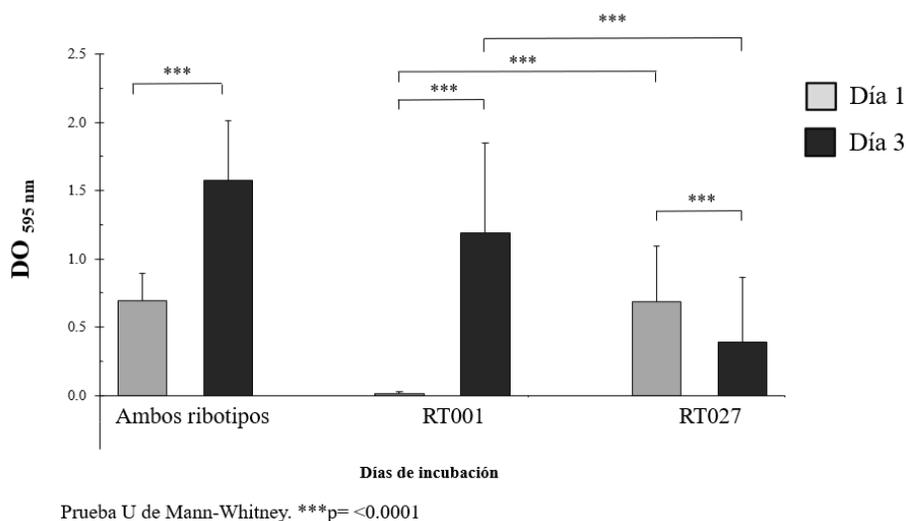


Figura 5. Producción de biopelícula de *C. difficile* ribotipos 001 y 027 a distintos días de crecimiento.

9.3. Producción de biopelícula en las cepas asociadas a ICD-R e ICD-NR

Para evaluar la producción de biopelícula por ribotipo y tipo de infección asociada (ICD-NR e ICD-R), se realizó la prueba de normalidad de Kolmogorov- Smirnov, los resultados se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Significancia de la prueba de normalidad para los grupos de cepas de *C. difficile*.

Grupo	p=	Normalidad
1- 1- NR	0.002	No paramétrica
1- 1- R	2.24x10 ⁻⁷	No paramétrica
1- 27- NR	0.093	Paramétrica
1- 27- R	0.068	Paramétrica
3- 1- NR	0.020	No paramétrica
3- 1- R	0.200	Paramétrica
3- 27- NR	0.200	Paramétrica
3- 27- R	0.200	Paramétrica

Las cepas de *C. difficile* del ribotipo 001 asociadas a ICD-NR e ICD-R presentaron mayor crecimiento el día 3 (RT001 ICD-NR DO_{595nm} 0.635, DE 0.533; RT001 ICD-R DO_{595nm} 1.654, DE 0.392) comparado con el día 1 (RT001 ICD-NR DO_{595nm} 0.015, DE 0.016; RT001 ICD-R DO_{595nm} 0.012, DE 0.019) (RT001 ICD-NR p=8.60x10⁻⁶; RT001 ICD-R 1.68x10⁻¹²) (Figura 6).

No existe diferencia estadísticamente significativa entre las cepas de *C. difficile* del ribotipo 001 asociadas a ICD-NR e ICD-R en el día uno de producción de biopelícula (RT001 ICD-NR DO_{595nm} 0.015, DE 0.016; RT001 ICD-R DO_{595nm} 0.012, DE 0.019) (p=0.290) (Figura 6).

Las cepas de *C. difficile* del ribotipo 001 asociadas a ICD-R presentaron mayor crecimiento el día 3 (RT001 ICD-R DO_{595nm} 1.654, DE 0.390) comparado con las cepas asociadas a ICD-NR del día 3 de crecimiento (RT001 ICD-NR DO_{595nm} 0.635, DE 0.533) (p=1.26x10⁻⁷) (Figura 6).

Las cepas de *C. difficile* del ribotipo 027 asociadas a ICD-NR del día 1 presentaron mayor crecimiento (RT027 ICD-NR DO_{595nm} 0.823, DE 0.510) comparado con el día 3 (RT027 ICD-NR DO_{595nm} 0.222, DE 0.098) (4.07x10⁻¹²) (Figura 6).

No se detectó diferencia en la producción de biopelícula de *C. difficile* del ribotipo 027 asociadas a ICD-R del día 1 (RT027 ICD-R DO_{595nm} 0.548, DE 0.245) comparada la producción de biopelícula del día 3 (RT027 ICD-R DO_{595nm} 0.649, DE 0.370) (p= 0.277) (Figura 6).

Las cepas de *C. difficile* del ribotipo 027 asociadas a ICD-NR presentaron mayor crecimiento el día 1 (RT027 ICD-NR DO_{595nm} 0.823, DE 0.510) comparado con las cepas asociadas a ICD-R del día 1 de crecimiento (RT027 ICD-R DO_{595nm} 0.649, DE 0.370) (p= 0.015) (Figura 6).

Las cepas de *C. difficile* del ribotipo 027 asociadas a ICD-R presentaron mayor crecimiento el día 3 (RT027 ICD-R DO_{595nm} 0.222, DE 0.098) comparado con las cepas asociadas a ICD-NR del día 3 de crecimiento (RT027 ICD-NR DO_{595nm} 0.649, DE 0.370) (p= 2.276x10⁻⁵) (Figura 6).

Las cepas de *C. difficile* del ribotipo 001 asociadas a ICD-R presentaron mayor crecimiento el día 3 (RT001 ICD-R DO_{595nm} 1.654, DE 0.390) comparado con las cepas asociadas a ICD-R del día 3 de crecimiento del ribotipo 027 (RT027 ICD-R DO_{595nm} 0.649, DE 0.370) (p= 1.98x10⁻¹²) (Figura 6).

Tabla 14. Significancia de la comparación de los grupos de cepas de *C. difficile*.

Grupos comparados			P=
1- 1- NR	vs	3- 1- NR	8.601x10 ⁻⁶
1- 1- R	vs	3- 1- R	1.68x10 ⁻¹²
1- 1- NR	vs	1- 1- R	0.290
3- 1- NR	vs	3-1- R	1.26x10 ⁻⁷
1-27- NR	vs	1- 27- R	0.015
3- 27- NR	vs	3- 27- R	2.28x10 ⁻⁵
1- 27- NR	vs	3- 27- NR	1.760x10 ⁻⁶
1- 27- R	vs	3- 27- R	0.277
1- 1- NR	vs	1- 27- NR	4.570x10 ⁻¹²
1-1- R	vs	1- 27- R	2.840x10 ⁻¹²
3- 1- NR	vs	3- 27- NR	0.033
3- 1- R	vs	3-27- R	1.980x10 ⁻¹²

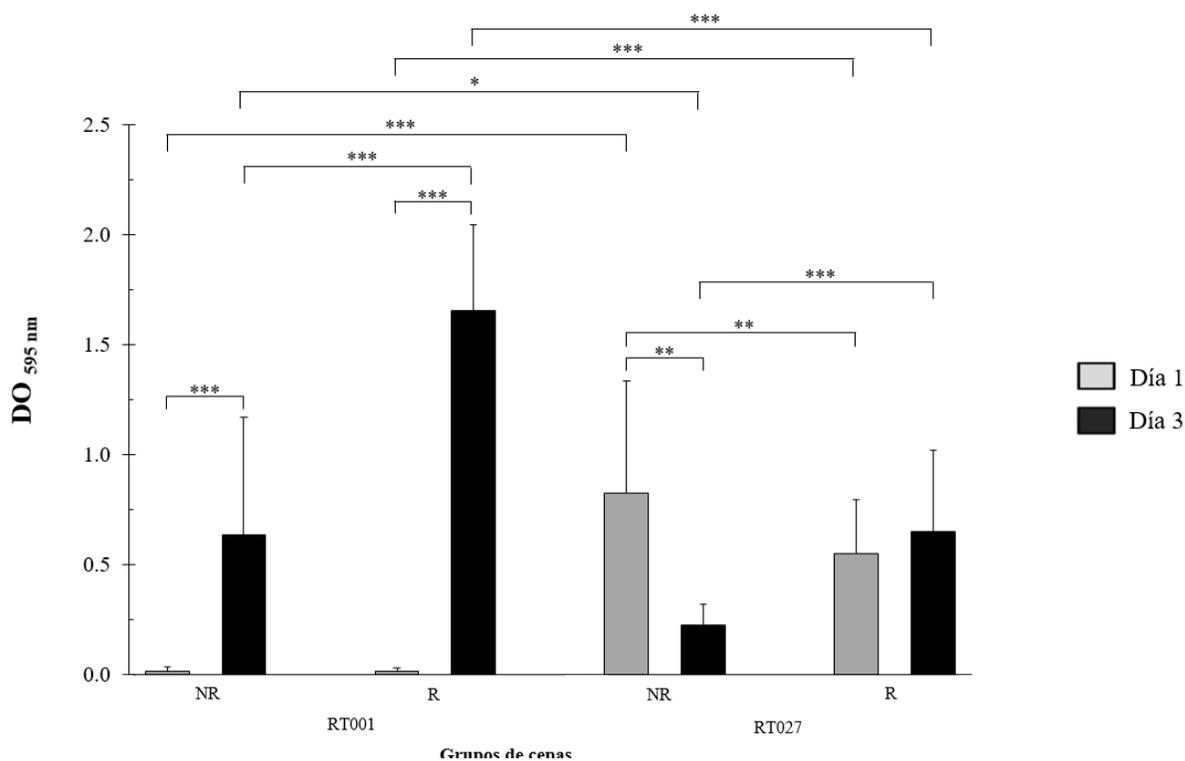


Figura 6. Producción de biopelícula de *C. difficile* ribotipos 001 y 027 en cepas asociadas a ICD-NR e ICD-R a los días 1 y 3 de incubación.

10. Determinación de la transcriptómica mediante microarreglos

Se diseñaron microarreglos de expresión a partir del transcriptoma completo de las cepas *C. difficile* 630 (RT012) (Gen Bank: GCA_000009205), *C. difficile* ATCC 9689 (RT001) (Gen Bank: GCA_001077535) y *C. difficile* R20291 (RT027) (Gen Bank: GCA_000027105), se incluyeron 3858 genes comunes entre las 3 cepas (Anexo 1, Tabla 1), 192 genes únicos de *C. difficile* ATCC 9689 (Anexo 1, Tabla 2) y 249 genes únicos para *C. difficile* R20291 (Anexo 1, Tabla 3) en el arreglo final. Se obtuvo una laminilla de 8x15K, con 14,928 spots, cada spot correspondía a 1 sonda y cada gen estaba representado por 3 sondas.

Se realizaron mezclas de ARN en concentraciones iguales de cada aislamiento, y se obtuvieron 8 pools de 25 ng/ μ L, que representaron las condiciones mostradas en la Tabla 15.

Tabla 15. Nomenclatura de los pools de ARNc.

Pool	Día	Ribotipo	Infección	Abreviatura
1	1	1	NR	1- 1- NR
2	1	1	R	1- 1- R
3	1	27	NR	1- 27- NR
4	1	27	R	1- 27- R
5	3	1	NR	3- 1- NR
6	3	1	R	3- 1- R
7	3	27	NR	3- 27- NR
8	3	27	R	3- 27- R

Se realizó la retrotranscripción, transcripción in vitro y purificación del ARNc de cada pool y se evaluó el rendimiento y la actividad específica para determinar si las muestras podían ser hibridadas en los microarreglos de expresión, los resultados se muestran en la Tabla 16.

Los 8 pools obtuvieron un rendimiento mayor a lo requerido por los parámetros de referencia de Agilent Technologies (ARNc >0.825 µg y una actividad específica >15 pmol Cy3 por µg de ARNc).

Tabla 16. Calidad de las muestras a hibridar.

Pool	Rendimiento ARNc * (µg)	Actividad específica (pmol Cy3 por µg de ARNc)
1	1.188	17.676
2	2.253	19.973
3	2.265	21.192
4	4.293	32.844
5	1.071	16.806
6	1.167	15.424
7	1.140	18.421
8	1.179	20.356

Los pools se hibridaron en los microarreglos con la distribución mostrada en la Figura 7.

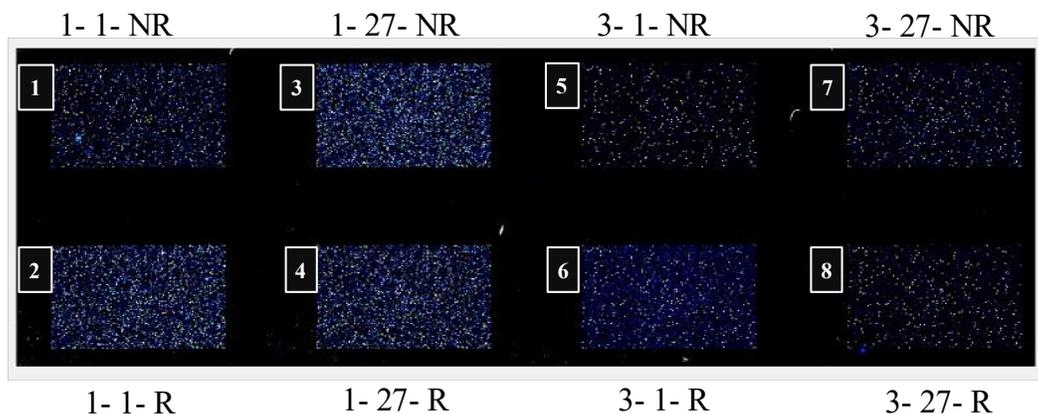


Figura 7. Figura representativa de la distribución de los 8 pools en la laminilla de los microarreglos, después de ser escaneadas por el SureScan Microarray.

Posterior al escaneo de los microarreglos se procedió a la visualización y extracción de los datos mediante el Software Agilent Feature Extraction y posteriormente se realizó el análisis de calidad, en el cual todos los microarreglos obtuvieron una calificación de “bueno”, como se muestra en la Figura 8, por lo cual todos los datos fueron utilizados para realizar el análisis estadístico y bioinformático.

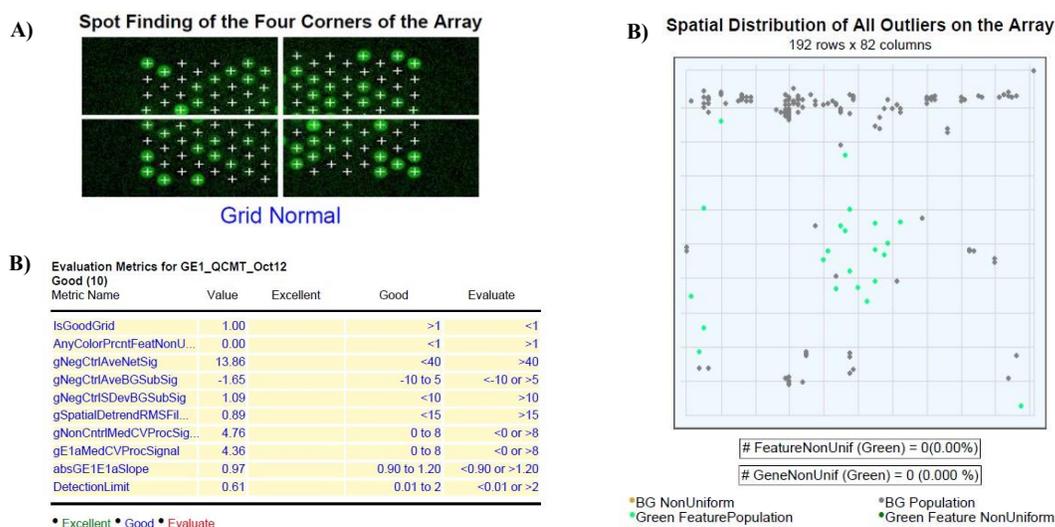


Figura 8. Figura representativa del reporte de control de calidad de microarreglos de expresión génica generado por el software Future Extraction (Agilent Technologies). (A) Alineamiento y detección de las cuatro esquinas del microarreglo. (B) Distribución espacial de los valores atípicos del microarreglo y estadísticas atípicas. (C) Métricas del control de calidad.

Para realizar el análisis bioinformático se utilizó la plataforma Gene Expression Analysis v.0.4, se seleccionó la corrección de fondo automática y la normalización por cuantiles, posteriormente se realizó el análisis de calidad con la herramienta Array Quality Metrics en donde todas las muestras obtuvieron resultados aprobatorios, por lo que se realizó el análisis de expresión diferencial con la herramienta Linear Models for Microarray Data (LIMMA), a través de la comparaciones entre dos grupos, las comparaciones realizadas se muestran en la Tabla 17, utilizando la prueba T- student con y sin la corrección de Benjamini-Hochberg con significancia estadística de $p \leq 0.01$ y un Fold Change ≥ 1.5 .

Tabla 17. Comparaciones realizadas y genes determinados.

Grupos comparados			Genes determinados
1- 1- NR	vs	3- 1- NR	Genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días
1- 1- R	vs	3- 1- R	
1- 27- NR	vs	3- 27- NR	
1- 27- R	vs	3- 27- R	
1- 1- NR	vs	3- 1- NR	Genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días en cepas, asociadas a ICD-NR, independiente de ribotipo
1- 27- NR	vs	3- 27- NR	
1- 1- R	vs	3- 1- R	Genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días en cepas, asociadas a ICD-R, independiente de ribotipo
1- 27- R	vs	3- 27- R	
1- 1- NR	vs	3- 1- NR	Genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días en cepas, asociadas a ICD-NR en el RT001
1- 1- R	vs	3- 1- R	Genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días en cepas, asociadas a ICD-R en el RT001
1- 27- NR	vs	3- 27- NR	Genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días en cepas, asociadas a ICD-NR en el RT027
1- 27- R	vs	3- 27- R	Genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días en cepas, asociadas a ICD-R en el RT027

Una vez identificados los genes diferencialmente expresados se realizó la anotación funcional con la herramienta bioinformática David Knowledgebase Query Tool, en caso de que la función del gen no estuviera en la base de datos se realizó la búsqueda manual en NCBI. Se determinó la interacción de proteínas mediante String y además se determinaron las vías enriquecidas utilizando la herramienta online ShinyGo v.0.75 que determina las vías KEGG enriquecidas y la ontología de genes. Con los resultados de las vías enriquecidas se realizaron graficas.

10.1. Análisis global de los genes expresados diferencialmente en la biopelícula de *C. difficile* a los 3 días de incubación

Se realizó un análisis global en donde se compararon todos los pools correspondientes a la incubación del día 1 contra los del día 3 (Tabla 17), sin hacer distinción entre el tipo de infección o el ribotipo, se encontraron 20 genes sobreexpresados y 5 subexpresados (Figura 9; Anexo II, Tabla 3).

El conjunto de genes se agrupó en 4 funciones principales, esporulación, metabolismo, procesamiento y almacenamiento de la información y proteínas no identificadas.

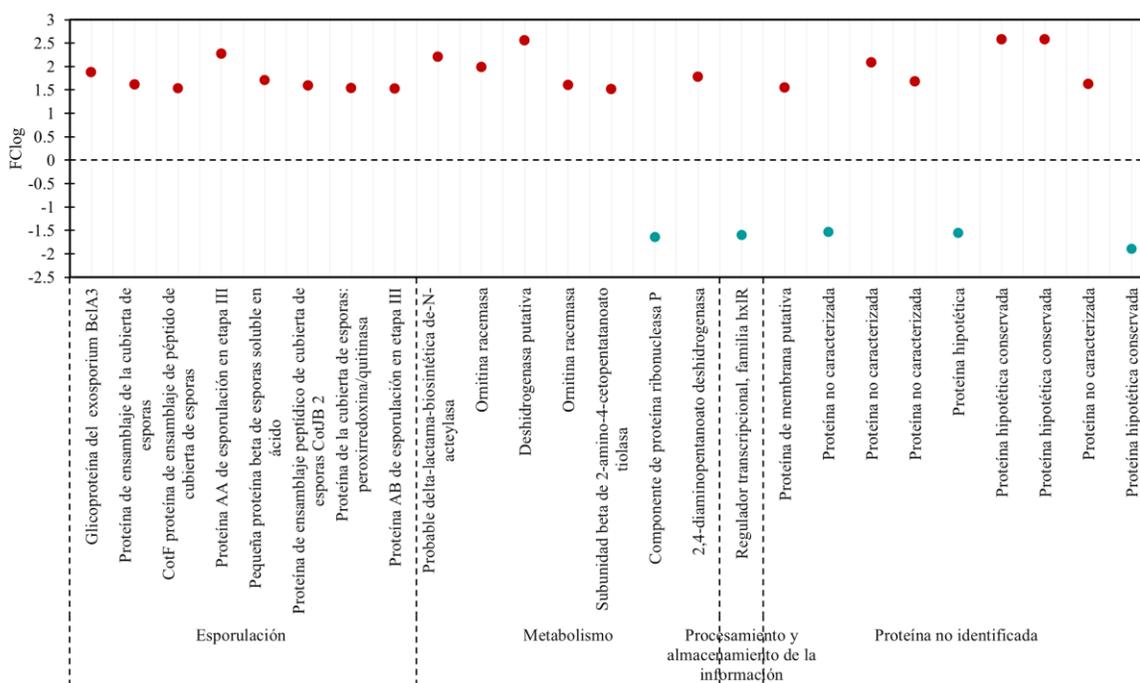
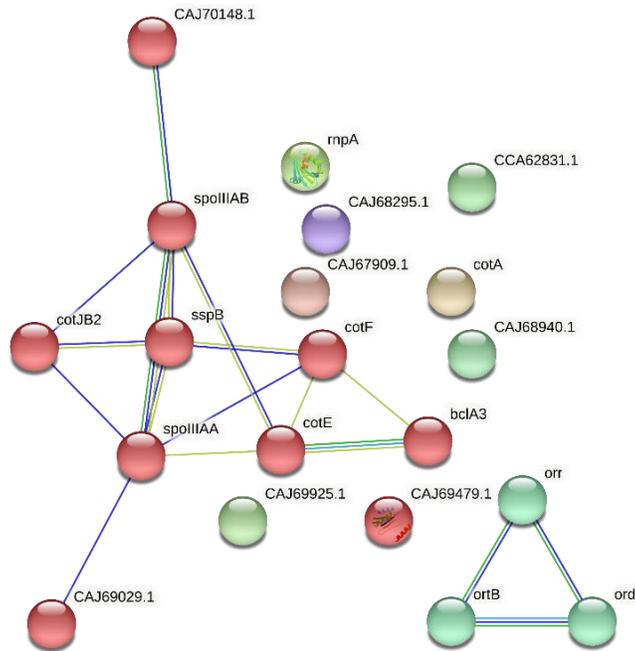


Figura 9. Genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días sin corrección de Benjamini-Hochberg. Los puntos rojos corresponden a los genes sobreexpresados y los puntos azules a los subexpresados. $FClog \geq 1.5$.

Posteriormente se realizó el interactoma de los genes expresados diferencialmente con la herramienta bioinformática String (Figura 10), se agruparon 2 clústeres que incluyeron funciones relacionados con la esporulación y el metabolismo de d-arginina y d-ornitina.



Símbolo	Cluster	Función
	1	Esporulación, oxidación de lípidos, proceso de desarrollo y repetición de triple hélice de colágeno.
	2	Metabolismo de d-arginina y d-ornitina, y proteína mutI

Figura 10. Interacción de proteínas y agrupamiento por clúster en String de los genes expresados diferencialmente en la biopelícula de *C. difficile* a los 3 días de incubación sin corrección de Benjamini-Hochberg.

Se enriquecieron 2 vías en la ontología de genes en el término GO de proceso biológico, cuya función está implicada en el metabolismo de la ornitina y alfa- aminoácidos (Tabla 18; Anexo VI, Tabla 6).

Tabla 18. Vías enriquecidas en la ontología de los genes expresados diferencialmente en la biopelícula de *C. difficile* a los 3 días de incubación sin corrección de Benjamini-Hochberg.

Vía enriquecida	Genes	False discovery rate
Proceso metabólico de la ornitina	2	0.0153
Proceso metabólico de alfa-aminoácido	3	0.0451

Posterior a aplicar la corrección de Benjamini-Hochberg para hipótesis múltiples los genes que conservaron su significancia fueron 12 sobreexpresados y 3 subexpresados (Figura 11).

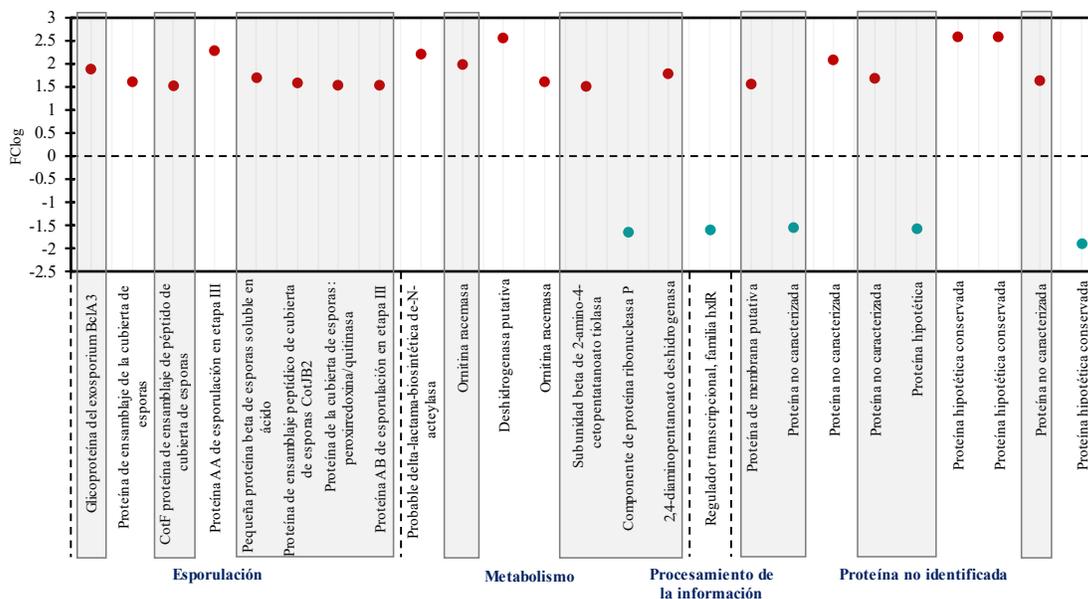
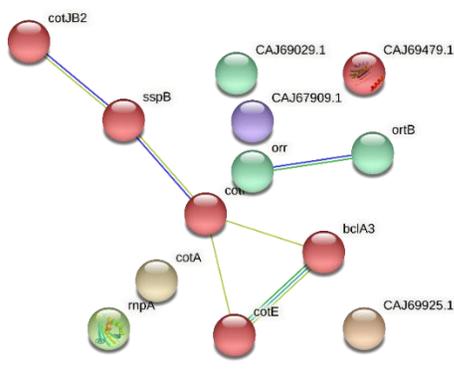


Figura 11. Genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días. Los puntos rojos corresponden a los genes sobreexpresados y los puntos azules a los subexpresados. En gris se muestran los genes estadísticamente significativos después de la corrección de Benjamini-Hochberg. $FClog = \geq 1.5$.

En el interactoma se identificaron 2 clúster, que correspondieron a la vía de la esporulación, oxidación de lípidos y metabolismo de d-arginina y d-ornitina (Figura 12), similar a los clústeres encontrados antes de la corrección de hipótesis múltiples. No se encontraron vías enriquecidas.



Símbolo	Cluster	Función
	1	Esporulación, oxidación de lípidos, proceso de desarrollo y repetición de triple hélice de colágeno.
	2	Metabolismo de d-arginina y d-ornitina, y proteína mutl

Figura 12. Interacción de proteínas y agrupamiento por clúster en String de los genes expresados diferencialmente en la biopelícula de *C. difficile* a los 3 días de incubación con corrección de Benjamini-Hochberg.

En la Tabla 19 se enlistan los genes después de la corrección con los datos de expresión relativa y valor de p corregido.

Tabla 19. Lista de los genes expresados diferencialmente en la biopelícula de *C. difficile* a los 3 días de incubación con corrección de Benjamini-Hochberg.

Nombre	FClog	AveExpr	t	adj.P.	B	ID
Glicoproteína de exosporium similar al colágeno BclA3	1.875	5.655	0.001	0.006	-0.114	CAJ70248
CotF proteína de ensamblaje de péptido de cubierta de esporas	1.538	4.875	0.001	0.010	-1.109	CAJ67429
Pequeña proteína beta de esporas soluble en ácido	1.716	10.411	0.000	0.001	4.386	CAJ70146
Proteína de cubierta de esporas CotJB	1.591	10.218	0.000	0.001	4.244	CAJ69285
Proteína de la cubierta de esporas: peroxirredoxina/quitinasa	1.541	12.198	0.000	0.000	5.587	CAJ68298
Proteína de membrana de esporulación YtaF	1.547	4.911	0.001	0.010	-1.061	CAJ69029
Enzima dependiente de PLP de la familia alanina/ornitina racemasa	1.989	11.139	0.000	0.001	4.900	CAJ67274
Enzima aminotransferasa clase V dependiente de PLP	2.000	5.254	0.001	0.008	-0.614	CAJ69925
Subunidad beta de 2-amino-4-cetopentatanoato tiolasa	1.521	9.682	0.000	0.001	3.834	CAJ67270
Componente de proteína ribonucleasa P	-1.635	-5.155	0.001	0.008	-0.741	CAJ70589
Proteína no caracterizada	1.681	-4.911	0.001	0.010	-1.060	CAJ69479
Proteína hipotética	1.618	5.517	0.001	0.007	-0.283	CAJ67909
Proteína hipotética	-1.554	7.491	0.000	0.002	1.904	CAJ68478
Proteína no caracterizada	-1.532	-5.080	0.001	0.009	-0.839	AKP44130
Proteína no caracterizada	1.625	8.627	0.000	0.002	2.961	CAJ67909

10.2. Subanálisis

Debido a que se estudiaron 8 grupos y 3 variables (ribotipo, tiempo, tipo de infección) se realizaron varios subanálisis para determinar los genes expresados con cada característica (Tabla 17).

Para todas las comparaciones múltiples se determinaron los genes expresados diferencialmente antes y después de la corrección de Benjamini-Hochberg, se graficaron, se determinó su interactoma y finalmente se realizó un diagrama de Venn, entre los grupos con características similares.

10.2.1. Genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días de cepas asociadas a ICD-NR e ICD-R, independientemente de ribotipo

Se realizaron subanálisis donde se compararon las cepas asociadas a ambos tipos de infección de 1 día de incubación contra las cepas asociadas a ambos tipos de infección de 3 días de crecimiento (Tabla 20), para determinar los genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días en cepas asociadas a ICD-NR e ICD-R independiente del ribotipo, como se muestran en la Tabla 22.

Tabla 20. Comparativos de los genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días de cepas asociadas a ICD-NR e ICD-R, independientemente de ribotipo.

Comparativos		
1- 1- NR	vs	3- 1- NR
1- 27- NR		3- 27- NR
1- 1- R	vs	3- 1- R
1- 27- R		3- 27- R

10.2.2. Genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días de cepas asociadas a ICD-NR, independientemente de ribotipo

Se realizó un subanálisis donde se compararon las cepas asociadas a ICD-NR de 1 día de incubación contra las cepas asociadas a ICD-NR de 3 días de crecimiento de ambos ribotipos para determinar los genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días en cepas asociadas a ICD-NR independiente del ribotipo. Se encontraron 13 genes sobreexpresados y 4 subexpresados (Figura 13; Anexo III, Tabla 4), sin embargo, posterior a la corrección de Benjamini-Hochberg ningún gen continuó siendo estadísticamente significativo.

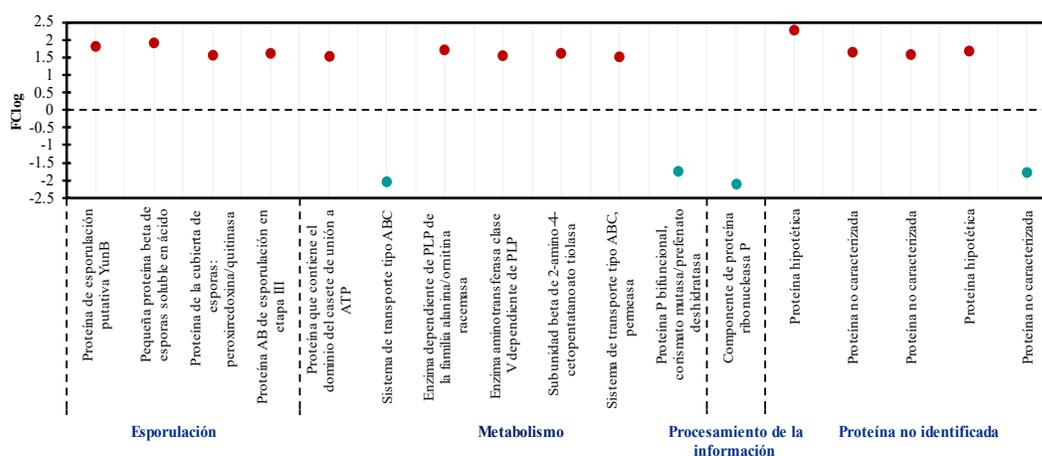
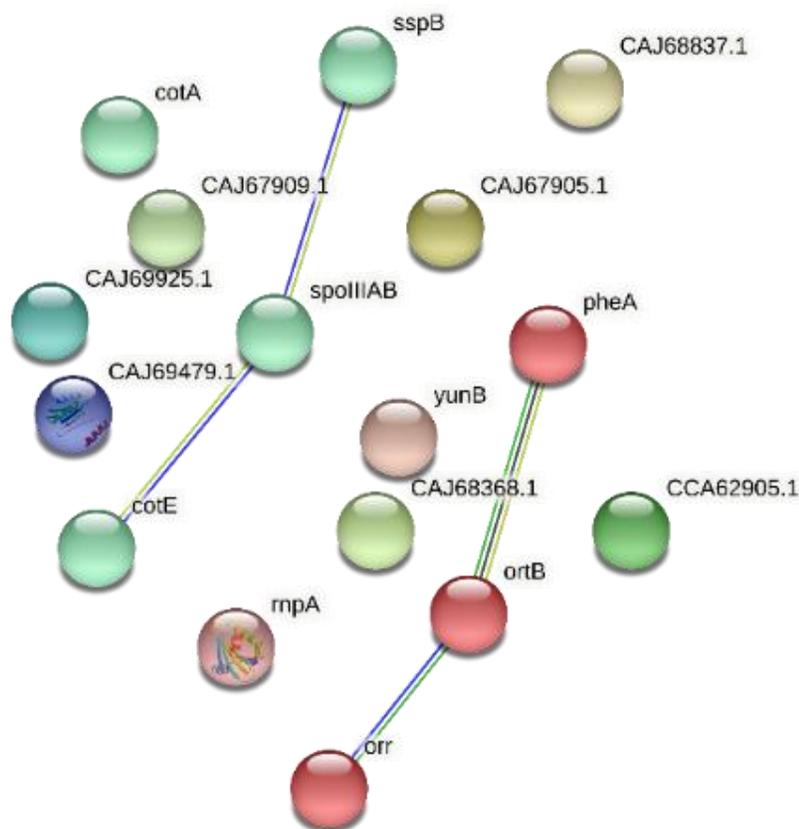


Figura 13. Genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días en cepas asociadas a ICD-NR, independiente de ribotipo, sin la corrección de Benjamini-Hochberg. Los puntos rojos corresponden a los genes sobreexpresados y los puntos azules a los subexpresados. $FC = \geq 1.5$.

En el interactoma de los genes expresados diferencialmente en biopelícula de 3 días en las cepas asociadas a ICD-NR, independiente de ribotipo, se identificaron 2 clúster, que correspondieron a la vía de la esporulación, oxidación de lípidos y metabolismo de d-arginina y d-ornitina (Figura 14), similar a los clústeres encontrados antes de la corrección de hipótesis múltiples. No se encontraron vías enriquecidas.



Símbolo	Cluster	Función
	1	Esporulación, oxidación de lípidos y virión.
	2	Metabolismo de d-arginina y d-ornitina, y proteína mutl

Figura 14. Interacción de proteínas y agrupamiento por clúster en String de los genes expresados diferencialmente en la biopelícula de *C. difficile* a los 3 días en cepas asociadas a ICD-NR, independiente de ribotipo, sin la corrección de Benjamini-Hochberg.

10.2.3. Genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días de cepas asociadas a ICD-R, independientemente de ribotipo

En el subanálisis realizado entre las cepas asociadas a ICD-R de 1 día de crecimiento de ambos ribotipos contra las cepas asociadas a ICD-R de 3 días de crecimiento de ambos ribotipos se determinaron los genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días en cepas asociadas a ICD-R independientemente del ribotipo y se encontraron 23 genes sobreexpresados y 3 subexpresados (Figura 15; Anexo III, Tabla 5), posterior a la corrección de Benjamini-Hochberg únicamente un gen continuo siendo estadísticamente significativo el cual correspondió a una probable proteína de membrana sobreexpresada (Figura 16; Anexo III, Tabla 6).

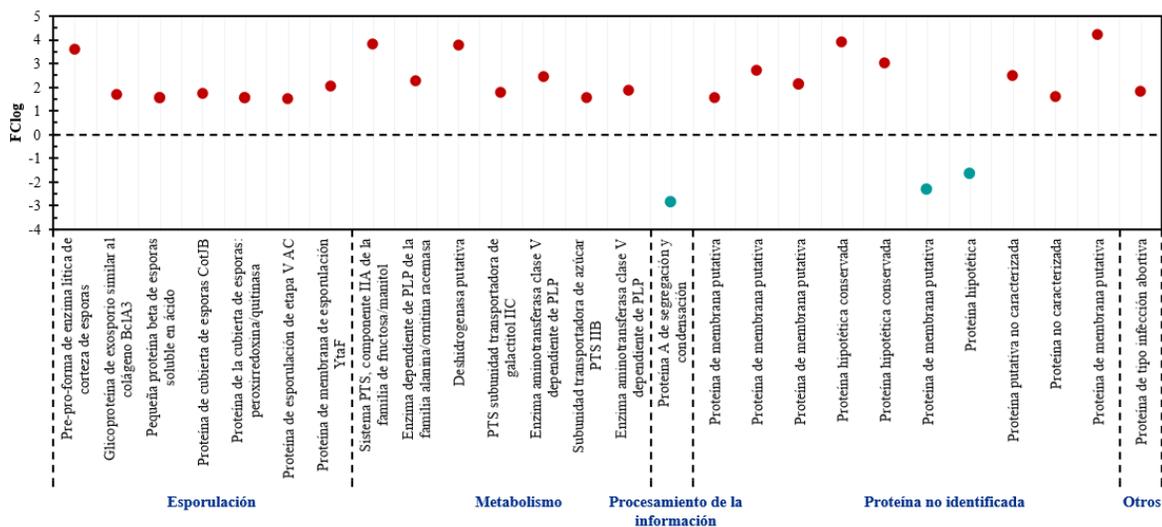


Figura 15. Genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días en cepas asociadas a ICD-R, independiente de ribotipo, sin la corrección de Benjamini-Hochberg. Los puntos rojos corresponden a los genes sobreexpresados y los puntos azules a los subexpresados. $FC = \geq 1.5$.

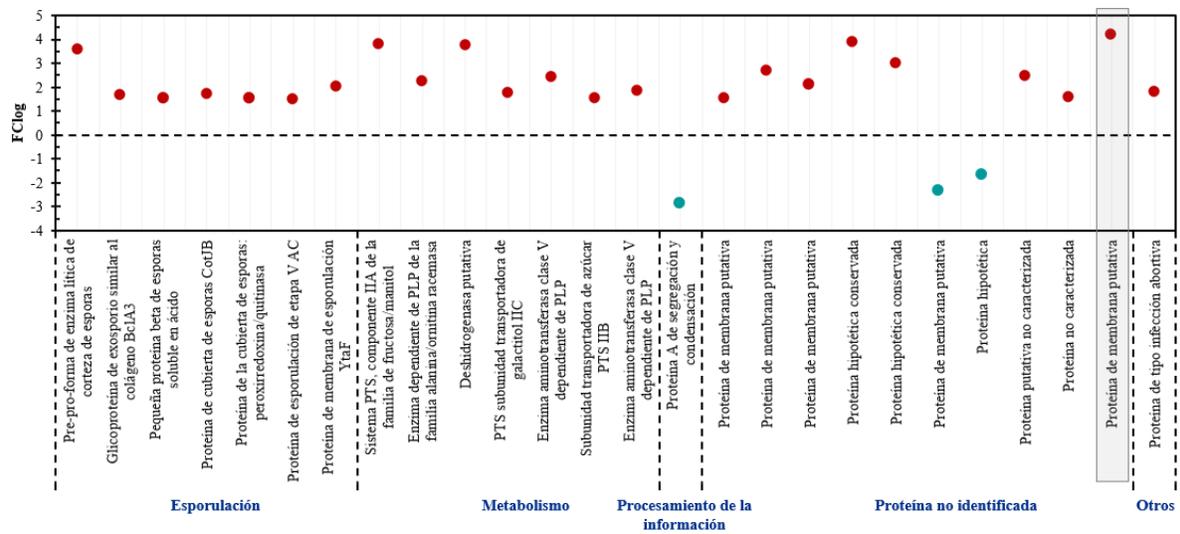


Figura 16. Genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días en cepas asociadas a ICD-R, independiente de ribotipo, con la corrección de Benjamini-Hochberg. Los puntos rojos corresponden a los genes sobreexpresados y los puntos azules a los subexpresados. $FC = \geq 1.5$.

En el interactoma de los genes expresados diferencialmente en biopelícula de 3 días en las cepas asociadas a ICD-R, independiente de ribotipo, se identificaron 2 clúster, de los cuales uno cuya función no ha sido definida sin embargo contine genes relacionados a la esporulación y otro relacionado con el metabolismo de la galactosa (Figura 17).

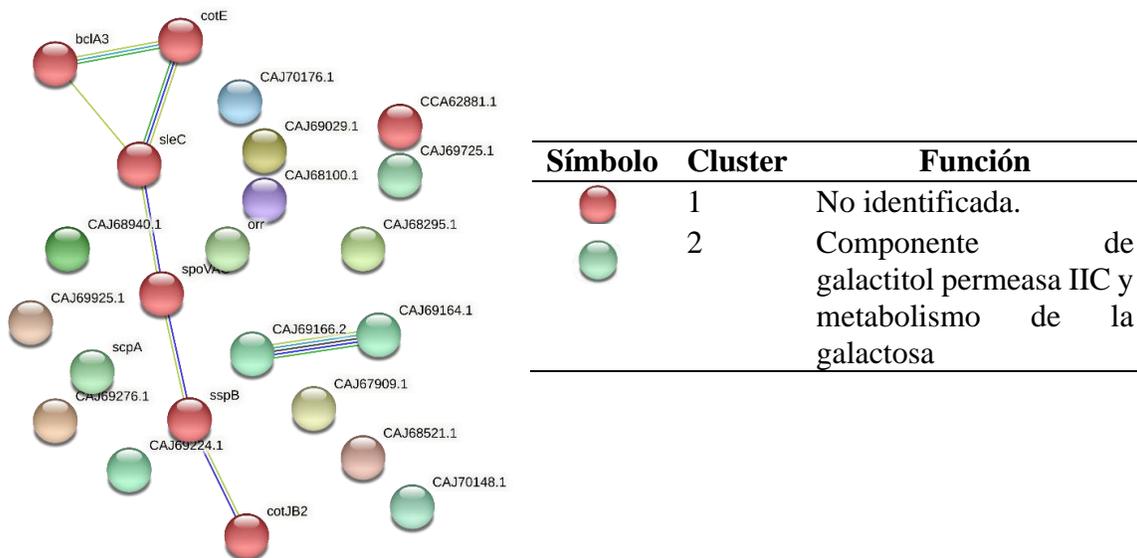


Figura 17. Interacción de proteínas y agrupamiento por clúster en String de los genes expresados diferencialmente en la biopelícula de *C. difficile* a los 3 días en cepas asociadas a ICD-R, independiente de ribotipo, sin la corrección de Benjamini-Hochberg.

Se encontró una vía enriquecida en la enciclopedia de Kioto, cuya función se relaciona con el metabolismo de la galactosa Tabla 21 (Anexo VI, Tabla 6).

Tabla 21. Vías enriquecidas de los genes expresados diferencialmente en la biopelícula de *C. difficile* a los 3 días de incubación en cepas asociadas a ICD-R, sin corrección de Benjamini-Hochberg.

Recurso bioinformático	Vía enriquecida	Genes	False discovery rate
KEEG	Metabolismo de la galactosa	2	0.0104

Se realizó un diagrama de Venn en donde se compararon los genes expresados diferencialmente entre la biopelícula de 3 días de las cepas asociadas a ICD-NR e ICD-R (Figura 18), 12 genes fueron únicos para la biopelícula de 3 días de las cepas asociadas a ICD-NR y 21 genes fueron únicos para la biopelícula de 3 días de las cepas asociadas a ICD-R y 5 genes en común (Anexo III, Tabla 17).

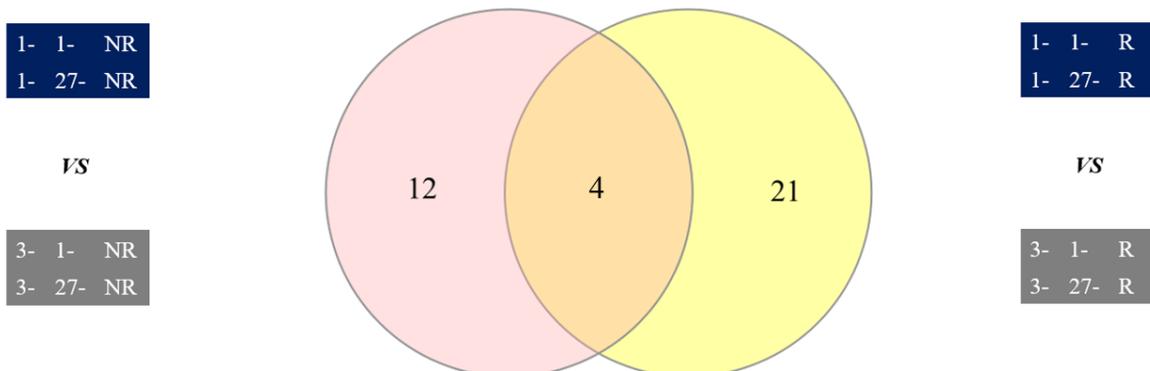


Figura 18. Diagrama de Venn. Los grupos comparados se muestran en los laterales.

De los 21 genes fueron únicos para la biopelícula de 3 días de las cepas asociadas a ICD-R, se encontraron 18 genes sobreexpresados y 3 subexpresados (Anexo III, Tabla 8), sin embargo, después de la corrección de Benjamini-Hochberg únicamente 3 genes permanecieron sobreexpresados y 1 subexpresado, en la biopelícula de 3 días asociada a ICD-R con una $p \leq 0.5$ (Figura 19; Anexo III, Tabla 9).

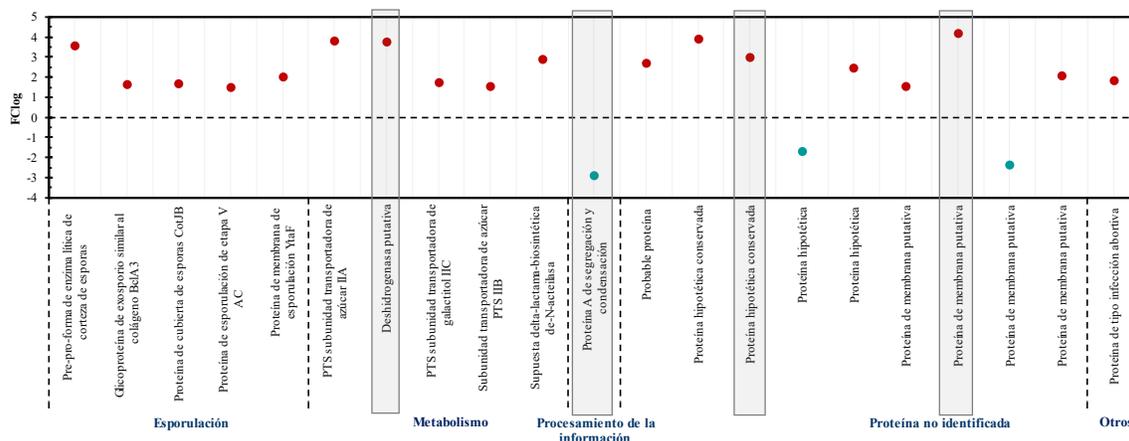


Figura 19. Genes únicos diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días en cepas asociadas a ICD-R, independiente de ribotipo. Los puntos rojos corresponden a los genes sobreexpresados y los puntos azules a los subexpresados, los genes que estadísticamente significativos después de la corrección de Benjamini-Hochberg se muestran sombreados en gris.

En el interactoma de los genes únicos expresados diferencialmente en biopelícula de 3 días en las cepas asociadas a ICD-R, independiente de ribotipo, se identificaron 4 clúster, incluyendo uno cuya función no ha sido definida sin embargo contine genes relacionados a la esporulación, y otros relacionados con el sistema fosfotransferasa (transportador de manosa), componente de galactitol permeasa IIC y metabolismo de la galactosa y la segregación cromosómica (Figura 20).

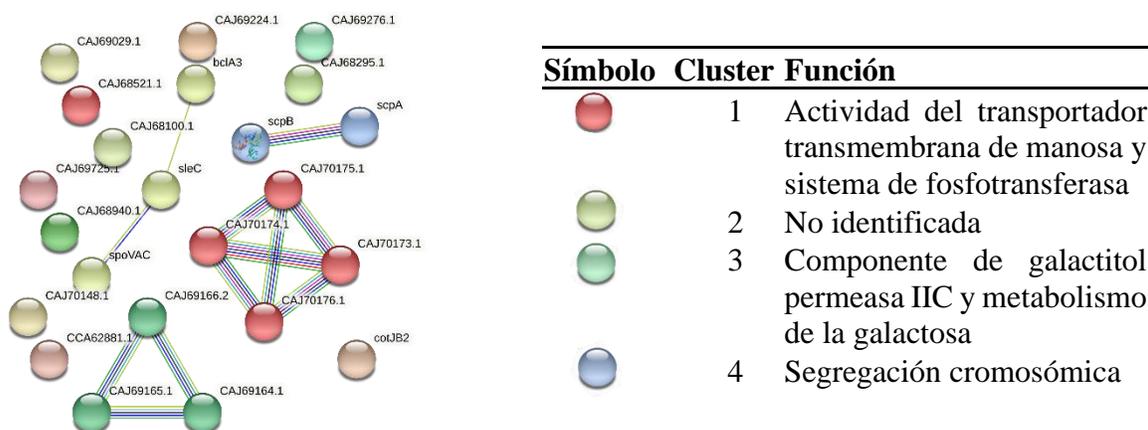


Figura 20. Interacción de proteínas y agrupamiento por clúster en String de los genes únicos expresados diferencialmente en la biopelícula de *C. difficile* a los 3 días en cepas asociadas a ICD-R, independiente de ribotipo, sin la corrección de Benjamini-Hochberg.

Al agregar interactores en String para mejorar la identificación de vías enriquecidas, se encontraron vías asociadas a la segregación cromosómica, sistema fosfotransferasa y metabolismo de la galactosa (Tabla 22; Anexo VI, Tabla 6).

Tabla 22. Vías enriquecidas de los genes únicos expresados diferencialmente en la biopelícula de *C. difficile* a los 3 días de incubación en cepas asociadas a ICD-R, sin corrección de Benjamini-Hochberg.

Recurso bioinformático	Vías enriquecidas	Genes	False discovery rate
GO	Segregación cromosómica	2	0.0382
GO	Sistema de fosfotransferasa de azúcar dependiente de fosfoenolpiruvato	7	0.0072
KEGG	Sistema fosfotransferasa	7	0.00014
KEGG	Metabolismo de la galactosa	3	0.00010

Se descargaron las secuencias aminoacídicas de las proteínas no caracterizadas codificadas por los genes con expresión diferencial sin corrección de Benjamini-Hochberg y se buscaron homólogos utilizando Blastp (Tabla 23). Sin embargo, se obtuvieron pocas similitudes con otras proteínas.

Tabla 23. Identificación mediante blastp de las proteínas únicas no identificadas en la biopelícula de *C. difficile* a los 3 días de incubación en cepas asociadas a ICD-R, sin corrección de Benjamini-Hochberg.

ID	Proteínas no identificadas	Query cover	Per identity
CAJ68100	Sistema de secreción tipo II Proteína de la familia GspH	97%	46.11%
AKP41282	Proteína que contiene dominio de cinta de zinc	83%	42.92%
CBE06724	Transposasa	100%	75.44%
CAJ69224	Proteína de la familia de hidrólisis de 5-bromo-4-cloroindolil fosfato	100%	100.00%
CCA62881	Indeterminado		
CD630_22670	Indeterminado		
CAJ68521	Indeterminado		
CAJ68940	Indeterminado		
CAJ69276	Indeterminado		
CAJ69725	Indeterminado		

En el caso de los genes estadísticamente significativos después de la corrección de Benjamini-Hochberg, se buscó homología utilizando Blastp (Tabla 24). Se identificó una proteína lactonasa y una proteína del sistema de secreción de tipo II, únicamente para la proteína codificada por el gen CAJ69725 no se encontró homología.

Tabla 24. Identificación mediante blastp de las proteínas únicas no identificadas y significativas después de la corrección de Benjamini-Hochberg en la biopelícula de *C. difficile* a los 3 días de incubación en cepas asociadas a ICD-R.

ID	Proteína	FClog	Query cover	E. value	Per identity
CAJ70148	Lactonasa	3.76755726	100%	0	98.96%
CAJ68151	Proteína A de segregación y condensación	-2.87713067			
CAJ68100	Proteína del sistema de secreción de tipo II	2.98680656	79%	2×10^{-23}	42.66%
CAJ69725	Proteína de membrana putativa	4.22233634			

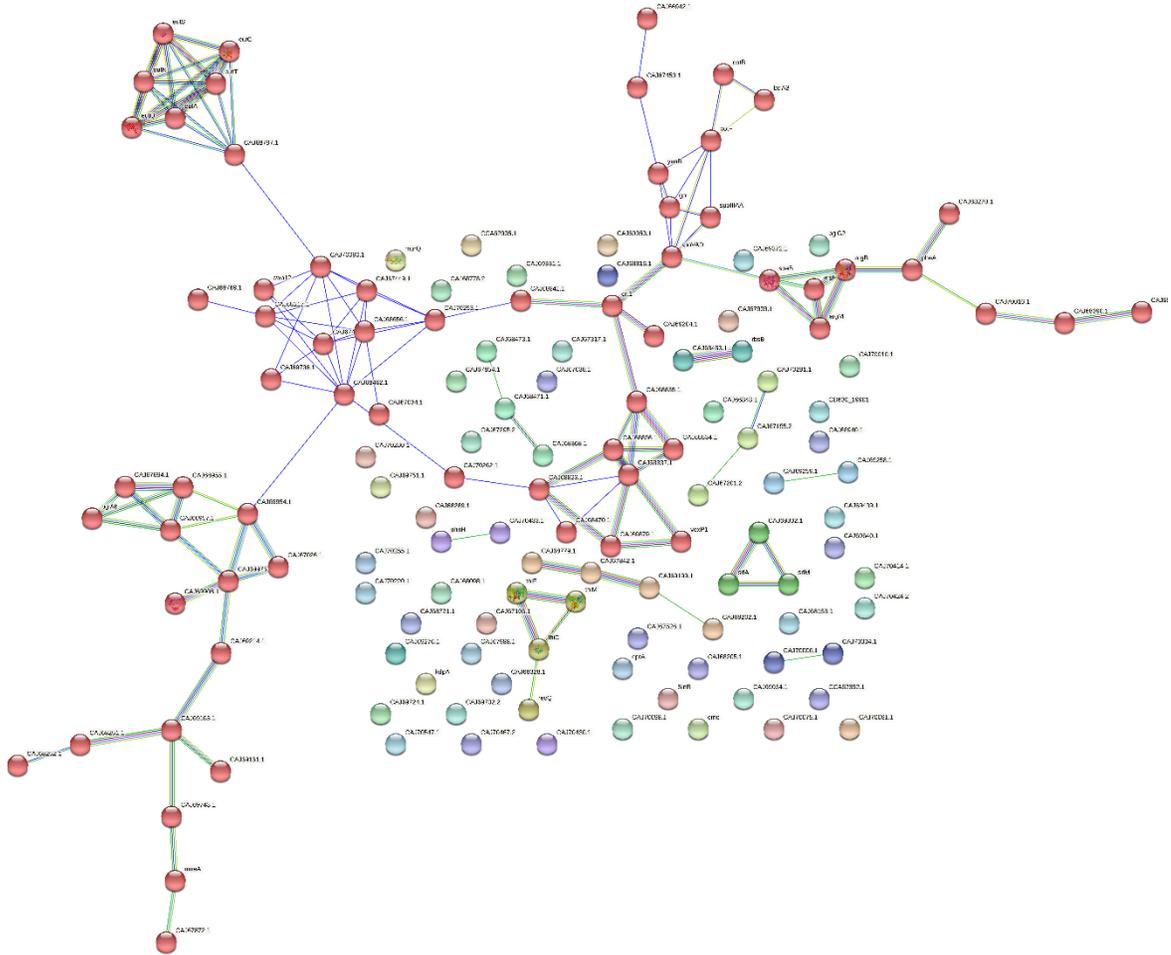
10.3. Genes diferencialmente expresados en las células planctónicas en cepas asociadas a ICD-NR e ICD-R

Para determinar los genes expresados en las células planctónicas asociados a ICD-R en cada ribotipo se realizaron comparaciones gen contra gen con la prueba de T-de Student comparando el día 1 de crecimiento de las células planctónicas asociadas a ICD-NR contra las células planctónicas asociadas a ICD-R. Debido a que no se realizaron comparaciones múltiples no se realizó la corrección de Benjamini-Hochberg, únicamente se tomó en cuenta el FC y la $p = \leq 0.01$, para definir los genes estadísticamente significativos.

10.3.1. Genes diferencialmente expresados en las células planctónicas del ribotipo 001 en cepas asociadas a ICD-R

Se compararon los grupos 1- 1- NR contra 1- 1- R para determinar los genes diferencialmente expresados en las células planctónicas de 1 día del RT001, se encontraron 124 genes sobreexpresados y 26 subexpresados los cuales se clasificaron en las categorías de esporulación, metabolismo, procesamiento y almacenamiento de la información y proteínas no caracterizadas (Figura 21; Anexo IV, Tabla 10).

En el interactoma de los genes expresados diferencialmente en las células planctónicas de 1 día en las cepas asociadas a ICD-R, se identificaron 9 clúster, la mayoría asociada a procesos metabólicos como el de la etanolamina, la tiamina y otros relacionados con el transporte de metabolitos (Figura 22).



Símbolo	Cluster	Función
	1	Proceso metabólico de etanolamina, exportación a través de la membrana plasmática y transportador ABC, exportación de macrólidos, dominio de unión a ATP, repetición putativa de unión a la pared celular 2 y superfamilia de cisteína peptidasa similar a la papaína, dominio de unión a atp, y familia de permeasa tipo.
	2	Familia similar a nmt1 y proteína de punto de control del ciclo celular rad17; quelación putativa de metales pesados y unión de iones molibdato
	3	Proceso biosintético de tiamina y piridoxina quinasa
	4	No identificado
	5	Enzima sorbitol fosfotransferasa II N-terminal y activador del operón glucitol
	6	Proteína transportadora de la familia abc-2 y represor transcripcional del operón gluconato hélix- turn- helix
	7	Dominio de proteína de unión periplásmica y transportador ABC, permeasa
	8	No identificado
	9	Amidohidrolasa y reconocimiento de nucleósidos

Figura 22. Interacción de proteínas y agrupamiento por clúster en String de los genes expresados diferencialmente en las células planctónicas de *C. difficile* al día 1 en cepas asociadas a ICD-R.

Se analizaron las vías enriquecidas de los genes expresados diferencialmente con String y el recurso online Shiny GO, únicamente se tomaron en cuenta las vías enriquecidas encontradas en la ontología de genes en el término de proceso biológico y un FDR = ≤ 0.05 . La mayoría de los genes están asociados a vías del transporte (carbohidratos, transmembrana y sustancias orgánicas) y del metabolismo incluyendo el sistema de fosfotransferasa, metabolismo de la arginina y aminos, así como procesos catabólicos de las moléculas pequeñas, compuestos organonitrogenados y etanolamina (Figura 23; Anexo VI, Tabla 6).

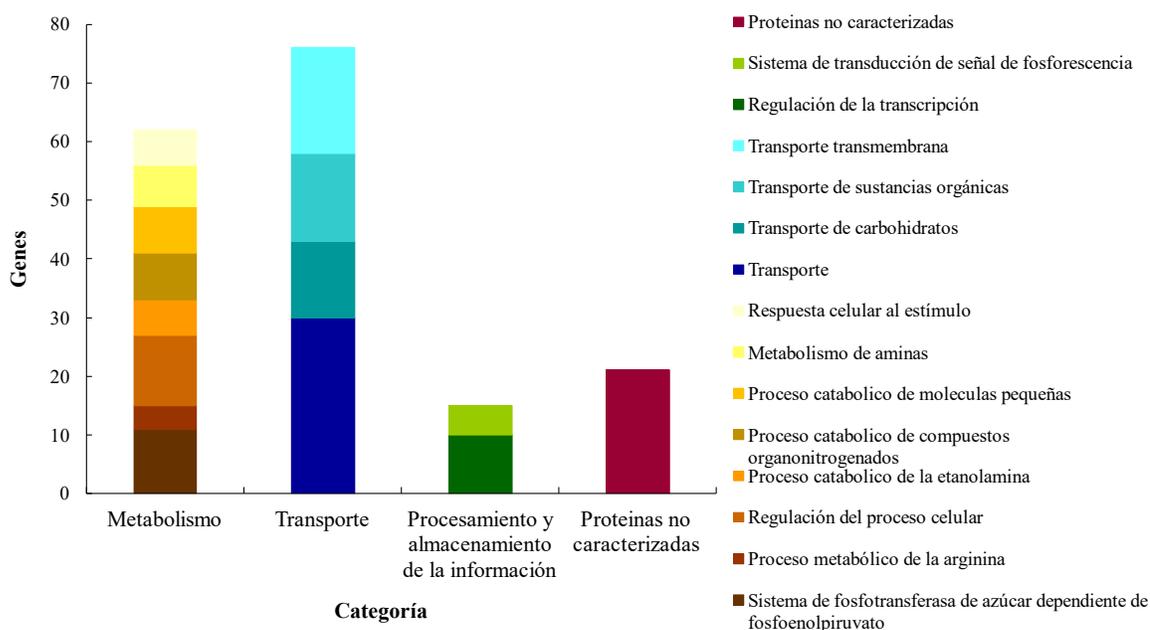


Figura 23. Vías enriquecidas en la ontología de genes de los genes expresados diferencialmente en las células planctónicas de *C. difficile* al día 1 en cepas asociadas a ICD-R.

10.3.2. Genes diferencialmente expresados en las células planctónicas del ribotipo 027 en cepas asociadas a ICD-R

Se compararon los grupos 1- 1- NR contra 1- 1- R para determinar los genes diferencialmente expresados en las células planctónicas de 1 día del RT027, se encontraron 31 genes sobreexpresados y 26 subexpresados los cuales se clasificaron en las categorías de esporulación, metabolismo, procesamiento y almacenamiento de la información y proteínas no caracterizadas (Figura 24; Anexo IV, Tabla 11).



Figura 24. Genes diferencialmente expresados en las células planctónicas de 1 día en cepas asociadas a ICD-R del RT027. Los puntos rojos corresponden a los genes sobreexpresados y los puntos azules a los subexpresados. $FCl_{log} \geq 1.5$.

En el interactoma de los genes expresados diferencialmente en las células planctónicas de 1 día en las cepas asociadas a ICD-R del RT027, se identificaron 3 clúster, asociados a la vía de la esporulación y oxidación de lípidos y dos clústeres con función no caracterizada (Figura 25).

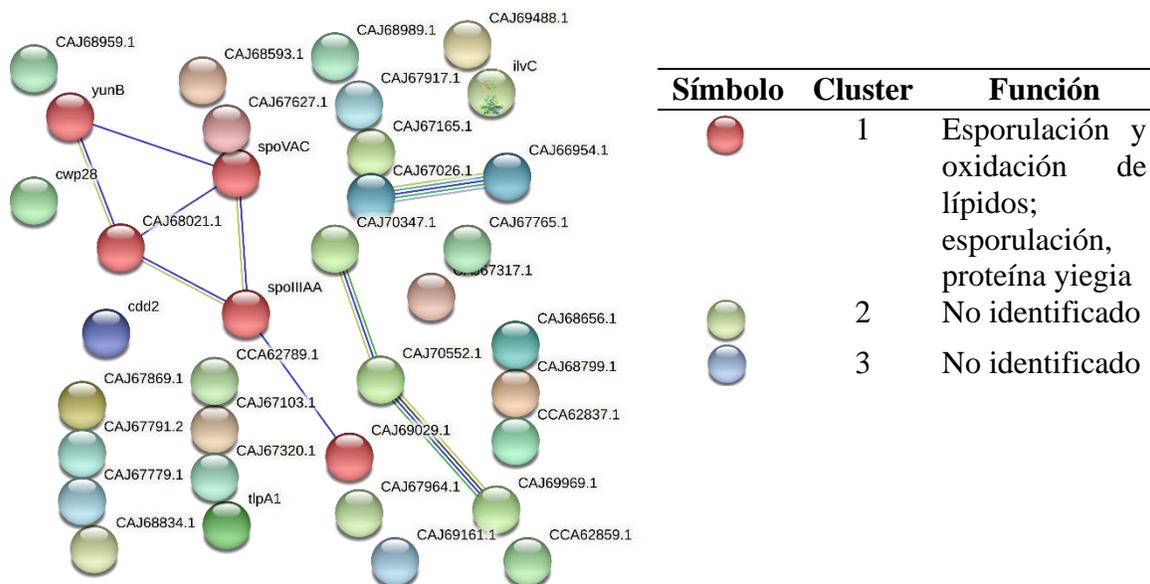


Figura 25. Interacción de proteínas y agrupamiento por clúster en String de los genes expresados diferencialmente en las células planctónicas de *C. difficile* al día 1 en cepas asociadas a ICD-R del RT027.

Únicamente se encontraron 3 vías enriquecidas que correspondieron a la vía de la esporulación y metabolismo del ascorbato, aldarato, sucrosa y almidón (Tabla 25; Anexo VI, Tabla 6).

Tabla 25. Vías enriquecidas de los genes expresados diferencialmente en las células planctónicas de *C. difficile* a los 3 días de incubación en cepas asociadas a ICD-R del RT027. FDR = ≤ 0.05

Recurso bioinformático	Vías enriquecidas	Genes	False discovery rate
GO	Esporulación	4	0.001
KEGG	Metabolismo del ascorbato y aldarato	2	0.0072
KEGG	Metabolismo de la sucrosa y almidón	3	0.0015

10.3.3. Genes diferencialmente expresados en común en las células planctónicas del ribotipo 001 y 027 en cepas asociadas a ICD-R

Se realizó un diagrama de Venn donde se compararon los genes expresados diferencialmente entre las células planctónicas de las cepas asociadas a ICD-R de los RT001 y RT027 (Figura 26), 142 genes fueron únicos para las células planctónicas de 1 día de las cepas asociadas a ICD-R del RT001 y 47 genes fueron únicos para las células planctónicas de 1 día de las cepas asociadas a ICD-R del RT027 y 10 genes en común.



Figura 26. Diagrama de Venn. Los grupos comparados se muestran en los laterales.

De los 10 genes en común de las células planctónicas de 1 día asociadas a ICD-R en los RT001 y 027, 9 se sobreexpresaron y 1 se subexpresó con $p \leq 0.01$ en el RT001 y 3 se sobreexpresaron y 7 se subexpresaron en el RT027 (Tabla 26).

Tabla 26. Genes en común de las células planctónicas del ribotipo 027 y 001 asociadas a ICD-R.

ID	RT001		RT027		Nombre
	FClog	AveExpr	FClog	AveExpr	
CAJ67616	1.612	0.929	3.226	0.238	Proteína de esporulación putativa YunB
CAJ68046	2.185	1.270	-2.059	1.113	Proteína AA de esporulación en etapa III
CAJ69161	1.991	1.139	-1.817	0.974	Proteína de la familia de la aldolasa/aducina de clase II
CAJ67317	2.230	1.303	-2.077	1.124	Transportador SMR de salida de compuestos de amonio cuaternario SugE
CAJ66954	1.991	1.139	-1.953	1.049	Antiterminador de transcripción, regulador de operón PTS
CAJ67026	-1.810	1.585	-2.011	1.084	Subunidad transportadora PTS EIIA
CD630_01800	1.882	1.072	4.908	0.714	Proteína de la familia M56 de la peptidasa blaR1
CAJ68834	1.991	1.139	5.286	0.921	Factor de transcripción regulador de respuesta
CAJ68781	2.150	1.245	-2.116	1.149	Proteína de la familia de las recombinasas
CAJ68656	1.612	0.929	-2.116	1.149	Proteína que contiene el dominio N-terminal de BtrH (serina recombinasa).

En el interactoma de los 10 genes en común, únicamente se encontró un clúster sin función identificada (Figura 27). Sin embargo, varios de los genes participan en la esporulación y el sistema fosfotransferasa.

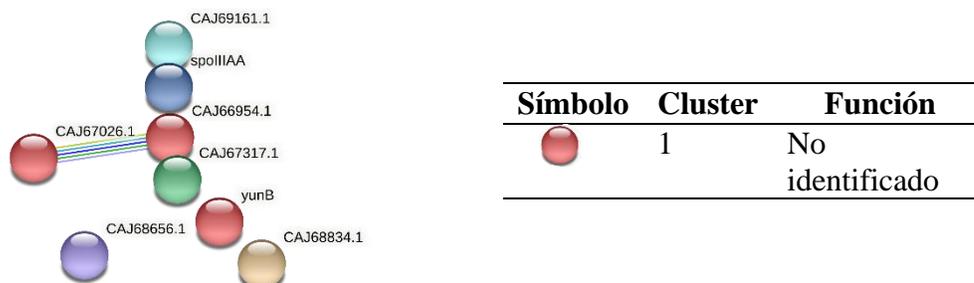


Figura 27. Interacción de proteínas y agrupamiento por clúster en String de los genes expresados diferencialmente en las células planctónicas de *C. difficile* al día 1 en cepas asociadas a ICD-R del RT027.

Se encontró una vía enriquecida asociada al metabolismo del ascorbato y aldarato en los genes en común expresados diferencialmente en las células planctónicas de *C. difficile* al día 1 de incubación en cepas asociadas a ICD-R de los RT001 y 027 (Tabla 27; Anexo VI, Tabla 6).

Tabla 27. Vías enriquecidas de los genes en común expresados diferencialmente en las células planctónicas de *C. difficile* al día 1 de incubación en cepas asociadas a ICD-R de los RT001 y 027. FDR = ≤ 0.05

Recurso bioinformático	Vías enriquecidas	Genes	False discovery rate
KEGG	Metabolismo del ascorbato y aldarato	2	0.0072

10.4. Genes que se expresan diferencialmente en la biopelícula de 3 días en cepas asociadas a ICD- NR e ICD-R en el RT001 y RT027

Para determinar los genes expresados en la biopelícula de 3 días asociados a ICD-R en cada ribotipo se realizaron comparaciones gen contra gen con la prueba de T-de Student comparando el día 1 de crecimiento de las células planctónicas asociadas a ICD-NR e ICD-R contra el día de crecimiento en biopelícula asociada a ICD-NR e ICD-R. Debido a que no se realizaron comparaciones múltiples no se realizó la corrección de Benjamini-Hochberg, únicamente se tomó en cuenta el FC y la $p = \leq 0.01$, para definir los genes estadísticamente significativos.

10.4.1. Genes que se expresan diferencialmente en la biopelícula de 3 días en cepas asociadas a ICD- NR e ICD-R en el RT001

Se realizaron subanálisis en donde se compararon los pools de cada ribotipo para determinar los genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días del RT001 en cepas asociadas a ICD-NR e ICD-R.

10.4.1.1. Genes que se expresan diferencialmente en la biopelícula de 3 días en cepas asociadas a ICD- NR en el RT001

Al comparar los genes expresados en la biopelícula de las cepas del RT001 asociadas a ICD-NR del día 1 y 3 de crecimiento se encontraron 150 genes sobreexpresados y 48 genes subexpresados, los cuales se dividieron en las categorías de esporulación, metabolismo, procesamiento y almacenaje de información, proteínas no identificadas y otros (Figura 28; Anexo V, Tabla 12).

En el interactoma de los genes expresados diferencialmente en la biopelícula de 3 días en las cepas asociadas a ICD-NR, se identificaron 9 clúster, la mayoría asociada a procesos metabólicos como el de la etanolamina, aminoazúcar, sistema fosfotransferasa e importación de hierro a la célula, además 4 clúster no tenían función identificada (Figura 29).

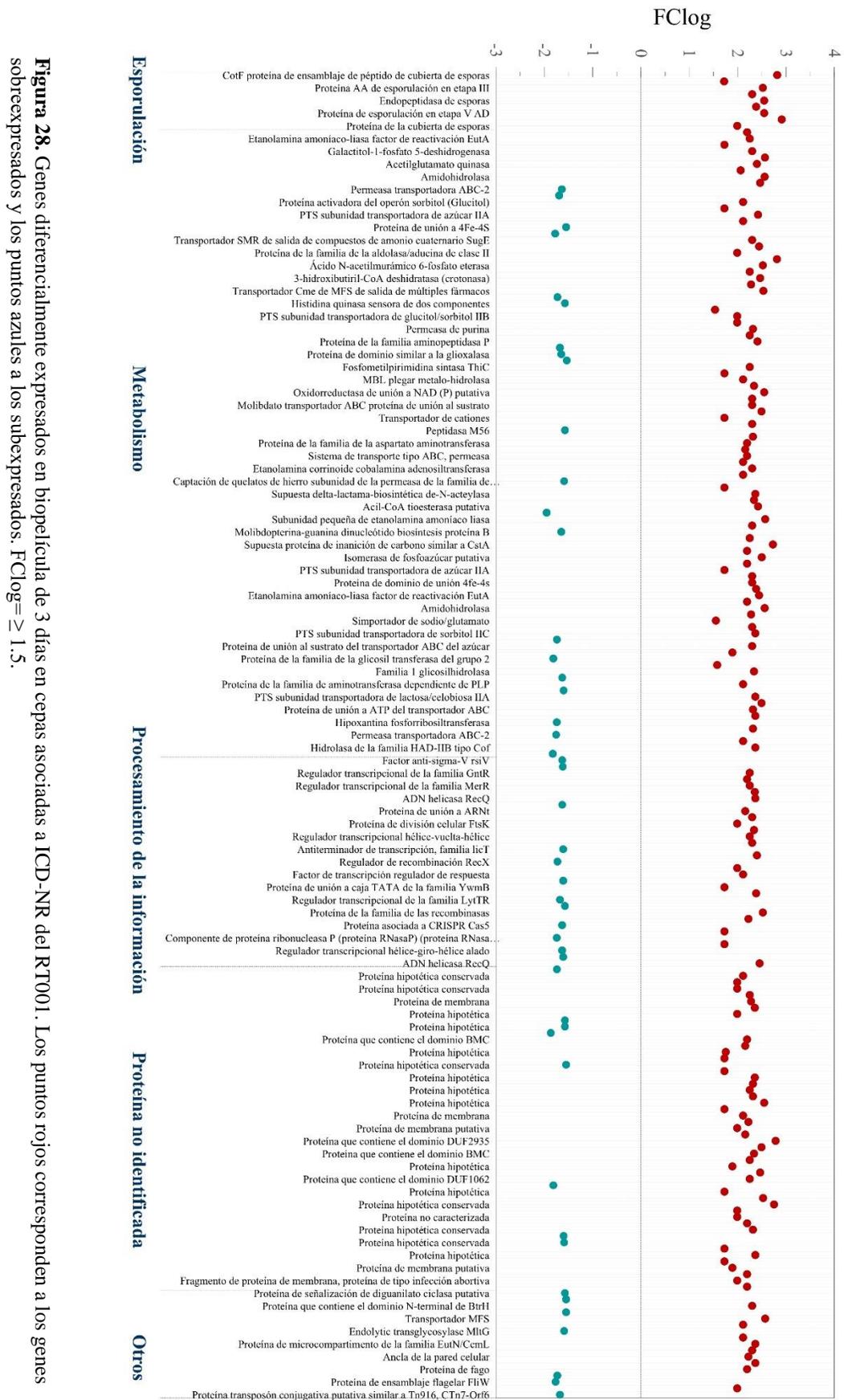
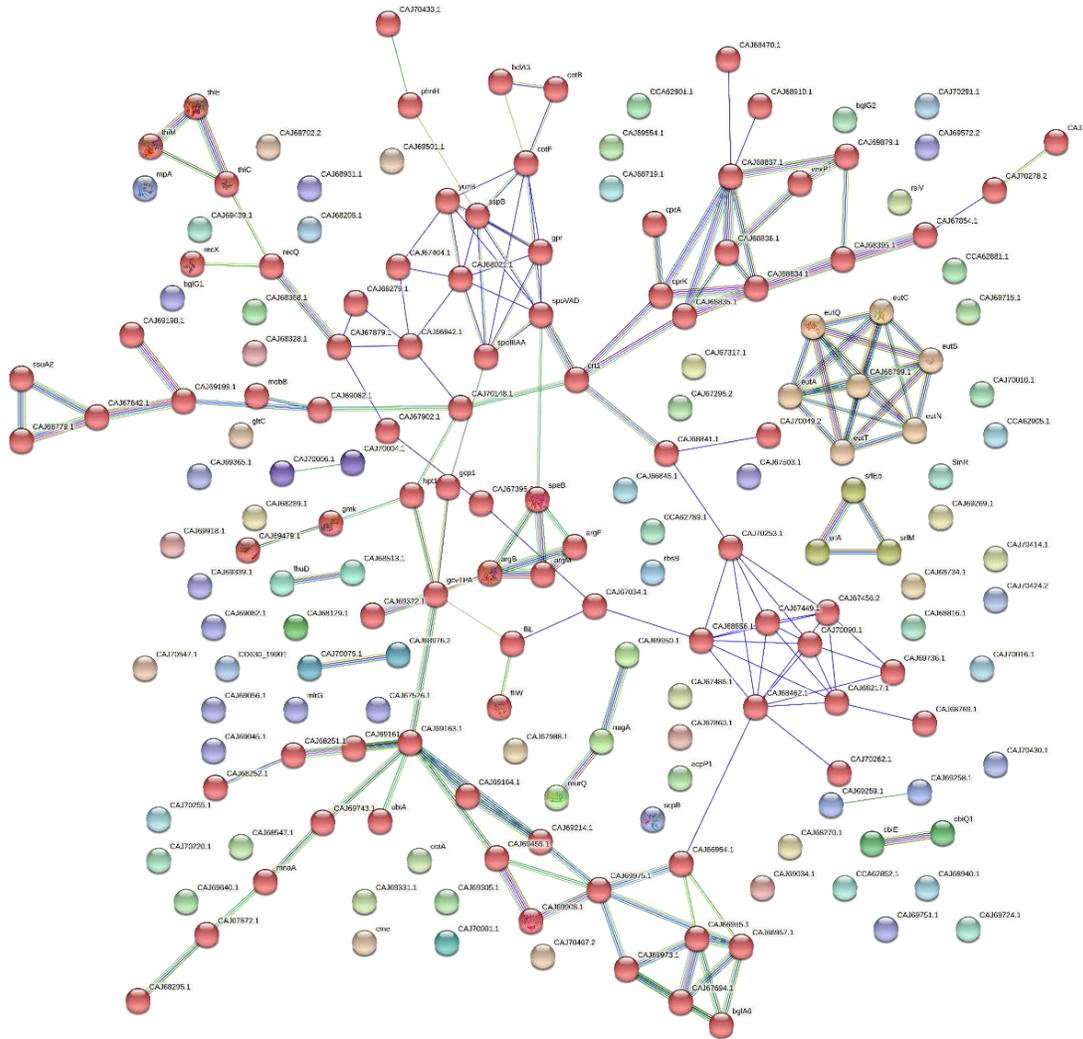


Figura 28. Genes diferencialmente expresados en biopelícula de 3 días en cepas asociadas a ICD-NR del RT001. Los puntos rojos corresponden a los genes sobreexpresados y los puntos azules a los subexpresados. $FClog \geq 1.5$.



Símbolo	Cluster	Función
	1	No identificada
	2	Proceso catabólico de etanolamina
	3	Sistema de fosfotransferasa de azúcar dependiente de fosfoenolpiruvato
	4	Proceso catabólico de aminoazúcar
	5	No identificada
	6	Importación de hierro a la célula y proteína de unión periplásmica
	7	No identificada
	8	Mixto, incl. amidohidrolasa y reconocimiento de nucleósidos
	9	No identificada

Figura 29. Interacción de proteínas y agrupamiento por clúster en String de los genes expresados diferencialmente en la biopelícula de *C. difficile* al día 3 en cepas asociadas a ICD-NR del RT001.

La mayoría de las vías enriquecidas en la ontología de genes se asociaron principalmente al metabolismo de la arginina, etanolamina, compuestos organonitrogenados, moléculas pequeñas, aminas y sistema fosfotransferasa, así como las vías de transporte transmembrana, de carbohidratos y sustancias orgánicas (Figura 30, Anexo VI, Tabla 6).

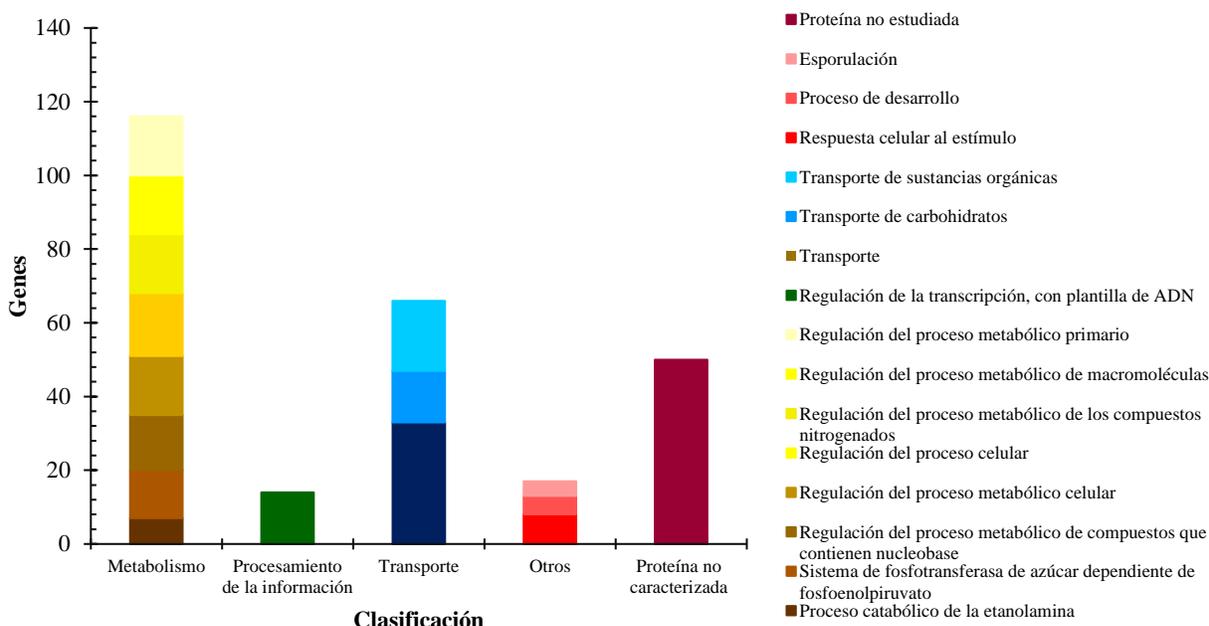


Figura 30. Vías enriquecidas en la ontología de los genes expresados diferencialmente en la biopelícula de *C. difficile* al día 3 en cepas asociadas a ICD-NR. FDR = ≤ 0.05

10.4.1.2. Genes que se expresan diferencialmente en la biopelícula de 3 días en cepas asociadas a ICD- R en el RT001

Al comparar los genes expresados en la biopelícula de las cepas del RT001 asociadas a ICD-R del día 1 y 3 de crecimiento se encontraron 56 genes sobreexpresados y 17 genes subexpresados, los cuales se dividieron en las categorías de esporulación, metabolismo, procesamiento y almacenaje de información, proteínas no identificadas y otros (Figura 31).

En el interactoma de los genes expresados diferencialmente en la biopelícula de 3 días en las cepas asociadas a ICD-R, se identificaron 9 clúster, la mayoría asociada a procesos metabólicos como el de la ornitina, arginina y sistema fosfotransferasa, además 4 clúster no tenían función identificada. Otro de los clústeres se asoció a la esporulación y oxidación de lípidos (Figura 32; Anexo V, Tabla 13).

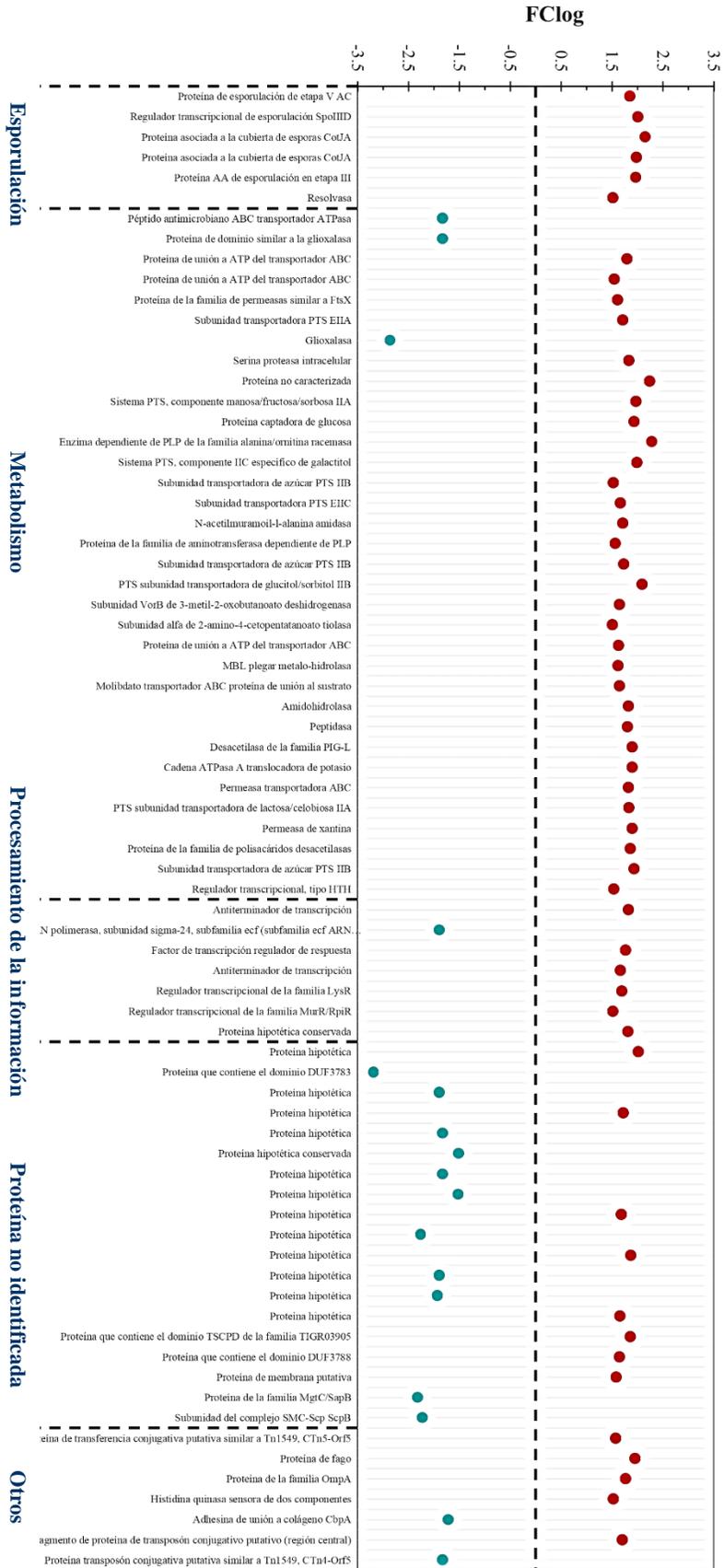
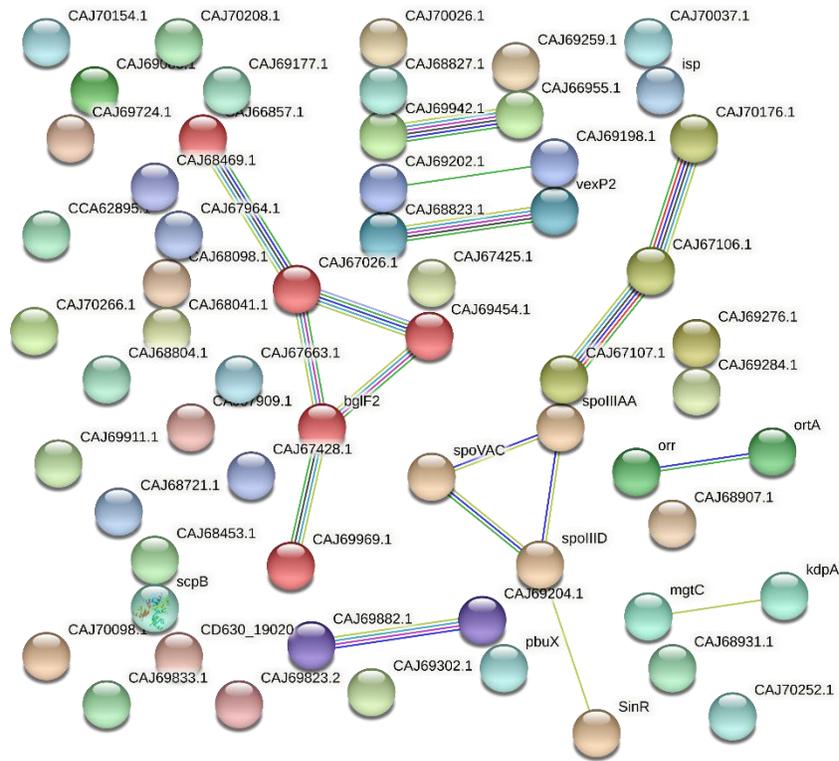


Figura 31. Genes diferencialmente expresados en biopelícula de 3 días en cepas asociadas a ICD-R del RT001. Los puntos rojos corresponden a los genes sobreexpresados y los puntos azules a los subexpresados. $FClog \geq 1.5$.



Símbolo	Cluster	Función
	1	Sistema de fosfotransferasa y metabolismo de ascorbato y aldarato
	2	Esporulación y oxidación de lípidos
	3	Sistema de fosfotransferasa, transportador transmembrana de manosa
	4	No identificada
	5	Metabolismo de la ornitina y arginina
	6	No identificada
	7	No identificada
	8	Quelación de metales pesados y unión de iones molibdato
	9	No identificada

Figura 32. Interacción de proteínas y agrupamiento por clúster en String de los genes expresados diferencialmente en la biopelícula de *C. difficile* al día 3 en cepas asociadas a ICD-R del RT001.

La mayoría de las vías enriquecidas en la ontología de genes se asociaron principalmente al transporte en general y específico de carbohidratos, sustancias orgánicas y transmembrana de carbohidratos. La vía asociada al metabolismo fue la del sistema fosfotransferasa de azúcar dependiente de fosfoenolpiruvato (Figura 33; Anexo VI, Tabla 6).

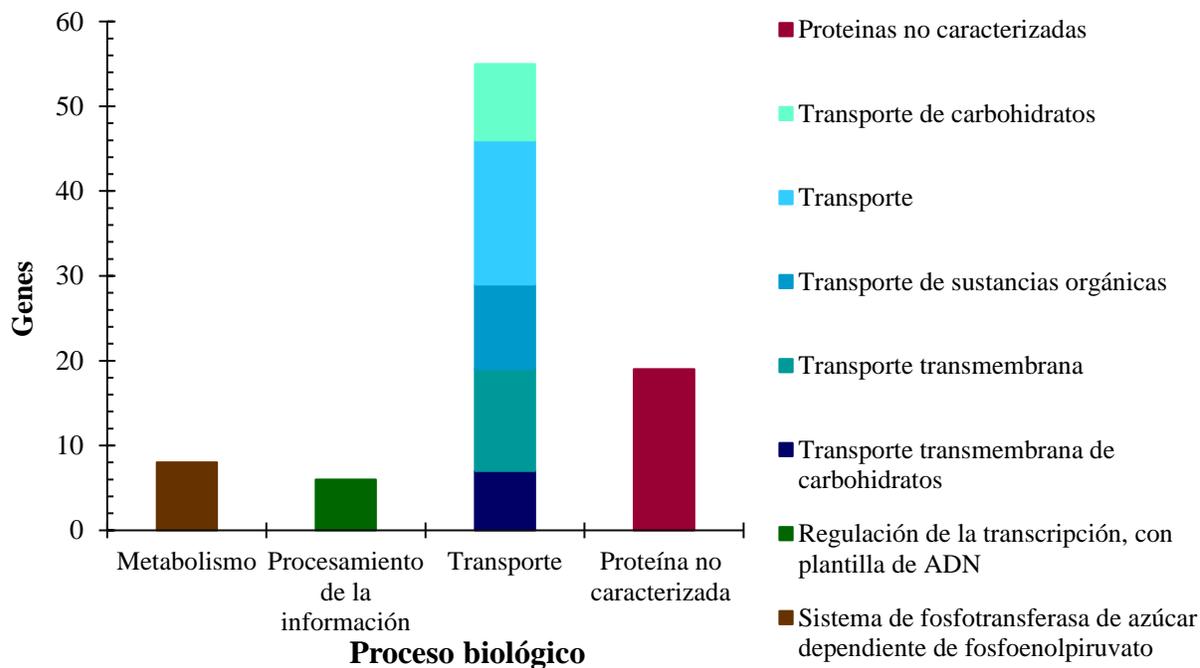


Figura 33. Vías enriquecidas en la ontología de los genes expresados diferencialmente en la biopelícula de *C. difficile* al día 3 en cepas asociadas a ICD-R. FDR = ≤ 0.05

Se realizó un diagrama de Venn para determinar los genes únicos diferencialmente expresados en la biopelícula del RT001 a los 3 días de cepas asociadas a ICD-NR contra ICD-R, así como los genes en común (Figura 34; Anexo V, Tabla 14 y 15).

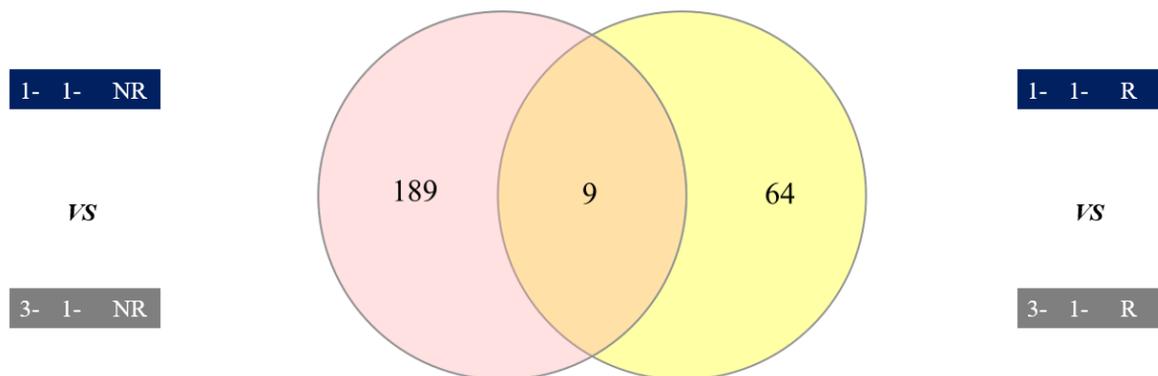


Figura 34. Diagrama de Venn. Los grupos comparados se muestran en los laterales.

En la biopelícula producida por las cepas asociadas a ICD-R de 3 días se sobreexpresaron 50 genes y subexpresaron 14 genes únicos de la condición (Figura 35; Anexo V, Tabla 16), los cuales se dividieron en las categorías de esporulación, metabolismo, procesamiento y almacenamiento de información, proteínas no identificadas y otros.

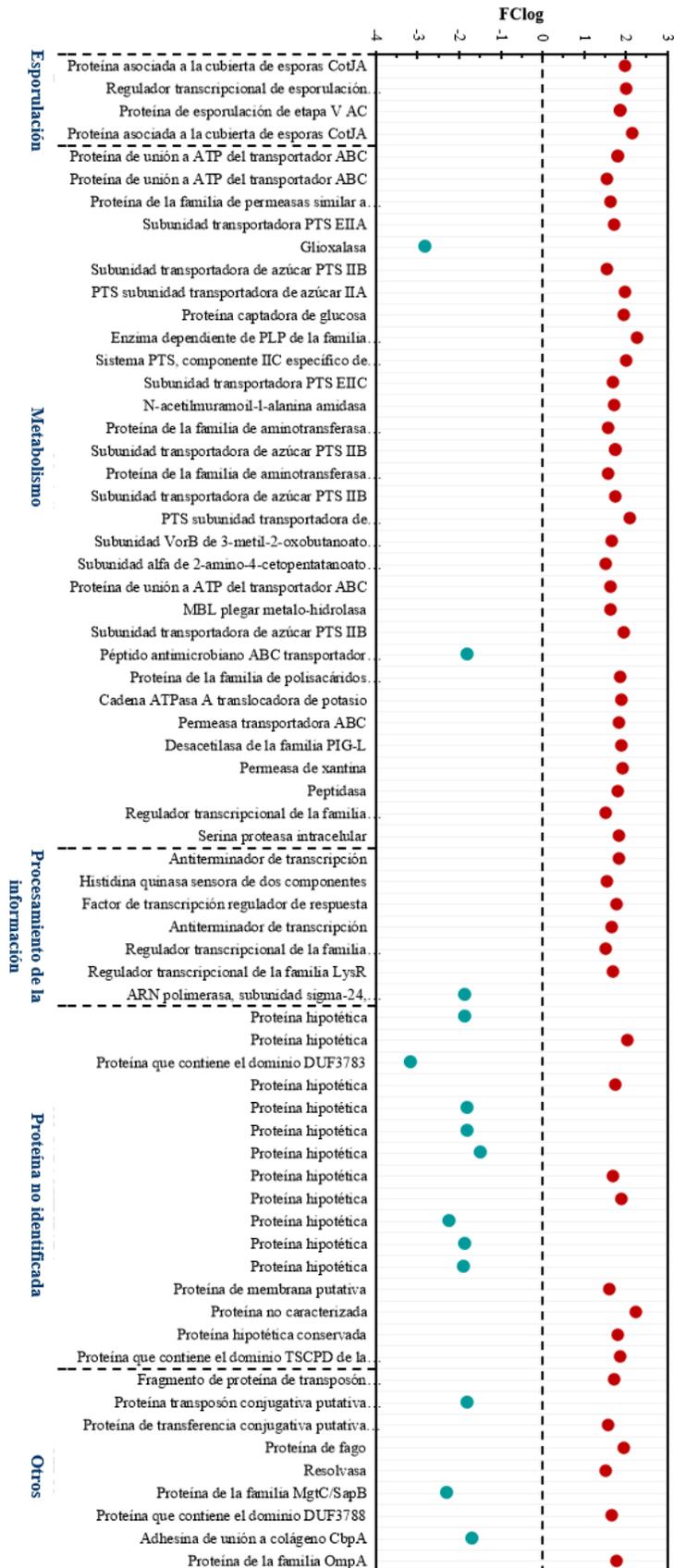
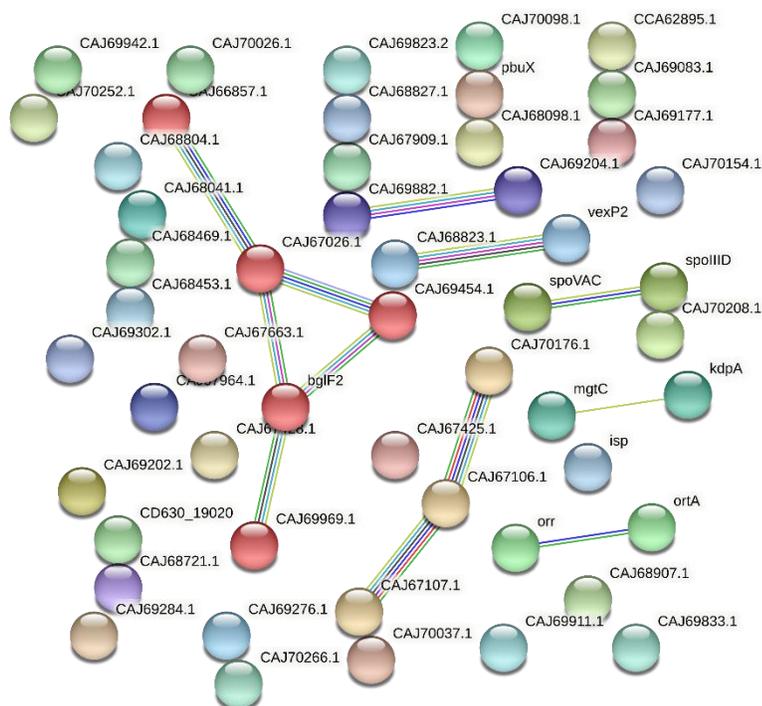


Figura 35. Genes únicos diferencialmente expresados en biopelícula de 3 días en cepas asociadas a ICD-R del RT001. Los puntos rojos corresponden a los genes sobreexpresados y los puntos azules a los subexpresados. $FClog \geq 1.5$.

En el interactoma de los genes expresados diferencialmente en la biopelícula de 3 días en las cepas asociadas a ICD-R, se identificaron 7 clúster, la mayoría asociada a procesos metabólicos como el de la ornitina, arginina y sistema fosfotransferasa, además 3 clúster no tenían función identificada. Otro de los clústeres se asoció a procesos del desarrollo como la esporulación (Figura 36).



Símbolo	Cluster	Función
	1	Sistema de fosfotransferasa y metabolismo de asorbato y aldarato
	2	Sistema de fosfotransferasa y actividad del transportador transmembrana de manosa
	3	Procesos del desarrollo
	4	Metabolismo de la ornitina y arginina
	5	No identificada
	6	No identificada
	7	No identificada

Figura 36. Interacción de proteínas y agrupamiento por clúster en String de los genes únicos expresados diferencialmente en la biopelícula de *C. difficile* al día 3 en cepas asociadas a ICD-R del RT001.

La mayoría de las vías enriquecidas en la ontología de genes se asociaron principalmente al transporte en general y específico de carbohidratos, sustancias orgánicas, transmembrana y transmembrana de carbohidratos. La vía asociada al metabolismo fue la del sistema fosfotransferasa de azúcar dependiente de fosfoenolpiruvato. También se encontraron vías asociadas a la regulación del proceso celular y regulación de la transcripción (Figura 37; Anexo VI, Tabla 6.).

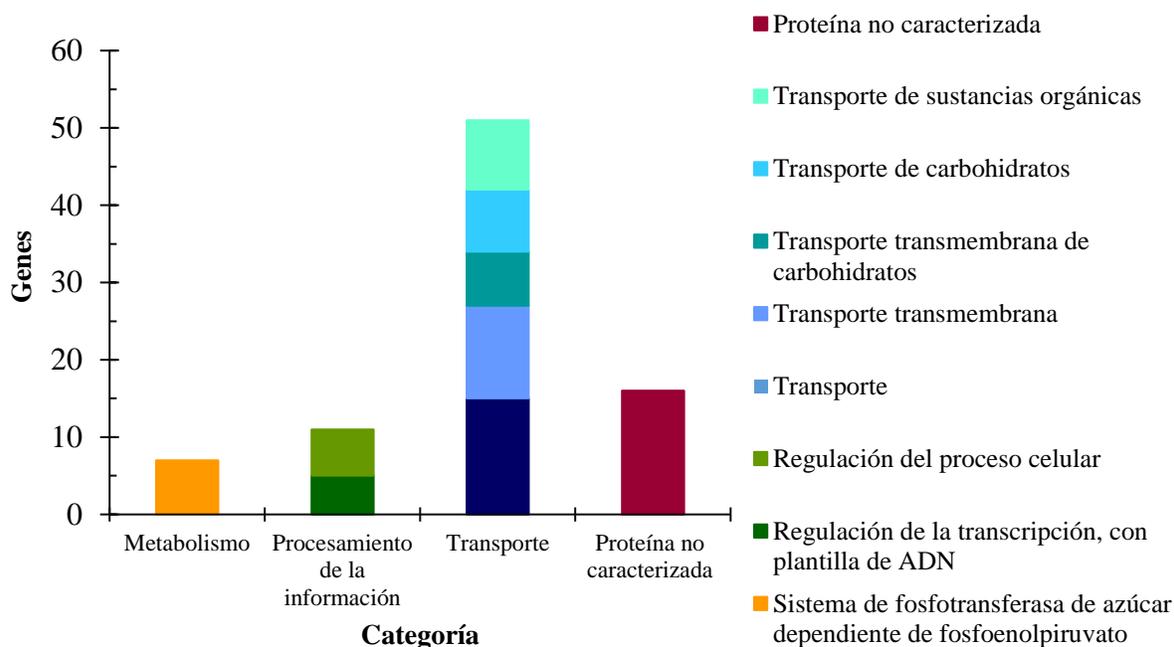


Figura 37. Vías enriquecidas en la ontología de los genes únicos expresados diferencialmente en la biopelícula de *C. difficile* al día 3 en cepas asociadas a ICD-R. FDR = ≤ 0.05 .

Se descargaron las secuencias aminoacídicas de las proteínas no caracterizadas codificadas por los genes únicos con expresión diferencial de la biopelícula de ICD-R del RT001 y se buscaron homólogos utilizando Blastp (Tabla 28). Sin embargo, se obtuvieron pocas similitudes con otras proteínas. Se identificaron dos proteínas con similitud a proteínas de los fagos phiC2 y phiCD211.

Tabla 28. Identificación mediante blastp de las proteínas únicas no identificadas en la biopelícula de *C. difficile* a los 3 días de incubación en cepas asociadas a ICD-R del RT001.

ID	Proteína	Query cover	Per identity
AKP41243	Sistema de transporte tipo ABC, proteína de unión a ATP	100%	100%
CBE03994	Proteína hipotética phiC2p09	97%	96.24%
CAJ67693	mgsA Proteína de la familia ATPasa AAA+	96%	72.64%
AKP41282	Proteína que contiene dominio de cinta de zinc	83%	42.92%
CAJ68907	Proteína de replicación/mantenimiento RepL	85%	99.12%
CAJ69823	Proteína hipotética PHICD211_20113 [fago de Clostridium phiCD211]	96%	75%
CCA62895	Indeterminado		
CAJ70208	Indeterminado		
CAJ69177	Indeterminado		
CD630_21820	Indeterminado		
CAJ70266	Indeterminado		
CAJ68098	Indeterminado		
CAJ69276	Indeterminado		
CAJ67909	Indeterminado		
CAJ69069	Indeterminado		
CAJ68041	Indeterminado		

10.4.2. Genes que se expresan diferencialmente en la biopelícula de 3 días en cepas asociadas a ICD- NR e ICD-R en el RT027

Se realizaron subanálisis en donde se compararon los pools de cada ribotipo para determinar los genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días del RT027 en cepas asociadas a ICD-NR e ICD-R.

10.4.2.1. Genes que se expresan diferencialmente en la biopelícula de 3 días en cepas asociadas a ICD- NR en el RT027

Se realizó un subanálisis en donde se compararon las mezclas de cada ribotipo para determinar los genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días en cada ribotipo en cepas asociadas a ICD-NR e ICD-R del ribotipo 027.

Al comparar los genes expresados en la biopelícula de las cepas del RT027 asociadas a ICD-NR del día 1 y 3 de crecimiento se encontraron 45 genes sobreexpresados y 25 genes subexpresados, los cuales se dividieron en las categorías de esporulación, metabolismo, procesamiento y almacenaje de información, proteínas no identificadas y otros (Figura 38; Anexo V, Tabla 17).

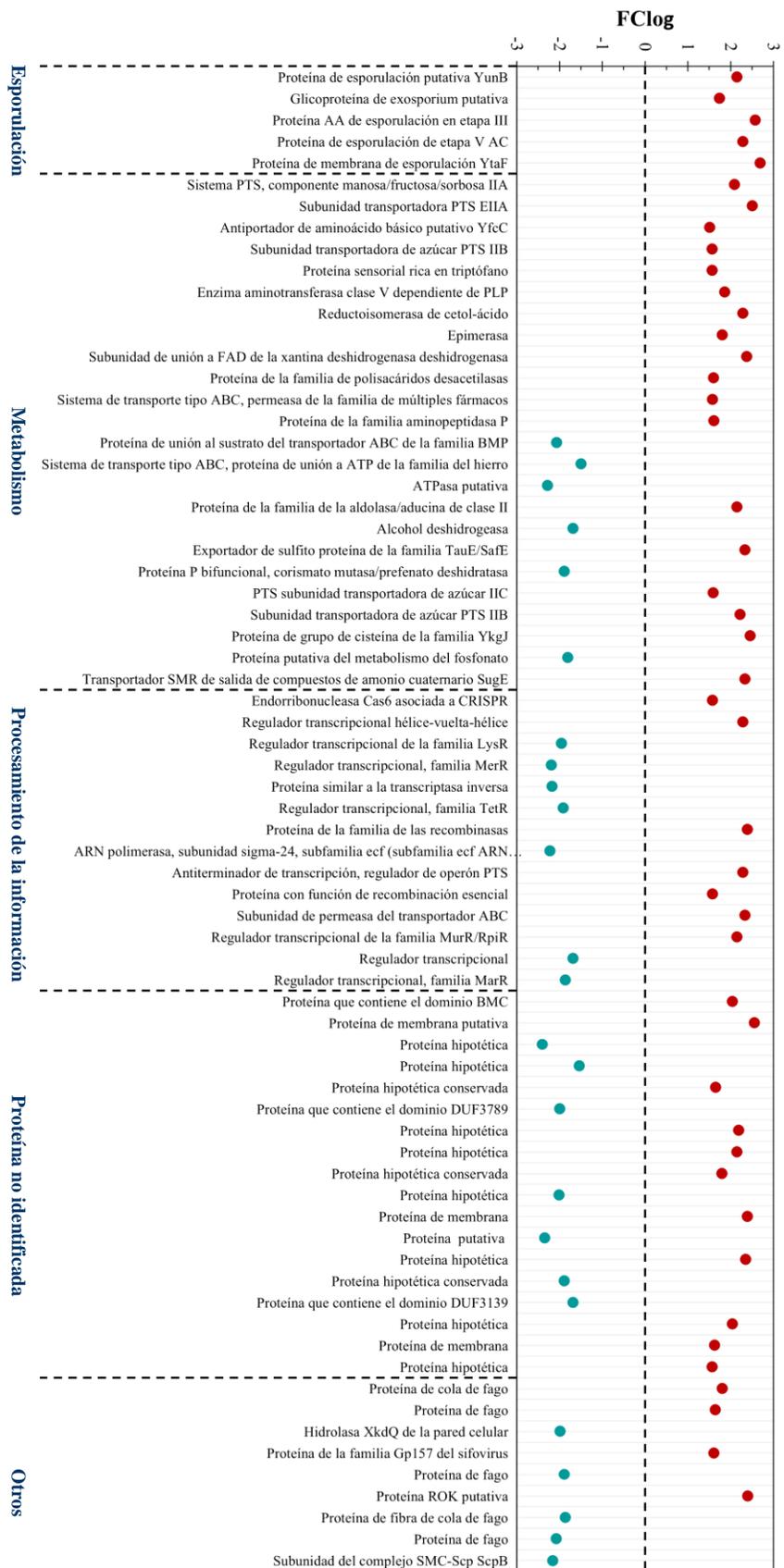


Figura 38. Genes diferencialmente expresados en biopelícula de 3 días en cepas asociadas a ICD-NR del RT027. Los puntos rojos corresponden a los genes sobreexpresados y los puntos azules a los subexpresados. $FClog \geq 1.5$.

Figura 39. Interacción de proteínas y agrupamiento por clúster en String de los genes expresados diferencialmente en la biopelícula de *C. difficile* al día 3 en cepas asociadas a ICD-NR del RT027.

Se encontraron dos vías enriquecidas, una asociada a la esporulación y la otra relacionada al metabolismo del ascorbato y aldarato en los genes diferencialmente expresados de la biopelícula asociada a ICD-NR del RT027 (Tabla 29; Anexo VI, Tabla 6).

Tabla 29. Vías enriquecidas de los genes expresados diferencialmente en la biopelícula de *C. difficile* al día 3 de incubación en cepas asociadas a ICD-NR de los RT027. FDR = ≤ 0.05

Recurso bioinformático	Vías enriquecidas	Genes	False discovery rate
GO	Esporulación	4	0.0010
KEGG	Metabolismo del ascorbato y aldarato	2	0.0216

10.4.2.2. Genes que se expresan diferencialmente en la biopelícula de 3 días en cepas asociadas a ICD- R en el RT027

Al comparar los genes expresados en la biopelícula de las cepas del RT027 asociadas a ICD-R del día 1 y 3 de crecimiento se encontraron 56 genes sobreexpresados y 17 genes subexpresados, los cuales se dividieron en las categorías de esporulación, metabolismo, procesamiento y almacenaje de información, proteínas no identificadas y otros (Figura 40).

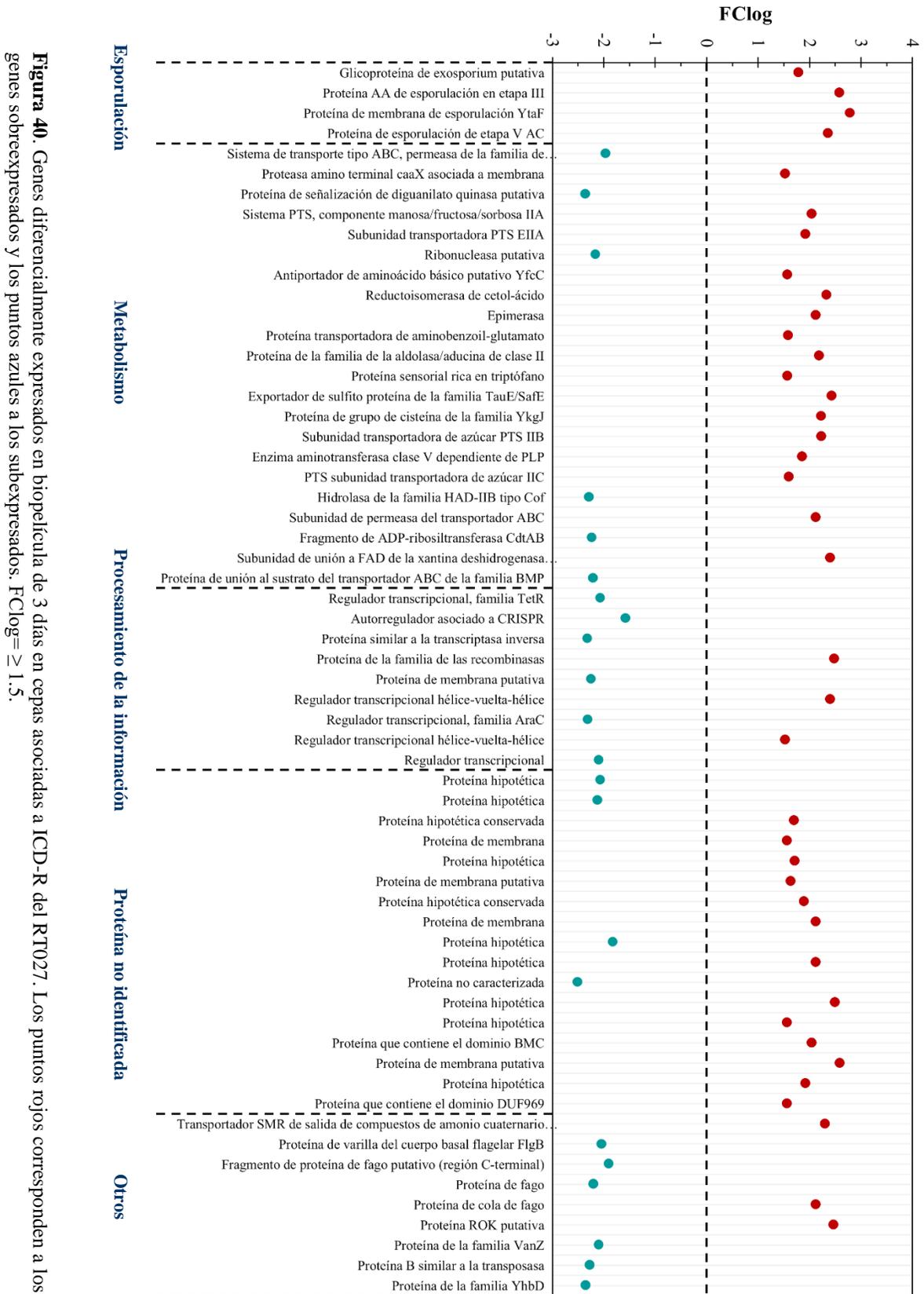


Figura 40. Genes diferencialmente expresados en biopelícula de 3 días en cepas asociadas a ICD-R del RT027. Los puntos rojos corresponden a los genes sobreexpresados y los puntos azules a los subexpresados. $FClog \geq 1.5$.

Se encontró una vía enriquecida asociada a la esporulación en los genes diferencialmente expresados de la biopelícula asociada a ICD-R del RT027 (Tabla 30, Anexo VI, Tabla 6).

Tabla 30. Vías enriquecidas de los genes expresados diferencialmente en la biopelícula de *C. difficile* al día 3 de incubación en cepas asociadas a ICD-R de los RT027. FDR = ≤ 0.05

Recurso bioinformático	Vías enriquecidas	Genes	False discovery rate
GO	Esporulación	3	0.0411

Se realizó un diagrama de Venn para determinar los genes únicos diferencialmente expresados en la biopelícula del RT027 a los 3 días de cepas asociadas a ICD-NR contra ICD-R, así como los genes en común (Figura 42, Anexo V, Tabla 18 y 19).



Figura 42. Diagrama de Venn. Los grupos comparados se muestran en los laterales.

En la biopelícula producida por las cepas asociadas a ICD-R de 3 días se sobreexpresaron 7 genes y subexpresaron 19 genes únicos de la condición, que se clasificaron en las categorías de metabolismo, procesamiento de la información, proteínas no identificadas y otros (Figura 43).

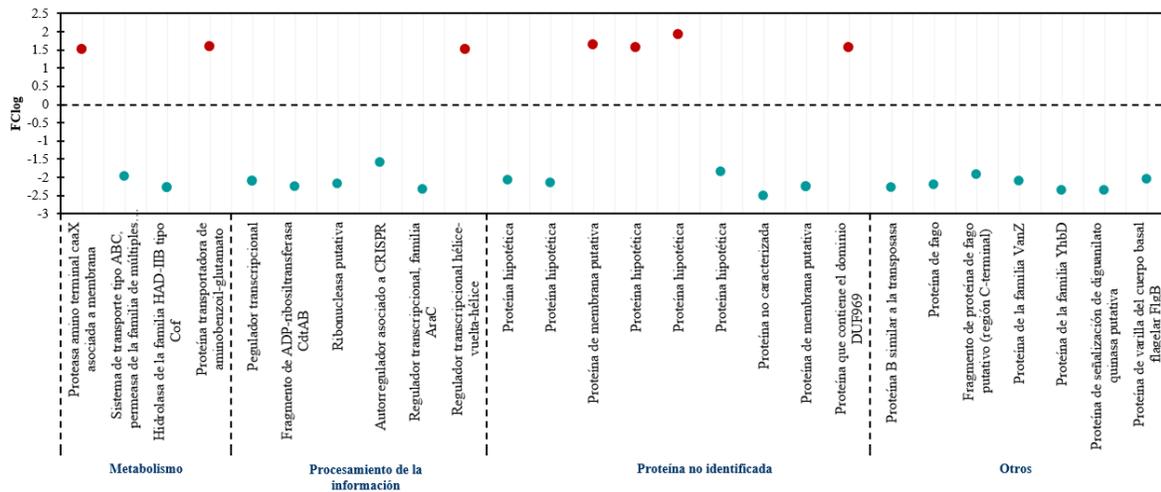


Figura 43. Genes únicos diferencialmente expresados en biopelícula de 3 días en cepas asociadas a ICD-R del RT027. Los puntos rojos corresponden a los genes sobreexpresados y los puntos azules a los subexpresados. $FClog \geq 1.5$.

En el interactoma de los genes únicos expresados diferencialmente en la biopelícula de 3 días en las cepas asociadas a ICD-R, se identificó 1 clúster, con función no identificada (Figura 44). No se encontraron vías enriquecidas.

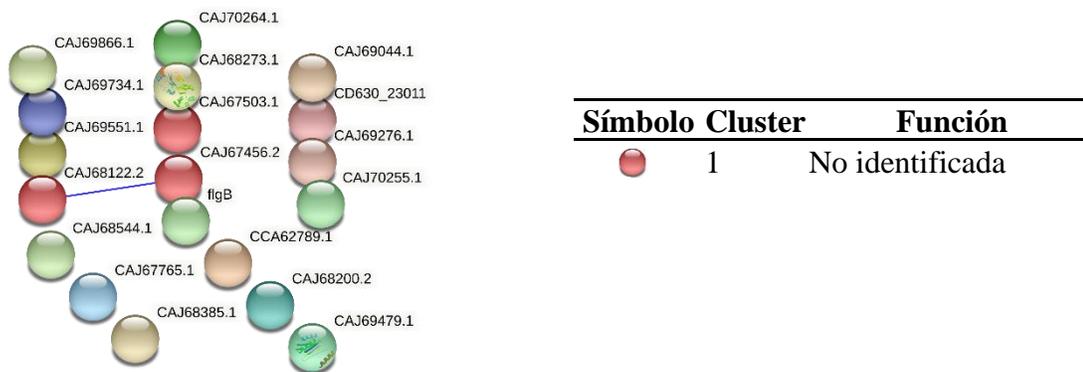


Figura 44. Interacción de proteínas y agrupamiento por clúster en String de los genes únicos expresados diferencialmente en la biopelícula de *C. difficile* al día 3 en cepas asociadas a ICD-R del RT027.

Se descargaron las secuencias aminoacídicas de las proteínas no caracterizadas codificadas por los genes únicos con expresión diferencial de la biopelícula de ICD-R del RT027 y se buscaron homólogos utilizando Blastp (Tabla 31). Sin embargo, se obtuvieron pocas similitudes con otras proteínas.

Tabla 31. Identificación mediante blastp de las proteínas únicas no identificadas en la biopelícula de *C. difficile* a los 3 días de incubación en cepas asociadas a ICD-R del RT027.

ID	Proteína	Query cover (%)	Per identity (%)
CAJ68385	Proteína de la familia YybS	99	88.16
CBE02518	Amidohidrolasa 3	78	99.71
CAJ69479	Proteína de la familia YicC	100	98.98
CAJ67456	Proteína que contiene el dominio C-terminal del fago	100	98.79
CBE04002	Proteína del tubo de la cola del fago	100	100
CCA62789	Indeterminado		
CAJ69866	Indeterminado		
CAJ67765	Indeterminado		
CAJ69276	Indeterminado		
CAJ68544	Indeterminado		
CD630_23011	Indeterminado		

10.4.3. Genes únicos diferencialmente expresados en común en la biopelícula de 3 días del RT001 y 027 en cepas asociadas a ICD-R

Se realizó un diagrama de Venn donde se compararon los genes expresados diferencialmente en la biopelícula de 3 días de las cepas asociadas a ICD-R de los RT001 y RT027, 63 genes fueron únicos para la biopelícula de 3 días de las cepas asociadas a ICD-R del RT001 y 25 genes fueron únicos para la biopelícula de 3 días de las cepas asociadas a ICD-R del RT027 y 1 genes en común de ambos ribotipos que correspondió a una probable proteína de membrana y se sobreexpresó en ambos ribotipos (Figura 45). No se encontró homología de la proteína en las bases de datos.

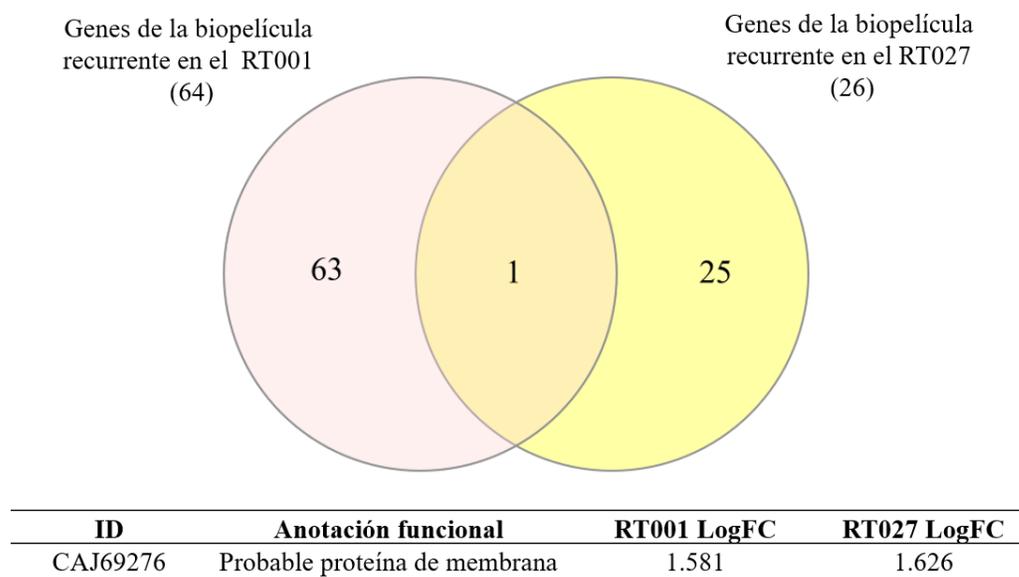


Figura 45. Diagrama de Venn. Los grupos comparados se muestran en los laterales

11. Validación de los resultados de los microarreglos mediante RTqPCR

11.1. Selección de genes

De los análisis y subanálisis realizados se seleccionaron 5 genes para realizar la validación de los resultados de los microarreglos mediante RTqPCR (Tabla 28). Se seleccionaron genes que participaran en la vía de la esporulación (Figura 46) y por el FClog ≥ 2 , excepto CAJ70248 que se seleccionó por la evidencia científica que verifica su asociación con la recurrencia en células planctónicas de *C. difficile* R20291 (RT027) (Castro-Córdova et al., 2021).

Los genes CAJ67607, CAJ70248, CAJ67384 y CAJ68100 se encontraron sobreexpresados en la biopelícula de 3 días asociados a ICD-R, independiente de ribotipo. El gen CAJ68046 se sobreexpresó en la biopelícula de 3 días asociada a ICD-NR e ICD-R de ambos ribotipos (Tabla 32).

Tabla 32. Características de los genes seleccionados para realizar la validación de los microarreglos.

ID	Nombre	FClog	Valor P	Sobreexpresado en:	Vía de la esporulación	Significativo después de la corrección	ICD-R
CAJ67607	Proteína de esporulación de etapa V AC	2.09	<0.001	Gen con expresión diferencial en la biopelícula de 3 días de cepas recurrentes del RT001 y RT027	X		
CAJ68046	Proteína AA de esporulación en etapa III	2.26	<0.001	Gen con expresión diferencial en la biopelícula de 3 días de cepas recurrentes del RT001 y RT027 Biopelícula recurrente de 3 días independiente de ribotipo	X		
CAJ70248	Glicoproteína de exosporium similar al colágeno BclA3	1.66	<0.001		X		X
CAJ67384	Pre-pro-forma de enzima lítica de corteza de esporas	3.57	<0.001	Biopelícula recurrente de 3 días independiente de ribotipo	X		
CAJ68100	Proteína hipotética conservada	2.98	<0.001	Biopelícula recurrente de 3 días independiente de ribotipo		X	

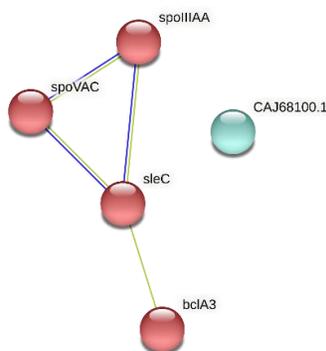


Figura 46. Interacción de proteínas de los genes seleccionados para la validación de los microarreglos.

11.1.1. Diseños de cebadores

Se descargaron las secuencias de cada gen y posterior se alinearon para obtener la secuencia consenso, con la que se diseñaron los cebadores con el método de la TM y utilizando Primer blast, posterior a su verificación con Oligo7 y PCR *in silico*. Las secuencias y el tamaño de los productos amplificados se muestran en la Tabla 29. El diseño de cebadores para el gen *rrs* se obtuvo de la literatura (Denève et al., 2009).

El ARN de cada pool fue retrotranscrito y posterior se realizó la estandarización de cada cebador utilizando de 60 °C hasta 63 °C, diferentes concentraciones de cebador 50, 200 y 300 nM, para establecer las mejores condiciones de amplificación (Tabla 33).

Tabla 33. Cebadores y concentraciones utilizadas para la qPCR

Gen	Cebador	Producto (pb)	Concentración qPCR
CAJ67607	F- GTAGACCAAATAAGCCCAAACCTAC	136	200 nM
	R- CACCTAGTTTATCAAGACCTCCAAC		200 nM
CAL68046	F- GGGAAATTATTGGATGCTCGG	210	200 nM
	R- CTCCTGCTATCTCATTACGCTCA		200 nM
CAJ70248	F- GCTGTTGCTGCTATATTTAATCCTG	187	200 nM
	R- CAGCACTTTCACTTGTGGTTC		200 nM
CAJ67384	F- ACAACGAAACCAGTAGGAGGT	168	200 nM
	R- AGCAAGACAAGGAGTTCCCAT		200 nM
CAJ68100	F- GAACTACAACAACAAAGTCTTGAA	238	200 nM
	R- CTGCTTGACTACTTTCGCCAT		200 nM
<i>rpsJ</i>	F- GATCACAAGTTTCAGGACCTG	151	200 nM
	R- GTCTTAGGTGTTGGATTAGC		200 nM
<i>rrs</i>	F- GGGAGACTTGAGTGCAGGAG	120	50 nM
	R- GTGCCTCAGCGTCAGTTACA	(Denève et al., 2009)	50 nM

Se realizó la curva de ADNc para cada gen, posteriormente se graficó el Ct y el log10 de la concentración de ADNc para obtener los valores de la ecuación (Figura 47), posteriormente se calculó la eficiencia para cada gen (Tabla 34). Solo para el gen CAJ68100 la pendiente fue menos a -3. El gen CAJ68046 presento el coeficiente de correlación (R^2) menor con 0.86. La eficiencia fue menor a 2 en los genes *rrs* (1.79) y CAJ70248 (1.82)

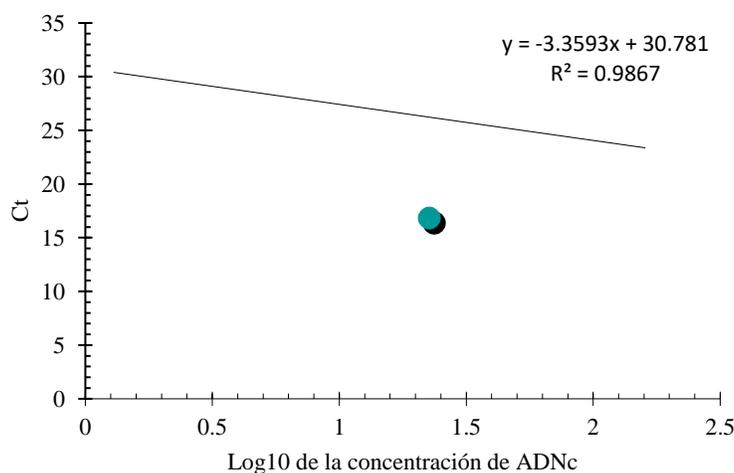


Figura 47. Curva de ADNc. Figura representativa de la curva de ADNc obtenida por cada gen para el cálculo de la eficiencia de la reacción.

Tabla 34. Resultados de la eficiencia de la reacción para cada gen.

Gen	Pendiente	R^2	Eficiencia
<i>rrs</i>	-3.96	0.99	1.79
<i>rpsJ</i>	-3.24	0.94	2.04
CAJ67384	-3.28	0.99	2.02
CAJ70248	-3.84	0.93	1.82
CAJ68100	-2.96	0.96	2.17
CAJ68046	-3.03	0.86	2.14
CAJ67607	-3.36	0.99	1.98

11.2. qPCR de los genes de interés

Una vez establecidas las condiciones de cada reacción se realizaron las qPCR para cada pool estudiado y se calculó la expresión relativa utilizando la fórmula de Método Delta-delta Ct Pfaffl, utilizando a los genes endógenos *rrs* y *rpsJ* para la normalización y el pool 1-1-NR como control para los pools 1-1-R, 3-1-NR y 3-1-R. En caso de los pools 1-27-R, 3-27-NR y 3-27-R se utilizó como control el pool 1-27-NR.

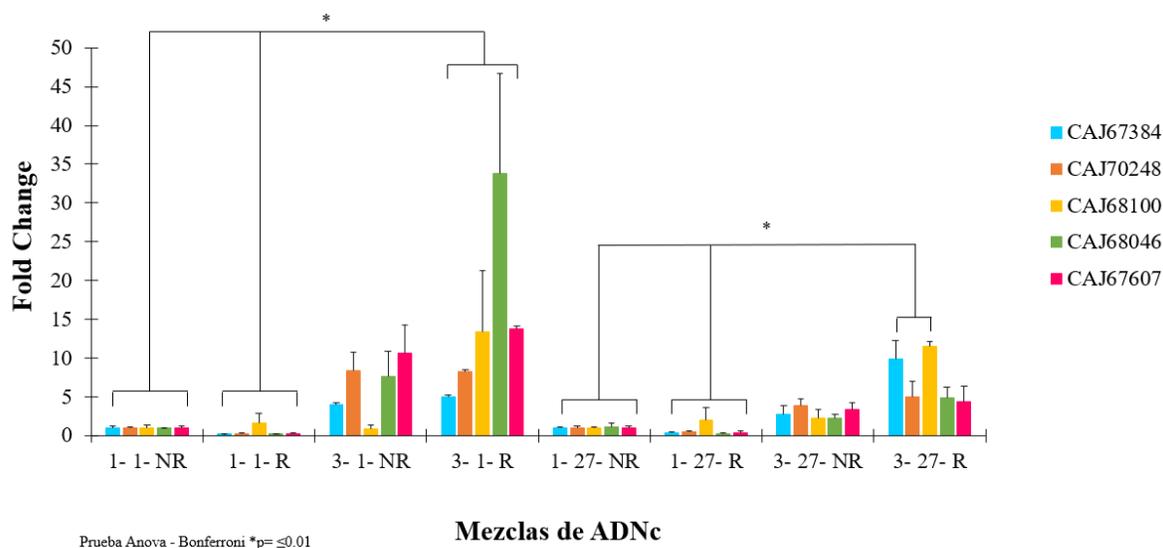


Figura 48. Grafica de expresión relativa de los 8 pools de interés.

Una vez obtenida la expresión relativa de cada pool se realizó una gráfica y análisis de significancia utilizando la prueba post hoc de Bonferroni (Figura 48).

En el caso de los pools del ribotipo 001, todos los genes se sobreexpresaron en el pool 3-1-R contra los pools 1-1-NR y 1-1-R con significancia de ≤ 0.01 (Figura 48). Al comprar la expresión contra el pool 3-1-NR, los genes CAJ67384, CAJ68046, se sobreexpresaron y alcanzaron una significancia ≤ 0.01 , para CAJ68100 la significancia fue de 0.022 (Tabla 32).

Se encontraron algunas diferencias en la expresión en los pools del ribotipo 027, al comprar el pool 3-27-R contra los pools 1-27-NR y 1-27-R, se sobreexpresaron los genes CAJ67384, CAJ70248 y CAJ38100 con significancia ≤ 0.01 (Figura 48). Al comparar la expresión contra el pool de 3-27-NR los genes CAJ67384, CAJ68046, se sobreexpresaron y alcanzaron una significancia ≤ 0.01 , para CAJ68100 la significancia fue de 0.04 (Tabla 35).

No hay diferencia en la expresión de los genes CAJ70248 y CAJ67607 entre la biopelícula de 3 días asociada a ICD-NR contra la biopelícula de 3 días asociada a ICD-R en ambos ribotipos (Tabla 35), pero si hay sobreexpresión al comparar la expresión con 1 día de crecimiento.

Tabla 35. Valores de la significancia estadística de cada gen en la biopelícula asociada a ICD-R de 3 días de cada ribotipo.

Pools comparados		Valor p por gen				
		CAJ67384	CAJ70248	CAJ68100	CAJ68046	CAJ67607
3-1-NR	3-1-R	≤ 0.01	1.000	0.022	≤ 0.01	1.000
3-27-NR	3-27-R	≤ 0.01	1.000	0.049	≤ 0.01	1.000

La sobreexpresión de los genes evaluados mediante qPCR, es similar a la encontrada en los microarreglos, por lo tanto, se validan los resultados.

DISCUSIÓN

12. Producción de biopelícula

En este trabajo, se analizó el perfil transcriptómico en un modelo de biopelícula *in vitro* de *C. difficile* en los ribotipos 027 y 001 asociados a infección recurrente. Se encontró que *C. difficile* produjo mayor biopelícula a los 3 días de crecimiento, el ribotipo 027 presentó mayor producción de biopelícula en el primer día comparado con el ribotipo 001, sin embargo, al tercer día el RT001 produjo mayor biopelícula que el RT027.

Monot et al., analizó la producción de biopelícula de 35 cepas aisladas de humanos correspondientes a diversos ribotipos en un modelo de biopelícula de 72 horas en microplacas de poliestireno de 24 pocillos en medio BHIS adicionado con 1.8% de glucosa y posterior tinción con 0.2% de cristal violeta y medición de la DO a 570 nm (Monot et al., 2018). Las cepas del RT001 (E23, DO_{570nm} 0.359; CD268 DO_{570nm} 0.648) fueron clasificadas como formadoras débiles de biopelícula y las cepas del RT027 (CD196, DO_{570nm} 1.630; R20291, DO_{570nm} 2.471) se clasificaron como productoras moderadas (Monot et al., 2018). En los resultados obtenidos en este trabajo existen diferencias en las clasificaciones de la producción de biopelícula encontradas debido a que el 40% de los aislamientos correspondientes al RT001 fueron clasificados como productores fuertes (4, n=10) y para el RT027 el 100% fueron productores fuertes (10, n=10) a las 72 horas.

Se encontró que el RT027 presenta mayor producción de biopelícula en el primer día comparado con el RT001, pero al tercer día el RT001 produce mayor biopelícula que el RT027. El único estudio en donde se analiza la producción de biopelícula de los RT001 y 027 es el de Pantaleón (Monot et al., 2018), la producción media a DO_{570 nm} de biopelícula por las cepas RT027 fue de 2.0505 y en el presente trabajo fue de 0.3898 a DO_{595 nm} y para el RT001 fue de DO_{570 nm} 0.5035 contra DO_{595 nm} 1.187. La mayor producción de biopelícula por *C. difficile* RT027 al día 1 y su menor producción en el día 3, concuerda con lo reportado en la cepa R20291 (RT027) (Đapa et al., 2013). La variación en los resultados con la literatura reportada podría deberse a las diferencias en el modelo de la biopelícula, ya que la adición de glucosa 1M aumenta la producción de biopelícula de *C. difficile* 630 (RT012) y R20291 (RT027) (Đapa et al., 2013) o del tamaño del inóculo utilizado para la formación de

biopelícula ya que al inocular con un cultivo de 16 horas de crecimiento no se tiene control estricto de la cantidad de bacterias existentes, como se utilizó en el modelo de Monot et al., en cambio al realizar una suspensión al 0.5 de McFarland el inóculo es más preciso, esta técnica se empleó en este trabajo. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la producción de biopelícula es variable entre las cepas de distintos ribotipos de *C. difficile* y cambia a través del tiempo.

Se ha descrito previamente la capacidad de la biopelícula para ser un reservorio de esporas y causar la ICD-R en un modelo in vitro de triple quimiostato (Normington et al., 2021), sin embargo la diferencia en la producción de biopelícula por cepas asociadas ICD-R e ICD-NR y su papel en la recurrencia de *C. difficile* ha sido poco estudiada, contrario a lo que sucede con otros microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* en donde se ha asociado la mayor producción de biopelícula con la infección recurrente (Svensson et al., 2021). En este trabajo se encontró mayor producción de biopelícula por las cepas asociadas a ICD-R a los 3 días de incubación de los RT001 y 027 ($p \leq 0.01$), lo cual sugiere que la producción de biopelícula tiene un papel importante en la ICD-R.

13. Genes expresados diferencialmente en la biopelícula

La expresión génica global se comparó entre las células planctónicas de 1 día y la biopelícula de 3 días y se encontraron 12 genes sobreexpresados y 3 subexpresados, que se agruparon en 2 clúster, asociados a la esporulación, oxidación de lípidos y metabolismo de d-arginina y d-ornitina. En un estudio previo realizado en un modelo de biopelícula de 3 días en un microfermentador con la cepa de *C. difficile* 630 (RT012) se encontraron 751 genes 338 genes subexpresados y 413 genes subexpresados con diferentes fold change entre la biopelícula y las células planctónicas (Poquet et al., 2018), entre los más sobreexpresados se encontraron los del sistema fosfotransferasa, resultado que no concuerda con lo encontrado en el presente trabajo. Probablemente debido al modelo utilizado de biopelícula y a la utilización de aislamientos proveniente de pacientes.

13.1. Genes expresados en la biopelícula de 3 días asociada a ICD-R, independiente del ribotipo

Se encontraron 18 genes sobreexpresados y 3 subexpresados, y después de la corrección de Benjamini-Hochberg únicamente 3 genes permanecieron sobreexpresados y 1 subexpresado, en la biopelícula de 3 días asociada a ICD-R con una $p \leq 0.5$. Entre los genes no significativos después de la corrección de encontraron genes que participan en la vía de la esporulación y del sistema fosfotransferasa. En el caso de los genes estadísticamente significativos después de la corrección fueron una deshidrogenasa putativa (ID CAJ70148; FClog= 3.7), la proteína A de segregación y condensación (ID= CAJ68151; FClog= -2.87) y dos proteínas no caracterizadas (ID CAJ68100 y CAJ69725; FClog 2.98 y 4.22). El gen CAJ68100 codifica a una probable proteína del sistema de secreción de tipo II con una identidad de 42.66%. Se desconoce identidad de la proteína que codifican los genes CAJ68100 y CAJ69725 por lo que se requiere el estudio y caracterización de estos.

13.2. Genes expresados en las células planctónicas asociados a ICD-R

Entre los 124 genes sobreexpresados y 26 subexpresados en las células planctónicas de 1 día de incubación asociadas a ICD-R del RT001 se encuentra el gen CAJ70248 (FClog 1.612) que codifica a la proteína BclA3. Esta proteína forma las estructuras hair-like del exosporium de las esporas de *C. difficile* 20291 (RT027) y participa en la adhesión (Mora-Uribe et al., 2016) a la fibronectina y vitronectina (Paredes-sabja et al., 2012), las cuales se unen a las subunidades Fn- $\alpha 5\beta 1$ y Vn- $\alpha v\beta 1$ para internalizarse a los colonocitos y favorecer a la ICD-R (Castro-Córdova et al., 2021), debido a la evasión de la respuesta inmune y a la terapia antibiótica. Otros genes que codifican para proteínas que participan en la vía de la esporulación se encontraron sobreexpresados CAJ69357 (FClog 1.612), CAJ67429 (FClog 2.112), CAJ67608 (FClog 2.185) y CAJ67034 (FClog 2.230), por lo que la vía de la esporulación podría jugar un papel importante en la ICD-R. Las vías enriquecidas con mayor número de genes se relacionaron con el transporte, transporte transmembrana, carbohidratos y sustancias orgánicas, así como vías asociadas al metabolismo de aminas, etanolamina y moléculas pequeñas, por lo que el transporte, la esporulación y el metabolismo tienen un papel importante en las células planctónicas de 1 día del RT001.

En las células plantónicas de 1 día asociadas a ICD-R del RT027 se encontraron 31 genes sobreexpresados y 26 subexpresados, la única vía enriquecida fue el de la esporulación, ya que 2 genes se sobreexpresaron CAJ67616 (FClog 3.226) y CAJ68046 (FClog 2.059) y 2 se subexpresaron CAJ67607 (FClog -2.039) y CAJ69029 (FClog -1.953), además también se subexpresaron 13 genes relacionados con el metabolismo sin embargo no se enriquecieron ninguna vía en específico. En el caso de las células planctónicas de 1 día asociada a ICD-R del RT027 la vía de la esporulación y la subexpresión de genes asociados al metabolismo parece tener un papel importante en la recurrencia.

Ambos ribotipos comparten 10 genes asociados a ICD-R, asociados con la vía de la esporulación CAJ67616 y CAJ68046, y la vía enriquecida del metabolismo del ascorbato y aldarato.

13.3. Genes expresados en la biopelícula asociados a ICD-NR e ICD-R

Se encontraron 150 genes sobreexpresados y 48 genes subexpresados en la biopelícula de *C. difficile* al día 3 en cepas asociadas a ICD-NR del RT001 y la mayoría de las vías enriquecidas en la ontología de genes se asociaron principalmente al metabolismo de la arginina, etanolamina, compuestos organonitrogenados, moléculas pequeñas, aminas y sistema fosfotransferasa, así como las vías de transporte transmembrana, de carbohidratos y sustancias orgánicas (Figura 32), similar a lo encontrado en la biopelícula de *C. difficile* al día 3 en cepas asociadas a ICD-R del RT001 en donde se encontraron 56 genes sobreexpresados y 17 genes, la mayoría de las vías enriquecidas en la ontología de genes se asociaron principalmente al transporte en general y específico de carbohidratos, sustancias orgánicas y transmembrana de carbohidratos. La vía asociada al metabolismo fue la del sistema fosfotransferasa de azúcar dependiente de fosfoenolpiruvato (Figura 33). Pese a que las vías enriquecidas en la biopelícula asociada a ICD-NR e ICD-R son similares, los genes que participan son diferentes, ya que solo se encontraron 9 genes en común, 189 genes únicos en caso de la ICD-NR y 64 únicos en el caso de ICD-R (Figura 34). Las vías enriquecidas con mayor número de genes únicos asociados a ICD-R fueron el transporte en general y específico de carbohidratos, sustancias orgánicas, transmembrana y transmembrana de carbohidratos. La vía asociada al metabolismo fue la del sistema fosfotransferasa de azúcar dependiente de fosfoenolpiruvato. También se encontraron vías asociadas a la regulación del

proceso celular y regulación de la transcripción (Figura 37). Además, se encontraron genes que codifican a dos proteínas homologas de fagos phiC2 (CBE03994) y phiCD211 o phiCDIF1296T (CAJ69823) (Tabla 24). El fago phiC2 se ha asociado a una mayor producción de TcdB sin la alteración de la transcripción del gen *tcdB* (Goh et al., 2005), y promueve la transducción de resistencia a la eritromicina a través de la transferencia del gen *erm* transportado en Tn6215 (Fortier, 2018), además se han encontrado elementos de este profago en genomas de *C. difficile* asociados a ICD-R (Kulecka et al., 2021). phiCD211 es el fago más grande identificado en *C. difficile* presenta varios genes de transposasa e integrasa que sugiere eventos de recombinación anteriores con otros elementos genéticos móviles, sin embargo aún se desconoce su papel en la virulencia de *C. difficile* (Garneau et al., 2014).

Kulecka et al. estudiaron mediante secuenciación de genoma completo los cambios en el genoma de 36 cepas de *C. difficile* asociadas a ICD-NR y 98 cepas asociadas a ICD-R de distintos ribotipos, proveniente de aislamientos de pacientes oncológicos. Se encontraron 65 genes con sitios bajo selección positiva en las cepas ICD-R, la mayoría relacionados con el metabolismo, quimiotaxis (*cheC*) y toxinas (*tcdB*), además se encontraron grupos de genes predictores de la recurrencia asociados a 7 vías enriquecidas como la fosforilación oxidativa, metabolismo del carbono, metabolismo microbiano en diversos ambientes, ribosoma, biosíntesis de antibióticos, metabolismo del ácido 2-oxocarboxílico y fijación de carbono en organismos fotosintéticos, estos resultados son similares a los encontrados en el trabajo actual en donde se encontraron vías enriquecidas en la ontología de genes del transporte de carbohidratos y sustancias orgánicas, transporte transmembrana de carbohidratos y sistema fosfotransferasa de azúcar dependiente de fosfoenolpiruvato en las cepas asociadas a recurrencia del ribotipo 001 (Kulecka et al., 2021).

El sistema fosfotransferasa y transporte de moléculas participa en la biopelícula asociada a ICD-R de los 3 días del RT001. El sistema de fosfotransferasa de carbohidratos dependiente de fosfoenolpiruvato es el principal sistema bacteriano de asimilación de carbohidratos (Antunes et al., 2011) y según el estado de fosforilación de las proteínas que lo constituyen se asocia a la absorción y metabolismo de los carbohidratos, funciones asociadas con el

metabolismo del C, N y P, la producción de toxinas y a la quimiotaxis, por lo que es importante para la adaptación, crecimiento y supervivencia de *C. difficile* (Janoir et al., 2013).

Se ha reportado la sobreexpresión de genes asociados a factores de virulencia en la biopelícula *in vitro* de 7 días *C. difficile* en cepas asociadas a ICD-R de distintos ribotipos que pertenecen a una proteína de la pared celular (*cwp84*), esporulación (*spo0A*, *sigH*) y quorum sensing (*agrDI*), similar a lo encontrado en el modelo *in vitro* de 3 días, donde se encontraron genes asociados a la vía de la esporulación (CAJ67607, CAJ66946, CAJ67428) sobreexpresados en las cepas asociadas a ICD-R en el RT001.

En la biopelícula de 3 días en cada ribotipo en cepas asociadas a ICD-NR del RT027 se encontraron 45 genes sobreexpresados y 25 genes subexpresados (Figura 38), que se asociaron dos vías enriquecidas, una asociada a la esporulación y la otra relacionada al metabolismo del ascorbato y aldarato (Tabla 25), en el interactoma se identificaron 7 clústeres, 2 asociados al sistema de fosfotransferasa relacionado con el transportador de manosa y componente IIC de tipo celobiosa y 1 correspondiente a la esporulación y oxidación de lípidos, así como 3 cluster con función no identificada (Figura 39), similar a lo encontrado en la biopelícula de 3 días de las cepas del RT027 asociadas a ICD-R se encontraron 56 genes sobreexpresados y 17 genes subexpresados (Figura 40). Se encontró una vía enriquecida asociada a la esporulación y en el interactoma se identificaron 7 clúster, 1 asociado al sistema de fosfotransferasa relacionado con el componente IIC de tipo celobiosa y 1 correspondiente a la esporulación y oxidación de lípidos, así como 4 clúster con función no identificada (Figura 39). Se comparten 35 genes entre la biopelícula de ICD-NR e ICD-R entre los cuales se incluyen los genes asociados a la vía de la esporulación CAJ70128, CAJ68046, CAJ67607 y CAJ69029 y genes relacionados con el sistema fosfotransferasa CAJ69973, CAJ70347, CAJ67320 y CAJ67026.

Entre los genes únicos diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días del RT027 están los genes relacionados al transporte del glutamato y sistema de transporte ABC y un gen asociado al flagelo CAJ67066 que codifica a la proteína de varilla del cuerpo basal flagelar (*flgB*, FClog -2.04) que se encontró subexpresado. Los flagelos son un sistema de

secreción de tipo III que puede regular los factores de virulencia y es importante para la inducción de respuestas proinflamatorias y la invasión de las células huésped (Baban et al., 2013; Duan et al., 2013; Stevenson et al., 2015). Este sistema también se ha asociado con las últimas etapas de formación de biopelículas. En general, el nivel de producción de biopelículas disminuye en la cepa *C. difficile* R20219 (mutante *fliC*) después de cinco días de incubación en un medio BHIS que contiene glucosa 0,1 M (Timmaraju et al., 2013). Algunos estudios han sugerido que se requiere motilidad mediada por flagelos en las últimas etapas de la formación de biopelículas (Pantaléon et al., 2018). Hasta el día de hoy no se ha estudiado el papel del gen *flgB* en la biopelícula.

Otro de los genes únicos asociados a factores de virulencia subexpresado en la biopelícula de 3 días del RT027 fue CD630_26040 (FClog -2.242) que codifica para un fragmento de ADP-ribosiltransferasa CdtAB, que es parte de dos genes que codifican a la toxina CDT (Antunes et al., 2011). No se encontraron genes relacionados a las toxinas TcdA y TcdB en la ICD-R en ninguno de los análisis, por lo que no juegan un papel importante en la biopelícula asociada a ICD-R, de los RT001 y RT027.

Entre los genes únicos expresados diferencialmente en la biopelícula de 3 días de los RT001 y RT027, solo una probable proteína de membrana (RT001, FClog 1.581; RT027, FClog 1.626) se compartía en ambos ribotipos. Es probable que no se encontraron más genes en común debido a la gran variabilidad en el genoma de *C. difficile* (Kulecka et al., 2021) o por el número de cepas utilizadas, por lo cual se requieren más estudios del transcriptoma de *C. difficile*.

Múltiples genes que codifican para probables proteínas no caracterizadas se expresaron diferencialmente en la biopelícula de cepas asociadas a ICD-R y carecen de homología con proteínas de diferentes bases de datos, por lo que deben ser caracterizadas lo que podría ayudar a entender las adaptaciones necesarias en las cepas que se asocian a ICD-R.

CONCLUSIONES

- Existen diferencias en la producción de biopelícula entre los ribotipos 001 y 027 de *C. difficile*.
- Las cepas de *C. difficile* ribotipo 001 y 027 asociadas a ICD-R presentan mayor producción de biopelícula comparada con las cepas asociadas a ICD-NR al tercer día de crecimiento en medio BHIS.
- Existen diferencias en la expresión de genes en el modo de vida planctónico y la biopelícula.
- En la biopelícula producida por cepas asociadas a ICD-R independiente del ribotipo, se sobreexpresaron los genes asociados a una deshidrogenasa putativa (ID CAJ70148; FClog 3.7), la proteína A de segregación y condensación (ID CAJ68151; FClog - 2.87) y dos proteínas desconocidas (ID CAJ68100 y CAJ69725; FClog 2.98 y 4.22).
- En las células planctónicas de las cepas de *C. difficile* ribotipo 001 asociadas a ICD-R se encontraron 124 genes sobreexpresados y 26 genes subexpresados, pertenecientes a vías enriquecidas en el transporte y del metabolismo incluyendo el sistema de fosfotransferasa, así como procesos catabólicos de la etanolamina.
- En las células planctónicas de las cepas de *C. difficile* ribotipo 027 asociadas a ICD-R se encontraron 31 genes sobreexpresados y 26 genes subexpresados, pertenecientes a vías enriquecidas de la esporulación y metabolismo del ascorbato, aldarato, sucrosa y almidón.
- En la biopelícula de 3 días de las cepas de *C. difficile* ribotipo 001 asociadas a ICD-R se encontraron 56 genes sobreexpresados y 17 genes subexpresados, pertenecientes a vías enriquecidas en los procesos biológicos del metabolismo del sistema fosfotransferasa, transporte de carbohidratos y materia orgánica, procesamiento de la información, y proteínas no caracterizadas.
- En la biopelícula de 3 días de las cepas de *C. difficile* ribotipo 027 asociadas a ICD-R se encontraron 7 genes sobreexpresados y 19 genes subexpresados, no se encontraron vías enriquecidas.
- La expresión relativa obtenida mediante qPCR de los genes seleccionados validan los resultados de los microarreglos.

APORTACIONES

- Diseño de un microarreglo para *C. difficile* para los ribotipos 012, 001 y 027.
- Genes candidatos para nuevos tratamientos en la ICD-R.
- Conocimiento sobre las adaptaciones de la bacteria *C. difficile* en la infección recurrente.
- Probables biomarcadores de la ICD-R.

PERSPECTIVAS

A corto plazo:

- Evaluar el transcriptoma de cepas asociadas a ICD-R en un modelo *in vivo*.
- Determinar el transcriptoma de cepas asociadas a ICD-R de otros ribotipos.
- Evaluar el transcriptoma de cepas asociadas a ICD-R a 7 y 14 días de crecimiento.
- Evaluar los posibles blancos terapéuticos en los genes diferencialmente expresados en las cepas asociadas a ICD-R.
- Analizar los elementos móviles en las cepas asociadas a ICD-R.

A largo plazo:

- Establecer biomarcadores de *C. difficile* para la predicción, diagnóstico y pronóstico de la ICD-R.
- Evaluar nuevas opciones terapéuticas diseñadas para la ICD-R.

BIBLIOGRAFÍA

- Abou Chakra, C. N., Pepin, J., Sirard, S., & Valiquette, L. (2014). Risk factors for recurrence, complications and mortality in *Clostridium difficile* infection: A systematic review. *PLoS ONE*, 9(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098400>
- Allegretti, J. R., Marcus, J., Storm, M., Sitko, J., Kennedy, K., Gerber, G. K., & Bry, L. (2020). Clinical Predictors of Recurrence After Primary *Clostridioides difficile* Infection: A Prospective Cohort Study. *Digestive Diseases and Sciences*, 65(6), 1761–1766. <https://doi.org/10.1007/s10620-019-05900-3>
- Almogbel, M. S. (2016). Matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry for identification of clostridium species isolated from Saudi Arabia. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(2), 410–413. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.01.027>
- Álvarez-Hernández, D. A., González-Chávez, A. M., González-Hermosillo-Cornejo, D., Franyuti-Kelly, G. A., Díaz-Girón-Gidi, A., & Vázquez-López, R. (2018). Present and past perspectives on *Clostridium difficile* infection. *Revista de Gastroenterología de México (English Edition)*, 83(1), 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.rgmexen.2017.07.016>
- Antunes, A., Martin-Verstraete, I., & Dupuy, B. (2011). CcpA-mediated repression of *Clostridium difficile* toxin gene expression. *Molecular Microbiology*, 79(4), 882–899. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07495.x>
- Arvand, M., Hauri, A. M., Zaiss, N. H., Witte, W., & Bettge-Weller, G. (2009). *Clostridium difficile* ribotypes 001, 017, and 027 are associated with lethal *C. difficile* infection in Hesse, Germany. *Euro Surveillance: Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 14(45), 1–4. <https://doi.org/10.2807/ese.14.45.19403-en>
- Azimirad, M., Krutova, M., Yadegar, A., Shahrokh, S., Olfatifar, M., Aghdaei, H. A., Fawley, W. N., Wilcox, M. H., & Zali, M. R. (2020). *Clostridioides difficile* ribotypes 001 and 126 were predominant in Tehran healthcare settings from 2004 to 2018: a 14-year-long cross-sectional study. *Emerging Microbes and Infections*, 9(1), 1432–1443. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1780949>
- Baban, S. T., Kuehne, S. A., Barketi-Klai, A., Cartman, S. T., Kelly, M. L., Hardie, K. R.,

- Kansau, I., Collignon, A., & Minton, N. P. (2013). The Role of Flagella in *Clostridium difficile* Pathogenesis: Comparison between a Non-Epidemic and an Epidemic Strain. *PLoS ONE*, 8(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073026>
- Baghani, A., Mesdaghinia, A., Kuijper, E. J., Aliramezani, A., Talebi, M., & Douraghi, M. (2020). High prevalence of *Clostridioides difficile* PCR ribotypes 001 and 126 in Iran. *Scientific Reports*, 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61604-z>
- Bartlett, J. G., Chang, T. W., Gurwith, M., Gorbach, S. L., & Onderdonk, A. B. (1978). Antibiotic-Associated Pseudomembranous Colitis Due to Toxin-Producing Clostridia. *New England Journal of Medicine*, 298(10), 531–534. <https://doi.org/10.1056/nejm197803092981003>
- Beitelshees, M., Hill, A., Jones, C. H., & Pfeifer, B. A. (2018). Phenotypic variation during biofilm formation: Implications for anti-biofilm therapeutic design. *Materials*, 11(7), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ma11071086>
- Bidet, P., & Petit, J. (1999). Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing. *FEMS Microbiology Letters*, 175, 261–266.
- Braun, V., Hundsberger, T., Leukel, P., Sauerborn, M., & Von Eichel-Streiber, C. (1996). Definition of the single integration site of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile*. *Gene*, 181(1–2), 29–38. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(96\)00398-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(96)00398-8)
- Burns, D. A., Heap, J. T., & Minton, N. P. (2010). SleC is essential for germination of *Clostridium difficile* spores in nutrient-rich medium supplemented with the bile salt taurocholate. *Journal of Bacteriology*, 192(3), 657–664. <https://doi.org/10.1128/JB.01209-09>
- Burns, D. A., Heeg, D., Cartman, S. T., & Minton, N. P. (2011). Reconsidering the sporulation characteristics of hypervirulent *Clostridium difficile* BI/NAP1/027. *PLoS ONE*, 6(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024894>
- C.D.C. (2019). Antibiotic resistance threats in the United States. *Centers for Disease Control and Prevention*, 1–113. https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest_threats.html
- Carter, G. P., Lyras, D., Allen, D. L., Mackin, K. E., Howarth, P. M., O'Connor, J. R., & Rood, J. I. (2007). Binary toxin production in *Clostridium difficile* is regulated by CdtR, a LytTR family response regulator. *Journal of Bacteriology*, 189(20), 7290–7301.

<https://doi.org/10.1128/JB.00731-07>

- Castro-Córdova, P., Mora-Urbe, P., Reyes-Ramírez, R., Cofré-Araneda, G., Orozco-Aguilar, J., Brito-Silva, C., Mendoza-León, M. J., Kuehne, S. A., Minton, N. P., Pizarro-Guajardo, M., & Paredes-Sabja, D. (2021). Entry of spores into intestinal epithelial cells contributes to recurrence of *Clostridioides difficile* infection. *Nature Communications*, *12*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21355-5>
- Cheng, V. C. C., Yam, W. C., Lam, O. T. C., Tsang, J. L. Y., Tse, E. Y. F., Siu, G. K. H., Chan, J. F. W., Tse, H., To, K. K. W., Tai, J. W. M., Ho, P. L., & Yuen, K. Y. (2011). *Clostridium difficile* isolates with increased sporulation: Emergence of PCR ribotype 002 in Hong Kong. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *30*(11), 1371–1381. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1231-0>
- Cho, J. M., Pardi, D. S., & Khanna, S. (2020). Update on Treatment of *Clostridioides difficile* Infection. *Mayo Clinic Proceedings*, *95*(4), 758–769. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.08.006>
- Clements, A. C., Magalhães, R. J., Tatem, A. J., Paterson, D. L., & Riley, T. V. (2010). *Clostridium difficile* PCR ribotype 027: assessing the risks of further worldwide spread. *Lancet Infect Dis*, *10*(6), 395–404. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70080-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70080-3)
- Dapa, T., Leuzzi, R., Ng, Y. K., Baban, S. T., Adamo, R., Kuehne, S. A., Scarselli, M., & Minton, N. P. (2013). Multiple Factors Modulate Biofilm Formation by the Anaerobic Pathogen *Clostridium difficile*. *Journal of Bacteriology*, *195*(3), 545–555. <https://doi.org/10.1128/JB.01980-12>
- Dapa, T., & Unnikrishnan, M. (2013). Biofilm formation by *Clostridium difficile*. *Gut Microbes*, *4*(5), 397–402. <https://doi.org/10.4161/gmic.25862>
- Davey, M. E., & O’toole, G. A. (2000). Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *64*(4), 847–867. <https://doi.org/10.1128/membr.64.4.847-867.2000>
- Dávila, L. P., Garza-González, E., Rodríguez-Zulueta, P., Morfín-Otero, R., Rodríguez-Noriega, E., Villar-Compte, D., Rodríguez-Aldama, J. C., & Camacho-Ortiz, A. (2017). Increasing rates of *Clostridium difficile* infection in Mexican hospitals. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, *21*(5), 530–534.

<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2017.05.007>

- Dawson, L. F., Peltier, J., Hall, C. L., Harrison, M. A., Derakhshan, M., Shaw, H. A., Fairweather, N. F., & Wren, B. W. (2021). Extracellular DNA, cell surface proteins and c-di-GMP promote biofilm formation in *Clostridioides difficile*. *Scientific Reports*, *11*(1), 1–21. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78437-5>
- Dawson, L. F., Valiente, E., Faulds-pain, A., Donahue, E. H., & Wren, B. W. (2012). *Characterisation of Clostridium difficile Biofilm Formation , a Role for Spo0A*. *7*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050527>
- De Vos et al. (2009). Bergey's Manual OF Systematic Bacteriology. In *Springer* (Vol. 3, Issue 0). <https://doi.org/DOI: 10.1007/b92997>
- Deakin, L. J., Clare, S., Fagan, R. P., Dawson, L. F., Pickard, D. J., West, M. R., Wren, B. W., Fairweather, N. F., Dougan, G., & Lawley, T. D. (2012). The *Clostridium difficile* spo0A gene is a persistence and transmission factor. *Infection and Immunity*, *80*(8), 2704–2711. <https://doi.org/10.1128/IAI.00147-12>
- Denève, C., Bouttier, S., Dupuy, B., Barbut, F., Collignon, A., & Janoir, C. (2009). Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on colonization factor expression by moxifloxacin-susceptible and moxifloxacin-resistant *Clostridium difficile* strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *53*(12), 5155–5162. <https://doi.org/10.1128/AAC.00532-09>
- Dineen, S. S., Villapakkam, A. C., Nordman, J. T., & Sonenshein, A. L. (2007). Repression of *Clostridium difficile* toxin gene expression by CodY. *Molecular Microbiology*, *66*(1), 206–219. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05906.x>
- Duan, Q., Zhou, M., Zhu, L., & Zhu, G. (2013). Flagella and bacterial pathogenicity. *Journal of Basic Microbiology*, *53*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1002/jobm.201100335>
- Dupuy, B., Govind, R., Antunes, A., & Matamouros, S. (2008). *Clostridium difficile* toxin synthesis is negatively regulated by TcdC. *Journal of Medical Microbiology*, *57*(6), 685–689. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47775-0>
- Edwards, A. N., Nawrocki, K. L., & McBride, S. M. (2014). Conserved oligopeptide permeases modulate sporulation initiation in *clostridium difficile*. *Infection and Immunity*, *82*(10), 4276–4291. <https://doi.org/10.1128/IAI.02323-14>
- Eyre, D. W., Babakhani, F., Griffiths, D., Seddon, J., Del Ojo Elias, C., Gorbach, S. L., Peto,

- T. E. A., Crook, D. W., & Walker, A. S. (2014). Whole-genome sequencing demonstrates that fidaxomicin is superior to vancomycin for preventing reinfection and relapse of infection with *Clostridium difficile*. *Journal of Infectious Diseases*, *209*(9), 1446–1451. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit598>
- Fatima, R., & Aziz, M. (2019). The Hypervirulent Strain of *Clostridium Difficile*: NAP1/B1/027 - A Brief Overview. *Cureus*, *11*(1), 1–8. <https://doi.org/10.7759/cureus.3977>
- Fawley, W. N., Underwood, S., Freeman, J., Baines, S. D., Saxton, K., Stephenson, K., Owens, R. C., & Wilcox, M. H. (2007). Efficacy of Hospital Cleaning Agents and Germicides Against Epidemic *Clostridium difficile* Strains . *Infection Control & Hospital Epidemiology*, *28*(8), 920–925. <https://doi.org/10.1086/519201>
- Fisher, R. A., Gollan, B., & Helaine, S. (2017). Persistent bacterial infections and persister cells. *Nature Reviews Microbiology*, *15*(8), 453–464. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.42>
- Fortier, L. C. (2018). Bacteriophages contribute to shaping *Clostridioides* (*Clostridium*) *difficile* species. *Frontiers in Microbiology*, *9*(AUG), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02033>
- Francis, M. B., Allen, C. A., Shrestha, R., & Sorg, J. A. (2013). Bile Acid Recognition by the *Clostridium difficile* Germinant Receptor, CspC, Is Important for Establishing Infection. *PLoS Pathogens*, *9*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003356>
- Frost, L. R., Cheng, J. K. J., & Unnikrishnan, M. (2021). *Clostridioides difficile* biofilms: A mechanism of persistence in the gut? *PLOS Pathogens*, *17*(3), e1009348. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009348>
- Furuya-Kanamori, L., Marquess, J., Yakob, L., Riley, T. V., Paterson, D. L., Foster, N. F., Huber, C. A., & Clements, A. C. A. (2015). Asymptomatic *Clostridium difficile* colonization: Epidemiology and clinical implications. *BMC Infectious Diseases*, *15*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1258-4>
- Garey, K. W., Sethi, S., Yadav, Y., & DuPont, H. L. (2008). Meta-analysis to assess risk factors for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Journal of Hospital Infection*, *70*(4), 298–304. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2008.08.012>
- Garneau, J. R., Valiquette, L., & Fortier, L. C. (2014). Prevention of *Clostridium difficile*

- spore formation by sub-inhibitory concentrations of tigecycline and piperacillin/tazobactam. *BMC Infectious Diseases*, *14*(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-29>
- Garrett, E. M., Sekulovic, O., Wetzel, D., Jones, J. B., Id, V., Id, S. M. M., & Id, R. T. (2019). *Phase variation of a signal transduction system controls Clostridioides difficile colony morphology, motility, and virulence.* 1–28. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000379>
- Ge, S. X., Jung, D., Jung, D., & Yao, R. (2020). ShinyGO: A graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics*, *36*(8), 2628–2629. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz931>
- Gil, F., Pizarro-Guajardo, M., Álvarez, R., Garavaglia, M., & Paredes-Sabja, D. (2015). Clostridium difficile recurrent infection: Possible implication of TA systems. *Future Microbiology*, *10*(10), 1649–1657. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.94>
- Goh, S., Chang, B. J., & Riley, T. V. (2005). Effect of phage infection on toxin production by Clostridium difficile. *Journal of Medical Microbiology*, *54*(2), 129–135. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45821-0>
- Guh, A. Y., Mu, Y., Winston, L. G., Johnston, H., Olson, D., Farley, M. M., Wilson, L. E., Holzbauer, S. M., Phipps, E. C., Dumyati, G. K., Beldavs, Z. G., Kainer, M. A., Karlsson, M., Gerding, D. N., & McDonald, L. C. (2020). Trends in U.S. Burden of Clostridioides difficile Infection and Outcomes. *New England Journal of Medicine*, *382*(14), 1320–1330. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1910215>
- Heberle, H., Meirelles, V. G., da Silva, F. R., Telles, G. P., & Minghim, R. (2015). InteractiVenn: A web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics*, *16*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0611-3>
- Herbert, R., Hatcher, J., Jauneikaite, E., Gharbi, M., d’Arc, S., Obaray, N., Rickards, T., Rebec, M., Blandy, O., Hope, R., Thomas, A., Bamford, K., Jepson, A., & Sriskandan, S. (2019). Two-year analysis of Clostridium difficile ribotypes associated with increased severity. *Journal of Hospital Infection*, *103*(4), 388–394. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2019.06.003>
- Hu, M. Y., Katchar, K., Kyne, L., Maroo, S., Tummala, S., Dreisbach, V., Xu, H., Leffler, D. A., & Kelly, C. P. (2009). Prospective Derivation and Validation of a Clinical

- Prediction Rule for Recurrent *Clostridium difficile* Infection. *Gastroenterology*, *136*(4), 1206–1214. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.12.038>
- Hung, Y. P., Huang, I. H., Lin, H. J., Tsai, B. Y., Liu, H. C., Liu, H. C., Lee, J. C., Wu, Y. H., Tsai, P. J., & Ko, W. C. (2016). Predominance of *clostridium difficile* ribotypes 017 and 078 among toxigenic clinical isolates in southern Taiwan. *PLoS ONE*, *11*(11), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166159>
- Janoir, C., Denève, C., Bouttier, S., Barbut, F., Hoys, S., Caleechum, L., Chapetón-Montes, D., Pereira, F. C., Henriques, A. O., Collignon, A., Monot, M., & Dupuy, B. (2013). Adaptive strategies and pathogenesis of *clostridium difficile* from In vivo transcriptomics. *Infection and Immunity*, *81*(10), 3757–3769. <https://doi.org/10.1128/IAI.00515-13>
- Knight, D. R., Elliott, B., Chang, B. J., Perkins, T. T., & Riley, T. V. (2015). Diversity and evolution in the genome of *clostridium difficile*. *Clinical Microbiology Reviews*, *28*(3), 721–741. <https://doi.org/10.1128/CMR.00127-14>
- Knight, D. R., Squire, M. M., Collins, D. A., & Riley, T. V. (2017). Genome analysis of *Clostridium difficile* PCR ribotype 014 lineage in Australian pigs and humans reveals a diverse genetic repertoire and signatures of long-range interspecies transmission. *Frontiers in Microbiology*, *7*(JAN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02138>
- Kong, K. Y., Kwong, T. N. Y., Chan, H., Wong, K., Wong, S. S. Y., Chaparala, A. P., Chan, R. C. Y., Zhang, L., Sung, J. J. Y., Yu, J., Hawkey, P. M., Ip, M., Wu, W. K. K., & Wong, S. H. (2020). Biological characteristics associated with virulence in *Clostridioides difficile* ribotype 002 in Hong Kong. *Emerging Microbes and Infections*, *9*(1), 631–638. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1739564>
- Krutova, M., Matejkova, J., Drevinek, P., Kuijper, E. J., Nyc, O., Tejkalova, R., Petrlova, K., Hanslianova, M., Balejova, M., Paleckova, V., Melichar, A., Ryskova, L., Nemcova, D., Vesela, D., Rumlerova, M., Havlinova, L., Nyc, O., Zamazalova, D., Laskafeldova, K., ... Skacani, H. (2017). Increasing incidence of *Clostridium difficile* ribotype 001 associated with severe course of the infection and previous fluoroquinolone use in the Czech Republic, 2015. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *36*(11), 2251–2258. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3055-z>
- Kulecka, M., Waker, E., Ambrozkiwicz, F., Paziewska, A., Skubisz, K., Cybula, P.,

- Targoński, Ł., Mikula, M., Walewski, J., & Ostrowski, J. (2021). Higher genome variability within metabolism genes associates with recurrent *Clostridium difficile* infection. *BMC Microbiology*, *21*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02090-9>
- Kumar, N., Browne, H. P., Viciani, E., Forster, S. C., Clare, S., Harcourt, K., Stares, M. D., Dougan, G., Fairley, D. J., Roberts, P., Pirmohamed, M., Clokie, M. R. J., Jensen, M. B. F., Hargreaves, K. R., Ip, M., Wieler, L. H., Seyboldt, C., Norén, T., Riley, T. V., ... Lawley, T. D. (2019). Adaptation of host transmission cycle during *Clostridium difficile* speciation. *Nature Genetics*, *51*(9), 1315–1320. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0478-8>
- Lawler, A. J., Lambert, P. A., & Worthington, T. (2020). A Revised Understanding of *Clostridioides difficile* Spore Germination. *Trends in Microbiology*, *28*(9), 744–752. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.03.004>
- Lawson, P. A., Citron, D. M., Tyrrell, K. L., & Finegold, S. M. (2016). Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O’Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe*, *40*, 95–99. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.06.008>
- Lee, A.-2 quorum sensing molecule regulates transcriptional virulence gene expression in *C. difficile* S. Y., & Song, K. P. (2005). LuxS/autoinducer-2 quorum sensing molecule regulates transcriptional virulence gene expression in *Clostridium difficile*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *335*(3), 659–666. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.07.131>
- Li, Y., Shan, M., Zhu, Z., Mao, X., Yan, M., Chen, Y., Zhu, Q., Li, H., & Gu, B. (2019). Application of MALDI-TOF MS to rapid identification of anaerobic bacteria. *BMC Infectious Diseases*, *19*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4584-0>
- Luk, S., Ho, A. Y. M., Chan, E. H. Y., Tsang, I. H. L., Ng, T. K., To, W. K., Choi, K. W., & Wong, A. T. Y. (2018). High Prevalence and Frequent Acquisition of *Clostridium difficile* Ribotype 002 among Nursing Home Residents in Hong Kong. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, *39*(7), 782–787. <https://doi.org/10.1017/ice.2018.92>
- Mac Aogáin, M., Moloney, G., Kilkenny, S., Kelleher, M., Kelleghan, M., Boyle, B., & Rogers, T. R. (2015). Whole-genome sequencing improves discrimination of relapse from reinfection and identifies transmission events among patients with recurrent

- Clostridium difficile infections. *Journal of Hospital Infection*, 90(2), 108–116. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2015.01.021>
- Magnusson, C., Wullt, M., Löfgren, S., Iveroth, P., Åkerlund, T., & Matussek, A. (2013). Ribotyping of Clostridium difficile strains associated with nosocomial transmission and relapses in a Swedish County. *Apmis*, 121(2), 153–157. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2012.02950.x>
- Maikova, A., Peltier, J., Boudry, P., Hajnsdorf, E., Kint, N., Monot, M., Poquet, I., Martin-Verstraete, I., Dupuy, B., & Soutourina, O. (2018). Discovery of new type I toxin – Antitoxin systems adjacent to CRISPR arrays in Clostridium difficile. *Nucleic Acids Research*, 46(9), 4733–4751. <https://doi.org/10.1093/nar/gky124>
- Maldarelli, G. A., Piepenbrink, K. H., Scott, A. J., Freiberg, J. A., Song, Y., Achermann, Y., Ernst, R. K., Shirtliff, M. E., Sundberg, E. J., Donnenberg, M. S., & von Roseninge, E. C. (2016). Type IV pili promote early biofilm formation by Clostridium difficile. *Pathogens and Disease*, 74(6), 1–10. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw061>
- Mani, N., & Dupuy, B. (2001). Regulation of toxin synthesis in Clostridium difficile by an alternative RNA polymerase sigma factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(10), 5844–5849. <https://doi.org/10.1073/pnas.101126598>
- Marsh, J. W., Arora, R., Schlackman, J. L., Shutt, K. A., Curry, S. R., & Harrison, L. H. (2012). Association of relapse of Clostridium difficile disease with BI/NAP1/027. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(12), 4078–4082. <https://doi.org/10.1128/JCM.02291-12>
- Martin-Verstraete, I., Peltier, J., & Dupuy, B. (2016). The regulatory networks that control Clostridium difficile toxin synthesis. *Toxins*, 8(5), 1–24. <https://doi.org/10.3390/toxins8050153>
- Martínez-Meléndez, A., Morfin-Otero, R., Villarreal-Treviño, L., Baines, S. D., Camacho-Ortíz, A., & Garza-González, E. (2020). Molecular epidemiology of predominant and emerging Clostridioides difficile ribotypes. *Journal of Microbiological Methods*, 175(June). <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105974>
- Martínez-Meléndez, A., Tijerina-Rodríguez, L., Morfin-Otero, R., Camacho-Ortíz, A., Villarreal-Treviño, L., Sánchez-Alanís, H., Rodríguez-Noriega, E., Baines, S. D.,

- Flores-Treviño, S., Maldonado-Garza, H. J., & Garza-González, E. (2018). Circulation of Highly Drug-Resistant *Clostridium difficile* Ribotypes 027 and 001 in Two Tertiary-Care Hospitals in Mexico. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, *24*(4), 386–392. <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0323>
- Martínez, L. C., & Vadyvaloo, V. (2014). Mechanisms of post-transcriptional gene regulation in bacterial biofilms. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *5*(MAR), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00038>
- McDonald, L. C., Gerding, D. N., Johnson, S., Bakken, J. S., Carroll, K. C., Coffin, S. E., Dubberke, E. R., Garey, K. W., Gould, C. V., Kelly, C., Loo, V., Shaklee Sammons, J., Sandora, T. J., & Wilcox, M. H. (2018). Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile* Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). *Clinical Infectious Diseases*, *66*(7), e1–e48. <https://doi.org/10.1093/cid/cix1085>
- McFarland, L. V., Elmer, G. W., & Surawicz, C. M. (2002). Breaking the cycle: Treatment strategies for 163 cases of recurrent *Clostridium difficile* disease. *American Journal of Gastroenterology*, *97*(7), 1769–1775. [https://doi.org/10.1016/S0002-9270\(02\)04195-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9270(02)04195-3)
- Mckee, R. W., Harvest, C. K., & Tamayo, R. (2018). Cyclic Diguanylate Regulates Virulence Factor Genes via Multiple Riboswitches in *Clostridium difficile*. *MSphere*, *3*(5), 1–15. <https://doi.org/DOI:10.1128/mSphere.00423-18>
- Merrigan, M., Venugopal, A., Mallozzi, M., Roxas, B., Viswanathan, V. K., Johnson, S., Gerding, D. N., & Vedantam, G. (2010). Human hypervirulent *Clostridium difficile* strains exhibit increased sporulation as well as robust toxin production. *Journal of Bacteriology*, *192*(19), 4904–4911. <https://doi.org/10.1128/JB.00445-10>
- Monot, M., Eckert, C., Hoys, S., Collignon, A., Janoir, C., & Candela, T. (2018). *Anaerobe Clostridium difficile forms variable biofilms on abiotic surface.* 4–7. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.05.006>
- Mora-Uribe, P., Miranda-Cárdenas, C., Castro-Córdova, P., Gil, F., Calderón, I., Fuentes, J. A., Rodas, P. I., Banawas, S., Sarker, M. R., & Paredes-Sabja, D. (2016). Characterization of the adherence of *Clostridium difficile* spores: The integrity of the outermost layer affects adherence properties of spores of the epidemic strain R20291 to

- components of the intestinal mucosa. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6(SEP), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00099>
- Neely, F., Lambert, M. L., Van Broeck, J., & Delmée, M. (2017). Clinical and laboratory features of the most common *Clostridium difficile* ribotypes isolated in Belgium. *Journal of Hospital Infection*, 95(4), 394–399. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2016.12.011>
- Normington, C., Moura, I. B., Bryant, J. A., Ewin, D. J., Clark, E. V., Kettle, M. J., Harris, H. C., Spittal, W., Davis, G., Henn, M. R., Ford, C. B., Wilcox, M. H., & Buckley, A. M. (2021). Biofilms harbour *Clostridioides difficile*, serving as a reservoir for recurrent infection. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41522-021-00184-w>
- Pantaléon, Véronique, Bouttier, S., Soavelomandroso, A. P., Janoir, C., & Candela, T. (2014). Anaerobe Biofilms of *Clostridium* species. *Anaerobe*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.09.010>
- Pantaléon, V., Monot, M., Eckert, C., Hoys, S., Collignon, A., Janoir, C., & Candela, T. (2018). *Clostridium difficile* forms variable biofilms on abiotic surface. *Anaerobe*, 53, 34–37. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.05.006>
- Pantaléon, Véronique, Soavelomandroso, A. P., Bouttier, S., Briandet, R., Roxas, B., Chu, M., Collignon, A., Janoir, C., Vedantam, G., & Candela, T. (2015). The *Clostridium difficile* protease Cwp84 Modulates both biofilm formation and cell- surface properties. *PLoS ONE*, 10(4), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124971>
- Paredes-sabja, D., Sarker, M. R., & Paredes-sabja, D. (2012). *Adherence of Clostridium difficile spores to Caco-2 cells in culture*. 1208–1218. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.043687-0>
- Poquet, I., Saujet, L., Canette, A., Monot, M., Mihajlovic, J., Ghigo, J., Soutourina, O., & Briandet, R. (2018). *Clostridium difficile* Biofilm : Remodeling Metabolism and Cell Surface to Build a Sparse and Heterogeneously Aggregated Architecture. 9(September), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02084>
- Rao Krishna, Higgins Peter, Y. V. (2018). An Observational Cohort Study of *Clostridium difficile* Ribotype 027 and Recurrent Infection. *MSphere*, 3(3), 1–8. <https://doi.org/doi:10.1128/mSphere.00033-18>

- Recamonde-mendoza, M. (2022). *Fast , Versatile and Ready-To-Use Microarray Analysis Platform*. 20210077, 1–15.
- Riegler, M., Sedivy, R., Pothoulakis, C., Hamilton, G., Zacherl, J., Bischof, G., Cosentini, E., Feil, W., Schiessel, R., LaMont, J. T., & Wenzl, E. (1995). Clostridium difficile toxin B is more potent than toxin A in damaging human colonic epithelium in vitro. *Journal of Clinical Investigation*, 95(5), 2004–2011. <https://doi.org/10.1172/JCI117885>
- Roberts, A. P., & Mullany, P. (2016). *Clostridium difficile Methods and Protocols Second Edition Methods in Molecular Biology 1476*. <http://www.springer.com/series/7651>
- Rocha, M. F. G., Maia, M. E. T., Bezerra, L. R. P. S., Lysterly, D. M., Guerrant, R. L., Ribeiro, R. A., & Lima, A. A. M. (1997). Clostridium difficile toxin A induces the release of neutrophil chemotactic factors from rat peritoneal macrophages: Role of interleukin- 1 β , tumor necrosis factor alpha, and leukotrienes. *Infection and Immunity*, 65(7), 2740–2746. <https://doi.org/10.1128/iai.65.7.2740-2746.1997>
- Rothenbacher, F. P., Suzuki, M., Hurley, J. M., Montville, T. J., Kirn, T. J., Ouyang, M., & Woychik, N. A. (2012). Clostridium difficile MazF toxin exhibits selective, not global, mRNA cleavage. *Journal of Bacteriology*, 194(13), 3464–3474. <https://doi.org/10.1128/JB.00217-12>
- Rounds, J., & Strain, J. (2017). Bezlotoxumab for Preventing Recurrent Clostridium difficile Infections. *South Dakota Medicine : The Journal of the South Dakota State Medical Association*, 70(9), 422–423. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1602615>
- Rumbaugh, K. P., & Sauer, K. (2020). Biofilm dispersion. *Nature Reviews Microbiology*, 18(10), 571–586. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0385-0>
- Salazar, C. L., Reyes, C., Cienfuegos-Gallet, A. V., Best, E., Atehortua, S., Sierra, P., Correa, M. M., Fawley, W. N., Paredes-Sabja, D., Wilcox, M., & Gonzalez, A. (2018). Subtyping of clostridium difficile PCR ribotypes 591, 106 and 002, the dominant strain types circulating in Medellin, Colombia. *PLoS ONE*, 13(4), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195694>
- Schulze, A., Mitterer, F., Pombo, J. P., & Schild, S. (2021). Biofilms by bacterial human pathogens: Clinical relevance, development, composition and regulation, therapeutical strategies. *Microbial Cell*, 8(2), 28–56. <https://doi.org/10.15698/mic2021.02.741>
- Sebahia, M., Wren, B. W., Mullany, P., Fairweather, N. F., Minton, N., Stabler, R.,

- Thomson, N. R., Roberts, A. P., Cerdeño-Tárraga, A. M., Wang, H., Holden, M. T. G., Wright, A., Churcher, C., Quail, M. A., Baker, S., Bason, N., Brooks, K., Chillingworth, T., Cronin, A., ... Parkhill, J. (2006). The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome. *Nature Genetics*, *38*(7), 779–786. <https://doi.org/10.1038/ng1830>
- Semenyuk, E. G., Laning, M. L., Foley, J., Johnston, P. F., Knight, K. L., Gerding, D. N., & Driks, A. (2014). Spore formation and toxin production in *Clostridium difficile* biofilms. *PLoS ONE*, *9*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087757>
- Shakov, R., Salazar, R. S., Kagunye, S. K., Baddoura, W. J., & DeBari, V. A. (2011). Diabetes mellitus as a risk factor for recurrence of *Clostridium difficile* infection in the acute care hospital setting. *American Journal of Infection Control*, *39*(3), 194–198. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2010.08.017>
- Sherman, B. T., Huang, D. W., Tan, Q., Guo, Y., Bour, S., Liu, D., Stephens, R., Baseler, M. W., Lane, C. H., & Lempicki, R. A. (2007). DAVID Knowledgebase: A gene-centered database integrating heterogeneous gene annotation resources to facilitate high-throughput gene functional analysis. *BMC Bioinformatics*, *8*, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-426>
- Soavelomandroso, A. P., Gaudin, F., Hoys, S., Nicolas, V., Vedantam, G., Janoir, C., & Bouttier, S. (2017). Biofilm structures in a mono-associated mouse model of *Clostridium difficile* infection. *Frontiers in Microbiology*, *8*(2086), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02086>
- Soto, S. M. (2014). Importance of Biofilms in Urinary Tract Infections: New Therapeutic Approaches. *Advances in Biology*, *2014*, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2014/543974>
- Stabler, R. A., He, M., Dawson, L., Martin, M., Valiente, E., Corton, C., Lawley, T. D., Sebahia, M., Quail, M. A., Rose, G., Gerding, D. N., Gibert, M., Popoff, M. R., Parkhill, J., Dougan, G., & Wren, B. W. (2009). Comparative genome and phenotypic analysis of *Clostridium difficile* 027 strains provides insight into the evolution of a hypervirulent bacterium. *Genome Biology*, *10*(9), 1–15. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-9-r102>
- Stevenson, E., Minton, N. P., & Kuehne, S. A. (2015). The role of flagella in *Clostridium difficile* pathogenicity. *Trends in Microbiology*, *23*(5), 275–282. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.01.004>

- Stewart, P. S., & Franklin, M. J. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 6(3), 199–210. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1838>
- Stubbs, S. L. J., Brazier, J. S., O'Neill, G. L., & Duerden, B. I. (1999). PCR targeted to the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of *Clostridium difficile* and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(2), 461–463. <https://doi.org/10.1128/jcm.37.2.461-463.1999>
- Sun, X., Savidge, T., & Feng, H. (2010). The Enterotoxicity of *Clostridium difficile* Toxins. *Toxins*, 2(7), 1848–1880. <https://doi.org/10.3390/toxins2071848>
- Surawicz, C. M., Brandt, L. J., Binion, D. G., Ananthakrishnan, A. N., Curry, S. R., Gilligan, P. H., McFarland, L. V., Mellow, M., & Zuckerbraun, B. S. (2013). Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of *clostridium difficile* infections. *American Journal of Gastroenterology*, 108(4), 478–498. <https://doi.org/10.1038/ajg.2013.4>
- Svensson Malchau, K., Tillander, J., Zaborowska, M., Hoffman, M., Lasa, I., Thomsen, P., Malchau, H., Rolfson, O., & Trobos, M. (2021). Biofilm properties in relation to treatment outcome in patients with first-time periprosthetic hip or knee joint infection. *Journal of Orthopaedic Translation*, 30(April), 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.jot.2021.05.008>
- Tijerina-Rodríguez, L., Villarreal-Treviño, L., Baines, S. D., Morfín-Otero, R., Camacho-Ortiz, A., Flores-Treviño, S., Maldonado-Garza, H., Rodríguez-Noriega, E., & Garza-González, E. (2019). High sporulation and overexpression of virulence factors in biofilms and reduced susceptibility to vancomycin and linezolid in recurrent *Clostridium* [Clostridioides] *difficile* infection isolates. *PLoS ONE*, 14(7), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220671>
- Timmaraju, A., Balasubramanian, K., Shakih, S., David, F., & Sapi, E. (2013). Biofilm formation by *Clostridium difficile*. *J Bacteriol*, 195(October), 1–20.
- Vukovic, D., Bonaventura, G. D. I., Djukic, S., & Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica, APMIS*, 115, 891–899. https://doi.org/DOI: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
- Vuotto, C., Donelli, G., Buckley, A., & Chilton, C. (2018a). *Clostridium difficile* Biofilm.

- Springer New York LLC*, 97–115. https://doi.org/DOI: 10.1007/978-3-319-72799-8_7
- Vuotto, C., Donelli, G., Buckley, A., & Chilton, C. (2018b). *Clostridium difficile* Biofilm. *January*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-72799-8>
- Walter, B. M., Cartman, S. T., Minton, N. P., Butala, M., & Rupnik, M. (2015). The SOS response master regulator LexA is associated with sporulation, motility and biofilm formation in *clostridium difficile*. *PLoS ONE*, *10*(12), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144763>
- Wen, Y., Behiels, E., & Devreese, B. (2014). Toxin-Antitoxin systems: Their role in persistence, biofilm formation, and pathogenicity. *Pathogens and Disease*, *70*(3), 240–249. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12145>
- Yutin, Natalya, Galperin, M. (2013). A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore-formers and other misplaced clostridia. *Environ Microbiol.*, *15*(10), 2631–2641. <https://doi.org/doi:10.1111/1462-2920.12173>
- Zhu, D., Sorg, J. A., & Sun, X. (2018). *Clostridioides difficile* biology: Sporulation, germination, and corresponding therapies for *C. difficile* infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *8*(FEB), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00029>

ANEXOS

ANEXO 1

Anexo. Tabla 1. Genes en común entre las cepas *C. difficile* R20291, 630 y 9689 agregados al diseño del microarreglo.

Genes en común entre las cepas <i>C. difficile</i> R20291, 630 y 9689						
CAJ66415	CAJ68779	CAJ67796	CAJ69819	CAJ67297	CAJ69295	CAJ68285
CAJ66416	CAJ68781	CAJ67797	CAJ69820	CAJ67298	CAJ69296	CAJ68286
CAJ66417	CAJ68782	CAJ67798	CAJ69821	CAJ67299	CAJ69297	CAJ68287
CAJ66418	CAJ68783	CAJ67799	CAJ69822	CAJ67300	CAJ69298	CAJ68288
CAJ66419	CAJ68784	CAJ67800	CAJ69823	CAJ67301	CAJ69299	CAJ68289
CAJ66420	CAJ68785	CAJ67801	CAJ69824	CAJ67302	CAJ69300	CAJ68290
CAJ66421	CAJ68786	CAJ67802	CAJ69825	CAJ67303	CAJ69301	CAJ68292
CAJ66422	CAJ68787	CAJ67803	CAJ69826	CAJ67304	CAJ69302	CAJ68293
CAJ66423	CAJ68788	CAJ67804	CAJ69827	CAJ67306	CAJ69303	CAJ68294
CAJ66815	CAJ68789	CAJ67805	CAJ69828	CAJ67307	CAJ69304	CAJ68295
CAJ66816	CAJ68790	CAJ67806	CAJ69829	CAJ67308	CAJ69305	CAJ68296
CAJ66817	CAJ68791	CAJ67807	CAJ69830	CAJ67309	CAJ69306	CAJ68297
CAJ66818	CAJ68792	CAJ67808	CAJ69831	CAJ67310	CAJ69307	CAJ68298
CAJ66819	CAJ68793	CAJ67809	CAJ69832	CAJ67311	CAJ69308	CAJ68299
CAJ66820	CAJ68794	CAJ67810	CAJ69833	CAJ67312	CAJ69309	CAJ68300
CAJ66821	CAJ68795	CAJ67811	CAJ69834	CAJ67313	CAJ69310	CAJ68301
CAJ66822	CAJ68796	CAJ67812	CAJ69835	CAJ67314	CAJ69311	CAJ68303
CAJ66823	CAJ68797	CAJ67813	CAJ69836	CAJ67315	CAJ69312	CAJ68304
CAJ66824	CAJ68798	CAJ67814	CAJ69837	CAJ67316	CAJ69313	CAJ68305
CAJ66825	CAJ68799	CAJ67815	CAJ69838	CAJ67317	CAJ69314	CAJ68306
CAJ66826	CAJ68800	CAJ67816	CAJ69839	CAJ67318	CAJ69315	CAJ68307
CAJ66827	CAJ68801	CAJ67817	CAJ69840	CAJ67319	CAJ69316	CAJ68308
CAJ66828	CAJ68803	CAJ67818	CAJ69841	CAJ67320	CAJ69317	CAJ68309
CAJ66829	CAJ68804	CAJ67819	CAJ69842	CAJ67321	CAJ69318	CAJ68310
CAJ66830	CAJ68805	CAJ67820	CAJ69843	CAJ67322	CAJ69319	CAJ68311
CAJ66831	CAJ68806	CAJ67821	CAJ69844	CAJ67323	CAJ69320	CAJ68312
CAJ66832	CAJ68807	CAJ67822	CAJ69845	CAJ67325	CAJ69321	CAJ68313
CAJ66833	CAJ68808	CAJ67823	CAJ69846	CAJ67326	CAJ69322	CAJ68314
CAJ66834	CAJ68809	CAJ67824	CAJ69847	CAJ67327	CAJ69323	CAJ68315
CAJ66835	CAJ68810	CAJ67825	CAJ69848	CAJ67328	CAJ69324	CAJ68316
CAJ66836	CAJ68811	CAJ67826	CAJ69849	CAJ67329	CAJ69325	CAJ68317
CAJ66837	CAJ68812	CAJ67827	CAJ69850	CAJ67330	CAJ69326	CAJ68318
CAJ66838	CAJ68813	CAJ67828	CAJ69851	CAJ67331	CAJ69327	CAJ68319
CAJ66839	CAJ68814	CAJ67829	CAJ69852	CAJ67332	CAJ69328	CAJ68320

CAJ66840	CAJ68815	CAJ67830	CAJ69853	CAJ67333	CAJ69329	CAJ68321
CAJ66841	CAJ68816	CAJ67831	CAJ69854	CAJ67334	CAJ69330	CAJ68322
CAJ66842	CAJ68817	CAJ67832	CAJ69855	CAJ67336	CAJ69331	CAJ68323
CAJ66843	CAJ68818	CAJ67833	CAJ69856	CAJ67337	CAJ69333	CAJ68324
CAJ66844	CAJ68820	CAJ67834	CAJ69857	CAJ67339	CAJ69334	CAJ68325
CAJ66845	CAJ68821	CAJ67835	CAJ69858	CAJ67340	CAJ69335	CAJ68326
CAJ66846	CAJ68822	CAJ67836	CAJ69859	CAJ67341	CAJ69336	CAJ68327
CAJ66847	CAJ68823	CAJ67837	CAJ69860	CAJ67342	CAJ69337	CAJ68328
CAJ66848	CAJ68824	CAJ67838	CAJ69861	CAJ67343	CAJ69338	CAJ68329
CAJ66849	CAJ68825	CAJ67839	CAJ69862	CAJ67344	CAJ69339	CAJ68330
CAJ66850	CAJ68826	CAJ67840	CAJ69863	CAJ67346	CAJ69340	CAJ68331
CAJ66851	CAJ68827	CAJ67841	CAJ69864	CAJ67347	CAJ69341	CAJ68332
CAJ66852	CAJ68828	CAJ67842	CAJ69865	CAJ67348	CAJ69342	CAJ68333
CAJ66853	CAJ68829	CAJ67843	CAJ69866	CAJ67349	CAJ69343	CAJ68334
CAJ66854	CAJ68830	CAJ67844	CAJ69868	CAJ67350	CAJ69344	CAJ68335
CAJ66855	CAJ68831	CAJ67845	CAJ69869	CAJ67351	CAJ69345	CAJ68336
CAJ66856	CAJ68832	CAJ67846	CAJ69870	CAJ67352	CAJ69346	CAJ68337
CAJ66857	CAJ68833	CAJ67847	CAJ69871	CAJ67353	CAJ69347	CAJ68338
CAJ66858	CAJ68834	CAJ67848	CAJ69872	CAJ67354	CAJ69348	CAJ68339
CAJ66859	CAJ68835	CAJ67849	CAJ69873	CAJ67355	CAJ69349	CAJ68340
CAJ66860	CAJ68836	CAJ67850	CAJ69874	CAJ67356	CAJ69350	CAJ68341
CAJ66861	CAJ68837	CAJ67851	CAJ69875	CAJ67357	CAJ69351	CAJ68342
CAJ66862	CAJ68838	CAJ67852	CAJ69876	CAJ67358	CAJ69352	CAJ68343
CAJ66863	CAJ68839	CAJ67853	CAJ69877	CAJ67360	CAJ69353	CAJ68344
CAJ66864	CAJ68840	CAJ67854	CAJ69878	CAJ67361	CAJ69354	CAJ68345
CAJ66865	CAJ68841	CAJ67855	CAJ69879	CAJ67362	CAJ69355	CAJ68346
CAJ66866	CAJ68842	CAJ67856	CAJ69880	CAJ67363	CAJ69356	CAJ68347
CAJ66867	CAJ68843	CAJ67857	CAJ69881	CAJ67364	CAJ69357	CAJ68348
CAJ66868	CAJ68844	CAJ67858	CAJ69882	CAJ67365	CAJ69358	CAJ68349
CAJ66869	CAJ68845	CAJ67859	CAJ69883	CAJ67366	CAJ69359	CAJ68350
CAJ66870	CAJ68846	CAJ67860	CAJ69884	CAJ67367	CAJ69360	CAJ68351
CAJ66871	CAJ68847	CAJ67861	CAJ69885	CAJ67368	CAJ69361	CAJ68352
CAJ66872	CAJ68848	CAJ67862	CAJ69886	CAJ67369	CAJ69362	CAJ68353
CAJ66873	CAJ68849	CAJ67863	CAJ69887	CAJ67370	CAJ69363	CAJ68354
CAJ66874	CAJ68850	CAJ67864	CAJ69888	CAJ67371	CAJ69364	CAJ68355
CAJ66875	CAJ68851	CAJ67865	CAJ69889	CAJ67372	CAJ69365	CAJ68356
CAJ66876	CAJ68852	CAJ67866	CAJ69890	CAJ67373	CAJ69366	CAJ68357
CAJ66877	CAJ68853	CAJ67867	CAJ69891	CAJ67374	CAJ69367	CAJ68358
CAJ66878	CAJ68854	CAJ67868	CAJ69892	CAJ67375	CAJ69368	CAJ68359
CAJ66879	CAJ68855	CAJ67869	CAJ69893	CAJ67376	CAJ69369	CAJ68360
CAJ66880	CAJ68856	CAJ67870	CAJ69894	CAJ67377	CAJ69370	CAJ68361

CAJ66881	CAJ68857	CAJ67871	CAJ69895	CAJ67378	CAJ69371	CAJ68362
CAJ66882	CAJ68859	CAJ67872	CAJ69896	CAJ67379	CAJ69372	CAJ68363
CAJ66883	CAJ68860	CAJ67873	CAJ69897	CAJ67380	CAJ69373	CAJ68364
CAJ66884	CAJ68861	CAJ67874	CAJ69898	CAJ67381	CAJ69374	CAJ68365
CAJ66885	CAJ68862	CAJ67875	CAJ69899	CAJ67382	CAJ69375	CAJ68366
CAJ66887	CAJ68863	CAJ67876	CAJ69900	CAJ67383	CAJ69376	CAJ68367
CAJ66888	CAJ68864	CAJ67877	CAJ69901	CAJ67384	CAJ69377	CAJ68368
CAJ66889	CAJ68865	CAJ67878	CAJ69903	CAJ67385	CAJ69378	CAJ68369
CAJ66890	CAJ68867	CAJ67879	CAJ69904	CAJ67386	CAJ69379	CAJ68370
CAJ66891	CAJ68869	CAJ67880	CAJ69905	CAJ67387	CAJ69380	CAJ68371
CAJ66892	CAJ68870	CAJ67881	CAJ69906	CAJ67388	CAJ69381	CAJ68372
CAJ66893	CAJ68871	CAJ67882	CAJ69907	CAJ67389	CAJ69382	CAJ68373
CAJ66894	CAJ68872	CAJ67883	CAJ69908	CAJ67390	CAJ69383	CAJ68374
CAJ66895	CAJ68873	CAJ67884	CAJ69909	CAJ67391	CAJ69384	CAJ68375
CAJ66896	CAJ68874	CAJ67885	CAJ69910	CAJ67392	CAJ69385	CAJ68376
CAJ66897	CAJ68875	CAJ67886	CAJ69911	CAJ67393	CAJ69386	CAJ68377
CAJ66898	CAJ68876	CAJ67887	CAJ69912	CAJ67394	CAJ69387	CAJ68378
CAJ66899	CAJ68877	CAJ67888	CAJ69913	CAJ67395	CAJ69388	CAJ68379
CAJ66900	CAJ68878	CAJ67889	CAJ69915	CAJ67396	CAJ69389	CAJ68380
CAJ66901	CAJ68879	CAJ67890	CAJ69916	CAJ67397	CAJ69390	CAJ68381
CAJ66902	CAJ68880	CAJ67891	CAJ69917	CAJ67398	CAJ69391	CAJ68382
CAJ66903	CAJ68881	CAJ67892	CAJ69918	CAJ67399	CAJ69392	CAJ68383
CAJ66904	CAJ68883	CAJ67893	CAJ69919	CAJ67400	CAJ69393	CAJ68384
CAJ66905	CAJ68884	CAJ67894	CAJ69920	CAJ67401	CAJ69394	CAJ68385
CAJ66906	CAJ68891	CAJ67895	CAJ69921	CAJ67402	CAJ69395	CAJ68386
CAJ66907	CAJ68895	CAJ67896	CAJ69922	CAJ67403	CAJ69396	CAJ68387
CAJ66908	CAJ68897	CAJ67897	CAJ69923	CAJ67404	CAJ69397	CAJ68388
CAJ66909	CAJ68898	CAJ67898	CAJ69924	CAJ67405	CAJ69398	CAJ68389
CAJ66910	CAJ68899	CAJ67899	CAJ69925	CAJ67406	CAJ69399	CAJ68390
CAJ66911	CAJ68900	CAJ67900	CAJ69926	CAJ67407	CAJ69400	CAJ68391
CAJ66912	CAJ68901	CAJ67901	CAJ69927	CAJ67408	CAJ69401	CAJ68392
CAJ66913	CAJ68902	CAJ67902	CAJ69928	CAJ67409	CAJ69402	CAJ68393
CAJ66914	CAJ68903	CAJ67903	CAJ69929	CAJ67410	CAJ69403	CAJ68394
CAJ66915	CAJ68904	CAJ67904	CAJ69930	CAJ67411	CAJ69404	CAJ68395
CAJ66916	CAJ68905	CAJ67905	CAJ69931	CAJ67412	CAJ69405	CAJ68396
CAJ66917	CAJ68906	CAJ67906	CAJ69932	CAJ67413	CAJ69406	CAJ68397
CAJ66918	CAJ68907	CAJ67907	CAJ69933	CAJ67414	CAJ69407	CAJ68398
CAJ66919	CAJ68908	CAJ67908	CAJ69934	CAJ67415	CAJ69408	CAJ68399
CAJ66920	CAJ68909	CAJ67909	CAJ69935	CAJ67416	CAJ69409	CAJ68400
CAJ66921	CAJ68910	CAJ67910	CAJ69936	CAJ67417	CAJ69410	CAJ68401
CAJ66922	CAJ68911	CAJ67911	CAJ69937	CAJ67418	CAJ69411	CAJ68402

CAJ66923	CAJ68912	CAJ67912	CAJ69938	CAJ67419	CAJ69412	CAJ68403
CAJ66924	CAJ68913	CAJ67913	CAJ69939	CAJ67420	CAJ69413	CAJ68404
CAJ66925	CAJ68914	CAJ67914	CAJ69940	CAJ67421	CAJ69414	CAJ68405
CAJ66926	CAJ68915	CAJ67915	CAJ69941	CAJ67422	CAJ69415	CAJ68406
CAJ70313	CAJ67051	CAJ69037	CAJ68039	CAJ70066	CAJ67551	CAJ69540
CAJ70314	CAJ67052	CAJ69038	CAJ68040	CAJ70067	CAJ67552	CAJ69541
CAJ70315	CAJ67053	CAJ69039	CAJ68041	CAJ70068	CAJ67553	CAJ69542
CAJ70316	CAJ67054	CAJ69040	CAJ68042	CAJ70069	CAJ67554	CAJ69543
CAJ70317	CAJ67055	CAJ69041	CAJ68043	CAJ70070	CAJ67555	CAJ69544
CAJ70318	CAJ67056	CAJ69042	CAJ68044	CAJ70071	CAJ67556	CAJ69545
CAJ70319	CAJ67057	CAJ69043	CAJ68045	CAJ70072	CAJ67557	CAJ69546
CAJ70320	CAJ67058	CAJ69044	CAJ68046	CAJ70073	CAJ67558	CAJ69547
CAJ70321	CAJ67059	CAJ69045	CAJ68047	CAJ70074	CAJ67559	CAJ69548
CAJ70322	CAJ67060	CAJ69046	CAJ68048	CAJ70075	CAJ67560	CAJ69549
CAJ70323	CAJ67061	CAJ69047	CAJ68049	CAJ70076	CAJ67561	CAJ69550
CAJ70324	CAJ67062	CAJ69048	CAJ68050	CAJ70077	CAJ67562	CAJ69551
CAJ70325	CAJ67063	CAJ69049	CAJ68051	CAJ70078	CAJ67563	CAJ69552
CAJ70326	CAJ67064	CAJ69050	CAJ68052	CAJ70079	CAJ67564	CAJ69553
CAJ70327	CAJ67065	CAJ69051	CAJ68053	CAJ70080	CAJ67565	CAJ69554
CAJ70328	CAJ67066	CAJ69052	CAJ68054	CAJ70081	CAJ67566	CAJ69555
CAJ70329	CAJ67067	CAJ69053	CAJ68055	CAJ70083	CAJ67567	CAJ69556
CAJ70330	CAJ67068	CAJ69054	CAJ68056	CAJ70084	CAJ67568	CAJ69557
CAJ70331	CAJ67069	CAJ69056	CAJ68057	CAJ70085	CAJ67569	CAJ69558
CAJ70332	CAJ67070	CAJ69057	CAJ68058	CAJ70086	CAJ67570	CAJ69559
CAJ70333	CAJ67071	CAJ69058	CAJ68059	CAJ70087	CAJ67571	CAJ69560
CAJ70334	CAJ67072	CAJ69059	CAJ68060	CAJ70088	CAJ67572	CAJ69561
CAJ70335	CAJ67073	CAJ69060	CAJ68061	CAJ70089	CAJ67573	CAJ69562
CAJ70336	CAJ67074	CAJ69061	CAJ68062	CAJ70090	CAJ67574	CAJ69563
CAJ70337	CAJ67075	CAJ69062	CAJ68063	CAJ70091	CAJ67575	CAJ69564
CAJ70338	CAJ67076	CAJ69063	CAJ68064	CAJ70092	CAJ67576	CAJ69565
CAJ70339	CAJ67077	CAJ69064	CAJ68065	CAJ70093	CAJ67577	CAJ69566
CAJ70340	CAJ67078	CAJ69065	CAJ68066	CAJ70094	CAJ67578	CAJ69567
CAJ70341	CAJ67079	CAJ69067	CAJ68067	CAJ70095	CAJ67579	CAJ69568
CAJ70342	CAJ67080	CAJ69069	CAJ68068	CAJ70096	CAJ67580	CAJ69569
CAJ70343	CAJ67081	CAJ69070	CAJ68069	CAJ70097	CAJ67581	CAJ69570
CAJ70344	CAJ67082	CAJ69071	CAJ68070	CAJ70098	CAJ67582	CAJ69571
CAJ70345	CAJ67083	CAJ69072	CAJ68071	CAJ70099	CAJ67583	CAJ69572
CAJ70346	CAJ67084	CAJ69073	CAJ68072	CAJ70100	CAJ67584	CAJ69573
CAJ70347	CAJ67085	CAJ69074	CAJ68073	CAJ70101	CAJ67585	CAJ69574
CAJ70348	CAJ67086	CAJ69075	CAJ68074	CAJ70102	CAJ67586	CAJ69575
CAJ70349	CAJ67087	CAJ69076	CAJ68075	CAJ70103	CAJ67587	CAJ69576

CAJ70350	CAJ67088	CAJ69078	CAJ68076	CAJ70104	CAJ67588	CAJ69577
CAJ70351	CAJ67089	CAJ69079	CAJ68077	CAJ70105	CAJ67589	CAJ69578
CAJ70352	CAJ67090	CAJ69080	CAJ68078	CAJ70106	CAJ67590	CAJ69579
CAJ70353	CAJ67091	CAJ69081	CAJ68079	CAJ70107	CAJ67591	CAJ69580
CAJ70354	CAJ67092	CAJ69082	CAJ68080	CAJ70108	CAJ67592	CAJ69581
CAJ70355	CAJ67093	CAJ69083	CAJ68081	CAJ70109	CAJ67593	CAJ69582
CAJ70356	CAJ67094	CAJ69084	CAJ68082	CAJ70110	CAJ67594	CAJ69583
CAJ70357	CAJ67095	CAJ69085	CAJ68083	CAJ70111	CAJ67595	CAJ69584
CAJ70358	CAJ67096	CAJ69086	CAJ68084	CAJ70112	CAJ67596	CAJ69585
CAJ70359	CAJ67097	CAJ69087	CAJ68085	CAJ70113	CAJ67597	CAJ69586
CAJ70360	CAJ67098	CAJ69088	CAJ68086	CAJ70114	CAJ67598	CAJ69587
CAJ70361	CAJ67099	CAJ69089	CAJ68087	CAJ70115	CAJ67599	CAJ69588
CAJ70362	CAJ67100	CAJ69090	CAJ68088	CAJ70116	CAJ67600	CAJ69589
CAJ70363	CAJ67101	CAJ69091	CAJ68089	CAJ70117	CAJ67601	CAJ69590
CAJ70364	CAJ67102	CAJ69092	CAJ68090	CAJ70118	CAJ67602	CAJ69591
CAJ70365	CAJ67103	CAJ69093	CAJ68092	CAJ70119	CAJ67603	CAJ69592
CAJ70366	CAJ67104	CAJ69094	CAJ68093	CAJ70120	CAJ67604	CAJ69593
CAJ70367	CAJ67105	CAJ69095	CAJ68094	CAJ70121	CAJ67605	CAJ69594
CAJ70368	CAJ67106	CAJ69096	CAJ68095	CAJ70122	CAJ67606	CAJ69595
CAJ70369	CAJ67107	CAJ69097	CAJ68096	CAJ70123	CAJ67607	CAJ69596
CAJ70370	CAJ67108	CAJ69098	CAJ68097	CAJ70124	CAJ67608	CAJ69597
CAJ70371	CAJ67109	CAJ69099	CAJ68098	CAJ70125	CAJ67609	CAJ69598
CAJ70372	CAJ67110	CAJ69100	CAJ68099	CAJ70126	CAJ67610	CAJ69599
CAJ70373	CAJ67111	CAJ69101	CAJ68100	CAJ70127	CAJ67611	CAJ69600
CAJ70374	CAJ67112	CAJ69102	CAJ68101	CAJ70128	CAJ67612	CAJ69601
CAJ70375	CAJ67113	CAJ69105	CAJ68102	CAJ70129	CAJ67613	CAJ69602
CAJ70376	CAJ67114	CAJ69107	CAJ68103	CAJ70130	CAJ67614	CAJ69603
CAJ70377	CAJ67115	CAJ69108	CAJ68104	CAJ70131	CAJ67615	CAJ69604
CAJ70378	CAJ67116	CAJ69109	CAJ68105	CAJ70132	CAJ67616	CAJ69605
CAJ70379	CAJ67117	CAJ69111	CAJ68106	CAJ70133	CAJ67617	CAJ69606
CAJ70380	CAJ67118	CAJ69112	CAJ68107	CAJ70134	CAJ67618	CAJ69607
CAJ70381	CAJ67119	CAJ69113	CAJ68108	CAJ70135	CAJ67619	CAJ69608
CAJ70382	CAJ67120	CAJ69114	CAJ68109	CAJ70136	CAJ67620	CAJ69609
CAJ70383	CAJ67121	CAJ69115	CAJ68110	CAJ70137	CAJ67621	CAJ69610
CAJ70384	CAJ67122	CAJ69116	CAJ68111	CAJ70138	CAJ67622	CAJ69611
CAJ70385	CAJ67123	CAJ69117	CAJ68112	CAJ70139	CAJ67623	CAJ69612
CAJ70386	CAJ67124	CAJ69118	CAJ68113	CAJ70140	CAJ67624	CAJ69613
CAJ70387	CAJ67125	CAJ69119	CAJ68114	CAJ70141	CAJ67625	CAJ69614
CAJ70388	CAJ67126	CAJ69120	CAJ68115	CAJ70142	CAJ67626	CAJ69615
CAJ70389	CAJ67127	CAJ69121	CAJ68116	CAJ70143	CAJ67627	CAJ69616
CAJ70390	CAJ67128	CAJ69122	CAJ68117	CAJ70144	CAJ67628	CAJ69617

CAJ70391	CAJ67129	CAJ69123	CAJ68118	CAJ70145	CAJ67629	CAJ69618
CAJ70392	CAJ67130	CAJ69124	CAJ68119	CAJ70146	CAJ67630	CAJ69619
CAJ70393	CAJ67131	CAJ69125	CAJ68120	CAJ70147	CAJ67631	CAJ69620
CAJ70394	CAJ67132	CAJ69126	CAJ68121	CAJ70148	CAJ67632	CAJ69621
CAJ70395	CAJ67133	CAJ69127	CAJ68122	CAJ70149	CAJ67633	CAJ69622
CAJ70396	CAJ67134	CAJ69128	CAJ68123	CAJ70150	CAJ67634	CAJ69623
CAJ70397	CAJ67135	CAJ69129	CAJ68124	CAJ70151	CAJ67635	CAJ69624
CAJ70398	CAJ67136	CAJ69130	CAJ68125	CAJ70152	CAJ67636	CAJ69625
CAJ70399	CAJ67137	CAJ69131	CAJ68126	CAJ70153	CAJ67637	CAJ69626
CAJ70400	CAJ67138	CAJ69132	CAJ68127	CAJ70154	CAJ67638	CAJ69627
CAJ70401	CAJ67139	CAJ69133	CAJ68128	CAJ70155	CAJ67639	CAJ69628
CAJ70402	CAJ67140	CAJ69134	CAJ68129	CAJ70156	CAJ67640	CAJ69629
CAJ70403	CAJ67141	CAJ69135	CAJ68130	CAJ70157	CAJ67641	CAJ69630
CAJ70404	CAJ67142	CAJ69136	CAJ68131	CAJ70158	CAJ67642	CAJ69631
CAJ70405	CAJ67143	CAJ69137	CAJ68132	CAJ70159	CAJ67643	CAJ69632
CAJ70406	CAJ67144	CAJ69138	CAJ68133	CAJ70160	CAJ67644	CAJ69633
CAJ70407	CAJ67145	CAJ69139	CAJ68134	CAJ70162	CAJ67645	CAJ69634
CAJ70408	CAJ67146	CAJ69140	CAJ68135	CAJ70163	CAJ67646	CAJ69635
CAJ70409	CAJ67147	CAJ69141	CAJ68136	CAJ70164	CAJ67647	CAJ69636
CAJ70410	CAJ67148	CAJ69142	CAJ68137	CAJ70165	CAJ67648	CAJ69637
CAJ70411	CAJ67149	CAJ69143	CAJ68138	CAJ70166	CAJ67649	CAJ69638
CAJ70412	CAJ67150	CAJ69144	CAJ68139	CAJ70167	CAJ67650	CAJ69639
CAJ70413	CAJ67151	CAJ69145	CAJ68140	CAJ70168	CAJ67651	CAJ69640
CAJ70414	CAJ67152	CAJ69146	CAJ68141	CAJ70169	CAJ67652	CAJ69641
CAJ70415	CAJ67153	CAJ69147	CAJ68142	CAJ70170	CAJ67653	CAJ69642
CAJ70416	CAJ67154	CAJ69148	CAJ68143	CAJ70171	CAJ67654	CAJ69643
CAJ70417	CAJ67155	CAJ69149	CAJ68144	CAJ70172	CAJ67655	CAJ69644
CAJ70418	CAJ67156	CAJ69150	CAJ68145	CAJ70173	CAJ67656	CAJ69645
CAJ70419	CAJ67157	CAJ69151	CAJ68146	CAJ70174	CAJ67657	CAJ69646
CAJ70420	CAJ67158	CAJ69153	CAJ68147	CAJ70175	CAJ67658	CAJ69647
CAJ70421	CAJ67159	CAJ69154	CAJ68148	CAJ70176	CAJ67659	CAJ69648
CAJ70422	CAJ67160	CAJ69155	CAJ68149	CAJ70177	CAJ67660	CAJ69649
CAJ70423	CAJ67161	CAJ69156	CAJ68150	CAJ70178	CAJ67661	CAJ69650
CAJ70424	CAJ67162	CAJ69157	CAJ68151	CAJ70179	CAJ67662	CAJ69651
CAJ70425	CAJ67163	CAJ69158	CAJ68152	CAJ70180	CAJ67663	CAJ69652
CAJ70426	CAJ67164	CAJ69159	CAJ68153	CAJ70181	CAJ67664	CAJ69653
CAJ70427	CAJ67165	CAJ69160	CAJ68154	CAJ70182	CAJ67665	CAJ69654
CAJ70428	CAJ67166	CAJ69161	CAJ68155	CAJ70183	CAJ67666	CAJ69655
CAJ70429	CAJ67167	CAJ69162	CAJ68156	CAJ70184	CAJ67667	CAJ69656
CAJ70430	CAJ67168	CAJ69163	CAJ68157	CAJ70185	CAJ67668	CAJ69657
CAJ70431	CAJ67169	CAJ69164	CAJ68158	CAJ70186	CAJ67669	CAJ69658

CAJ70432	CAJ67171	CAJ69165	CAJ68159	CAJ70187	CAJ67670	CAJ69659
CAJ68528	CAJ70555	CAJ66927	CAJ68916	CAJ67916	CAJ69942	CAJ67423
CAJ68529	CAJ70556	CAJ66928	CAJ68917	CAJ67917	CAJ69943	CAJ67424
CAJ68530	CAJ70557	CAJ66929	CAJ68918	CAJ67918	CAJ69944	CAJ67425
CAJ68531	CAJ70558	CAJ66930	CAJ68919	CAJ67919	CAJ69945	CAJ67426
CAJ68532	CAJ70559	CAJ66931	CAJ68920	CAJ67920	CAJ69946	CAJ67427
CAJ68533	CAJ70560	CAJ66932	CAJ68921	CAJ67921	CAJ69947	CAJ67428
CAJ68534	CAJ70561	CAJ66933	CAJ68922	CAJ67922	CAJ69948	CAJ67429
CAJ68535	CAJ70562	CAJ66934	CAJ68923	CAJ67923	CAJ69949	CAJ67430
CAJ68536	CAJ70563	CAJ66935	CAJ68924	CAJ67924	CAJ69950	CAJ67432
CAJ68537	CAJ70564	CAJ66936	CAJ68925	CAJ67925	CAJ69951	CAJ67433
CAJ68538	CAJ70565	CAJ66937	CAJ68926	CAJ67926	CAJ69952	CAJ67434
CAJ68539	CAJ70566	CAJ66938	CAJ68927	CAJ67927	CAJ69953	CAJ67436
CAJ68540	CAJ70567	CAJ66939	CAJ68928	CAJ67928	CAJ69954	CAJ67438
CAJ68541	CAJ70568	CAJ66940	CAJ68929	CAJ67929	CAJ69955	CAJ67440
CAJ68542	CAJ70569	CAJ66941	CAJ68930	CAJ67930	CAJ69956	CAJ67441
CAJ68543	CAJ70570	CAJ66942	CAJ68931	CAJ67931	CAJ69957	CAJ67442
CAJ68544	CAJ70571	CAJ66943	CAJ68932	CAJ67932	CAJ69958	CAJ67443
CAJ68545	CAJ70572	CAJ66944	CAJ68933	CAJ67933	CAJ69959	CAJ67444
CAJ68546	CAJ70573	CAJ66945	CAJ68934	CAJ67935	CAJ69960	CAJ67445
CAJ68547	CAJ70574	CAJ66946	CAJ68935	CAJ67936	CAJ69961	CAJ67446
CAJ68548	CAJ70575	CAJ66947	CAJ68936	CAJ67937	CAJ69962	CAJ67447
CAJ68549	CAJ70576	CAJ66948	CAJ68937	CAJ67938	CAJ69963	CAJ67448
CAJ68550	CAJ70577	CAJ66949	CAJ68938	CAJ67939	CAJ69964	CAJ67449
CAJ68551	CAJ70578	CAJ66950	CAJ68939	CAJ67940	CAJ69965	CAJ67450
CAJ68552	CAJ70579	CAJ66951	CAJ68940	CAJ67941	CAJ69966	CAJ67451
CAJ68553	CAJ70580	CAJ66952	CAJ68941	CAJ67942	CAJ69967	CAJ67452
CAJ68554	CAJ70581	CAJ66953	CAJ68942	CAJ67943	CAJ69968	CAJ67453
CAJ68555	CAJ70582	CAJ66954	CAJ68943	CAJ67944	CAJ69969	CAJ67454
CAJ68556	CAJ70584	CAJ66955	CAJ68944	CAJ67945	CAJ69970	CAJ67455
CAJ68557	CAJ70585	CAJ66956	CAJ68945	CAJ67946	CAJ69971	CAJ67456
CAJ68558	CAJ70586	CAJ66957	CAJ68946	CAJ67947	CAJ69972	CAJ67457
CAJ68559	CAJ70587	CAJ66958	CAJ68947	CAJ67948	CAJ69973	CAJ67458
CAJ68560	CAJ70588	CAJ66959	CAJ68948	CAJ67949	CAJ69974	CAJ67459
CAJ68561	CAJ70589	CAJ66960	CAJ68949	CAJ67950	CAJ69975	CAJ67460
CAJ68562	CAJ70590	CAJ66961	CAJ68950	CAJ67951	CAJ69976	CAJ67461
CAJ68563	CCA62784	CAJ66962	CAJ68951	CAJ67952	CAJ69977	CAJ67462
CAJ68564	CCA62785	CAJ66963	CAJ68952	CAJ67953	CAJ69978	CAJ67463
CAJ68565	CCA62786	CAJ66964	CAJ68953	CAJ67954	CAJ69979	CAJ67464
CAJ68566	CCA62787	CAJ66965	CAJ68954	CAJ67955	CAJ69980	CAJ67465
CAJ68567	CCA62788	CAJ66966	CAJ68955	CAJ67956	CAJ69981	CAJ67466

CAJ68568	CCA62789	CAJ66967	CAJ68956	CAJ67957	CAJ69982	CAJ67467
CAJ68569	CCA62790	CAJ66968	CAJ68957	CAJ67958	CAJ69983	CAJ67468
CAJ68570	CCA62791	CAJ66969	CAJ68958	CAJ67959	CAJ69984	CAJ67469
CAJ68571	CCA62792	CAJ66970	CAJ68959	CAJ67960	CAJ69985	CAJ67470
CAJ68572	CCA62793	CAJ66971	CAJ68960	CAJ67961	CAJ69986	CAJ67471
CAJ68573	CCA62794	CAJ66972	CAJ68961	CAJ67962	CAJ69987	CAJ67472
CAJ68574	CCA62795	CAJ66973	CAJ68962	CAJ67963	CAJ69988	CAJ67473
CAJ68575	CCA62796	CAJ66974	CAJ68963	CAJ67964	CAJ69989	CAJ67474
CAJ68576	CCA62797	CAJ66975	CAJ68964	CAJ67965	CAJ69990	CAJ67475
CAJ68577	CCA62798	CAJ66976	CAJ68965	CAJ67966	CAJ69991	CAJ67476
CAJ68578	CCA62799	CAJ66977	CAJ68966	CAJ67967	CAJ69992	CAJ67477
CAJ68579	CCA62801	CAJ66978	CAJ68967	CAJ67968	CAJ69993	CAJ67478
CAJ68580	CCA62802	CAJ66979	CAJ68968	CAJ67969	CAJ69994	CAJ67480
CAJ68581	CCA62803	CAJ66980	CAJ68969	CAJ67970	CAJ69995	CAJ67481
CAJ68582	CCA62804	CAJ66981	CAJ68970	CAJ67971	CAJ69996	CAJ67482
CAJ68583	CCA62805	CAJ66982	CAJ68971	CAJ67972	CAJ69997	CAJ67483
CAJ68584	CCA62806	CAJ66983	CAJ68972	CAJ67973	CAJ69998	CAJ67484
CAJ68585	CCA62807	CAJ66984	CAJ68973	CAJ67974	CAJ69999	CAJ67485
CAJ68586	CCA62808	CAJ66985	CAJ68974	CAJ67975	CAJ70000	CAJ67486
CAJ68587	CCA62809	CAJ66986	CAJ68975	CAJ67976	CAJ70001	CAJ67487
CAJ68588	CCA62810	CAJ66987	CAJ68976	CAJ67977	CAJ70002	CAJ67488
CAJ68589	CCA62811	CAJ66988	CAJ68977	CAJ67978	CAJ70003	CAJ67489
CAJ68590	CCA62812	CAJ66989	CAJ68978	CAJ67979	CAJ70004	CAJ67490
CAJ68591	CCA62813	CAJ66990	CAJ68979	CAJ67980	CAJ70005	CAJ67491
CAJ68592	CCA62814	CAJ66991	CAJ68980	CAJ67981	CAJ70006	CAJ67492
CAJ68593	CCA62816	CAJ66992	CAJ68981	CAJ67982	CAJ70007	CAJ67493
CAJ68594	CCA62817	CAJ66993	CAJ68982	CAJ67983	CAJ70008	CAJ67494
CAJ68595	CCA62818	CAJ66994	CAJ68983	CAJ67984	CAJ70009	CAJ67495
CAJ68596	CCA62819	CAJ66995	CAJ68984	CAJ67985	CAJ70010	CAJ67496
CAJ68598	CCA62820	CAJ66996	CAJ68985	CAJ67986	CAJ70011	CAJ67497
CAJ68599	CCA62821	CAJ66997	CAJ68986	CAJ67987	CAJ70012	CAJ67498
CAJ68600	CCA62823	CAJ66998	CAJ68987	CAJ67988	CAJ70013	CAJ67499
CAJ68601	CCA62824	CAJ66999	CAJ68988	CAJ67989	CAJ70014	CAJ67500
CAJ68602	CCA62825	CAJ67000	CAJ68989	CAJ67990	CAJ70015	CAJ67501
CAJ68603	CCA62826	CAJ67001	CAJ68990	CAJ67991	CAJ70016	CAJ67502
CAJ68604	CCA62827	CAJ67003	CAJ68991	CAJ67992	CAJ70017	CAJ67503
CAJ68605	CCA62828	CAJ67004	CAJ68992	CAJ67993	CAJ70018	CAJ67504
CAJ68606	CCA62829	CAJ67005	CAJ68993	CAJ67994	CAJ70019	CAJ67505
CAJ68607	CCA62830	CAJ67006	CAJ68994	CAJ67996	CAJ70020	CAJ67506
CAJ68608	CCA62831	CAJ67007	CAJ68995	CAJ67997	CAJ70021	CAJ67507
CAJ68610	CCA62832	CAJ67008	CAJ68996	CAJ67998	CAJ70022	CAJ67508

CAJ68611	CCA62833	CAJ67009	CAJ68997	CAJ67999	CAJ70023	CAJ67509
CAJ68612	CCA62834	CAJ67010	CAJ68998	CAJ68000	CAJ70024	CAJ67510
CAJ68613	CCA62835	CAJ67011	CAJ68999	CAJ68001	CAJ70025	CAJ67512
CAJ68614	CCA62836	CAJ67012	CAJ69000	CAJ68002	CAJ70026	CAJ67513
CAJ68615	CCA62837	CAJ67013	CAJ69001	CAJ68003	CAJ70027	CAJ67514
CAJ68616	CCA62838	CAJ67014	CAJ69002	CAJ68004	CAJ70028	CAJ67515
CAJ68617	CCA62839	CAJ67015	CAJ69003	CAJ68005	CAJ70029	CAJ67516
CAJ68618	CCA62840	CAJ67016	CAJ69004	CAJ68006	CAJ70030	CAJ67517
CAJ68619	CCA62841	CAJ67017	CAJ69005	CAJ68007	CAJ70031	CAJ67518
CAJ68620	CCA62842	CAJ67019	CAJ69006	CAJ68008	CAJ70032	CAJ67519
CAJ68621	CCA62845	CAJ67020	CAJ69007	CAJ68009	CAJ70033	CAJ67520
CAJ68622	CCA62846	CAJ67022	CAJ69008	CAJ68010	CAJ70034	CAJ67521
CAJ68623	CCA62847	CAJ67023	CAJ69009	CAJ68011	CAJ70035	CAJ67522
CAJ68624	CCA62848	CAJ67024	CAJ69010	CAJ68012	CAJ70036	CAJ67523
CAJ68625	CCA62850	CAJ67025	CAJ69011	CAJ68013	CAJ70037	CAJ67524
CAJ68626	CCA62851	CAJ67026	CAJ69012	CAJ68014	CAJ70040	CAJ67525
CAJ68627	CCA62852	CAJ67027	CAJ69013	CAJ68015	CAJ70041	CAJ67526
CAJ68628	CCA62853	CAJ67028	CAJ69014	CAJ68016	CAJ70042	CAJ67527
CAJ68630	CCA62854	CAJ67029	CAJ69015	CAJ68017	CAJ70043	CAJ67528
CAJ68631	CCA62855	CAJ67030	CAJ69016	CAJ68018	CAJ70044	CAJ67529
CAJ68632	CCA62856	CAJ67031	CAJ69017	CAJ68019	CAJ70045	CAJ67530
CAJ68633	CCA62857	CAJ67032	CAJ69018	CAJ68020	CAJ70046	CAJ67531
CAJ68634	CCA62858	CAJ67033	CAJ69019	CAJ68021	CAJ70047	CAJ67532
CAJ68635	CCA62859	CAJ67034	CAJ69020	CAJ68022	CAJ70048	CAJ67533
CAJ68636	CCA62860	CAJ67035	CAJ69021	CAJ68023	CAJ70049	CAJ67534
CAJ68637	CCA62861	CAJ67036	CAJ69022	CAJ68024	CAJ70050	CAJ67535
CAJ68638	CCA62862	CAJ67037	CAJ69023	CAJ68025	CAJ70052	CAJ67536
CAJ68639	CCA62863	CAJ67038	CAJ69024	CAJ68026	CAJ70053	CAJ67537
CAJ68640	CCA62864	CAJ67039	CAJ69025	CAJ68027	CAJ70054	CAJ67538
CAJ68641	CCA62865	CAJ67040	CAJ69026	CAJ68028	CAJ70055	CAJ67539
CAJ68642	CCA62866	CAJ67041	CAJ69027	CAJ68029	CAJ70056	CAJ67540
CAJ68643	CCA62868	CAJ67042	CAJ69028	CAJ68030	CAJ70057	CAJ67541
CAJ68644	CCA62869	CAJ67043	CAJ69029	CAJ68031	CAJ70058	CAJ67542
CAJ68645	CCA62871	CAJ67044	CAJ69030	CAJ68032	CAJ70059	CAJ67543
CAJ68646	CCA62872	CAJ67045	CAJ69031	CAJ68033	CAJ70060	CAJ67544
CAJ68647	CCA62873	CAJ67046	CAJ69032	CAJ68034	CAJ70061	CAJ67545
CAJ68648	CCA62874	CAJ67047	CAJ69033	CAJ68035	CAJ70062	CAJ67546
CAJ68649	CCA62875	CAJ67048	CAJ69034	CAJ68036	CAJ70063	CAJ67547
CAJ68650	CCA62876	CAJ67049	CAJ69035	CAJ68037	CAJ70064	CAJ67549
CAJ68732	CAJ68735	CAJ67050	CAJ69036	CAJ68038	CAJ70065	CAJ67550
CAJ69416	CAJ68407	CAJ70433	CAJ67172	CAJ69166	CAJ68160	CAJ70188

CAJ69417	CAJ68408	CAJ70434	CAJ67173	CAJ69167	CAJ68161	CAJ70189
CAJ69418	CAJ68409	CAJ70435	CAJ67174	CAJ69168	CAJ68162	CAJ70190
CAJ69419	CAJ68410	CAJ70436	CAJ67176	CAJ69169	CAJ68163	CAJ70191
CAJ69420	CAJ68411	CAJ70437	CAJ67177	CAJ69170	CAJ68164	CAJ70192
CAJ69421	CAJ68412	CAJ70438	CAJ67178	CAJ69171	CAJ68165	CAJ70193
CAJ69422	CAJ68413	CAJ70439	CAJ67180	CAJ69172	CAJ68166	CAJ70194
CAJ69423	CAJ68414	CAJ70440	CAJ67181	CAJ69173	CAJ68167	CAJ70195
CAJ69424	CAJ68415	CAJ70441	CAJ67182	CAJ69174	CAJ68170	CAJ70196
CAJ69425	CAJ68416	CAJ70442	CAJ67183	CAJ69175	CAJ68171	CAJ70197
CAJ69426	CAJ68417	CAJ70443	CAJ67184	CAJ69176	CAJ68172	CAJ70198
CAJ69427	CAJ68418	CAJ70444	CAJ67185	CAJ69177	CAJ68173	CAJ70199
CAJ69428	CAJ68419	CAJ70445	CAJ67186	CAJ69178	CAJ68174	CAJ70200
CAJ69429	CAJ68420	CAJ70446	CAJ67187	CAJ69179	CAJ68175	CAJ70201
CAJ69430	CAJ68421	CAJ70447	CAJ67188	CAJ69181	CAJ68176	CAJ70202
CAJ69431	CAJ68422	CAJ70448	CAJ67189	CAJ69182	CAJ68177	CAJ70203
CAJ69432	CAJ68423	CAJ70449	CAJ67190	CAJ69184	CAJ68178	CAJ70204
CAJ69433	CAJ68424	CAJ70450	CAJ67191	CAJ69185	CAJ68179	CAJ70205
CAJ69434	CAJ68425	CAJ70451	CAJ67192	CAJ69186	CAJ68180	CAJ70206
CAJ69435	CAJ68426	CAJ70452	CAJ67193	CAJ69190	CAJ68181	CAJ70207
CAJ69436	CAJ68427	CAJ70453	CAJ67194	CAJ69191	CAJ68182	CAJ70208
CAJ69437	CAJ68428	CAJ70454	CAJ67195	CAJ69194	CAJ68183	CAJ70209
CAJ69438	CAJ68429	CAJ70455	CAJ67196	CAJ69195	CAJ68184	CAJ70210
CAJ69439	CAJ68430	CAJ70456	CAJ67197	CAJ69196	CAJ68185	CAJ70211
CAJ69440	CAJ68431	CAJ70457	CAJ67198	CAJ69197	CAJ68186	CAJ70212
CAJ69441	CAJ68432	CAJ70458	CAJ67199	CAJ69198	CAJ68187	CAJ70213
CAJ69443	CAJ68433	CAJ70459	CAJ67200	CAJ69199	CAJ68188	CAJ70214
CAJ69444	CAJ68434	CAJ70460	CAJ67201	CAJ69200	CAJ68189	CAJ70215
CAJ69445	CAJ68435	CAJ70461	CAJ67202	CAJ69201	CAJ68190	CAJ70216
CAJ69446	CAJ68436	CAJ70462	CAJ67203	CAJ69202	CAJ68191	CAJ70217
CAJ69447	CAJ68437	CAJ70463	CAJ67204	CAJ69203	CAJ68192	CAJ70218
CAJ69448	CAJ68438	CAJ70464	CAJ67205	CAJ69204	CAJ68193	CAJ70219
CAJ69449	CAJ68439	CAJ70465	CAJ67206	CAJ69205	CAJ68194	CAJ70220
CAJ69450	CAJ68440	CAJ70466	CAJ67207	CAJ69206	CAJ68195	CAJ70221
CAJ69451	CAJ68441	CAJ70467	CAJ67208	CAJ69207	CAJ68196	CAJ70222
CAJ69452	CAJ68442	CAJ70468	CAJ67209	CAJ69208	CAJ68197	CAJ70223
CAJ69453	CAJ68443	CAJ70469	CAJ67210	CAJ69209	CAJ68198	CAJ70224
CAJ69454	CAJ68444	CAJ70470	CAJ67211	CAJ69210	CAJ68199	CAJ70225
CAJ69455	CAJ68445	CAJ70471	CAJ67212	CAJ69211	CAJ68200	CAJ70226
CAJ69456	CAJ68446	CAJ70472	CAJ67213	CAJ69212	CAJ68201	CAJ70227
CAJ69457	CAJ68447	CAJ70473	CAJ67214	CAJ69213	CAJ68202	CAJ70228
CAJ69458	CAJ68448	CAJ70474	CAJ67215	CAJ69214	CAJ68203	CAJ70229

CAJ69459	CAJ68449	CAJ70475	CAJ67216	CAJ69215	CAJ68204	CAJ70230
CAJ69460	CAJ68450	CAJ70476	CAJ67217	CAJ69216	CAJ68205	CAJ70231
CAJ69461	CAJ68451	CAJ70477	CAJ67218	CAJ69217	CAJ68206	CAJ70232
CAJ69462	CAJ68452	CAJ70478	CAJ67219	CAJ69218	CAJ68207	CAJ70233
CAJ69463	CAJ68453	CAJ70479	CAJ67220	CAJ69219	CAJ68208	CAJ70234
CAJ69464	CAJ68454	CAJ70480	CAJ67221	CAJ69220	CAJ68209	CAJ70235
CAJ69465	CAJ68455	CAJ70481	CAJ67222	CAJ69221	CAJ68210	CAJ70236
CAJ69466	CAJ68456	CAJ70482	CAJ67223	CAJ69222	CAJ68211	CAJ70237
CAJ69467	CAJ68457	CAJ70483	CAJ67224	CAJ69223	CAJ68212	CAJ70238
CAJ69468	CAJ68458	CAJ70484	CAJ67225	CAJ69224	CAJ68213	CAJ70240
CAJ69469	CAJ68459	CAJ70485	CAJ67226	CAJ69225	CAJ68214	CAJ70241
CAJ69470	CAJ68460	CAJ70486	CAJ67227	CAJ69226	CAJ68215	CAJ70242
CAJ69471	CAJ68461	CAJ70487	CAJ67228	CAJ69227	CAJ68216	CAJ70243
CAJ69472	CAJ68462	CAJ70488	CAJ67229	CAJ69228	CAJ68217	CAJ70244
CAJ69473	CAJ68463	CAJ70489	CAJ67230	CAJ69229	CAJ68218	CAJ70245
CAJ69474	CAJ68464	CAJ70490	CAJ67231	CAJ69230	CAJ68219	CAJ70246
CAJ69475	CAJ68465	CAJ70491	CAJ67232	CAJ69231	CAJ68220	CAJ70247
CAJ69476	CAJ68466	CAJ70492	CAJ67233	CAJ69232	CAJ68221	CAJ70248
CAJ69477	CAJ68467	CAJ70493	CAJ67234	CAJ69233	CAJ68222	CAJ70249
CAJ69478	CAJ68468	CAJ70494	CAJ67235	CAJ69234	CAJ68223	CAJ70250
CAJ69479	CAJ68469	CAJ70495	CAJ67236	CAJ69235	CAJ68224	CAJ70251
CAJ69480	CAJ68470	CAJ70496	CAJ67237	CAJ69236	CAJ68225	CAJ70252
CAJ69481	CAJ68471	CAJ70497	CAJ67238	CAJ69237	CAJ68226	CAJ70253
CAJ69482	CAJ68472	CAJ70498	CAJ67239	CAJ69238	CAJ68227	CAJ70254
CAJ69483	CAJ68473	CAJ70499	CAJ67240	CAJ69239	CAJ68228	CAJ70255
CAJ69484	CAJ68474	CAJ70500	CAJ67241	CAJ69240	CAJ68229	CAJ70256
CAJ69485	CAJ68475	CAJ70501	CAJ67242	CAJ69241	CAJ68230	CAJ70258
CAJ69486	CAJ68476	CAJ70502	CAJ67243	CAJ69242	CAJ68231	CAJ70259
CAJ69487	CAJ68477	CAJ70503	CAJ67244	CAJ69243	CAJ68232	CAJ70260
CAJ69488	CAJ68478	CAJ70504	CAJ67245	CAJ69244	CAJ68233	CAJ70261
CAJ69489	CAJ68479	CAJ70505	CAJ67246	CAJ69245	CAJ68234	CAJ70262
CAJ69490	CAJ68480	CAJ70506	CAJ67247	CAJ69246	CAJ68235	CAJ70263
CAJ69491	CAJ68481	CAJ70507	CAJ67248	CAJ69248	CAJ68236	CAJ70264
CAJ69492	CAJ68482	CAJ70508	CAJ67249	CAJ69249	CAJ68237	CAJ70265
CAJ69493	CAJ68483	CAJ70509	CAJ67250	CAJ69250	CAJ68238	CAJ70266
CAJ69496	CAJ68484	CAJ70510	CAJ67251	CAJ69251	CAJ68239	CAJ70267
CAJ69497	CAJ68485	CAJ70511	CAJ67252	CAJ69252	CAJ68240	CAJ70268
CAJ69498	CAJ68486	CAJ70512	CAJ67253	CAJ69253	CAJ68241	CAJ70269
CAJ69499	CAJ68487	CAJ70513	CAJ67254	CAJ69254	CAJ68242	CAJ70270
CAJ69500	CAJ68488	CAJ70514	CAJ67255	CAJ69255	CAJ68243	CAJ70271
CAJ69501	CAJ68489	CAJ70515	CAJ67256	CAJ69256	CAJ68244	CAJ70272

CAJ69502	CAJ68490	CAJ70516	CAJ67257	CAJ69257	CAJ68245	CAJ70273
CAJ69503	CAJ68491	CAJ70517	CAJ67258	CAJ69258	CAJ68246	CAJ70274
CAJ69504	CAJ68492	CAJ70518	CAJ67259	CAJ69259	CAJ68247	CAJ70275
CAJ69505	CAJ68493	CAJ70520	CAJ67260	CAJ69260	CAJ68248	CAJ70276
CAJ69506	CAJ68494	CAJ70521	CAJ67262	CAJ69261	CAJ68249	CAJ70277
CAJ69507	CAJ68495	CAJ70522	CAJ67263	CAJ69262	CAJ68251	CAJ70278
CAJ69508	CAJ68496	CAJ70523	CAJ67264	CAJ69263	CAJ68252	CAJ70279
CAJ69509	CAJ68497	CAJ70524	CAJ67265	CAJ69264	CAJ68253	CD630_19020
CAJ69510	CAJ68498	CAJ70525	CAJ67266	CAJ69265	CAJ68254	CD630_19260
CAJ69511	CAJ68499	CAJ70526	CAJ67267	CAJ69266	CAJ68255	CD630_19270
CAJ69512	CAJ68500	CAJ70527	CAJ67268	CAJ69267	CAJ68256	CD630_19440
CAJ69513	CAJ68501	CAJ70528	CAJ67269	CAJ69268	CAJ68257	CD630_19820
CAJ69514	CAJ68502	CAJ70529	CAJ67270	CAJ69269	CAJ68258	CD630_19901
CAJ69515	CAJ68503	CAJ70530	CAJ67271	CAJ69270	CAJ68259	CD630_19910
CAJ69516	CAJ68504	CAJ70531	CAJ67272	CAJ69271	CAJ68260	CD630_19981
CAJ69517	CAJ68505	CAJ70532	CAJ67273	CAJ69272	CAJ68261	CD630_20021
CAJ69518	CAJ68506	CAJ70533	CAJ67274	CAJ69273	CAJ68262	CD630_20050
CAJ69519	CAJ68507	CAJ70534	CAJ67275	CAJ69274	CAJ68263	CD630_20051
CAJ69520	CAJ68508	CAJ70535	CAJ67276	CAJ69275	CAJ68264	CD630_20052
CAJ69521	CAJ68509	CAJ70536	CAJ67277	CAJ69276	CAJ68265	CD630_20060
CAJ69522	CAJ68510	CAJ70537	CAJ67278	CAJ69277	CAJ68266	CD630_20071
CAJ69523	CAJ68511	CAJ70538	CAJ67279	CAJ69278	CAJ68267	CD630_20090
CAJ69524	CAJ68512	CAJ70539	CAJ67281	CAJ69279	CAJ68268	CD630_20102
CAJ69525	CAJ68513	CAJ70540	CAJ67282	CAJ69280	CAJ68269	CD630_20103
CAJ69526	CAJ68514	CAJ70541	CAJ67283	CAJ69281	CAJ68270	CD630_21710
CAJ69527	CAJ68515	CAJ70542	CAJ67284	CAJ69282	CAJ68271	CD630_21820
CAJ69528	CAJ68516	CAJ70543	CAJ67285	CAJ69283	CAJ68272	CD630_21840
CAJ69529	CAJ68517	CAJ70544	CAJ67286	CAJ69284	CAJ68273	CD630_21930
CAJ69530	CAJ68518	CAJ70545	CAJ67287	CAJ69285	CAJ68274	CD630_22180
CAJ69531	CAJ68519	CAJ70546	CAJ67288	CAJ69286	CAJ68275	CD630_22190
CAJ69532	CAJ68520	CAJ70547	CAJ67289	CAJ69287	CAJ68276	CD630_22210
CAJ69533	CAJ68521	CAJ70548	CAJ67290	CAJ69288	CAJ68277	CD630_22250
CAJ69534	CAJ68522	CAJ70549	CAJ67291	CAJ69289	CAJ68278	CD630_22670
CAJ69535	CAJ68523	CAJ70550	CAJ67292	CAJ69290	CAJ68279	CD630_22841
CAJ69536	CAJ68524	CAJ70551	CAJ67293	CAJ69291	CAJ68280	CD630_22951
CAJ69537	CAJ68525	CAJ70552	CAJ67294	CAJ69292	CAJ68281	CD630_22980
CAJ69538	CAJ68526	CAJ70553	CAJ67295	CAJ69293	CAJ68283	CD630_23011
CAJ69539	CAJ68527	CAJ70554	CAJ67296	CAJ69294	CAJ68284	CD630_23020
CAJ67671	CAJ69660	CAJ68651	CCA62878	CAJ67737	CAJ69724	CD630_23021
CAJ67672	CAJ69661	CAJ68652	CCA62879	CAJ67738	CAJ69725	CD630_23030
CAJ67673	CAJ69662	CAJ68653	CCA62880	CAJ67739	CAJ69726	CD630_23051

CAJ67674	CAJ69663	CAJ68654	CCA62881	CAJ67740	CAJ69727	CD630_23060
CAJ67675	CAJ69664	CAJ68655	CCA62882	CAJ67741	CAJ69728	CD630_23620
CAJ67676	CAJ69665	CAJ68656	CCA62883	CAJ67742	CAJ69729	CD630_25201
CAJ67677	CAJ69666	CAJ68657	CCA62884	CAJ67743	CAJ69730	CD630_26040
CAJ67678	CAJ69667	CAJ68658	CCA62885	CAJ67744	CAJ69731	CD630_26050
CAJ67679	CAJ69668	CAJ68659	CCA62886	CAJ67745	CAJ69732	CD630_28240
CAJ67680	CAJ69669	CAJ68660	CCA62887	CAJ67746	CAJ69733	CD630_29721
CAJ67681	CAJ69670	CAJ68661	CCA62890	CAJ67747	CAJ69734	CD630_30080
CAJ67682	CAJ69671	CAJ68662	CCA62892	CAJ67748	CAJ69735	CD630_30200
CAJ67683	CAJ69672	CAJ68663	CCA62893	CAJ67749	CAJ69736	CD630_31381
CAJ67684	CAJ69673	CAJ68664	CCA62894	CAJ67750	CAJ69737	CD630_31382
CAJ67685	CAJ69674	CAJ68665	CCA62895	CAJ67751	CAJ69738	CD630_31460
CAJ67686	CAJ69675	CAJ68666	CCA62896	CAJ67752	CAJ69739	CD630_31461
CAJ67687	CAJ69676	CAJ68667	CCA62898	CAJ67753	CAJ69740	CD630_31531
CAJ67688	CAJ69677	CAJ68668	CCA62899	CAJ67754	CAJ69741	CD630_31561
CAJ67689	CAJ69678	CAJ68669	CCA62900	CAJ67755	CAJ69742	CD630_32640
CAJ67690	CAJ69679	CAJ68670	CCA62901	CAJ67756	CAJ69743	CD630_33410
CAJ67693	CAJ69680	CAJ68671	CCA62903	CAJ67757	CAJ69744	CD630_33580
CAJ67694	CAJ69681	CAJ68672	CCA62905	CAJ67758	CAJ69745	CD630_33781
CAJ67695	CAJ69682	CAJ68673	CCA62906	CAJ67759	CAJ69746	CD630_33810
CAJ67696	CAJ69683	CAJ68674	CCA62907	CAJ67760	CAJ69747	CD630_33871
CAJ67697	CAJ69684	CAJ68675	CCA62908	CAJ67761	CAJ69748	CD630_33872
CAJ67698	CAJ69685	CAJ68676	CCA62909	CAJ67762	CAJ69749	CD630_36110
CAJ67699	CAJ69686	CAJ68677	CAJ68744	CAJ67763	CAJ69750	CD630_36341
CAJ67700	CAJ69687	CAJ68678	CAJ68745	CAJ67764	CAJ69751	CD630_01800
CAJ67701	CAJ69688	CAJ68680	CAJ68746	CAJ67765	CAJ69752	CD630_01960
CAJ67702	CAJ69689	CAJ68683	CAJ68747	CAJ67766	CAJ69753	CD630_02000
CAJ67703	CAJ69690	CAJ68684	CAJ68748	CAJ67767	CAJ69754	CD630_03480
CAJ67704	CAJ69691	CAJ68685	CAJ68749	CAJ67768	CAJ69755	CD630_03540
CAJ67705	CAJ69692	CAJ68686	CAJ68750	CAJ67769	CAJ69756	CD630_04370
CAJ67706	CAJ69693	CAJ68687	CAJ68751	CAJ67770	CAJ69757	CD630_04950
CAJ67707	CAJ69694	CAJ68688	CAJ68752	CAJ67771	CAJ69758	CD630_05040
CAJ67708	CAJ69695	CAJ68689	CAJ68753	CAJ67772	CAJ69759	CD630_05071
CAJ67709	CAJ69696	CAJ68690	CAJ68754	CAJ67773	CAJ69760	CD630_05102
CAJ67710	CAJ69697	CAJ68691	CAJ68756	CAJ67774	CAJ69761	CD630_05822
CAJ67711	CAJ69698	CAJ68692	CAJ68758	CAJ67775	CAJ69762	CD630_05990
CAJ67712	CAJ69699	CAJ68693	CAJ68759	CAJ67776	CAJ69763	CD630_06030
CAJ67713	CAJ69700	CAJ68694	CAJ68760	CAJ67777	CAJ69764	CD630_06050
CAJ67714	CAJ69701	CAJ68695	CAJ68761	CAJ67778	CAJ69765	CD630_06071
CAJ67715	CAJ69702	CAJ68696	CAJ68762	CAJ67779	CAJ69766	CD630_06470
CAJ67716	CAJ69703	CAJ68697	CAJ68763	CAJ67780	CAJ69767	CD630_06780

CAJ67717	CAJ69704	CAJ68698	CAJ68764	CAJ67781	CAJ69768	CD630_07141
CAJ67718	CAJ69705	CAJ68699	CAJ68765	CAJ67782	CAJ69769	CD630_08570
CAJ67719	CAJ69706	CAJ68700	CAJ68766	CAJ67783	CAJ69770	CD630_08580
CAJ67720	CAJ69707	CAJ68701	CAJ68767	CAJ67784	CAJ69771	CD630_09030
CAJ67721	CAJ69708	CAJ68702	CAJ68768	CAJ67785	CAJ69772	CD630_10900
CAJ67722	CAJ69709	CAJ68703	CAJ68769	CAJ67786	CAJ69773	CD630_12360
CAJ67723	CAJ69710	CAJ68704	CAJ68770	CAJ67787	CAJ69774	CD630_12382
CAJ67724	CAJ69711	CAJ68705	CAJ68771	CAJ67788	CAJ69775	CD630_13100
CAJ67725	CAJ69713	CAJ68706	CAJ68772	CAJ67789	CAJ69776	CD630_14181
CAJ67726	CAJ69714	CAJ68707	CAJ68773	CAJ67790	CAJ69778	CD630_14260
CAJ67727	CAJ69715	CAJ68708	CAJ68774	CAJ67791	CAJ69779	CD630_14370
CAJ67728	CAJ69716	CAJ68709	CAJ68775	CAJ67792	CAJ69803	CD630_17291
CAJ67729	CAJ69717	CAJ68710	CAJ68776	CAJ67793	CAJ69806	CD630_17410
CAJ67730	CAJ69718	CAJ68711	CAJ68778	CAJ67794	CAJ69817	CD630_17591
CAJ67731	CAJ69719	CAJ68712	CAJ70280	CAJ67795	CAJ69818	CD630_18090
CAJ67732	CAJ69720	CAJ68713	CAJ67734	CAJ69722	CAJ68715	CD630_18110
CAJ67733	CAJ69721	CAJ68714	CAJ67735	CAJ69723	CAJ68717	CD630_18120
CAJ70281	CAJ70290	CAJ70297	CAJ70304	CAJ70311	CAJ68723	CD630_18441
CAJ70282	CAJ70291	CAJ70298	CAJ70305	CAJ70312	CAJ68724	CD630_18781
CAJ70284	CAJ70292	CAJ70299	CAJ70306	CAJ68718	CAJ68725	CD630_18910
CAJ70285	CAJ70293	CAJ70300	CAJ70307	CAJ68719	CAJ68726	
CAJ70286	CAJ70294	CAJ70301	CAJ70308	CAJ68720	CAJ68727	
CAJ70287	CAJ70295	CAJ70302	CAJ70309	CAJ68721	CAJ68728	
CAJ70288	CAJ70296	CAJ70303	CAJ70310	CAJ68722	CAJ68729	
CAJ68730	CAJ68733	CAJ68736	CAJ68739	CAJ68742	CAJ68741	
CAJ68731	CAJ68734	CAJ68737	CAJ68740	CAJ68743	CAJ68738	

Anexo. Tabla 2. Genes únicos de la cepa *C. difficile* ATCC9689 agregados al diseño del microarreglo.

Genes únicos de la cepa <i>C. difficile</i> ATCC9689					
AKP41177	AKP41272	AKP41697	AKP44000	AKP41257	AKP44675
AKP41178	AKP41274	AKP41772	AKP44001	AKP41259	AKP44678
AKP41179	AKP41276	AKP41773	AKP44002	AKP41260	AKP41255
AKP41184	AKP41278	AKP41956	AKP44017	AKP41262	AKP41498
AKP41216	AKP41279	AKP42258	AKP44018	AKP41263	AKP43345
AKP41219	AKP41280	AKP42333	AKP44041	AKP41264	AKP44371
AKP41220	AKP41281	AKP42362	AKP44042	AKP41265	AKP44407
AKP41221	AKP41282	AKP42363	AKP44052	AKP41266	
AKP41222	AKP41283	AKP42369	AKP44059	AKP41267	
AKP41223	AKP41285	AKP42445	AKP44060	AKP41268	

AKP41224	AKP41286	AKP42570	AKP44061	AKP41269	
AKP41225	AKP41291	AKP42670	AKP44062	AKP41270	
AKP41226	AKP41292	AKP42671	AKP44063	AKP41499	
AKP41227	AKP41294	AKP42696	AKP44064	AKP41500	
AKP41228	AKP41295	AKP42739	AKP44065	AKP41501	
AKP41229	AKP41296	AKP42740	AKP44066	AKP41502	
AKP41230	AKP41297	AKP42749	AKP44067	AKP41503	
AKP41231	AKP41298	AKP42756	AKP44068	AKP41504	
AKP41232	AKP41299	AKP42757	AKP44069	AKP41505	
AKP41233	AKP41300	AKP42798	AKP44070	AKP41506	
AKP41234	AKP41301	AKP42801	AKP44071	AKP41534	
AKP41237	AKP41302	AKP42927	AKP44072	AKP41535	
AKP41238	AKP41303	AKP42929	AKP44073	AKP41536	
AKP41239	AKP41304	AKP42938	AKP44075	AKP41615	
AKP41240	AKP41352	AKP43064	AKP44079	AKP43346	
AKP41241	AKP41385	AKP43133	AKP44126	AKP43793	
AKP41242	AKP41386	AKP43169	AKP44130	AKP43815	
AKP41243	AKP41387	AKP43171	AKP44168	AKP43908	
AKP41244	AKP41388	AKP43176	AKP44191	AKP43920	
AKP41245	AKP41389	AKP43219	AKP44192	AKP43975	
AKP41246	AKP41390	AKP43250	AKP44253	AKP43976	
AKP41249	AKP41391	AKP43251	AKP44254	AKP43977	
AKP41250	AKP41392	AKP43255	AKP44270	AKP43996	
AKP41251	AKP41393	AKP43256	AKP44285	AKP43997	
AKP41252	AKP41426	AKP43259	AKP44295	AKP43998	
AKP41253	AKP41427	AKP43305	AKP44300	AKP43999	
AKP41254	AKP41469	AKP43315	AKP44304	AKP44372	

Anexo. Tabla 3. Genes únicos de la cepa *C. difficile* R20291 agregados al diseño del microarreglo.

Genes únicos de la cepa <i>C. difficile</i> R20291						
CBE01538	CBE03345	CBE04038	CBE05328	CBE06736	CBE02703	CBE05146
CBE01539	CBE03545	CBE04041	CBE05329	CBE06754	CBE02874	CBE05305
CBE01541	CBE03634	CBE04532	CBE05512	CBE06781	CBE02904	CBE06713
CBE01543	CBE03710	CBE04534	CBE05856	CBE06811	CBE02965	CBE06715
CBE01806	CBE03711	CBE04536	CBE05858	CBE06825	CBE02966	CBE06717
CBE01844	CBE03795	CBE04537	CBE05874	CBE06827	CBE02968	CBE06719
CBE01846	CBE03954	CBE04541	CBE05897	CBE06829	CBE02970	CBE06720
CBE01848	CBE03956	CBE04545	CBE05898	CBE06831	CBE03138	CBE06722
CBE01850	CBE03958	CBE04547	CBE05900	CBE06960	CBE03142	CBE06724
CBE01879	CBE03960	CBE04549	CBE05902	CBE06962	CBE03143	CBE06725
CBE01881	CBE03962	CBE04551	CBE06183	CBE06963	CBE03145	CBE06727

CBE01883	CBE03963	CBE04552	CBE06247	CBE07070	CBE03174	CBE06729
CBE01884	CBE03965	CBE04554	CBE06255	CBE07072	CBE03343	CBE06731
CBE01886	CBE03967	CBE04556	CBE06259	CBE07074	CBE04011	CBE06733
CBE01888	CBE03969	CBE04559	CBE06313	CBE07076	CBE04013	CBE06734
CBE01997	CBE03971	CBE04561	CBE06315	CBE07078	CBE04014	CBE07581
CBE01998	CBE03973	CBE04562	CBE06317	CBE07079	CBE04016	CBE07585
CBE02118	CBE03974	CBE04564	CBE06319	CBE07081	CBE04018	CBE07587
CBE02127	CBE03976	CBE04566	CBE06320	CBE07237	CBE04020	CBE07589
CBE02129	CBE03978	CBE04568	CBE06363	CBE07240	CBE04022	CBE07598
CBE02207	CBE03980	CBE04570	CBE06446	CBE07244	CBE04024	CBE07696
CBE02227	CBE03981	CBE04571	CBE06575	CBE07246	CBE04026	CDR20291_0337
CBE02229	CBE03983	CBE04573	CBE06577	CBE07247	CBE04027	CDR20291_0514
CBE02250	CBE03985	CBE04574	CBE06579	CBE07249	CBE04029	CDR20291_0667
CBE02335	CBE03987	CBE04576	CBE06581	CBE07251	CBE04034	CDR20291_1758
CBE02337	CBE03988	CBE04577	CBE06583	CBE07253	CBE04036	CDR20291_1785
CBE02339	CBE03990	CBE04579	CBE06663	CBE07255	CBE04600	CDR20291_2275
CBE02352	CBE03992	CBE04580	CBE06665	CBE07256	CBE04601	
CBE02387	CBE03994	CBE04582	CBE06667	CBE07258	CBE04604	
CBE02389	CBE03996	CBE04584	CBE06668	CBE07260	CBE04606	
CBE02425	CBE03997	CBE04585	CBE06670	CBE07261	CBE04608	
CBE02512	CBE03999	CBE04589	CBE06672	CBE07556	CBE04712	
CBE02514	CBE04001	CBE04591	CBE06700	CBE07558	CBE04714	
CBE02516	CBE04002	CBE04592	CBE06701	CBE07560	CBE04716	
CBE02518	CBE04004	CBE04594	CBE06703	CBE07567	CBE04717	
CBE02677	CBE04006	CBE04596	CBE06705	CBE07571	CBE04891	
CBE02701	CBE04008	CBE04598	CBE06711	CBE07580	CBE04892	

ANEXO II

Anexo. Tabla 4. Genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días, sin corrección de Benjamini – Hochberg.

ID	Nombre	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B
CAJ70248	Glicoproteína BclA3 de xosporium	1.875	2.423	5.655	0.00052	0.00624	-0.114
CAJ67909	Proteína no caracterizada	1.681	2.573	5.517	0.00061	0.00675	-0.283
CAJ67274	Ornitina racemasa	1.989	2.445	8.887	0.00002	0.00138	3.185
CAJ68478	Proteína de ensamblaje de la cubierta de esporas	1.618	2.552	7.491	0.00008	0.00248	1.904
CAJ67429	CotF proteína de ensamblaje de péptido de cubierta de esporas	1.538	2.241	4.875	0.00131	0.00985	-1.109
CAJ70148	Deshidrogenasa putativa	2.559	1.039	3.736	0.00598	0.02441	-2.719

CAJ68046	Proteína AA de esporulación en etapa III	2.276	1.428	3.795	0.00549	0.02312	-2.63
AKP44130.1	Proteína hipotética	-1.554	1.679	-5.08	0.00102	0.00875	-0.839
CAJ70146	Pequeña proteína beta de esporas soluble en ácido	1.716	2.387	10.411	0.00001	0.00078	4.386
CAJ70589	Componente de proteína ribonucleasa P (proteína RNasaP) (proteína RNasa P) (Proteína C5)	-1.635	1.684	-5.155	0.00093	0.00828	-0.741
CAJ67274	Ornitina racemasa	1.602	2.702	11.139	0.00000	0.00060	4.9
CAJ69479	Proteína no caracterizada	-1.532	1.828	-4.911	0.00126	0.00964	-1.06
CAJ69925	Aminotransferasa putativa	2	1.991	5.254	0.00083	0.00778	-0.614
CAJ70520	Proteína no caracterizada	2.082	1.406	3.482	0.00859	0.03075	-3.101
CAJ69285	Proteína de ensamblaje peptídico de cubierta de esporas CotJB 2	1.591	2.449	10.218	0.00001	0.00084	4.244
CAJ68298	Proteína de la cubierta de esporas: peroxirredoxina/quitinasa	1.541	2.383	12.198	0.00000	0.00038	5.587
CAJ69925	Aminotransferasa putativa	1.619	2.204	5.861	0.00041	0.00561	0.134
CAJ68940	Proteína hipotética conservada	2.583	1.207	3.509	0.00825	0.02990	-3.059
CAJ67268	2,4-diaminopentanoato deshidrogenasa	1.783	2.512	3.616	0.00708	0.02698	-2.899
CAJ70248	Glicoproteína BclA3 de Exosporium	1.808	2.525	3.69	0.00638	0.02541	-2.788
CAJ68292	Regulador transcripcional, familia hxlR	-1.598	1.03	-3.956	0.00439	0.02022	-2.394
CAJ67270	Subunidad beta de 2-amino-4-cetopentanoato tiolasa	1.521	2.693	9.682	0.00001	0.00107	3.834
CAJ67909	Proteína no caracterizada	1.625	2.588	8.627	0.00003	0.00158	2.961
CAJ68295	Supuesta delta-lactama-biosintética de-N-acteylase	2.202	1.082	4.38	0.00248	0.01414	-1.785
CCA62831	Proteína hipotética conservada	-1.885	1.54	-3.385	0.00990	0.03346	-3.249
CAJ68047	Proteína AB de esporulación en etapa III	1.524	1.585	3.985	0.00422	0.01966	-2.351
CAJ69029	Proteína de membrana putativa	1.547	2.168	4.911	0.00126	0.00964	-1.061

ANEXO III

Anexo. Tabla 5. Genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días de cepas asociadas a ICD-NR, independientemente de ribotipo sin corrección de Benjamini – Hochberg.

ID	Nombre	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B
CAJ68478	Proteína hipotética	1.61626	2.54956	6.39856	0.00354	0.19157	-1.09320

CAJ67274	Enzima dependiente de PLP de la familia alanina/ornitina racemasa	1.71448	2.58885	18.35997	0.00007	0.15085	1.97338
CAJ67616	Proteína de esporulación putativa YunB	1.82318	1.16351	8.60974	0.00121	0.15085	-0.04381
CAJ68478	Proteína hipotética	1.84418	2.44515	4.96743	0.00857	0.20711	-2.02767
CAJ68478	Proteína hipotética	1.57054	2.56591	10.45679	0.00059	0.15085	0.58253
CAJ70146	Pequeña proteína beta de esporas soluble en ácido	1.91470	2.28780	7.42144	0.00208	0.15890	-0.55830
CAJ70589	Componente de proteína ribonucleasa P (proteína RNasaP) (proteína RNasa P) (Proteína C5)	-2.07970	1.45864	-5.41210	0.00638	0.20211	-1.71050
CAJ67274	Enzima dependiente de PLP de la familia alanina/ornitina racemasa	1.72332	2.64025	6.52028	0.00331	0.19157	-1.02439
CAJ69479	Proteína no caracterizada	-1.75059	1.73140	-17.30495	0.00009	0.15085	1.86014
CAJ69925	Enzima aminotransferasa clase V dependiente de PLP	1.55191	2.29670	5.04098	0.00815	0.20625	-1.97337
CAJ68298	Proteína de la cubierta de esporas: peroxirredoxina/quitinasa	1.56706	2.40729	8.04448	0.00155	0.15085	-0.27582
CAJ67270	Subunidad beta de 2-amino-4-cetopentatanoato tiolasa	1.61906	2.63345	5.47649	0.00613	0.20211	-1.66671
CAJ68837	Sistema de transporte tipo ABC, permeasa	1.50303	1.37597	10.18898	0.00065	0.15085	0.50257
CCA62905	Proteína hipotética	2.27539	0.65312	5.79875	0.00502	0.20153	-1.45522
CAJ67909	Proteína no caracterizada	1.64853	2.59148	6.42287	0.00350	0.19157	-1.07934
CAJ67909	Proteína no caracterizada	1.61443	2.61656	5.64642	0.00551	0.20153	-1.55362
CAJ67905	Proteína no caracterizada	1.57572	2.25860	6.20400	0.00395	0.19157	-1.20636
CD630_19270	Proteína que contiene el dominio del casete de unión a ATP	1.53247	2.19199	4.99832	0.00839	0.20711	-2.00478
CAJ68368	Sistema de transporte tipo ABC, proteína de unión a ATP de la familia de múltiples fármacos	-2.03730	0.81418	-17.03167	0.00009	0.15085	1.82835
CAJ68047	Proteína AB de esporulación en etapa III	1.59932	1.58366	8.02316	0.00157	0.15085	-0.28501
CAJ68707	Proteína P bifuncional, corismato mutasa/prefenato deshidratasa	-1.72949	1.06920	-6.78085	0.00288	0.18495	-0.88198

Anexo. Tabla 6. Genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días de cepas asociadas a ICD-R, independientemente de ribotipo sin corrección de Benjamini – Hochberg.

ID	Nombre	logFC	AveExp _r	t	P.Value	adj.P.Val _l	B
----	--------	-------	---------------------	---	---------	------------------------	---

CD630_22670	Fragmento de proteína de membrana, proteína de tipo infección abortiva	1.82019	0.80826	7.58697	0.00156	0.11348	-0.34495
CAJ67384	Pre-pro-forma de enzima lítica de corteza de esporas	3.57129	0.94656	7.01098	0.00211	0.11907	-0.66077
CAJ70248	Glicoproteína de exosporio similar al colágeno BclA3	1.66269	2.51585	7.60057	0.00155	0.11348	-0.33783
CAJ67274	Enzima dependiente de PLP de la familia alanina/ornitina racemasa	2.26391	2.30119	6.63588	0.00260	0.12650	-0.88228
CAJ70148	Deshidrogenasa putativa	3.76756	0.36062	34.71454	0.00000	0.01854	3.73785
CAJ70146	Pequeña proteína beta de esporas soluble en ácido	1.51682	2.48577	13.92068	0.00015	0.08454	1.85242
CAJ69164	PTS subunidad transportadora de galactitol IIC	1.74505	1.25188	4.76929	0.00866	0.13627	-2.21173
CAJ69925	Enzima aminotransferasa clase V dependiente de PLP	2.44784	1.68518	5.52972	0.00509	0.13137	-1.61956
CAJ69285	Proteína de cubierta de esporas CotJB	1.71241	2.39085	12.36168	0.00023	0.08454	1.46873
CAJ68298	Proteína de la cubierta de esporas: peroxirredoxina/quitinasa	1.51499	2.35828	8.32339	0.00110	0.11348	0.02051
CAJ68151	Proteína A de segregación y condensación	-2.87713	0.76747	-25.31382	0.00001	0.03298	3.29817
CAJ70176	Subunidad transportadora de azúcar PTS IIB	1.55189	1.53119	5.67400	0.00464	0.13097	-1.51558
CAJ69925	Enzima aminotransferasa clase V dependiente de PLP	1.83678	2.02196	8.08001	0.00123	0.11348	-0.09585
CAJ68940	Proteína hipotética conservada	3.90547	0.42958	20.65086	0.00003	0.05364	2.90087
CAJ67607	Proteína de esporulación de etapa V AC	1.51222	1.51136	7.23639	0.00187	0.11533	-0.53381
CAJ68100	Proteína hipotética conservada	2.98681	-0.02976	30.95154	0.00001	0.01961	3.60065
CAJ69725	Proteína de membrana putativa	4.22234	0.58801	48.30375	0.00000	0.00980	4.01782
CAJ69224	Proteína de membrana putativa	-2.34399	0.81212	-9.93516	0.00055	0.10343	0.69576
CAJ69166	Sistema PTS, componente IIA de la familia de fructosa/manitol	3.79801	0.37585	18.04777	0.00005	0.07305	2.58390
AKP41282	Proteína hipotética	-1.67451	1.59183	-8.62835	0.00095	0.11348	0.16053
CBE06724	Proteína putativa no caracterizada	2.46652	0.39417	4.58903	0.00991	0.13901	-2.36382
CAJ67909	Proteína no caracterizada	1.60147	2.58358	5.54113	0.00506	0.13137	-1.61124
CAJ68295	Supuesta delta-lactama-biosintética de-N-acteylase	2.91410	0.61796	5.91618	0.00398	0.12650	-1.34658
CAJ69276	Proteína de membrana putativa	1.54286	1.52668	9.27452	0.00072	0.10917	0.43756
CAJ68521	Proteína de membrana putativa	2.68790	0.50486	5.21406	0.00630	0.13137	-1.85608
CCA62881	Proteína de membrana putativa	2.10385	0.95008	20.26377	0.00003	0.05364	2.85899
CAJ69029	Proteína de membrana de esporulación YtaF	2.02004	1.92528	5.73341	0.00446	0.12865	-1.47349

Anexo. Tabla 7. Genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días de cepas asociadas a ICD-R, independientemente de ribotipo con corrección de Benjamini – Hochberg.

ID	Nombre	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B
CAJ69725	Proteína de membrana putativa	4.22234	0.58801	48.30375	0.00000	0.00980	4.01782

Anexo. Tabla 8. Diagrama de Venn.

[B 3D RT001027 NR]:		[B 3D RT001027 NR] y [B 3D RT00127 R]:	
ID	Nombre	ID	Nombre
CAJ68478	Proteína hipotética	CAJ67274	Enzima dependiente de PLP de la familia alanina/ornitina racemasa
CAJ67616	Proteína de esporulación putativa YunB	CAJ70146	Pequeña proteína beta de esporas soluble en ácido
CAJ70589	Componente de proteína ribonucleasa P (proteína RNasaP) (proteína RNasa P) (Proteína C5)	CAJ69925	Enzima aminotransferasa clase V dependiente de PLP
CAJ69479	Proteína no caracterizada	CAJ68298	Proteína de la cubierta de esporas: peroxirredoxina/ quitinasa
CAJ67270	Subunidad beta de 2-amino-4-cetopentatanoato tiolasa	CAJ67909	Proteína no caracterizada
CAJ68837	Sistema de transporte tipo ABC, permeasa		
CCA62905	Proteína hipotética		
CAJ67905	Proteína no caracterizada		
CD630_19270	Proteína que contiene el dominio del casete de unión a ATP		
CAJ68368	Sistema de transporte tipo ABC, proteína de unión a ATP de la familia de múltiples fármacos		
CAJ68047	Proteína AB de esporulación en etapa III		
CAJ68707	Proteína P bifuncional, corismato mutasa/prefenato deshidratasa		

Anexo. Tabla 9. Genes únicos diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días de cepas asociadas a ICD-R, independientemente de ribotipo sin corrección de Benjamini – Hochberg.

ID	Nombre	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B
CD630_22670	Fragmento de proteína de membrana, proteína de tipo infección abortiva	1.82019	0.80826	7.58697	0.00156	0.11348	-0.34495
CAJ67384	Pre-pro-forma de enzima lítica de corteza de esporas	3.57129	0.94656	7.01098	0.00211	0.11907	-0.66077
CAJ70248	Glicoproteína de exosporio similar al colágeno BclA3	1.66269	2.51585	7.60057	0.00155	0.11348	-0.33783
CAJ70148	Deshidrogenasa putativa	3.76756	0.36062	34.71454	0	0.01854	3.73785

CAJ69164	PTS subunidad transportadora de galactitol IIC	1.74505	1.25188	4.76929	0.00866	0.13627	-2.21173
CAJ69285	Proteína de cubierta de esporas CotJB	1.71241	2.39085	12.36168	0.00023	0.08454	1.46873
CAJ68151	Proteína A de segregación y condensación	-2.87713	0.76747	-25.31382	0.00001	0.03298	3.29817
CAJ70176	Subunidad transportadora de azúcar PTS IIB	1.55189	1.53119	5.674	0.00464	0.13097	-1.51558
CAJ68940	Proteína hipotética conservada	3.90547	0.42958	20.65086	0.00003	0.05364	2.90087
CAJ67607	Proteína de esporulación de etapa V AC	1.51222	1.51136	7.23639	0.00187	0.11533	-0.53381
CAJ68100	Proteína hipotética conservada	2.98681	-0.02976	30.95154	0.00001	0.01961	3.60065
CAJ69725	Proteína de membrana putativa	4.22234	0.58801	48.30375	0	0.0098	4.01782
CAJ69224	Proteína de membrana putativa	-2.34399	0.81212	-9.93516	0.00055	0.10343	0.69576
CAJ69166	PTS subunidad transportadora de azúcar IIA	3.79801	0.37585	18.04777	0.00005	0.07305	2.5839
AKP41282	Proteína hipotética	-1.67451	1.59183	-8.62835	0.00095	0.11348	0.16053
CBE06724	Proteína hipotética	2.46652	0.39417	4.58903	0.00991	0.13901	-2.36382
CAJ68295	Supuesta delta-lactama-biosintética de-N-acteylasa	2.9141	0.61796	5.91618	0.00398	0.1265	-1.34658
CAJ69276	Proteína de membrana putativa	1.54286	1.52668	9.27452	0.00072	0.10917	0.43756
CAJ68521	Proteína que contiene el dominio HXXEE	2.6879	0.50486	5.21406	0.0063	0.13137	-1.85608
CCA62881	Proteína de membrana putativa	2.10385	0.95008	20.26377	0.00003	0.05364	2.85899
CAJ69029	Proteína de membrana de esporulación YtaF	2.02004	1.92528	5.73341	0.00446	0.12865	-1.47349

Anexo. Tabla 10. Genes únicos diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días de cepas asociadas a ICD-R, independientemente de ribotipo con corrección de Benjamini – Hochberg.

ID	Nombre	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B
CAJ70148	Deshidrogenasa putativa	3.76756	0.36062	34.71454	0.00000	0.01854	3.73785
CAJ68151	Proteína A de segregación y condensación	-2.87713	0.76747	-25.31382	0.00001	0.03298	3.29817
CAJ68100	Proteína hipotética conservada	2.98681	-0.02976	30.95154	0.00001	0.01961	3.60065
CAJ69725	Proteína de membrana putativa	4.22234	0.58801	48.30375	0.00000	0.00980	4.01782

ANEXO IV

Anexo. Tabla 11. Genes únicos de las células planctónicas del ribotipo 001 asociadas a ICD-R.

ID	FClog	AVE.Expr	Nombre
CAJ70248	1.612	0.929	Glicoproteína de exosporio similar al colágeno BclA3
CAJ69357	1.612	0.929	Endopeptidasa de esporas
CAJ67429	2.112	1.218	CotF proteína de ensamblaje de péptido de cubierta de esporas
CAJ67608	2.185	1.270	Proteína de esporulación en etapa V AD
CAJ67034	2.230	1.303	Proteína de la cubierta de esporas
CAJ68797	1.947	1.111	Proteína de utilización de etanolamina
CAJ67597	1.882	1.072	Proteína activadora del operón sorbitol (Glucitol)
CAJ68790	2.092	1.205	Subunidad pequeña de etanolamina amoníaco liasa
CAJ68466	2.351	1.397	Tiamina fosfato sintasa
CAJ69258	2.092	1.205	Supuesta proteína de inanición de carbono similar a CstA
CAJ69439	2.246	1.315	Isomerasa de fosfoazúcar putativa
CAJ68207	1.947	1.111	Sistema de transporte tipo ABC, lantibiótico/proteína de unión a ATP de la familia de múltiples fármacos
CAJ67106	-1.565	1.392	Sistema PTS, componente manosa/fructosa/sorbosa IIA
CAJ67694	1.947	1.111	Sistema PTS, componente IIB de la lactosa/celobiosa-familia
CAJ68368	2.246	1.315	Sistema de transporte tipo ABC, proteína de unión a ATP de la familia de múltiples fármacos
CAJ69214	2.035	1.167	PTS subunidad transportadora de azúcar IIA
CAJ69950	1.773	1.011	Sistema PTS, componente IIA alfa-glucósido específico
CAJ70095	1.882	1.072	Transportador Cme de MFS de salida de múltiples fármacos
CAJ68779	1.882	1.072	Sistema de transporte tipo ABC, permeasa
CAJ69939	2.168	1.258	Ácido N-acetilmurámico 6-fosfato eterasa
CAJ66848	2.150	1.245	Transportador MFS
CAJ69302	-1.620	1.432	PTS subunidad transportadora de glucitol/sorbitol IIB
CAJ70430	2.185	1.270	Subunidad putativa de la permeasa del transportador ABC del 2-aminoetilfosfonato
CAJ67038	2.060	1.183	Proteína de la familia de las nitroreductasas
AKP41296	-1.690	1.486	N-acetilmuramoil-l-alanina amidasa
CAJ69372	1.612	0.929	Proteína de la familia aminopeptidasa P
CAJ69199	1.991	1.139	Permeasa transportadora ABC
CAJ68915	2.092	1.205	Ornitina carbamoiltransferasa
CBE04714	-1.642	1.449	Peptidasa
CAJ69743	2.289	1.347	Oxidoreductasa de unión a NAD (P) putativa
CAJ68569	2.112	1.218	Fosfometilpirimidina sintasa ThiC
CAJ70098	-1.565	1.392	Proteína de unión a ATP del transportador ABC
CAJ68841	1.773	1.011	Acil-CoA tioesterasa putativa
CAJ69724	-1.733	1.520	Amidohidrolasa

CAJ68837	2.230	1.303	Sistema de transporte tipo ABC, permeasa
CAJ69736	2.271	1.334	Proteína de la familia de la aldolasa/aducina de clase II
CAJ68795	2.112	1.218	Etanolamina corrinoide cobalamina adenosiltransferasa
CAJ68456	-1.530	1.366	Cadena ATPasa A translocadora de potasio
CAJ68453	-1.661	1.463	Permeasa transportadora ABC
CAJ70016	2.278	1.339	Proteína de dominio de unión 4fe-4s
CAJ67842	1.991	1.139	Proteína de unión a ATP del transportador ABC
CAJ68788	1.991	1.139	Etanolamina amoníaco-liasa factor de reactivación EutA
CAJ69908	2.316	1.369	PTS subunidad transportadora de fructosa IIB
CAJ66955	2.131	1.231	PTS subunidad transportadora de lactosa/celobiosa IIA
CAJ70424	2.185	1.270	Transportador de cationes
CAJ68251	2.150	1.245	Dipéptido epimerasa
CAJ68748	1.612	0.929	Permeasa transportadora ABC
CAJ69202	-1.530	1.366	Desacetilasa de la familia PIG-L
CAJ68916	2.112	1.218	Proteína de la familia de la aspartato aminotransferasa
CAJ70441	2.092	1.205	Proteína putativa del metabolismo del fosfonato
CAJ67598	1.991	1.139	PTS subunidad transportadora de sorbitol IIC
CAJ70009	2.112	1.218	Antiterminador de transcripción, regulador de operón PTS, bgIG2
CAJ68270	2.332	1.381	Proteína de la familia de aminotransferasa dependiente de PLP
CAJ70004	2.324	1.375	Amidohidrolasa
CAJ67724	2.293	1.351	Agmatinasa
CAJ70023	2.239	1.310	Familia 1 glicosilhidrolasa
CAJ67122	2.150	1.245	Proteína de unión al sustrato del transportador ABC del azúcar
CAJ67874	2.230	1.303	UDP-N-acetilglucosamina 2-epimerasa (no hidrolizante)
CAJ69163	2.060	1.183	Galactitol-1-fosfato 5-deshidrogenasa
CAJ70075	2.324	1.375	Dihidropirimidinasa
CAJ68465	2.316	1.369	Hidroxietiltiazol quinasa
CAJ68917	2.185	1.270	Acetilglutamato quinasa
CAJ69331	1.991	1.139	Proteína sensorial rica en triptófano
CAJ68836	2.289	1.347	Proteína de unión a ATP del transportador ABC
CAJ67634	2.112	1.218	3-Hidroxibutiril-CoA deshidratasa (crotonasa)
AKP41956	2.363	1.407	Aldo/ceto reductasa
CAJ66957	2.230	1.303	PTS subunidad transportadora de celobiosa IIC
CAJ67295	1.612	0.929	Hidrolasa de la familia HAD-IIB tipo Cof
CAJ69034	2.150	1.245	Endonucleasa
CAJ68707	2.199	1.280	Proteína P bifuncional, corismato mutasa/prefenato deshidratasa
CAJ69082	2.221	1.296	Transportador MFS
CAJ70262	1.773	1.011	Sistema de transporte tipo ABC, permeasa de la familia de múltiples fármacos
CD630_19901	1.612	0.929	Fragmento de regulador transcripcional, represor de betalactámicos
CAJ68473	-1.565	1.392	Sistema de transporte tipo ABC, permeasa de la familia de múltiples fármacos

CAJ68823	-1.565	1.392	Proteína de la familia de permeasas similar a FtsX
CAJ67449	1.991	1.139	Metaloproteasa intramembrana de la familia CPBP
CAJ70433	2.112	1.218	ABC-type transport system, iron-family permease
CAJ69879	2.150	1.245	ABC-type transport system, ATP-binding protein
CAJ69099	2.060	1.183	Regulador transcripcional, tipo HTH
CAJ69702	2.299	1.355	Regulador transcripcional de la familia GntR
CAJ68568	2.230	1.303	ADN helicasa RecQ
CAJ69975	2.060	1.183	Antiterminador de transcripción
CAJ66942	2.060	1.183	Proteína de unión a caja TATA de la familia YwmB
CAJ67526	2.289	1.347	Regulador transcripcional de la familia MerR
CAJ70547	2.246	1.315	Regulador transcripcional de la familia LysR
CAJ67872	2.337	1.386	Ancla de la pared celular
CAJ69751	2.230	1.303	Regulador transcripcional que interactúa con sigma 54
CAJ70255	2.210	1.288	Regulador transcripcional hélice-vuelta-hélice
CAJ70253	1.947	1.111	Proteína de unión a ARNt
CAJ70291	1.773	1.011	Proteína de división celular FtsK
CAJ68471	-1.565	1.392	Regulador transcripcional de la familia GntR
CAJ67854	2.185	1.270	Factor de transcripción regulador de respuesta
CAJ68835	1.991	1.139	Histidina quinasa que contiene dominio HAMP
CAJ69204	-1.676	1.475	Histidina quinasa sensora de dos componentes
CAJ69682	2.397	1.434	Proteína de unión a la pared celular cwp12
CBE04026	2.185	1.270	Proteína de fago
CAJ70280	1.612	0.929	Proteína transposón conjugativa putativa similar a Tn916, CTn7-Orf13
CAJ68721	-1.690	1.486	Proteína de transferencia conjugativa putativa similar a Tn1549, CTn5-Orf5
CAJ67195	-1.565	1.392	Proteína de membrana putativa similar a Tn916, CTn1-Orf18
CD630_22670	2.210	1.288	Fragmento de proteína de membrana, proteína de tipo infección abortiva
CAJ69640	2.289	1.347	Proteína hipotética conservada
CAJ68390	2.341	1.388	Proteína que contiene el dominio DUF362
CAJ68940	1.612	0.929	Proteína hipotética conservada
CAJ68769	2.060	1.183	Proteína hipotética
CAJ70006	1.882	1.072	Proteína hipotética
CCA62852	1.612	0.929	Proteína hipotética
CAJ70220	1.882	1.072	Proteína que contiene el dominio DUF1062
CAJ70061	2.131	1.231	Proteína no caracterizada
CAJ68153	-1.565	1.392	Proteína que contiene el dominio DUF2953
CAJ67909	-1.530	1.366	Proteína no caracterizada
CAJ68205	2.343	1.390	Proteína de repetición de cadena beta de la familia DUF4097
CAJ70010	1.612	0.929	Proteína que contiene el dominio DUF3139
CBE03999	-1.998	1.756	Proteína de fago
CBE03994	-1.620	1.432	Proteína hipotética

CAJ68328	2.199	1.280	Proteína hipotética
CAJ68098	-1.836	1.607	Proteína hipotética
CAJ68289	2.168	1.258	Proteína hipotética conservada
CAJ68775	-1.565	1.392	Proteína hipotética
CAJ67453	2.060	1.183	Proteína que contiene el dominio DUF1659
CAJ67201	-1.676	1.475	Proteína que contiene el dominio DUF3789
CAJ68462	2.210	1.288	Proteína hipotética conservada
CAJ68217	2.185	1.270	Proteína hipotética
CCA62905	1.991	1.139	Proteína hipotética
CAJ68376	2.293	1.351	Proteína que contiene el dominio DUF2935
CAJ67988	2.278	1.339	Proteína hipotética
CAJ70090	2.035	1.167	Proteína hipotética
CAJ68252	1.947	1.111	Proteína de la familia DUF819
CBE02514	2.230	1.303	Proteína hipotética
CAJ70467	2.255	1.321	Proteína hipotética conservada
CAJ68784	2.112	1.218	Proteína que contiene el dominio BMC
CD630_03480	2.351	1.397	Fragmento de proteína hipotética conservada
CAJ70414	2.035	1.167	Proteína de membrana
CAJ68801	2.060	1.183	Proteína que contiene el dominio DUF861
CAJ69276	-1.690	1.486	Proteína de membrana putativa
CAJ68816	2.210	1.288	Proteína no caracterizada
CAJ67456	2.210	1.288	Proteína hipotética
CAJ69259	-1.642	1.449	Proteína hipotética
CD630_22980	2.092	1.205	Fragmento de proteína hipotética conservada (región central)
CAJ68798	2.131	1.231	Proteína de microcompartimento de la familia EutN/CcmL
CAJ68470	2.060	1.183	Proteína que contiene un dominio similar a GyrI
CAJ67693	-1.620	1.432	Proteína hipotética
AKP42369	2.150	1.245	Proteína hipotética

Anexo. Tabla 12. Genes únicos de las células planctónicas del ribotipo 027 asociadas a ICD-R.

ID	FClog	AVE.Expr	Nombre
CAJ67616	3.226	0.238	Proteína de esporulación putativa YunB
CAJ68046	2.059	1.113	Proteína AA de esporulación en etapa III
CAJ67607	-2.039	1.100	Proteína de esporulación de etapa V AC
CAJ69029	-1.953	1.049	Proteína de membrana de esporulación YtaF
CBE06733	4.133	0.427	Familia de proteínas cas5 asociadas a CRISPR
AKP44018	1.616	1.084	Alcohol deshidrogenasa
CAJ67627	-2.039	1.100	Exportador de sulfito proteína de la familia TauE/SafE
CAJ68989	5.393	0.990	Permeasa transportadora ABC

CAJ68959	-1.917	1.029	Subunidad de unión a FAD de la xantina deshidrogenasa deshidrogenasa
CAJ69488	-1.917	1.029	Proteína de la familia de polisacáridos desacetilasas
CAJ68429	-2.197	1.203	Reductoisomerasa de cetol-ácido
AKP42929	-1.679	0.905	Epimerasa
CAJ67498	-1.917	1.029	Subunidad de permeasa del transportador ABC
CAJ67320	-2.077	1.124	Sistema PTS, componente manosa/fructosa/sorbosa IIA
CAJ67165	-2.011	1.084	Proteína de grupo de cisteína de la familia YkgJ
CAJ70347	-1.679	0.905	Subunidad transportadora de azúcar PTS IIB
CBE05146	5.361	0.969	Lipoproteína
CBE07587	5.526	1.083	Permeasa transportadora ABC
CBE06672	5.151	0.841	Regulador transcripcional
CAJ67917	-1.699	1.714	Regulador transcripcional, familia GntR
CAJ69969	-1.679	0.905	Regulador transcripcional de la familia MurR/RpiR
CBE07571	5.151	0.841	Proteína transposón conjugativa
CBE04041	5.361	0.969	Proteína de unión a penicilina
CAJ67964	4.626	0.591	Proteína transposón conjugativa putativa similar a Tn1549, CTn4-Orf5
CBE06247	4.133	0.427	Transposasa
CAJ68526	4.908	0.714	Proteína A similar a la transposasa
CBE03996	5.453	1.031	Proteína de fago
CBE03992	5.581	1.124	Proteína de la cápside principal del fago
CBE03985	2.063	1.381	Subunidad grande de la terminación del fago
CAJ68862	4.626	0.591	Proteína de unión a la pared celular Cwp28
CAJ67779	5.869	1.368	Proteína hipotética
CCA62789	5.393	0.990	Proteína hipotética
CBE06713	5.514	1.074	Proteína hipotética
CAJ70552	1.616	1.084	Proteína que contiene el dominio DUF871
CAJ67791	1.523	1.532	Proteína hipotética
AKP44126	1.979	1.318	Proteína hipotética
CBE06754	4.133	0.427	Proteína hipotética
CBE04537	5.151	0.841	Proteína hipotética
CBE03969	5.434	1.018	Proteína hipotética
CAJ68593	5.043	0.782	Proteína hipotética
CAJ67765	3.226	0.238	Proteína hipotética
CAJ68799	-2.077	1.124	Proteína que contiene el dominio BMC
CAJ69078	-2.116	1.149	Proteína ROK putativa
CAJ67103	-2.215	1.215	Proteína hipotética
CAJ70520	-1.817	0.974	Proteína hipotética
CCA62837	-2.146	1.169	Proteína hipotética
CAJ68021	-2.116	1.149	Proteína de membrana
CAJ67869	5.333	0.950	Proteína que contiene el dominio GGDEF
CCA62859	4.133	0.427	Proteína hipotética

ANEXO V

Anexo. Tabla 13. Genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días de cepas asociadas a ICD-NR ribotipo 001.

ID	LogFC	AVE. EXPR	Nombre
CAJ67429	2.81696721	1.84196448	CotF proteína de ensamblaje de péptido de cubierta de esporas
CAJ70146	1.72103433	2.22242054	Pequeña proteína beta de esporas soluble en ácido
CAJ68046	2.51690669	1.53906177	Proteína AA de esporulación en etapa III
CAJ67616	2.29765932	1.35434752	Proteína de esporulación putativa YunB
CAJ69357	2.54666785	1.56636948	Endopeptidasa de esporas
CAJ68046	2.38234773	1.42239019	Proteína AA de esporulación en etapa III
CAJ67608	2.54666785	1.56636948	Proteína de esporulación en etapa V AD
CAJ70248	2.90860874	1.94775194	Glicoproteína de exosporio similar al colágeno BclA3
CAJ67034	1.99060233	1.13858805	Proteína de la cubierta de esporas
CAJ69879	2.19165048	1.27461563	ABC transporter ATP-binding protein
CAJ68788	2.24921132	1.31718097	Etanolamina amoníaco-liasa factor de reactivación EutA
CAJ68270	1.7243025	0.98526058	Proteína de la familia de aminotransferasa dependiente de PLP
CAJ69163	2.29765932	1.35434752	Galactitol-1-fosfato 5-deshidrogenasa
CAJ70075	2.56523364	1.58369228	Dihidropirimidinasa
CAJ68917	2.39683589	1.43443605	Acetilglutamato quinasa
CAJ68465	2.05981204	1.18329145	Hidroxietiltiazol quinasa
CAJ69724	2.55982848	1.57862597	Amidohidrolasa
CAJ69372	2.46193287	1.49007757	Proteína de la familia aminopeptidasa P
CAJ67486	-1.64100686	1.59483839	Permeasa transportadora ABC-2
CAJ69056	-1.69676271	1.64242335	Aminoácido transportador ABC proteína de unión a ATP
CAJ67597	2.11174062	1.21826944	Proteína activadora del operón sorbitol (Glucitol)
CAJ68368	1.7243025	0.98526058	Sistema de transporte tipo ABC, proteína de unión a ATP de la familia de múltiples fármacos
CAJ69214	2.42151844	1.45523846	PTS subunidad transportadora de azúcar IIA
CAJ69950	2.11174062	1.21826944	Sistema PTS, componente IIA alfa-glucósido específico
CAJ69062	-1.55115829	1.52192322	Proteína de unión a 4Fe-4S
CAJ69766	-1.77716315	1.71436169	Proteína de unión al sustrato del transportador ABC
CAJ67317	2.29765932	1.35434752	Transportador SMR de salida de compuestos de amonio cuaternario SugE
CAJ70148	2.44265837	1.4733403	Deshidrogenasa putativa
CAJ69161	1.99060233	1.13858805	Proteína de la familia de la aldolasa/aducina de clase II
CAJ68779	2.81059748	1.83485827	Sistema de transporte tipo ABC, permeasa
CAJ69939	2.51690669	1.53906177	Ácido N-acetilmurámico 6-fosfato eterasa
CAJ69305	2.24921132	1.31718097	Amida C-N hidrolasa lineal
CAJ67634	2.46193287	1.49007757	3-hidroxi-butiril-CoA deshidratasa (crotonasa)

AKP41956	2.27627181	1.33778626	Aldo/ceto reductasa
CAJ70095	2.53288078	1.55364893	Transportador Cme de MFS de salida de múltiples fármacos
CAJ67851	-1.72781602	1.66973416	N-acetilglucosamina-6-fosfato desacetilasa
CAJ68395	-1.57432943	1.54029506	Histidina quinasa sensora de dos componentes
CAJ68522	1.52909813	2.01000573	Subunidad de glicina deshidrogenasa de transferencia de aminometilo GcvPA
CAJ67600	1.99060233	1.13858805	PTS subunidad transportadora de glucitol/sorbitol IIB
CAJ66954	1.99060233	1.13858805	Antiterminador de transcripción, regulador de operón PTS
CAJ68976	2.31685297	1.36942046	Permeasa de purina
CAJ69164	2.24921132	1.31718097	PTS subunidad transportadora de galactitol IIC
CAJ69372	2.41038888	1.44581441	Proteína de la familia aminopeptidasa P
CAJ69478	-1.67986063	1.6278035	Guanilato quinasa
CD630_19440	-1.65204569	1.60411407	Proteína de dominio similar a la glioxalasa
CAJ69918	-1.53694993	1.51080283	Epoxiqueuosina reductasa
CAJ68569	2.24921132	1.31718097	Fosfometilpirimidina sintasa ThiC
CD630_01800	1.7243025	0.98526058	Proteína de la familia M56 de la peptidasa blaR1
CAJ69365	2.11174062	1.21826944	MBL plegar metalo-hidrolasa
CAJ69973	2.33460366	1.38353984	PTS subunidad transportadora de azúcar IIC
CAJ69743	2.54666785	1.56636948	Oxidorreductasa de unión a NAD (P) putativa
CAJ68915	2.29765932	1.35434752	Ornitina carbamoiltransferasa
CAJ69198	2.29765932	1.35434752	Molibdato transportador ABC proteína de unión al sustrato
CAJ69199	2.49055307	1.51534651	Permeasa transportadora ABC
CAJ70424	1.7243025	0.98526058	Transportador de cationes
CAJ68251	2.29765932	1.35434752	Dipéptido epimerasa
CAJ67003	-1.57432943	1.54029506	Peptidasa M56
CAJ68748	2.31685297	1.36942046	Permeasa transportadora ABC
CAJ68916	2.19165048	1.27461563	Proteína de la familia de la aspartato aminotransferasa
CAJ70441	2.15238789	1.24654068	Proteína putativa del metabolismo del fosfonato
CAJ68837	2.19165048	1.27461563	Sistema de transporte tipo ABC, permeasa
CAJ69736	2.11174062	1.21826944	Proteína de la familia de la aldolasa/aducina de clase II
CAJ68795	2.29765932	1.35434752	Etanolamina corrinoide cobalamina adenosiltransferasa
CAJ70262	2.11174062	1.21826944	Sistema de transporte tipo ABC, permeasa de la familia de múltiples fármacos
CAJ68513	-1.5934504	1.55567942	Captación de quelatos de hierro subunidad de la permeasa de la familia de transportadores ABC
CAJ67842	1.7243025	0.98526058	Proteína de unión a ATP del transportador ABC
CAJ68295	2.36711898	1.40985832	Supuesta delta-lactama-biosintética de-N-acteylase
CAJ69908	2.33460366	1.38353984	PTS subunidad transportadora de fructosa IIB
CAJ68841	2.42151844	1.45523846	Acil-CoA tioesterasa putativa
CAJ67148	-1.95504652	1.88851502	Sistema de transporte tipo ABC, permeasa específica de cobalto
CAJ68790	2.57097175	1.58909147	Subunidad pequeña de etanolamina amoníaco liasa
CAJ68466	2.29765932	1.35434752	Tiamina fosfato sintasa

CAJ67926	-1.65204569	1.60411407	Molibdopterina-guanina dinucleótido biosíntesis proteína B
CAJ67694	2.24921132	1.31718097	Sistema PTS, componente IIB de la lactosa/celobiosa-familia
CAJ69258	2.72650641	1.7439272	Supuesta proteína de inanición de carbono similar a CstA
CAJ70430	2.19165048	1.27461563	Subunidad putativa de la permeasa del transportador ABC del 2-aminoetilfosfonato
CAJ69439	2.49983345	1.52364843	Isomerasa de fosfoazúcar putativa
CAJ68207	2.19165048	1.27461563	Sistema de transporte tipo ABC, lantibiótico/proteína de unión a ATP de la familia de múltiples fármacos
CAJ69455	1.7243025	0.98526058	PTS subunidad transportadora de azúcar IIA
CAJ67449	2.29765932	1.35434752	Metaloproteasa intramembrana de la familia CPBP
CAJ70016	2.29765932	1.35434752	Proteína de dominio de unión 4fe-4s
CAJ68279	2.38234773	1.42239019	Transportador familiar EamA
CAJ68788	2.44265837	1.4733403	Etanolamina amoníaco-liasa factor de reactivación EutA
CAJ67598	2.19165048	1.27461563	PTS subunidad transportadora de sorbitol IIC
CAJ70004	2.55982848	1.57862597	Amidohidrolasa
CAJ67724	2.27627181	1.33778626	Agmatinasa
CAJ68614	1.54837036	2.03008067	Simportador de sodio/glutamato
CAJ67874	2.29765932	1.35434752	UDP-N-acetilglucosamina 2-epimerasa (no hidrolizante)
CAJ67598	2.36711898	1.40985832	PTS subunidad transportadora de sorbitol IIC
CAJ67823	-1.73883159	1.67956427	Decaprenil-fosfato fosforribosiltransferasa
CAJ67122	2.29765932	1.35434752	Proteína de unión al sustrato del transportador ABC del azúcar
CAJ67295	1.89229587	1.07866632	Hidrolasa de la familia HAD-IIB tipo Cof
CBE01879	-1.81474371	1.74938677	Proteína de la familia de la glicosil transferasa del grupo 2
CD630_19270	1.57313876	2.05627765	Proteína que contiene el dominio del casete de unión a ATP
CAJ70023	2.33460366	1.38353984	Familia 1 glicosilhidrolasa
CAJ70331	-1.62845756	1.58437935	Cobalto-precorrina-7 (C(5))-metiltransferasa
CAJ68270	2.11174062	1.21826944	Proteína de la familia de aminotransferasa dependiente de PLP
CAJ68056	-1.60425448	1.56446275	O-sialoglicoproteína endopeptidasa
CAJ66955	2.36711898	1.40985832	PTS subunidad transportadora de lactosa/celobiosa IIA
CAJ69331	2.49055307	1.51534651	Proteína sensorial rica en triptófano
CAJ68836	2.31685297	1.36942046	Proteína de unión a ATP del transportador ABC
CAJ66955	2.36711898	1.40985832	PTS subunidad transportadora de lactosa/celobiosa IIA
CAJ70129	-1.7438341	1.68405326	Hipoxantina fosforribosiltransferasa
CAJ66957	2.31685297	1.36942046	PTS subunidad transportadora de celobiosa IIC
CAJ68910	-1.75639738	1.69539578	Permeasa transportadora ABC-2
CAJ70433	2.11174062	1.21826944	Subunidad putativa de la permeasa del transportador ABC del 2-aminoetilfosfonato
CAJ67295	2.36711898	1.40985832	Hidrolasa de la familia HAD-IIB tipo Cof
CAJ68037	-1.83082165	1.76465234	Proteína transportadora de acilo
CAJ68424	-1.62845756	1.58437935	Factor anti-sigma-V rsiV

CAJ67395	-1.62077053	1.57801748	Endodesoxirribonucleasa de unión cruzada de la familia RusA
CAJ69702	2.24921132	1.31718097	Regulador transcripcional de la familia GntR
CD630_19901	2.19165048	1.27461563	Fragmento de regulador transcripcional, represor de betalactámicos
CAJ67526	2.24921132	1.31718097	Regulador transcripcional de la familia MerR
CAJ70547	2.35109543	1.39681443	Regulador transcripcional de la familia LysR
CAJ68568	2.36711898	1.40985832	ADN helicasa RecQ
CAJ68129	-1.62845756	1.58437935	Procesamiento de ADN putativo Smf Proteína de unión de cadena sencilla
CAJ70253	2.15238789	1.24654068	Proteína de unión a ARNt
CAJ69034	2.29765932	1.35434752	Endonucleasa
CAJ70291	1.99060233	1.13858805	Proteína de división celular FtsK
CBE06733	2.33460366	1.38353984	Familia de proteínas cas5 asociadas a CRISPR
CAJ70255	2.24921132	1.31718097	Regulador transcripcional hélice-vuelta-hélice
CAJ69099	2.29765932	1.35434752	Regulador transcripcional, tipo HTH
CAJ69554	-1.61162026	1.57048868	Antiterminador de transcripción, familia licT
CAJ69975	2.39683589	1.43443605	Antiterminador de transcripción
CAJ69412	-1.72781602	1.66973416	Regulador de recombinación RecX
CAJ70278	1.99060233	1.13858805	Regulador transcripcional hélice-giro-hélice alado
CAJ68834	2.11174062	1.21826944	Factor de transcripción regulador de respuesta
CAJ67879	-1.61162026	1.57048868	Helicasa dependiente de ATP
CAJ66942	1.7243025	0.98526058	Proteína de unión a caja TATA de la familia YwmB
CAJ67854	2.38234773	1.42239019	Factor de transcripción regulador de respuesta
CD630_18120	-1.67986063	1.6278035	Regulador transcripcional de la familia LytTR
CAJ67503	-1.57432943	1.54029506	Regulador transcripcional
CAJ68781	2.51690669	1.53906177	Proteína de la familia de las recombinasas
CAJ69751	2.22277469	1.29742051	Regulador transcripcional que interactúa con sigma 54
CAJ69339	-1.63471566	1.58958371	Proteína asociada a CRISPR Cas5
CAJ70255	1.7243025	0.98526058	Regulador transcripcional hélice-vuelta-hélice
CAJ70589	-1.7438341	1.68405326	Componente de proteína ribonucleasa P (proteína RNasaP) (proteína RNasa P) (Proteína C5)
CAJ70009	1.7243025	0.98526058	Antiterminador de transcripción, regulador de operón PTS, bglG2
CAJ69715	-1.63471566	1.58958371	Regulador transcripcional hélice-giro-hélice alado
CAJ69501	-1.61162026	1.57048868	Regulador transcripcional, familia TetR
CAJ68568	2.45185414	1.48129768	ADN helicasa RecQ
CAJ69479	-1.74121988	1.68170546	Proteína no caracterizada
CAJ68462	2.11174062	1.21826944	Proteína hipotética conservada
CAJ68217	1.99060233	1.13858805	Proteína hipotética
CAJ67860	1.99060233	1.13858805	Proteína hipotética conservada
CAJ68769	2.24921132	1.31718097	Proteína hipotética
CAJ68021	2.27627181	1.33778626	Proteína de membrana
CAJ70006	2.35109543	1.39681443	Proteína hipotética
CAJ67404	1.99060233	1.13858805	Proteína hipotética

CAJ70049	-1.57432943	1.54029506	Proteína hipotética
CAJ69259	-1.57432943	1.54029506	Proteína hipotética
AKP43815	-1.8657768	1.79843416	Proteína hipotética
CAJ68784	2.19165048	1.27461563	Proteína que contiene el dominio BMC
CCA62789	2.15238789	1.24654068	Proteína hipotética
CAJ68478	1.75019277	2.25723481	Proteína hipotética
CAJ70010	1.7243025	0.98526058	Proteína que contiene el dominio DUF3139
CAJ68931	-1.55115829	1.52192322	Proteína hipotética conservada
CAJ69990	1.7243025	0.98526058	Proteína que contiene el dominio PRD
CAJ67988	2.35109543	1.39681443	Proteína hipotética
CAJ70090	2.31685297	1.36942046	Proteína hipotética
CBE03978	2.24921132	1.31718097	Proteína hipotética
CAJ67456	2.31685297	1.36942046	Proteína hipotética
CAJ68328	2.54666785	1.56636948	Proteína hipotética
CAJ68252	1.7243025	0.98526058	Proteína de la familia DUF819
CAJ70414	2.11174062	1.21826944	Proteína de membrana
AKP42369	2.22277469	1.29742051	Proteína hipotética
CCA62881	1.99060233	1.13858805	Proteína de membrana putativa
CCA62905	2.15238789	1.24654068	Proteína hipotética
CAJ68376	2.78476317	1.80635648	Proteína que contiene el dominio DUF2935
CAJ68801	2.49055307	1.51534651	Proteína que contiene el dominio DUF861
CAJ68784	2.33460366	1.38353984	Proteína que contiene el dominio BMC
CAJ68816	2.24921132	1.31718097	Proteína no caracterizada
AKP41179	1.89229587	1.07866632	Proteína hipotética
CCA62852	2.46193287	1.49007757	Proteína hipotética
CAJ70220	2.24921132	1.31718097	Proteína que contiene el dominio DUF1062
CAJ69883	-1.8175853	1.75207242	Proteína de membrana
AKP41245	1.7243025	0.98526058	Proteína hipotética
CAJ68940	2.52512997	1.5465509	Proteína hipotética conservada
CAJ69640	2.75166215	1.77057571	Proteína hipotética conservada
CAJ68205	1.99060233	1.13858805	Proteína de repetición de cadena beta de la familia DUF4097
CAJ70061	1.99060233	1.13858805	Proteína no caracterizada
CAJ69879	2.19165048	1.27461563	ABC transporter ATP-binding protein
CAJ68289	2.31685297	1.36942046	Proteína hipotética conservada
CAJ69045	-1.60425448	1.56446275	Proteína hipotética
CAJ67902	-1.5934504	1.55567942	Proteína hipotética conservada
CAJ68252	1.7243025	0.98526058	Proteína de la familia DUF819
CBE02514	2.36711898	1.40985832	Proteína hipotética
CAJ70467	1.7243025	0.98526058	Proteína hipotética conservada
CAJ69572	1.89229587	1.07866632	Proteína de membrana putativa
CAJ68799	2.19165048	1.27461563	Proteína que contiene el dominio BMC

CD630_22670	1.99060233	1.13858805	Fragmento de proteína de membrana, proteína de tipo infección abortiva
CAJ68799	2.19165048	1.27461563	Proteína que contiene el dominio BMC
CAJ69269	-1.57432943	1.54029506	Proteína de señalización de diguanilato ciclasa putativa
CAJ68152	-1.55115829	1.52192322	Subunidad del complejo SMC-Scp ScpB
CAJ68656	2.29765932	1.35434752	Proteína que contiene el dominio N-terminal de BtrH
CAJ68547	-1.55115829	1.52192322	Proteína de unión a FMN
CAJ66848	2.57097175	1.58909147	Transportador MFS
CAJ68719	2.11174062	1.21826944	Proteína de transferencia conyugal
CAJ68080	-1.5934504	1.55567942	Endolytic transglycosylase MltG
CAJ68835	2.11174062	1.21826944	Histidina quinasa que contiene dominio HAMP
CAJ68798	2.36711898	1.40985832	Proteína de microcompartimento de la familia EutN/CcmL
CAJ68470	2.29765932	1.35434752	Proteína que contiene un dominio similar a GyrI
CAJ67872	2.22277469	1.29742051	Ancla de la pared celular
CAJ69082	2.36711898	1.40985832	Transportador MFS
CBE04026	2.19165048	1.27461563	Proteína de fago
CAJ67080	-1.73619192	1.67720183	Proteína de la familia FliL asociada al cuerpo basal flagelar
CAJ67054	-1.76857291	1.70648288	Proteína de ensamblaje flagelar FliW
CAJ70280	1.99060233	1.13858805	Proteína transposón conjugativa putativa similar a Tn916, CTn7-Orf13
CCA62901	-1.67986063	1.6278035	Proteína transposón conjugativa putativa similar a Tn916, CTn7-Orf6

Anexo. Tabla 14. Genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días de cepas asociadas a ICD-R ribotipo 001.

ID	LogFC	AVE. EXPR	Nombre
CAJ69833	1.51548618	1.35666916	Resolvasa
AKP44061	-1.83727066	1.16425644	Péptido antimicrobiano ABC transportador ATPasa
CD630_19440	-1.84325465	1.61304184	Proteína de dominio similar a la glioxalasa
CAJ68749	1.78938565	1.56680788	Proteína de unión a ATP del transportador ABC
CAJ70098	1.54453205	1.37711008	Proteína de unión a ATP del transportador ABC
CAJ68823	1.6085094	1.42361211	Proteína de la familia de permeasas similar a FtsX
CAJ67026	1.70691773	1.49928977	Subunidad transportadora PTS EIIA
CAJ68820	-2.86621369	1.15488885	Glioxalasa
CAJ68879	1.83083985	1.60223304	Serina proteasa intracelular
CAJ67909	2.2366283	2.00846622	Proteína no caracterizada
CAJ67106	1.96841901	1.72737206	Sistema PTS, componente manosa/fructosa/sorbosa IIA
CAJ69911	1.92901678	1.69030511	Proteína captadora de glucosa
CAJ67274	2.26812567	2.045038	Enzima dependiente de PLP de la familia alanina/ornitina racemasa

CAJ66857	1.98632139	1.7445508	Sistema PTS, componente IIC específico de galactitol
CAJ67107	1.52360362	1.3623404	Subunidad transportadora de azúcar PTS IIB
CAJ69989	1.6644737	1.46601559	Subunidad transportadora PTS EIIC
AKP41296	1.71090461	1.50246588	N-acetilmuramoil-l-alanina amidasa
CAJ70252	1.56365536	1.39079446	Proteína de la familia de aminotransferasa dependiente de PLP
CAJ69942	1.72637817	1.51487626	Subunidad transportadora de azúcar PTS IIB
CAJ69302	2.09007995	1.84842487	PTS subunidad transportadora de glucitol/sorbitol IIB
CAJ69083	1.63788698	1.44566599	Subunidad VorB de 3-metil-2-oxobutanoato deshidrogenasa
CAJ67269	1.50599746	1.3500802	Subunidad alfa de 2-amino-4-cetopentanoato tiolasa
CAJ68469	1.6252884	1.43615316	Proteína de unión a ATP del transportador ABC
CAJ67663	1.61447578	1.42805483	MBL plegar metalo-hidrolasa
CAJ69198	1.64134421	1.44829101	Molibdato transportador ABC proteína de unión al sustrato
CAJ69724	1.82141826	1.5940921	Amidohidrolasa
CBE04714	1.80203141	1.57750677	Peptidasa
CAJ69202	1.88784959	1.65264412	Desacetilasa de la familia PIG-L
CAJ68456	1.88784959	1.65264412	Cadena ATPasa A translocadora de potasio
CAJ68453	1.82141826	1.5940921	Permeasa transportadora ABC
CAJ66955	1.82649595	1.59847299	PTS subunidad transportadora de lactosa/celobiosa IIA
CAJ68960	1.89559021	1.65964367	Permeasa de xantina
CAJ70154	1.85680327	1.62494442	Proteína de la familia de polisacáridos desacetilasas
CAJ70176	1.92581094	1.68733357	Subunidad transportadora de azúcar PTS IIB
CAJ67607	1.84841927	1.61756583	Proteína de esporulación de etapa V AC
CAJ66946	2.0036097	1.76134385	Regulador transcripcional de esporulación SpoIIID
CAJ67428	2.14460518	1.90607988	Proteína asociada a la cubierta de esporas CotJA
CAJ67428	2.10306493	1.86195818	Proteína asociada a la cubierta de esporas CotJA
CAJ69284	1.97599313	1.73461402	Proteína asociada a la cubierta de esporas CotJA
CAJ68046	1.95967765	1.71906117	Proteína AA de esporulación en etapa III
CAJ69069	1.80655268	1.58135479	Proteína hipotética conservada
CCA62895	2.01597483	1.7734788	Proteína hipotética
CAJ70208	-3.18849083	1.40909674	Proteína que contiene el dominio DUF3783
AKP41243	-1.90648037	1.20895984	Proteína hipotética
CBE03994	1.72012537	1.50984525	Proteína hipotética
CAJ69177	-1.83727066	1.16425644	Proteína hipotética
CAJ68931	-1.52539011	1.81870117	Proteína hipotética conservada
CD630_21820	-1.83727066	1.16425644	Proteína hipotética
CAJ70266	-1.53047628	1.36716699	Proteína hipotética
CAJ68098	1.67745095	1.47608546	Proteína hipotética
AKP41282	-2.26518563	1.47835845	Proteína hipotética
CAJ67693	1.86809374	1.63494893	Proteína hipotética
CAJ68907	-1.90648037	1.20895984	Proteína hipotética

CAJ69823	-1.93820933	1.23018199	Proteína hipotética
CAJ69259	1.65512582	1.45881789	Proteína hipotética
CAJ68041	1.85680327	1.62494442	Proteína que contiene el dominio TSCPD de la familia TIGR03905
CAJ67425	1.64641856	1.45215528	Proteína que contiene el dominio DUF3788
CAJ69276	1.5812275	1.40352977	Proteína de membrana putativa
CAJ70208	-1.70159681	1.68211829	Proteína que contiene el dominio DUF3783
CAJ69099	1.53047628	1.36716699	Regulador transcripcional, tipo HTH
CAJ70026	1.81585212	1.58930747	Antiterminador de transcripción
CBE04551	-1.90648037	1.20895984	ARN polimerasa, subunidad sigma-24, subfamilia ecf (subfamilia ecf ARN polimerasa factor sigma-70)
CAJ69882	1.76331871	1.54504777	Factor de transcripción regulador de respuesta
CAJ69454	1.65985668	1.46245474	Antiterminador de transcripción
CAJ68827	1.68825311	1.4845369	Regulador transcripcional de la familia LysR
CAJ69969	1.51548618	1.35666916	Regulador transcripcional de la familia MurR/RpiR
CD630_19020	1.69526286	1.49005517	Fragmento de proteína de transposón conjugativo putativo (región central)
CAJ67964	-1.83727066	1.16425644	Proteína transposón conjugativa putativa similar a Tn1549, CTn4-Orf5
CAJ70277	-2.3290702	0.8391725	Proteína de la familia MgtC/SapB
CAJ68152	-2.23918044	1.45649686	Subunidad del complejo SMC-Scp ScpB
CAJ68721	1.56940409	1.39494376	Proteína de transferencia conjugativa putativa similar a Tn1549, CTn5-Orf5
CBE03999	1.9509911	1.71085213	Proteína de fago
CAJ68804	1.76112052	1.54323067	Proteína de la familia OmpA
CAJ69204	1.52360362	1.3623404	Histidina quinasa sensora de dos componentes
CAJ70037	-1.72836778	1.09811621	Adhesina de unión a colágeno CbpA

Anexo. Tabla 15. Genes únicos diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días de cepas asociadas a ICD-R ribotipo 001.

ID	LogFC	AVE. Expr	Nombre
CAJ69284	1.97599313	1.73461402	Proteína asociada a la cubierta de esporas CotJA
CAJ66946	2.0036097	1.76134385	Regulador transcripcional de esporulación SpoIIID
CAJ67607	1.84841927	1.61756583	Proteína de esporulación de etapa V AC
CAJ67428	2.14460518	1.90607988	Proteína asociada a la cubierta de esporas CotJA
CAJ68749	1.78938565	1.56680788	Proteína de unión a ATP del transportador ABC
CAJ70098	1.54453205	1.37711008	Proteína de unión a ATP del transportador ABC
CAJ68823	1.6085094	1.42361211	Proteína de la familia de permeasas similar a FtsX
CAJ67026	1.70691773	1.49928977	Subunidad transportadora PTS EIIA
CAJ68820	-2.86621369	1.15488885	Glioxalasa
CAJ67107	1.52360362	1.3623404	Subunidad transportadora de azúcar PTS IIB
CAJ67106	1.96841901	1.72737206	PTS subunidad transportadora de azúcar IIA
CAJ69911	1.92901678	1.69030511	proteína captadora de glucosa

CAJ67274	2.26812567	2.045038	Enzima dependiente de PLP de la familia alanina/ornitina racemasa
CAJ66857	1.98632139	1.7445508	Sistema PTS, componente IIC específico de galactitol
CAJ69989	1.6644737	1.46601559	Subunidad transportadora PTS EIIC
AKP41296	1.71090461	1.50246588	N-acetilmuramoil-l-alanina amidasa
CAJ70252	1.56365536	1.39079446	Proteína de la familia de aminotransferasa dependiente de PLP
CAJ69942	1.72637817	1.51487626	Subunidad transportadora de azúcar PTS IIB
CAJ70252	1.56365536	1.39079446	Proteína de la familia de aminotransferasa dependiente de PLP
CAJ69942	1.72637817	1.51487626	Subunidad transportadora de azúcar PTS IIB
CAJ69302	2.09007995	1.84842487	PTS subunidad transportadora de glucitol/sorbitol IIB
CAJ69083	1.63788698	1.44566599	Subunidad VorB de 3-metil-2-oxobutanoato deshidrogenasa
CAJ67269	1.50599746	1.3500802	Subunidad alfa de 2-amino-4-cetopentanoato tiolasa
CAJ70037	-1.72836778	1.09811621	Adhesina de unión a colágeno CbpA
CAJ68469	1.6252884	1.43615316	Proteína de unión a ATP del transportador ABC
CAJ67663	1.61447578	1.42805483	MBL plegar metalo-hidrolasa
CAJ70176	1.92581094	1.68733357	Subunidad transportadora de azúcar PTS IIB
AKP44061	-1.83727066	1.16425644	Péptido antimicrobiano ABC transportador ATPasa
CAJ70154	1.85680327	1.62494442	Proteína de la familia de polisacáridos desacetilasas
CAJ68456	1.88784959	1.65264412	Cadena ATPasa A translocadora de potasio
CAJ68453	1.82141826	1.5940921	Permeasa transportadora ABC
CAJ69202	1.88784959	1.65264412	Desacetilasa de la familia PIG-L
CAJ68960	1.89559021	1.65964367	Permeasa de xantina
CBE04714	1.80203141	1.57750677	Peptidasa
CAJ69969	1.51548618	1.35666916	Regulador transcripcional de la familia MurR/RpiR
CAJ68879	1.83083985	1.60223304	Serina proteasa intracelular
CAJ70026	1.81585212	1.58930747	Antiterminador de transcripción
CAJ69204	1.52360362	1.3623404	Histidina quinasa sensora de dos componentes
CAJ69882	1.76331871	1.54504777	Factor de transcripción regulador de respuesta
CAJ69454	1.65985668	1.46245474	Antiterminador de transcripción
CAJ69969	1.51548618	1.35666916	Regulador transcripcional de la familia MurR/RpiR
CAJ68827	1.68825311	1.4845369	Regulador transcripcional de la familia LysR
CBE04551	-1.90648037	1.20895984	ARN polimerasa, subunidad sigma-24, subfamilia ecf (subfamilia ecf ARN polimerasa factor sigma-70)
CD630_19020	1.69526286	1.49005517	Fragmento de proteína de transposón conjugativo putativo (región central)
CAJ67964	-1.83727066	1.16425644	Supuesta proteína de transposón conjugativo similar a Tn1549, CTn4-Orf5
CAJ68721	1.56940409	1.39494376	Proteína de transferencia conjugativa putativa similar a Tn1549, CTn5-Orf5
CBE03999	1.9509911	1.71085213	Proteína de fago
CAJ69833	1.51548618	1.35666916	Resolvasa
CAJ70277	-2.3290702	0.8391725	Proteína de la familia MgtC/SapB
CAJ67425	1.64641856	1.45215528	Proteína que contiene el dominio DUF3788

CAJ68804	1.76112052	1.54323067	Proteína de la familia OmpA
AKP41243	-1.90648037	1.20895984	Proteína hipotética
CCA62895	2.01597483	1.7734788	Proteína hipotética
CAJ70208	-3.18849083	1.40909674	Proteína que contiene el dominio DUF3783
CBE03994	1.72012537	1.50984525	Proteína hipotética
CAJ69177	-1.83727066	1.16425644	Proteína hipotética
CD630_21820	-1.83727066	1.16425644	Proteína hipotética
CAJ70266	-1.53047628	1.36716699	Proteína hipotética
CAJ68098	1.67745095	1.47608546	Proteína hipotética
CAJ67693	1.86809374	1.63494893	Proteína hipotética
AKP41282	-2.26518563	1.47835845	Proteína hipotética
CAJ68907	-1.90648037	1.20895984	Proteína hipotética
CAJ69823	-1.93820933	1.23018199	Proteína hipotética
CAJ69276	1.5812275	1.40352977	Proteína de membrana putativa
CAJ67909	2.2366283	2.00846622	Proteína no caracterizada
CAJ69069	1.80655268	1.58135479	Proteína hipotética conservada
CAJ68041	1.85680327	1.62494442	Proteína que contiene el dominio TSCPD de la familia TIGR03905

Anexo. Tabla 16. Diagrama de Venn de genes únicos diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días de cepas asociadas a ICD-R e ICD-NR ribotipo 001.

[B 3D RT001 NR]:		[B 3D RT001 NR] and [B 3D RT001 R]:	
ID	Nombre	ID	Nombre
CAJ68734	Proteína que contiene el dominio DUF1016	CAJ69099	Regulador transcripcional, tipo HTH
CAJ70280	Proteína transposón conjugativa putativa similar a Tn916, CTn7-Orf13	CAJ68152	Subunidad del complejo SMC-Scp ScpB
AKP43815	Proteína hipotética	CAJ68931	Proteína hipotética conservada
CAJ68784	Proteína que contiene el dominio BMC	CAJ69259	Proteína hipotética
CCA62789	Proteína hipotética	CAJ69198	Molibdato transportador ABC proteína de unión al sustrato
CAJ67486	Permeasa transportadora ABC-2	CD630_19440	Proteína de dominio similar a la glioxalasa
CAJ67080	Proteína de la familia FliL asociada al cuerpo basal flagelar	CAJ66955	PTS subunidad transportadora de lactosa/celobiosa IIA
CAJ69269	Proteína de señalización de diguanilato ciclasa putativa	CAJ69724	Amidohidrolasa
CAJ69056	Aminoácido transportador ABC proteína de unión a ATP		
CAJ67597	Proteína activadora del operón sorbitol (Glucitol)		

CAJ69640	Proteína hipotética conservada		
CAJ70248	Glicoproteína de exosporio similar al colágeno BclA3		
CAJ68056	O-sialoglicoproteína endopeptidasa		
AKP41245	Proteína hipotética		
CAJ68129	Procesamiento de ADN putativo Smf Proteína de unión de cadena sencilla		
CAJ67449	Metaloproteasa intramembrana de la familia CPBP		
CAJ68790	Subunidad pequeña de etanolamina amoníaco liasa		
CAJ68466	Tiamina fosfato sintasa		
CAJ67926	Molibdopterina-guanina dinucleótido biosíntesis proteína B		
CAJ68940	Proteína hipotética conservada		
CAJ69258	Supuesta proteína de inanición de carbono similar a CstA		
CAJ66942	Proteína de unión a caja TATA de la familia YwmB		
CAJ70430	Subunidad putativa de la permeasa del transportador ABC del 2-aminoetilfosfonato		
CAJ69439	Isomerasa de fosfoazúcar putativa		
CAJ68207	Sistema de transporte tipo ABC, lantibiótico/proteína de unión a ATP de la familia de múltiples fármacos		
CAJ69455	PTS subunidad transportadora de azúcar IIA		
CCA62852	Proteína hipotética		
CAJ70220	Proteína que contiene el dominio DUF1062		
CAJ69883	Proteína de membrana		
CAJ67879	Helicasa dependiente de ATP		
CAJ67616	Proteína de esporulación putativa YunB		
CAJ67694	Sistema PTS, componente IIB de la lactosa/celobiosa-familia		
CAJ70061	Proteína no caracterizada		
CAJ69879	Proteína de unión a ATP del transportador ABC		
CAJ68205	Proteína de repetición de cadena beta de la familia DUF4097		
CAJ68478	Proteína hipotética		
CAJ70010	Proteína que contiene el dominio DUF3139		
CAJ69990	Proteína que contiene el dominio PRD		
CAJ68368	Sistema de transporte tipo ABC, proteína de unión a ATP de la familia de múltiples fármacos		
CAJ69214	PTS subunidad transportadora de azúcar IIA		
CAJ69950	Sistema PTS, componente IIA alfa-glucósido específico		
CAJ67404	Proteína hipotética		

CAJ67429	CotF proteína de ensamblaje de péptido de cubierta de esporas		
CAJ69062	Proteína de unión a 4Fe-4S		
CAJ69766	Proteína de unión al sustrato del transportador ABC		
CAJ67317	Transportador SMR de salida de compuestos de amonio cuaternario SugE		
CAJ68547	Proteína de unión a FMN		
CAJ70148	Deshidrogenasa putativa		
CAJ70547	Regulador transcripcional de la familia LysR		
CAJ70049	Proteína hipotética		
CAJ69305	Amida C-N hidrolasa lineal		
CAJ68769	Proteína hipotética		
CAJ68021	Proteína de membrana		
CAJ70006	Proteína hipotética		
CAJ70095	Transportador Cme de MFS de salida de múltiples fármacos		
CAJ67851	N-acetilglucosamina-6-fosfato desacetilasa		
CAJ69161	Proteína de la familia de la aldolasa/aducina de clase II		
CAJ68779	Sistema de transporte tipo ABC, permeasa		
CAJ69939	Ácido N-acetilmurámico 6-fosfato eterasa		
CAJ70146	Pequeña proteína beta de esporas soluble en ácido		
CAJ66848	Transportador MFS		
CAJ68395	Histidina quinasa sensora de dos componentes		
CAJ68522	Subunidad de glicina deshidrogenasa de transferencia de aminometilo GcvPA		
CAJ68568	ADN helicasa RecQ		
CAJ67600	PTS subunidad transportadora de glucitol/sorbitol IIB		
CAJ66954	Antiterminador de transcripción, regulador de operón PTS		
CAJ68976	Permeasa de purina		
CAJ69479	Proteína no caracterizada		
CAJ69164	PTS subunidad transportadora de galactitol IIC		
CAJ69372	Proteína de la familia aminopeptidasa P		
CAJ69478	Guanilato quinasa		
CAJ68462	Proteína hipotética conservada		
CAJ68915	Ornitina carbamoiltransferasa		
CAJ68217	Proteína hipotética		
CAJ69199	Permeasa transportadora ABC		
CAJ67860	Proteína hipotética conservada		

CAJ67526	Regulador transcripcional de la familia MerR		
CAJ68656	Proteína que contiene el dominio N-terminal de BtrH		
CAJ69973	PTS subunidad transportadora de azúcar IIC		
CAJ69743	Oxidoreductasa de unión a NAD (P) putativa		
CAJ69357	Endopeptidasa de esporas		
CAJ68328	Proteína hipotética		
CAJ68252	Proteína de la familia DUF819		
CAJ69918	Epoxiqueosina reductasa		
CAJ68569	Fosfometilpirimidina sintasa ThiC		
CD630_01800	Proteína de la familia M56 de la peptidasa blaR1		
CAJ69365	MBL plegar metalo-hidrolasa		
CAJ67503	Regulador transcripcional		
CAJ67054	Proteína de ensamblaje flagelar FliW		
CAJ68799	Proteína que contiene el dominio BMC		
CAJ68841	Acil-CoA tioesterasa putativa		
CD630_18120	Regulador transcripcional de la familia LylTR		
CAJ68289	Proteína hipotética conservada		
CD630_19901	Fragmento de regulador transcripcional, represor de betalactámicos		
CAJ68719	Proteína de transferencia conyugal		
CAJ67148	Sistema de transporte tipo ABC, permeasa específica de cobalto		
CAJ67854	Factor de transcripción regulador de respuesta		
CAJ69045	Proteína hipotética		
CCA62901	Proteína transposón conjugativa putativa similar a Tn916, CTn7-Orf6		
CAJ68080	Transglicosilasa endolítica MltG		
CAJ68837	Sistema de transporte tipo ABC, permeasa		
CAJ69736	Proteína de la familia de la aldolasa/aducina de clase II		
CAJ68795	Etanolamina corrinoide cobalamina adenosiltransferasa		
CAJ70262	Sistema de transporte tipo ABC, permeasa de la familia de múltiples fármacos		
CAJ70414	Proteína de membrana		
CAJ70255	Regulador transcripcional hélice-vuelta-hélice		
CAJ68513	Captación de quelatos de hierro subunidad de la permeasa de la familia de transportadores ABC		
CAJ67842	Proteína de unión a ATP del transportador ABC		
CAJ68781	Proteína de la familia de las recombinasas		

CBE06733	Familia de proteínas cas5 asociadas a CRISPR		
CAJ70016	Proteína de dominio de unión 4fe-4s		
CAJ68279	Transportador familiar EamA		
CCA62905	Proteína hipotética		
CAJ68376	Proteína que contiene el dominio DUF2935		
CAJ68788	Etanolamina amoniaco-liasa factor de reactivación EutA		
CAJ68801	Proteína que contiene el dominio DUF861		
CAJ68295	Supuesta delta-lactama-biosintética de-N-acteylase		
CAJ69908	PTS subunidad transportadora de fructosa IIB		
CAJ70291	Proteína de división celular FtsK		
AKP41179	Proteína hipotética		
CAJ70253	Proteína de unión a ARNt		
CAJ70424	Transportador de cationes		
CAJ68251	Dipéptido epimerasa		
CAJ67003	Peptidasa M56		
CAJ68748	Permeasa transportadora ABC		
CAJ68916	Proteína de la familia de la aspartato aminotransferasa		
CAJ70441	Proteína putativa del metabolismo del fosfonato		
CAJ67598	PTS subunidad transportadora de sorbitol IIC		
CAJ68816	Proteína no caracterizada		
CD630_19270	Proteína que contiene el dominio del casete de unión a ATP		
CAJ67902	Proteína hipotética conservada		
CAJ70331	Cobalto-precorrina-7 (C(5))-metiltransferasa		
CAJ70009	Antiterminador de transcripción, regulador de operón PTS, bglG2		
CAJ68270	Proteína de la familia de aminotransferasa dependiente de PLP		
CAJ67872	Ancla de la pared celular		
CAJ70004	Amidohidrolasa		
CAJ67724	Agmatinasa		
CAJ68614	Simportador de sodio/glutamato		
CAJ69751	Regulador transcripcional que interactúa con sigma 54		
CAJ69339	Proteína asociada a CRISPR Cas5		
CAJ70023	Familia 1 glicosilhidrolasa		
CAJ67823	Decaprenil-fosfato fosforribosiltransferasa		
CAJ70589	Componente de proteína de ribonucleasa P (proteína RNaseP) (Proteína C5)		
CAJ67456	Proteína hipotética		

CBE01879	Proteína de la familia de la glicosil transferasa del grupo 2		
CAJ69715	Regulador transcripcional hélice-giro-hélice alado		
CAJ69082	Transportador MFS		
CBE03978	Proteína hipotética		
CAJ67122	Proteína de unión al sustrato del transportador ABC del azúcar		
CAJ67988	Proteína hipotética		
CAJ70090	Proteína hipotética		
CAJ67874	UDP-N-acetilglucosamina 2-epimerasa (no hidrolizante)		
CAJ67608	Proteína de esporulación en etapa V AD		
CBE04026	Proteína de fago		
CAJ67295	Hidrolasa de la familia HAD-IIB tipo Cof		
CAJ69702	Regulador transcripcional de la familia GntR		
CAJ68037	Proteína transportadora de acilo		
CAJ69163	Galactitol-1-fosfato 5-deshidrogenasa		
CAJ70075	Dihidropirimidinasa		
CAJ68917	Acetilglutamato quinasa		
CAJ68465	Hidroxietiltiazol quinasa		
CAJ69412	Regulador de recombinación RecX		
AKP42369	Proteína hipotética		
CAJ69331	Proteína sensorial rica en triptófano		
CAJ68836	Proteína de unión a ATP del transportador ABC		
CAJ67034	Proteína de la cubierta de esporas		
CAJ68834	Factor de transcripción regulador de respuesta		
CAJ69501	Regulador transcripcional, familia TetR		
CD630_22670	Fragmento de proteína de membrana, proteína de tipo infección abortiva		
CCA62881	Proteína de membrana putativa		
CAJ68835	Histidina quinasa que contiene dominio HAMP		
CAJ68424	Factor anti-sigma-V rsiV		
CBE02514	Proteína hipotética		
CAJ69554	Antiterminador de transcripción, familia licT		
CAJ70467	Proteína hipotética conservada		
CAJ70129	Hipoxantina fosforribosiltransferasa		
CAJ66957	PTS subunidad transportadora de celobiosa IIC		
CAJ67395	Endodesoxirribonucleasa de unión cruzada de la familia RusA		
CAJ69975	Antiterminador de transcripción		
CAJ69572	Proteína de membrana putativa		

CAJ68210	Sensor de sistema de dos componentes histidina quinasa		
CAJ68798	Proteína de microcompartimento de la familia EutN/CcmL		
CAJ68470	Proteína que contiene un dominio similar a GyrI		
CAJ69034	Endonucleasa		
CAJ68910	Permeasa transportadora ABC-2		
CAJ70433	Sistema de transporte tipo ABC, permeasa de la familia del hierro		
CAJ67634	3-hidroxi-butiril-CoA deshidratasa (crotonasa)		
AKP41956	Aldo/ceto reductasa		
CAJ70278	Regulador transcripcional hélice-giro-hélice alado		

Anexo. Tabla 17. Genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días de cepas asociadas a ICD-NR ribotipo 027.

ID	LogFC	AVE. Expr	Nombre
CAJ67616	2.14060489	1.16503301	Proteína de esporulación putativa YunB
CAJ70128	1.73785417	1.75013688	Glicoproteína de exosporium putativa
CAJ68046	2.5642579	1.48917186	Proteína AA de esporulación en etapa III
CAJ67607	2.28118836	1.26223191	Proteína de esporulación de etapa V AC
CAJ67165	2.45119806	1.39315889	Proteína de grupo de cisteína de la familia YkgJ
CAJ67607	1.54477496	1.58147611	Proteína de esporulación de etapa V AC
CAJ69029	2.68991209	1.60509088	Proteína de membrana de esporulación YtaF
CAJ68157	1.61911026	1.64375271	Proteína de membrana
CAJ69696	1.56474298	1.59789096	Proteína hipotética
CAJ68799	2.03255205	1.09650479	Proteína que contiene el dominio BMC
CAJ68815	2.55283563	1.47912658	Proteína de membrana putativa
CAJ70520	2.34688719	1.3110071	Proteína hipotética
CAJ68462	1.75351863	1.764836	Proteína hipotética conservada
CAJ67779	-2.4019301	1.60002872	Proteína hipotética
CAJ69817	-1.54970004	1.84163849	Proteína hipotética
CAJ68940	1.64641253	1.6674438	Proteína hipotética conservada
CAJ67201	-2.00284304	1.2748837	Proteína que contiene el dominio DUF3789
CAJ70010	-1.68343404	1.07224845	Proteína que contiene el dominio DUF3139
CDR20291_0667	-2.35821842	1.55987469	Seudo
CAJ68462	1.78835515	1.79810348	Proteína hipotética conservada
CBE06722	-2.01737765	1.28521488	Proteína hipotética
CAJ68021	2.3841903	1.33970594	Proteína de membrana
CBE07070	2.18681407	1.19594289	Proteína hipotética
CCA62837	2.14060489	1.16503301	Proteína hipotética

CCA62906	-1.8934528	1.20038052	Proteína hipotética conservada
CAJ67103	2.03255205	1.09650479	Proteína hipotética
CAJ70441	-1.81820566	1.15231422	Proteína putativa del metabolismo del fosfonato
CAJ68429	2.28118836	1.26223191	Reductoisomerasa de cetol-ácido
AKP42929	1.79887246	0.96474243	Epimerasa
CAJ68514	-1.50035631	1.79548133	Sistema de transporte tipo ABC, proteína de unión a ATP de la familia del hierro
CAJ68959	2.36683281	1.32625976	Subunidad de unión a FAD de la xantina deshidrogenasa deshidrogenasa
CAJ69488	1.59563563	0.86627448	Proteína de la familia de polisacáridos desacetilasas
CAJ70056	1.57430973	1.60583624	Sistema de transporte tipo ABC, permeasa de la familia de múltiples fármacos
CAJ66954	2.28118836	1.26223191	Antiterminador de transcripción, regulador de operón PTS
CAJ67401	-2.06875339	1.32257827	Proteína de unión al sustrato del transportador ABC de la familia BMP
CAJ69372	1.60143354	1.62865142	Proteína de la familia aminopeptidasa P
CAJ70176	1.56474298	1.59789096	Subunidad transportadora de azúcar PTS IIB
CAJ69331	1.56474298	1.59789096	Proteína sensorial rica en triptófano
CAJ69925	1.85351768	1.86252946	Enzima aminotransferasa clase V dependiente de PLP
CAJ69973	1.58334998	1.61339284	PTS subunidad transportadora de azúcar IIC
CAJ68228	-1.9852783	1.2625368	Hidrolasa XkdQ de la pared celular
CAJ70347	2.21829318	1.2175738	Subunidad transportadora de azúcar PTS IIB
CAJ67320	2.08581507	1.12964349	Sistema PTS, componente manosa/fructosa/sorbosa IIA
CAJ67026	2.49882577	1.43269021	Subunidad transportadora PTS EIIA
CAJ68575	1.50666267	1.55076932	Antiportador de aminoácido básico putativo YfcC
CAJ67498	2.32851409	1.29714234	Subunidad de permeasa del transportador ABC
CAJ67317	2.32851409	1.29714234	Transportador SMR de salida de compuestos de amonio cuaternario SugE
CAJ67144	-2.28832561	1.49814548	ATPasa putativa
CAJ69161	2.14060489	1.16503301	Proteína de la familia de la aldolasa/aducina de clase II
AKP44018	-1.68343404	1.07224845	Alcohol deshidrogenasa
CAJ67627	2.32851409	1.29714234	Exportador de sulfito proteína de la familia TauE/SafE
CAJ68707	-1.8934528	1.20038052	Proteína P bifuncional, corismato mutasa/prefenato deshidratasa
CAJ68297	-2.1876849	1.4143521	Proteína similar a la transcriptasa inversa
CAJ69195	2.28118836	1.26223191	Regulador transcripcional hélice-vuelta-hélice
CAJ70547	-1.95147356	1.23919314	Regulador transcripcional de la familia LysR
CAJ67686	-1.86521511	1.18204837	Regulador transcripcional, familia MarR
CBE04551	-2.2284327	1.44757609	ARN polimerasa, subunidad sigma-24, subfamilia ecf (subfamilia ecf ARN polimerasa factor sigma-70)
CAJ69501	-1.92548354	1.22161415	Regulador transcripcional, familia TetR
CAJ68781	2.3841903	1.33970594	Proteína de la familia de las recombinasas
CBE06672	-1.68343404	1.07224845	Regulador transcripcional
CAJ69876	1.57430973	1.60583624	Endorribonucleasa Cas6 asociada a CRISPR
CAJ69835	1.57430973	1.60583624	Proteína con función de recombinación esencial

CAJ69969	2.14060489	1.16503301	Regulador transcripcional de la familia MurR/RpiR
CAJ68657	-2.19706278	1.4219155	Regulador transcripcional, familia MerR
CBE04006	1.63309614	1.65583271	Proteína de fago
CAJ67750	1.60143354	1.62865142	Proteína de la familia Gp157 del sifovirus
CBE04022	-1.8934528	1.20038052	Proteína de fago
CAJ69078	2.39788928	1.35043283	Proteína ROK putativa
CBE04024	1.79887246	0.96474243	Proteína de cola de fago
CBE04027	-1.86521511	1.18204837	Proteína de fibra de cola de fago
CBE04026	-2.08017312	1.33106565	Proteína de fago
CAJ68152	-2.15836277	1.39101808	Subunidad del complejo SMC-Scp ScpB
CAJ68462	1.69094733	1.7070633	Proteína hipotética conservada

Tabla 17: Genes diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días de cepas asociadas a ICD-R ribotipo 027.

ID	LogFC	AVE. Exp	Nombre
CAJ70128	1.77454798	1.78482201	Glicoproteína de exosporium putativa
CAJ68046	2.56670538	1.49133465	Proteína AA de esporulación en etapa III
CAJ67607	2.34486311	1.30947101	Proteína de esporulación de etapa V AC
CAJ69029	2.7764757	1.69102841	Proteína de membrana de esporulación YtaF
CAJ68122	-1.97153733	1.12664582	Sistema de transporte tipo ABC, permeasa de la familia de múltiples fármacos
AKP43219	1.51612768	1.55831966	Proteasa amino terminal caaX asociada a membrana
CD630_26040	-2.24213817	1.3118585	Fragmento de ADP-ribosiltransferasa CdtAB
CAJ68959	2.38701193	1.34190708	Subunidad de unión a FAD de la xantina deshidrogenasa
CAJ67401	-2.22208506	1.29690987	Proteína de unión al sustrato del transportador ABC de la familia BMP
CAJ69331	1.56123042	1.59498694	proteína sensorial rica en triptófano
CAJ69925	1.8482588	1.85722139	Enzima aminotransferasa clase V dependiente de PLP
CAJ69973	1.58515047	1.6149035	PTS subunidad transportadora de azúcar IIC
CAJ67165	2.21723901	1.21684176	Proteína de grupo de cisteína de la familia YkgJ
CAJ70347	2.21723901	1.21684176	Subunidad transportadora de azúcar PTS IIB
CAJ67320	2.03471816	1.09782875	Sistema PTS, componente manosa/fructosa/sorbosa IIA
CAJ67026	1.91035691	1.02494654	Subunidad transportadora PTS EIIA
CAJ68575	1.56123042	1.59498694	Antiportador de aminoácido básico putativo YfcC
CAJ67498	2.10814608	1.14390534	Subunidad de permeasa del transportador ABC
CAJ68273	-2.30184447	1.35761708	Hidrolasa de la familia HAD-IIB tipo Cof
CAJ67317	2.29124866	1.26955747	Transportador SMR de salida de compuestos de amonio cuaternario SugE
CBE04716	1.57376207	1.60537998	Proteína transportadora de aminobenzoil-glutamato
CAJ67627	2.42255077	1.37000244	Exportador de sulfito proteína de la familia TauE/SafE
CAJ68429	2.32145191	1.29185985	Reductoisomerasa de cetol-ácido

AKP42929	2.10814608	1.14390534	Epimerasa
CCA62789	-2.07881521	1.19594576	Proteína hipotética
CAJ69866	-2.13860996	1.2368684	Proteína hipotética
CAJ68940	1.68409919	1.70089114	Proteína hipotética conservada
CAJ68385	-2.25749643	1.32344869	Proteína de membrana putativa
CAJ68462	1.87769182	1.88718012	Proteína hipotética conservada
CAJ68021	2.10814608	1.14390534	Proteína de membrana
CBE02518	-1.83676571	1.04658006	Proteína hipotética
CBE07070	2.10814608	1.14390534	Proteína hipotética
CAJ69479	-2.51974243	1.54163952	Proteína no caracterizada
CAJ70520	2.48018516	1.41706276	Proteína hipotética
CAJ68462	1.78870778	1.79844436	Proteína hipotética conservada
CAJ69044	-2.10480522	1.21352474	Proteína de la familia VanZ
CBE04002	-2.21145544	1.28906985	Proteína de fago
CD630_23011	-1.91242022	1.09060279	Fragmento de proteína de fago putativo (región C-terminal)
CAJ68157	1.54768417	1.58385353	Proteína de membrana
CAJ69696	1.69855004	1.71394997	Proteína hipotética
CAJ69276	1.6261651	1.64983154	Proteína de membrana putativa
CAJ69078	2.45410727	1.39553631	Proteína ROK putativa
CAJ68799	2.03471816	1.09782875	Proteína que contiene el dominio BMC
CAJ68815	2.57499597	1.49868823	Proteína de membrana putativa
CAJ67456	1.54768417	1.58385353	Proteína hipotética
CAJ67765	1.91035691	1.02494654	Proteína hipotética
CAJ68462	1.78870778	1.79844436	Proteína hipotética conservada
CAJ68544	1.54768417	1.58385353	Proteína que contiene el dominio DUF969
CBE06727	-1.59413651	0.92000714	Autorregulador asociado a CRISPR
CAJ68297	-2.32993362	1.37980831	Proteína similar a la transcriptasa inversa
CAJ68781	2.46765351	1.40666972	Proteína de la familia de las recombinasas
CAJ67503	-2.10480522	1.21352474	Regulador transcripcional
CAJ69501	-2.07881521	1.19594576	Regulador transcripcional, familia TetR
CAJ68200	-2.17070932	1.25954648	Ribonucleasa putativa
CAJ69551	-2.32351155	1.37469652	Regulador transcripcional, familia AraC
CAJ70255	1.51612768	1.55831966	Regulador transcripcional hélice-vuelta-hélice
AKP43255	-2.27627181	1.33778626	Proteína B similar a la transposasa
CBE06727	1.91035691	1.02494654	Autorregulador asociado a CRISPR
CAJ69161	2.17320848	1.18673889	Proteína de la familia de la aldolasa/adcina de clase II
CAJ69195	2.38701193	1.34190708	Regulador transcripcional hélice-vuelta-hélice
CAJ70264	-2.36325094	1.40669629	Proteína de señalización de diguanilato quinasa putativa
CBE04024	2.10814608	1.14390534	Proteína de cola de fago
CAJ69734	-2.35728013	1.40183189	Proteína de la familia YhbD
CAJ67066	-2.04678447	1.17471212	Proteína de varilla del cuerpo basal flagelar FlgB

Anexo. Tabla 18. Genes únicos diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días de cepas asociadas a ICD-R ribotipo 027.

ID	LogFC	AVE. Expr	Nombre
CCA62789	-2.07881521	1.19594576	Proteína hipotética
CAJ69866	-2.13860996	1.2368684	Proteína hipotética
CAJ68122	-1.97153733	1.12664582	Sistema de transporte tipo ABC, permeasa de la familia de múltiples fármacos
AKP43219	1.51612768	1.55831966	Proteasa amino terminal caaX asociada a membrana
CBE04002	-2.21145544	1.28906985	Proteína de fago
CAJ70264	-2.36325094	1.40669629	Proteína de señalización de diguanilato quinasa putativa
CAJ67503	-2.10480522	1.21352474	Regulador transcripcional
CAJ69044	-2.10480522	1.21352474	Proteína de la familia VanZ
CBE06727	-1.59413651	0.92000714	Autorregulador asociado a CRISPR
CAJ68385	-2.25749643	1.32344869	Proteína de membrana putativa
CD630_26040	-2.24213817	1.3118585	Fragmento de ADP-ribosiltransferasa CdtAB
CBE02518	-1.83676571	1.04658006	Proteína hipotética
CAJ69479	-2.51974243	1.54163952	Proteína no caracterizada
CD630_23011	-1.91242022	1.09060279	Fragmento de proteína de fago putativo (región C-terminal)
CAJ67456	1.54768417	1.58385353	Proteína hipotética
CAJ68200	-2.17070932	1.25954648	Ribonucleasa putativa
CAJ67765	1.91035691	1.02494654	Proteína hipotética
AKP43255	-2.27627181	1.33778626	Proteína B similar a la transposasa
CAJ68273	-2.30184447	1.35761708	Hidrolasa de la familia HAD-IIB tipo Cof
CAJ69734	-2.35728013	1.40183189	Proteína de la familia YhbD
CAJ69276	1.6261651	1.64983154	Proteína de membrana putativa
CBE04716	1.57376207	1.60537998	Proteína transportadora de aminobenzoil-glutamato
CAJ69551	-2.32351155	1.37469652	Regulador transcripcional, familia AraC
CAJ70255	1.51612768	1.55831966	Regulador transcripcional hélice-vuelta-hélice
CAJ67066	-2.04678447	1.17471212	Proteína de varilla del cuerpo basal flagelar FlgB
CAJ68544	1.54768417	1.58385353	Proteína que contiene el dominio DUF969

Anexo. Tabla 19. Diagrama de Venn de genes únicos diferencialmente expresados en la biopelícula de 3 días de cepas asociadas a ICD-R e ICD-NR ribotipo 027.

[B 3D RT027NR]:		[B 3D RT027NR] and [B 3D RT027 R]:	
CAJ67779	Proteína hipotética	CAJ68940	Proteína hipotética conservada
CAJ69817	Proteína hipotética	CAJ69501	Regulador transcripcional, familia TetR
CAJ67616	Proteína de esporulación putativa YunB	CAJ68781	Proteína de la familia de las recombinasas
CAJ68514	Sistema de transporte tipo ABC, proteína de unión a ATP de la familia del hierro	CAJ70128	Glicoproteína de exosporium putativa

CAJ67201	Proteína que contiene el dominio DUF3789	CAJ68046	Proteína AA de esporulación en etapa III
CBE04006	Proteína de fago	CAJ68462	Proteína hipotética conservada
CBE04551	ARN polimerasa, subunidad sigma-24, subfamilia ecf (subfamilia ecf ARN polimerasa factor sigma-70)	CAJ68021	Proteína de membrana
CAJ70010	Proteína que contiene el dominio DUF3139	CAJ68959	Subunidad de unión a FAD de la xantina deshidrogenasa
CDR20291_0667	Seudo	CBE07070	Proteína hipotética
CBE06722	Proteína hipotética	CAJ67401	Proteína de unión al sustrato del transportador ABC de la familia BMP
CAJ69488	Proteína de la familia de polisacáridos desacetilasas	CAJ70520	Proteína hipotética
CAJ70056	Sistema de transporte tipo ABC, permeasa de la familia de múltiples fármacos	CAJ69331	Proteína sensorial rica en triptófano
CCA62837	Proteína hipotética	CAJ69925	Enzima aminotransferasa clase V dependiente de PLP
CAJ6954	Antiterminador de transcripción, regulador de operón PTS	CAJ69973	PTS subunidad transportadora de azúcar IIC
CCA62906	Proteína hipotética conservada	CAJ67607	Proteína de esporulación de etapa V AC
CAJ69372	Proteína de la familia aminopeptidasa P	CAJ67165	Proteína de grupo de cisteína de la familia YkgJ
CAJ70176	Subunidad transportadora de azúcar PTS IIB	CAJ70347	Subunidad transportadora de azúcar PTS IIB
CBE06672	Regulador transcripcional	CAJ69078	Proteína ROK putativa
CAJ68228	Hidrolasa XkdQ de la pared celular	CAJ67320	Sistema PTS, componente manosa/fructosa/sorbosa IIA
CAJ67750	Proteína de la familia Gp157 del sifovirus	CAJ67026	Subunidad transportadora PTS EIIA
CAJ67103	Proteína hipotética	CAJ68575	Antiportador de aminoácido básico putativo YfcC
CBE04022	Proteína de fago	CAJ68799	Proteína que contiene el dominio BMC
CAJ69876	Endorribonucleasa Cas6 asociada a CRISPR	CAJ68815	Proteína de membrana putativa
CAJ69835	Proteína con función de recombinación esencial	CAJ68429	Reductoisomerasa de cetol-ácido
CAJ69969	Regulador transcripcional de la familia MurR/RpiR	AKP42929	Epimerasa
CAJ70441	Proteína putativa del metabolismo del fosfonato	CBE04024	Proteína de cola de fago
CBE04027	Proteína de fibra de cola de fago	CAJ67498	Subunidad de permeasa del transportador ABC
CAJ67686	Regulador transcripcional, familia MarR	CAJ68157	Proteína de membrana
CBE04026	Proteína de fago	CAJ69696	Proteína hipotética
CAJ68152	Subunidad del complejo SMC-Scp ScpB	CAJ67317	Transportador SMR de salida de compuestos de amonio cuaternario SugE
CAJ67144	ATPasa putativa	CAJ69161	Proteína de la familia de la aldolasa/aducina de clase II
CAJ70547	Regulador transcripcional de la familia LysR	CAJ69195	Regulador transcripcional hélice-vuelta-hélice
AKP44018	Alcohol deshidrogenasa	CAJ67627	Exportador de sulfito proteína de la familia TauE/SafE

CAJ68657	Regulador transcripcional, familia MerR	CAJ68297	Proteína similar a la transcriptasa inversa
CAJ68707	Proteína P bifuncional, corismato mutasa/prefenato deshidratasa	CAJ69029	Proteína de membrana de esporulación YtaF

ANEXO VI

Anexo. Tabla 20. Rutas enriquecidas en la ontología génica (GO) y Enciclopedia de genes y genomas de Kioto (KEGG).

Grupo	Vía	Descripción	Número de genes	FDR	Nombre
B3	GO:0006591	Proceso metabólico de la ornitina	2	0.0153	ord,orr
	GO:1901605	Proceso metabólico de alfa-aminoácidos	3	0.0451	ord,ortB,orr
B3 ICD-R independiente de RT	KEGG: pdc00052	Metabolismo de la galactosa	2	0.0104	CAJ69164.1,CAJ69166.2
B3 ICD-R únicos independiente de RT	GO:0009401	Sistema de fosfotransferasa (PTS)	7	0.0072	CAJ69164.1,CAJ69165.1,CAJ69166.2,CAJ70173.1,CAJ70174.1,CAJ70175.1,CAJ70176.1
	GO:0007059	Segregación de cromosomas	2	0.0382	scpA,scpB
	KEGG: pdc02060	Sistema de fosfotransferasa (PTS)	7	0.0014	CAJ69164.1,CAJ69165.1,CAJ69166.2,CAJ70173.1,CAJ70174.1,CAJ70175.1,CAJ70176.1
	KEGG: pdc00052	Metabolismo de la galactosa	3	0.00010	CAJ69164.1,CAJ69165.1,CAJ69166.2
CP 1D ICD-R RT001	GO:0006810	Transporte	30	2.5x10 ⁻⁵	CAJ66848.1,CAJ66954.1,CAJ66955.1,CAJ66957.1,CAJ67106.1,rbsB,CAJ67317.1,srlM,srlA,CAJ67694.1,CAJ67842.1,cprA,CAJ68368.1,CAJ68453.1,kdpA,vexP1,CAJ68779.1,CAJ68823.1,CAJ68836.1,CAJ68837.1,CAJ69199.1,CAJ69214.1,CAJ69258.1,CAJ69302.1,CAJ69879.1,CAJ69908.1,CAJ69950.1,cme,CAJ70098.1,CAJ70424.2
	GO:0009401	Sistema de fosfotransferasa (PTS)	11	0.006	CAJ66954.1,CAJ66955.1,CAJ66957.1,CAJ67106.1,srlM,srlA,CAJ67694.1,CAJ69214.1,CAJ69302.1,CAJ69908.1,CAJ69950.1
	GO:0071702	Transporte de sustancias orgánicas	15	0.0293	CAJ66848.1,CAJ66954.1,CAJ66955.1,CAJ66957.1,CAJ67106.1,rbsB,srlM,srlA,CAJ67694.1,cprA,CAJ69214.1,CAJ69258.1,CAJ69302.1,CAJ69908.1,CAJ69950.1
	GO:0006525	Proceso metabólico de la arginina	4	0.0331	speB,argF,argM,argB
	GO:0055085	Transporte transmembrana	18	0.0409	CAJ66848.1,CAJ66954.1,CAJ66957.1,CAJ67317.1,CAJ67694.1,CAJ67842.1,CAJ68453.1,kdpA,vexP1,CAJ68779.1,CAJ68823.1,CAJ68837.1,CAJ69199.1,CAJ69302.1,CAJ69879.1,CAJ69908.1,cme,CAJ70424.2

	GO:0006576	Proceso metabólico de amina biogénica celular	7	0.0163	speB,eutS,eutA,eutC,eutT,eutN,eutQ
	GO:0046336	Proceso catabólico de la etanolamina	6	0.0163	eutS,eutA,eutC,eutT,eutN,eutQ
	GO:0008643	Transporte de carbohidrato	14	0.0356	CAJ66848.1,CAJ66954.1,CAJ66955.1,CAJ66957.1,CAJ67106.1,rbsB,srlM,srlA,CAJ67694.1,CAJ69214.1,CAJ69302.1,CAJ69908.1,CAJ69950.1,CAJ69975.1
	GO:0050794	Regulación del proceso celular	12	0.00016	CAJ67526.1,CAJ67854.1,CAJ68471.1,CAJ68834.1,CAJ68835.1,SinR,CAJ69204.1,CAJ69702.2,CAJ69751.1,CAJ69975.1,CAJ70255.1,CAJ70547.1
	GO:0006355	Regulación de la transcripción, con plantilla de ADN	10	0.00021	CAJ67526.1,CAJ67854.1,CAJ68471.1,CAJ68834.1,SinR,CAJ69702.2,CAJ69751.1,CAJ69975.1,CAJ70255.1,CAJ70547.1
	GO:0000160	Sistema de transducción de señal de fosforescencia	5	0.0119	CAJ67854.1,CAJ68834.1,CAJ68835.1,CAJ69204.1,CAJ69751.1
	GO:0051716	Respuesta celular al estímulo	6	0.0194	CAJ67854.1,recQ,CAJ68834.1,CAJ68835.1,CAJ69204.1,CAJ69751.1
	GO:0032502	Proceso de desarrollo	4	0.0091	CAJ67034.1,yunB,spoIIIAA,gpr
	GO:0044282	Proceso catabólico de molécula pequeña	8	0.0043	spoVAD,CAJ68251.1,eutS,eutA,eutC,eutT,eutN,eutQ
	GO:1901565	Proceso catabólico de compuestos organonitrógenos	8	0.0077	CAJ68251.1,CAJ68656.1,eutS,eutA,eutC,eutT,eutN,eutQ
	GO:1990961	Desintoxicación de xenobióticos por exportación transmembrana a través de la membrana plasmática	3	0.0313	vexP1,CAJ68823.1,CAJ68837.1
CP 1D ICD-R RT027	GO:0030435	Esporulación	4	0.001	spoVAC,yunB,CAJ68021.1,spoIIIAA
	KEGG: pdc00053	Metabolismo del ascorbato y aldarato	2	0.0072	CAJ66954.1,CAJ67026.1
	KEGG: pdc00500	Metabolismo de la sacarosa y el almidón	3	0.0015	CAJ69969.1,CAJ70347.1,CAJ70552.1
CP comunes 1D ICD-R RT027/001					No se encontraron vías GO
	KEGG: pdc00053	Metabolismo del ascobarto y aldarato	2	0.0072	CAJ66954.1,CAJ67026.1

B RT001	ICD-NR	GO:0032502	Proceso de desarrollo	5	0.00032	CAJ67034.1,yunB,spoIIIAA,gpr,sspB
		GO:0030435	Esporulación que resulta en la formación de una espora celular.	4	0.007	CAJ67034.1,yunB,spoIIIAA,sspB
		GO:0006810	Transporte	34	1.4x10 ⁻⁵	CAJ66954.1,CAJ66955.1,CAJ66957.1,rbsB,cbiQ1,CAJ67317.1,srlM,srlA,srlEb,CAJ67694.1,CAJ67842.1,cprA,CAJ68368.1,CAJ68513.1,glcC,vexP1,CAJ68779.1,CAJ68836.1,CAJ68837.1,CAJ68976.2,CAJ69056.1,CAJ69164.1,CAJ69198.1,CAJ69199.1,CAJ69214.1,CAJ69258.1,CAJ69455.1,fhuD,CAJ69879.1,CAJ69908.1,CAJ69950.1,CAJ69973.1,cme,CAJ70424.2
		GO:0008643	Transporte de carbohidratos	14	0.0012	CAJ66954.1,CAJ66955.1,CAJ66957.1,rbsB,srlM,srlA,srlEb,CAJ67694.1,CAJ69164.1,CAJ69214.1,CAJ69455.1,CAJ69908.1,CAJ69950.1,CAJ69973.1
		GO:0009401	Sistema de fosfotransferasa (PTS)	13	0.0013	CAJ66954.1,CAJ66955.1,CAJ66957.1,srlM,srlA,srlEb,CAJ67694.1,CAJ69164.1,CAJ69214.1,CAJ69455.1,CAJ69908.1,CAJ69950.1,CAJ69973.1
		GO:0071702	Transporte de sustancias organicas	19	0.0017	CAJ66954.1,CAJ66955.1,CAJ66957.1,rbsB,srlM,srlA,srlEb,CAJ67694.1,cprA,glcC,CAJ68976.2,CAJ69056.1,CAJ69164.1,CAJ69214.1,CAJ69258.1,CAJ69455.1,CAJ69908.1,CAJ69950.1,CAJ69973.1
		GO:0055085	Transporte transmembrana	21	0.0212	CAJ66954.1,CAJ66957.1,cbiQ1,CAJ67317.1,srlEb,CAJ67694.1,CAJ67842.1,CAJ68513.1,glcC,vexP1,CAJ68779.1,CAJ68837.1,CAJ68976.2,CAJ69056.1,CAJ69164.1,CAJ69199.1,CAJ69879.1,CAJ69908.1,CAJ69973.1,cme,CAJ70424.2
		GO:0009987	Proceso celular	65	0.0381	CAJ66954.1,CAJ66957.1,cbiQ1,CAJ67295.2,CAJ67317.1,CAJ67449.1,srlEb,crt1,CAJ67694.1,speB,ubiA,CAJ67842.1,nagA,mnaA,mobB,acpP1,gcp1,CAJ68251.1,CAJ68295.1,CAJ68368.1,CAJ68395.1,thiM,thiE,CAJ68513.1,gcvTPA,thiC,glcC,vexP1,CAJ68779.1,eutA,eutC,eutT,CAJ68837.1,argF,argM,argB,CAJ68976.2,CAJ69056.1,CAJ69164.1,CAJ69199.1,CAJ69214.1,CAJ69258.1,CAJ69305.1,CAJ69331.1,CAJ69365.1,CAJ69455.1,gmk,CAJ69724.1,CAJ69879.1,CAJ69908.1,CAJ69918.1,murQ,CAJ69950.1,CAJ69973.1,CAJ70004.1,CAJ70016.1,bglA6,CAJ70075.1,cme,hpt1,cbiE,CAJ70424.2,CAJ70430.1,CAJ70433.1,phnH
		GO:0019219	Regulación del proceso metabólico de compuestos que contienen nucleobase	15	8.7x10 ⁻⁷	CAJ67503.1,CAJ67526.1,CAJ67854.1,CAJ68834.1,SinR,recX,CAJ69554.1,CAJ69702.2,CAJ69715.1,CAJ69751.1,CAJ69975.1,bglG2,CAJ70255.1,CAJ70278.2,CAJ70547.1

	GO:0031323	Regulación del proceso metabólico celular	16	8.7x10 ⁻⁷	CAJ67503.1,CAJ67526.1,CAJ67854.1,rsiV,CAJ68834.1,SinR,recX,CAJ69554.1,CAJ69702.2,CAJ69715.1,CAJ69751.1,CAJ69975.1,bglG2,CAJ70255.1,CAJ70278.2,CAJ70547.1
	GO:0050794	Regulación del proceso celular	17	8.7x10 ⁻⁷	CAJ67503.1,CAJ67526.1,CAJ67854.1,rsiV,CAJ68834.1,SinR,recX,CAJ69501.1,CAJ69554.1,CAJ69702.2,CAJ69715.1,CAJ69751.1,CAJ69975.1,bglG2,CAJ70255.1,CAJ70278.2,CAJ70547.1
	GO:0051171	Regulación del proceso metabólico de los compuestos nitrogenados	16	8.7x10 ⁻⁷	CAJ67503.1,CAJ67526.1,CAJ67854.1,rsiV,CAJ68834.1,SinR,recX,CAJ69554.1,CAJ69702.2,CAJ69715.1,CAJ69751.1,CAJ69975.1,bglG2,CAJ70255.1,CAJ70278.2,CAJ70547.1
	GO:0060255	Regulación del proceso metabólico de macromoléculas	16	8.7x10 ⁻⁷	CAJ67503.1,CAJ67526.1,CAJ67854.1,rsiV,CAJ68834.1,SinR,recX,CAJ69554.1,CAJ69702.2,CAJ69715.1,CAJ69751.1,CAJ69975.1,bglG2,CAJ70255.1,CAJ70278.2,CAJ70547.1
	GO:0080090	Regulación del proceso metabólico primario	16	8.7x10 ⁻⁷	CAJ67503.1,CAJ67526.1,CAJ67854.1,rsiV,CAJ68834.1,SinR,recX,CAJ69554.1,CAJ69702.2,CAJ69715.1,CAJ69751.1,CAJ69975.1,bglG2,CAJ70255.1,CAJ70278.2,CAJ70547.1
	GO:0006355	Regulación de la transcripción, con plantilla de ADN	14	2.9x10 ⁻⁶	CAJ67503.1,CAJ67526.1,CAJ67854.1,CAJ68834.1,SinR,CAJ69554.1,CAJ69702.2,CAJ69715.1,CAJ69751.1,CAJ69975.1,bglG2,CAJ70255.1,CAJ70278.2,CAJ70547.1
	GO:0051716	Respuesta celular al estímulo	8	0.0099	CAJ67395.2,CAJ67854.1,CAJ67879.1,CAJ68129.1,recQ,CAJ68834.1,CAJ69751.1,CAJ70278.2
	GO:0045893	Regulación positiva de la transcripción, con plantilla de ADN	3	0.0478	CAJ67854.1,CAJ69554.1,bglG2
	GO:0006576	Proceso metabólico de amina biogénica	8	0.0086	speB,eutS,eutA,eutC,eutT,eutN,CAJ68799.1,eutQ
	GO:0046336	Proceso catabólico de la etanolamina	7	0.0086	eutS,eutA,eutC,eutT,eutN,CAJ68799.1,eutQ
	GO:0044282	Proceso catabólico de moléculas pequeñas	12	0.0327	spoVAD,nagA,CAJ68251.1,gcvTPA,eutS,eutA,eutC,eutT,eutN,CAJ68799.1,eutQ,murQ
B ICD-R RT001	GO:0006810	Transporte	17	4.4x10 ⁻⁵	CAJ66857.1,CAJ66955.1,CAJ67106.1,CAJ67107.1,CAJ68453.1,kdpA,CAJ68469.1,vexP2,CAJ68823.1,pbuX,CAJ69198.1,CAJ69302.1,CAJ69911.1,CAJ69942.1,bglF2,CAJ70098.1,CAJ70176.1
	GO:0008643	Transporte de carbohidratos	9	0.00019	CAJ66857.1,CAJ66955.1,CAJ67106.1,CAJ67107.1,CAJ69302.1,CAJ69911.1,CAJ69942.1,bglF2,CAJ70176.1
	GO:0009401	Sistema de fosfotransferasa (PTS)	8	0.00071	CAJ66857.1,CAJ66955.1,CAJ67106.1,CAJ67107.1,CAJ69302.1,CAJ69942.1,bglF2,CAJ70176.1
	GO:0034219	Transporte transmembrana de carbohidratos	7	0.00079	CAJ66857.1,CAJ67107.1,CAJ69302.1,CAJ69911.1,CAJ69942.1,bglF2,CAJ70176.1

	GO:0055085	Transmembrane transport	12	0.0019	CAJ66857.1,CAJ67107.1,CAJ68453.1,kdpA,vexP2,CAJ68823.1,pbuX,CAJ69302.1,CAJ69911.1,CAJ69942.1,bglF2,CAJ70176.1
	GO:0071702	Transporte orgánico de sustancias	10	0.0025	CAJ66857.1,CAJ66955.1,CAJ67106.1,CAJ67107.1,pbuX,CAJ69302.1,CAJ69911.1,CAJ69942.1,bglF2,CAJ70176.1
	GO:0006355	Regulación de la transcripción, con plantilla de ADN	6	0.00077	CAJ68827.1,SinR,CAJ69454.1,CAJ69882.1,CAJ69969.1,CAJ70026.1
UNICOS B ICD-R RT001	GO:0006810	Transporte	15	0.00038	CAJ66857.1,CAJ67106.1,CAJ67107.1,CAJ68453.1,kdpA,CAJ68469.1,vexP2,CAJ68823.1,pbuX,CAJ69302.1,CAJ69911.1,CAJ69942.1,bglF2,CAJ70098.1,CAJ70176.1
	GO:0034219	Transporte transmembrana de carbohidratos	7	0.00053	CAJ66857.1,CAJ67107.1,CAJ69302.1,CAJ69911.1,CAJ69942.1,bglF2,CAJ70176.1
	GO:0008643	Transporte de carbohidratos	8	0.00066	CAJ66857.1,CAJ67106.1,CAJ67107.1,CAJ69302.1,CAJ69911.1,CAJ69942.1,bglF2,CAJ70176.1
	GO:0055085	Transporte transmembrana	12	0.00066	CAJ66857.1,CAJ67107.1,CAJ68453.1,kdpA,vexP2,CAJ68823.1,pbuX,CAJ69302.1,CAJ69911.1,CAJ69942.1,bglF2,CAJ70176.1
	GO:0009401	Sistema de fosfotransferasa (PTS)	7	0.0025	CAJ66857.1,CAJ67106.1,CAJ67107.1,CAJ69302.1,CAJ69942.1,bglF2,CAJ70176.1
	GO:0071702	Transporte orgánico de sustancias	9	0.0065	CAJ66857.1,CAJ67106.1,CAJ67107.1,pbuX,CAJ69302.1,CAJ69911.1,CAJ69942.1,bglF2,CAJ70176.1
	GO:0050794	Regulación del proceso celular	6	0.0078	CAJ68827.1,CAJ69204.1,CAJ69454.1,CAJ69882.1,CAJ69969.1,CAJ70026.1
	GO:0006355	Regulación de la transcripción, con plantilla de ADN	5	0.0166	CAJ68827.1,CAJ69454.1,CAJ69882.1,CAJ69969.1,CAJ70026.1
B ICD-NR RT027	GO:0030435	Esporulación	4	0.001	spoVAC,yunB,CAJ68021.1,spoIIIAA
	KEGG: pdc00053	Metabolismo del ascorbato y aldarato	2	0.0216	CAJ66954.1,CAJ67026.1
B ICD-R RT027	GO:0030435	Esporulación	3	0.0411	spoVAC,CAJ68021.1,spoIIIAA
UNICOS B ICD-R RT027					No se encontraron vías GO