



Universidad Nacional Autónoma de México

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Salud y de la Producción Animal

GENOTIPIFICACIÓN DE CEPAS COMENSALES DE *Escherichia coli* DE DELFÍN
NARIZ DE BOTELLA (*Tursiops truncatus*) MEDIANTE SECUENCIAS MULTILOCUS
(MLST)

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

JUAN JOSÉ FRANCO ORONA

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Rigoberto Hernández Castro

Hospital General "Manuel Gea González"

COMITÉ TUTOR

Dr. Hipólito Ángel Manjarrez Hernández

Facultad de Medicina – UNAM

Dr. Francisco Suárez Güemes

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia - UNAM

México, CDMX

Agosto 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatorias

A mi familia, en especial a mi amada madre por su comprensión, fortaleza, apoyo y cariño inagotable.

A Momore adorada por estar a mi lado en esta noche que es un puñado de estrellas y de alegría.

Agradecimientos

Agradezco de forma especial al Dr. Rigoberto Hernández Castro (Tutor Principal) por su valiosa tutela y por la oportunidad que me brindió de trabajar con él y continuar mi formación personal y académica.

A mis compañeros de laboratorio del Área de Ecología de Agentes Patógenos del Hospital General “Manuel Gea González”.

A los M. en C. Annia López y Jorge de la Garza por su ayuda al principio del trabajo.

A los miembros de mi Comité Tutorial: el Dr. Angel Manjarrez, el Dr. Francisco Suárez y la Dra. Beatriz Arellano.

A la Lic. en Comunicación Cintia Sánchez por su ayuda en la revisión final de esta tesis.

Resumen

México alberga una de las más grandes poblaciones de delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*) a nivel mundial. Dentro de los diez agentes patógenos de mayor importancia en cetáceos pequeños como *T. truncatus*, se encuentra *Escherichia coli* (*E. coli*). Existen varios métodos para caracterizar a *E. coli* de acuerdo a diferentes rasgos fenotípicos o genéticos, entre ellos el método de filotipificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que clasifica a las cepas de esta especie en 8 grupos filogenéticos. Por otro lado, la tipificación mediante secuencias multi locus (MLST) es una técnica de genotipificación a nivel infraespecífico, que utiliza variaciones alélicas de 7 genes conservados o de mantenimiento (*housekeeping*). La caracterización molecular de cepas comensales de *E. coli* de mamíferos marinos bajo cuidado humano es importante para conocer las particularidades de su microbiota. El objetivo del presente trabajo fue genotipificar por medio de MLST, 19 cepas comensales de *E. coli* provenientes de diferentes sitios anatómicos de ejemplares de *T. truncatus* mantenidos en instalaciones de nuestro país. Las cepas se confirmaron como miembros de *E. coli* mediante la amplificación del gen *gadA*. Se determinó su grupo filogenético utilizando el método de Clermont, así como la MLST con el esquema de Achtman. La distribución de grupos filogenéticos fue: B2 36.8% (7/19), U 31.6% (6/19), D 10.5% (2/19), Clado I o II 10.5% (2/19), B1 5.3% (1/19) y F 5.3% (1/19). Se realizó el análisis de las concatenaciones de las secuencias MLST de las cepas clasificadas como posibles Clado I o II y se determinó que ambas pertenecieron al filogrupo A. Se identificaron 14 Secuencias Tipo (ST) diferentes y 4 complejos ST (STc). Seis de estas ST son reconocidas como patógenas en humanos y otras

especies, siendo de especial interés las ST10, ST69 y ST131 catalogadas como linajes pandémicos patógenos extraintestinales en humanos. Además se detectó la ST2185, miembro del STc131, aislada previamente de un delfín en cautiverio en Europa. En este trabajo se identificaron por primera vez dos ST inéditas (ST5098 y ST5166). Éste es el primer estudio de epidemiología molecular que emplea cepas de *E. coli* provenientes de ejemplares de *T. truncatus* bajo cuidado humano.

Palabras clave: *Escherichia coli*, *Tursiops truncatus*, Genotipificación, Filogrupos, MLST, Secuencias Tipo, ST, STc.

Abstract

Mexico hosts one of the largest bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) collections worldwide. *Escherichia coli* (*E. coli*) is listed among the ten most important pathogens for *T. truncatus*. There are various typifying methods for *E. coli* that are based on phenotypic and genetic traits among these, the Clermont phylotyping PCR method, classifies the strains within 8 different phylogroups. Another method, the multilocus sequence typing (MLST) is a technique for genotypic characterization at the infraspecific level using the allelic mismatches of 7 housekeeping genes. The molecular characterization of *E. coli* commensal strains from marine mammals under human care is important to understand the microbial structure on these animals. The objective of the present study was the genotypification of 19 *E. coli* commensal strains isolated from different anatomical sites of *T. truncatus* held on facilities in Mexico using MLST. The isolates were confirmed to be members of *E. coli* through the amplification of the molecular marker gene *gadA*. Furthermore, the phylogenetic group was determined by the Clermont method, as well as the MLST using the Achtman scheme. The phylogroup distribution was as follows: B2 36.8% (7/19), U 31.6% (6/19), D 10.5% (2/19), Clade I or II 10.5% (2/19), B1 5.3% (1/19) and F 5.3% (1/19). The correct phylogroup assignment for the 2 strains sorted as either Clade I or II was done by analyzing the construct made with the sequence of the MLST fragments, and it was determined that both strains belonged to phylogroup A. Fourteen different Sequence Type (ST) and 4 ST complexes (STc) were identified; six of these are recognized as human and animal pathogens; of special interest were ST10, ST69 and ST131 human extrapathogenic pandemic lineages. Additionally the ST2185 was detected,

which is a STc131 member and was previously isolated from one dolphin in captivity in Europe. In this study, two novel sequence types were identified (ST5098 and ST5166). This is the first study focused on molecular epidemiology of *E. coli* strains from samples of *T. truncatus* under human care.

Key Words: *Escherichia coli*, *Tursiops truncatus*, Genotyping, phylogroups, MLST, Sequence Type, ST, STc.

Contenido

Resumen	i
Abstract	iii
1. Introducción	1
1.1. <i>Escherichia coli</i>	1
1.1.1. Características generales de <i>E. coli</i>	1
1.1.2. Características genéticas de <i>E. coli</i>	2
1.1.3. Métodos de identificación de <i>E. coli</i>	3
1.1.3.1. Métodos tradicionales	3
1.1.3.1.1. Medios de cultivo	3
1.1.3.1.2. Pruebas bioquímicas	4
1.1.3.2. Métodos moleculares	5
1.1.4. Clasificación de <i>E. coli</i>	6
1.1.4.1. Serotipificación	7
1.1.4.2. Clasificación por patotipos	8
1.1.4.3. Grupos filogenéticos	12
1.1.4.4. Tipificación por secuencias multilocus (MLST).....	14
1.1.4.4.1. Esquema EcMLST	16
1.1.4.4.2. Esquema Pasteur	17
1.1.4.4.3. Esquema de Achtman	17
1.2. <i>Tursiops truncatus</i> (<i>T. truncatus</i>)	19
1.2.1. Generalidades de <i>T. truncatus</i>	19

1.2.2. Situación de <i>T. truncatus</i> en México	19
1.2.3. <i>T. truncatus</i> y <i>E. coli</i>	20
1.2.3.1. Tipificación molecular de cepas de <i>E. coli</i> de <i>T. truncatus</i>	22
1.3. Justificación	24
1.4. Hipótesis	24
1.5. Objetivos	24
1.5.1. Objetivo general	24
1.5.2. Objetivos específicos	24
2. Material y métodos	25
2.1. Cepas bacterianas	25
2.2. Identificación molecular por medio de la amplificación del gen <i>gadA</i>	27
2.3. Determinación de grupos filogenéticos	28
2.4. Extracción de DNA	30
2.5. Tipificación por secuencias multilocus (MLST)	30
2.6. Análisis de las secuencias genéticas	32
2.7. Análisis genético de las ST	33
2.8. Análisis genético global de las ST	34
3. Resultados	35
3.1. Identificación molecular por medio de la amplificación del gen <i>gadA</i>	35
3.2. Grupos filogenéticos	35
3.3. Tipificación por secuencias multilocus (MLST)	38
3.4. Análisis genético de las secuencias obtenidas	41

3.4.1. Análisis genético global de las secuencias obtenidas	47
3.4.1.1. Árbol 0	49
3.4.1.2. Árbol 1	57
3.4.1.3. Árbol 3	60
3.4.1.4. Árbol 6	62
3.4.1.5. Árbol 7	64
3.4.1.6. Árbol 30	67
3.4.1.7. Árbol 31	68
3.4.1.8. Árbol 38	70
3.4.1.9. Árbol 1314	72
4. Discusión	73
4.1. Identificación molecular de <i>E. coli</i>	73
4.2. Grupos filogenéticos de <i>E. coli</i>	73
4.3. Genotipificación de <i>E. coli</i> de <i>T. truncatus</i> por MLST	75
4.3.1. STc648	76
4.3.2. STc131	78
4.3.2.1. ST131	78
4.3.2.2. ST2185	81
4.3.3. STc69	81
4.3.4. STc10	82
4.3.4.1. ST10	83
4.3.4.2. ST617	85

4.3.5. Cepas sin STc asociado	86
4.3.5.1. ST99	86
4.3.5.2. ST372	87
4.3.5.3. ST986	89
4.3.5.4. ST1858	89
4.3.5.5. ST1946	91
4.3.5.6. ST2016	91
4.3.5.7. ST5098	92
4.3.5.8. ST5166	92
4.5. Posible origen de las clonas encontradas	93
5. Conclusiones	95
6. Referencias	96

Cuadros

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de <i>E. coli</i>	1
Cuadro 2. Pruebas bioquímicas para la identificación de <i>E. coli</i>	5
Cuadro 3. Genes usados en el esquema MLST de Achtman	18
Cuadro 4. Secuencias Tipo de <i>E. coli</i> procedentes de <i>T. truncatus</i>	23
Cuadro 5. Origen, filogrupo y serotipo de las cepas utilizadas en este trabajo	26
Cuadro 6. Factores de virulencia y evaluación de la resistencia antimicrobiana de las cepas del estudio	27
Cuadro 7. Características de los genes y fragmentos utilizados en el método Clermont 2013	29
Cuadro 8. Oligonucleótidos y amplicón de los genes empleados en el esquema MLST de Achtman	31
Cuadro 9. Resultados de la determinación de grupos filogenéticos	36
Cuadro 10. Perfiles alélicos, secuencias tipo y complejos ST obtenidos	40
Cuadro 11. Filogrupos, serotipos, FV, resistencia a antibióticos y ST obtenidos	41
Cuadro 12. Filogrupos finales y origen de las cepas estudiadas	45

Figuras

Figura 1. Morfología de <i>E. coli</i> en diferentes medios de cultivo.....	4
Figura 2. Árbol de decisión del método triplex de filotipificación	13
Figura 3. Árbol de decisión del método cuádruplex de filotipificación	14
Figura 4. Posición de los genes utilizados en la MLST de Achtman en el cromosoma bacteriano	15
Figura 5. Distribución conocida de <i>T. truncatus</i> en México	20
Figura 6. Amplificación del gen <i>gadA</i>	35
Figura 7. Determinación de grupos filogenéticos por el método Clermont 2013	37
Figura 8. Representación gráfica de los grupos filogenéticos obtenidos	38
Figura 9. Amplificación de los genes de MLST de Achtman de la cepa 1	39
Figura 10. Dendrograma de las secuencias de los siete genes de la MLST de Achtman.	43
Figura 11. Dendrograma de las ST de delfines en el esquema MLST de Achtman	44
Figura 12. Dendrograma de las ST confirmadas como filogrupo A, Clado I y II	46
Figura 13. Árboles de interés	48
Figura 14. Patotipos de las cepas de <i>E. coli</i> en los árboles de interés	49
Figura 15. Posición de las ST de interés en el Árbol 0	51
Figura 16. Posición de ST10, ST617 y ST986 en el Árbol 0	52
Figura 17. Posición de ST2016 y ST5166 en el Árbol 0	52
Figura 18. Subgrupo fundado por la ST617 en el Árbol 0	53
Figura 19. ST cercanas a la ST986, sección del Árbol 0	54
Figura 20. ST cercanas a la ST2016, sección del Árbol 0	55

Figura 21. ST cercanas a la ST5166, sección del Árbol 0.....	56
Figura 22. Posición de las ST de interés en el Árbol 1	57
Figura 23. Origen de las cepas del Árbol 1	58
Figura 24. Origen de las cepas del STc69 y ST cercanas	59
Figura 25. Posición de las ST de interés en el Árbol 3	60
Figura 26. Origen de las cepas del Árbol 3	61
Figura 27. Posición de las ST de interés en el Árbol 6	62
Figura 28. Origen de las cepas del Árbol 6..	63
Figura 29. Posición de la ST de interés en el Árbol 7	64
Figura 30. Origen de las cepas del Árbol 7	65
Figura 31. Acercamiento del Árbol 7	66
Figura 32. Origen de las cepas del Árbol 30	67
Figura 33. Posición de la ST de interés en el Árbol 31	68
Figura 34. Origen de las cepas del Árbol 31	69
Figura 35. Posición de la ST de interés en el Árbol 38	70
Figura 36. Origen de las cepas del Árbol 38	71
Figura 37. Árbol <i>singleton</i> 1314	72

1. Introducción

1.1. *Escherichia coli*

1.1.1. Características generales de *E. coli*

El género *Escherichia*, miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, ha sido aislado tanto de individuos endotérmicos como ectotérmicos, vertebrados e invertebrados, especies animales domésticas, de vida libre y humanos, además de ser encontrado en plantas, suelo y cuerpos de agua alrededor de todo el planeta.^{1,2,3,4,5} Dentro de este género, *Escherichia coli* (*E. coli*) es la especie bacteriana más estudiada (Cuadro 1).⁶

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Escherichia coli*

Dominio: Bacteria	Reino: Bacteria
Phylum: Proteobacteria	Clase: Gamma Proteobacteria
Orden: Enterobacteriales	Familia: <i>Enterobacteriaceae</i>
Género: <i>Escherichia</i>	Especie: <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)

E. coli ha sido empleada como indicador de contaminación de agua, alimentos y medio ambiente, y es un modelo para el estudio de gran variedad de tópicos, incluidos la estructura celular, crecimiento y metabolismo. Así mismo, ha sido ampliamente utilizada como vehículo de clonación.^{1,2} De 2010 a la fecha se tienen publicados más de 100,000 artículos científicos sobre *E. coli* y al consultar en el motor de búsqueda web más importante se obtienen casi dos y medio millones de resultados sobre esta bacteria.

E. coli es un bacilo Gram-negativo comensal del tracto gastrointestinal de organismos homeotermos que mide 2 a 3 µm de largo por 0.4 a 0.6 µm de ancho.^{6,7} Es un microorganismo anaerobio facultativo, no esporulado, con cápsula o microcápsula, que puede ser inmóvil o móvil por flagelos peritricos, puede crecer aeróbica o anaeróticamente,

preferentemente a 36°C y se aísla de muestras de heces usando medios de cultivo selectivos.^{1,2,6,7}

En algunos estudios en mamíferos se ha sugerido que el nicho ecológico de *E. coli* es el aparato digestivo de animales con modificaciones intestinales que permitan fermentación microbiana o cuya masa corporal sea mayor a un kilogramo de peso lo que también ocurre en aves.^{1,8} Se ha demostrado que la densidad de *E. coli* varía dependiendo del tiempo de tránsito intestinal y de otros factores como tipo de dieta y hospedero.^{7,9} En el tracto gastrointestinal de mamíferos, *E. coli* forma parte de una microbiota compuesta por más de 500 especies de bacterias y en la cual se encuentra superada en proporción de 100:1 o hasta 10,000:1 por las bacterias anaerobias que forman parte de esta comunidad bacteriana.^{9,10}

1.1.2. Características genéticas de *E. coli*

Para poder competir por los nutrientes necesarios para su supervivencia, *E. coli* posee una gran plasticidad genética que se refleja en su cromosoma de tamaño variable de 4.6 a 5.3 millones de pares de bases y en un pangenoma de entre 10,000 y 16,000 genes.^{1,6,9,11} El pangenoma de *E. coli* está constituido por el *core* (la porción compartida por todas las cepas de la especie), mas todos los genes extras presentes en una o más cepas de la especie, pero no en todas. El *core* del genoma de esta bacteria es de aproximadamente el 20% de este acervo génico.^{1,11} Una *E. coli* típica posee entre 4,100 a 4,700 genes; mientras que las variantes patógenas pueden llegar a tener hasta 5,600 genes.^{1,6,9} *E. coli* posee la capacidad de perder y ganar genes para adaptarse a su nicho nutricional.^{1,6,13} Esto se debe a que el DNA puede transferirse entre organismos procariotas por mecanismos como conjugación, transformación y transducción, que se llevan a cabo por elementos genéticos móviles (EGM) como bacteriófagos, transposones o secuencias de inserción codificadas en

plásmidos e islas genómicas.^{1,6,14,15,16} Todos estos EGM forman parte del pangenoma de *E. coli*.¹⁷ Tanto en el *core* del genoma como en los EGM se encuentran codificados factores de virulencia que hacen de esta bacteria una de las mejores adaptadas a las características particulares del tracto digestivo de los organismos homeotermos y le permiten sobrevivir en otros ambientes.^{1,8,16,17}

1.1.3. Métodos de identificación de *E. coli*

1.1.3.1. Métodos tradicionales

Dentro de los métodos de identificación para *E. coli* se encuentran las pruebas convencionales, que incluyen el cultivo y las pruebas bioquímicas y fenotípicas, las cuales son utilizadas de forma rutinaria en la mayoría de los laboratorios.^{1,2,6,7}

1.1.3.1.1. Medios de cultivo

Para el aislamiento e identificación se puede utilizar el cultivo en medios selectivos y diferenciales.^{2,7} La identificación por medios de cultivo se basa en sus características fenotípicas.^{2,6,7} Por ejemplo, el cambio de pH debido a la fermentación de lactosa puede ser usado para diferenciar entre cepas de *E. coli* fermentadoras y no fermentadoras, en donde cepas lactosa-positivas se observan de color rojo o rosas en medios como agar MacConkey.^{2,7}

Existen más de 10 medios de cultivo diferenciales para *E. coli* que son empleados a nivel clínico, ambiental y en la industria de alimentos.^{2,7,18,19} Entre éstos se encuentran el medio eosina-azul de metileno (EMB) con el que se puede diferenciar *E. coli* de organismos Gram positivos y otras enterobacterias como especies de *Enterobacter*, el sorbitol-MacConkey (SMAC) que se utiliza para detección presuntiva del serotipo O157:H7 de *E. coli* (Figura 1) y el agar EC-MUG que se utiliza en muestras de agua y en el que el substrato 4-

metilumbeliferil- β -D-glucorónido (MUG) es transformado por la enzima β -D-glucuronidasa (GUD) de *E. coli* en 4-metilumbeliferona, que se caracteriza por ser fluorescente al iluminarse con una lámpara de luz UV de 366 nm, lo que permite su detección en forma inmediata.^{2,3,7,18,19,20}

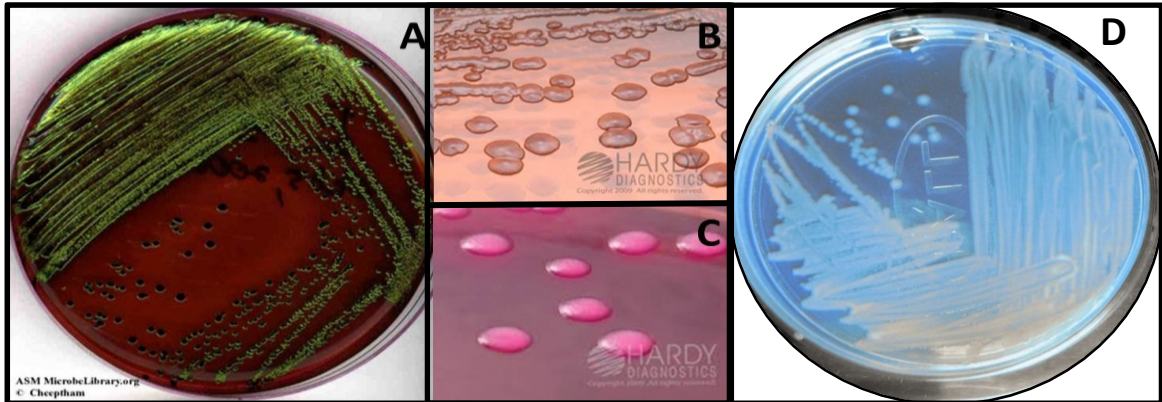


Figura 1. Morfología de *E. coli* en diferentes medios de cultivo. A: Aislamiento de *E. coli* en agar EMB. B: Aislamiento de cepa de *E. coli* no fermentadora de la lactosa en medio SMAC. C: Aislamiento de cepa de *E. coli* fermentadora de lactosa en medio SMAC. D: Aislamiento de *E. coli* en medio EC-MUG iluminado con luz UV de 366 nm. Tomadas de las páginas electrónicas de Hardy Diagnostics¹⁸ y de ASM Microbe Library¹⁹.

1.1.3.1.2. Pruebas bioquímicas

Algunas de las pruebas bioquímicas clásicas para la detección rutinaria de *E. coli* son: producción de indol a partir de triptófano (positivo 98%); rojo de metilo (positivo 99%), el cual es un indicador de pH que se torna de color rojo como producto de la acidificación del caldo de glucosa, causada por la formación de una mezcla de ácidos carboxílicos originados del piruvato; Voges-Proskauer (negativo), que evalúa la producción de acetoína a partir del piruvato en un caldo de glucosa; y citrato de Simmons (positividad de 0 - 1%), que evidencia la habilidad para utilizar citrato como única fuente de carbono.^{2,7,13} Estas cuatro pruebas son conocidas como IMViC. Además, existen otras pruebas que se usan para identificar fenotípicamente a *E. coli* (Cuadro 2).^{2,3,4,7}

Cuadro 2. Pruebas bioquímicas para la identificación de *E. coli*

Prueba bioquímica (Positividad %)	Prueba bioquímica (Positividad %)
DNasa a 25 °C (0)	Ornitina descarboxilasa (65)
Fermentación de eritritol (0)	Fermentación de glicerol (75)
Fermentación de α -metil-D glucósido (0)	Fermentación de melobiosa (75)
Fenilalanina desaminasa (0)	Fermentación de L-ramnosa (80)
Hidrólisis de gelatina a 22 °C (0)	Lisina descarboxilasa (90)
Lipasa [aceite de maíz] (0)	Utilización de Acetato (90)
Oxidasa (0)	Fermentación de D-sorbitol (94)
Utilización de malonato (0)	Fermentación de D-xilosa (95)
Voges-Proskauer (0)	Fermentación de lactosa (95)
Citrato de Simmons (1)	Fermentación de maltosa (95)
Fermentación de inositol (1)	Fermentación de mucato (95)
H ₂ S [ácido sulfhídrico] TSI [triple azúcar hierro] (1)	Gas de glucosa (95)
Hidrólisis de urea (1)	Movilidad a 36 °C (95)
Fermentación de celobiosa (2)	Tartrato de Jordán (95)
Crecimiento en KCN [cianuro de potasio] (3)	Fermentación de D-manosa (98)
Fermentación de adonitol (5)	Fermentación de D-manitol (98)
Fermentación de D-arabitol (5)	Producción de indol (98)
Arginina dihidrolasa (17)	Fermentación de trehalosa (98)
Hidrólisis de la esculina (35)	Fermentación de L-arabinosa (99)
Fermentación de salicina (40)	Rojo de metilo (99)
Fermentación de la rafinosa (50)	Ácido de glucosa (100)
Fermentación de la sacarosa (50)	Nitrato a nitrito (100)
Fermentación de dulcitol (60)	

Tomado y modificado de Markey 2013², McVey 2013⁷ y Rodríguez-Ángeles 2002¹³.

1.1.3.2. Métodos moleculares

Las técnicas tradicionales de cultivo y de identificación pueden ser muy laboriosas y tardadas, por lo que se han implementado métodos moleculares, los cuales permiten la detección más rápida y precisa de *E. coli*.^{2,7,21,22}

Una de las técnicas moleculares más empleadas es la Reacción en Cadena de la Polimerasa

(PCR).²³ En términos generales, en esta técnica se obtiene un gran número de copias a partir de un fragmento original de DNA específico. Para esto las dos cadenas que conforman el DNA son separadas y cada una es usada como plantilla para producir una nueva cadena complementaria.²⁴ Esta síntesis se basa en el apareamiento de bases reconocido por Watson y Crick (1953)²⁵ en donde adenina (A) siempre se para con timina (T) y guanina (G) con citosina (C); esto significa que la cadena original especifica la secuencia de bases de la nueva cadena complementaria de DNA.²⁴

Existen diferentes marcadores genéticos empleados para confirmar la identidad de especímenes del género *Escherichia* mediante su amplificación por PCR: el gen de la subunidad ribosomal 16S (16S rDNA²⁶), que se encuentra en todas las especies bacterianas pero que difiere en longitud entre ellas; el gen *uidA* que codifica para la enzima β -D-glucuronidasa (GUD), este gen también se ha detectado en *Shigella* spp, *Escherichia fergusonii* y *Escherichia vulneris*, por lo tanto no es específico de *E. coli*^{20,26}; y el gen *gadA*, que codifica para una de las subunidades de la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD) y que forma parte de un sistema de resistencia a la acidez del cual también forma parte el gen homólogo *gadB* y *gadC* (antiporter de GABA); es específico de *E. coli* y se estima que puede identificar al 99% de las cepas de esta especie.^{20,21,27,28,29}

1.1.4. Clasificación de *E. coli*

La presencia de diferentes variantes de *E. coli* ha sido descrita desde hace tiempo^{13,17,30,31}, esta diversidad genética es de dos a tres veces mayor que la estimada para especies eucariotas.³⁰ En forma general puede clasificarse a la cepas de *E. coli* por sus grados de patogenicidad de la siguiente manera:^{6,7,32,33,34}

-Cepas saprófitas; son propias del medio ambiente, no infectan a un hospedero.

-Cepas comensales; colonizan a un hospedero sin causar enfermedad.

-Cepas patógenas; causan enfermedad en el hospedero al que infectan. Existen dos divisiones: patógenas intestinales y patógenas extraintestinales.^{1,2,6,7,32,33,34}

Existen diferentes métodos para clasificar a *E. coli*, tales como la serotipificación, la división por patotipos, la caracterización de factores de virulencia e islas genómicas, la determinación de grupos filogenéticos y la tipificación por secuencias multilocus, entre otros.^{1,3,11}

1.1.4.1. Serotipificación

Esta clasificación tiene como base la determinación de antígenos somáticos (O), capsulares (K) y flagelares (H).³¹ Aunque históricamente se han descrito 186 variedades para el antígeno O, en la actualidad se reconocen solo 174 grupos (del O1 al O181, excepto los grupos O31, O47, O67, O72, O93, O94 y O122 que fueron descartados), cuatro de los cuales fueron divididos en subtipos: O18ab/ac, O28ab/ac, O112ab/ac y O125ab/ac. Para el antígeno K existen 80 tipos distintos. Para el antígeno H se reconocen 53 tipos diferentes (de H1 a H56, menos H13, H22 y H50); la designación NM o H- se refiere a que la cepa es no-móvil. Cuando no es posible tipificar alguno de los antígenos O o H en un cepa, al serotipo de esta cepa se le denomina como no tipificable (NT), ya sea ONT o HNT, respectivamente.^{1,6,32,35,36}

Un serogrupo es una variedad antigénica basada únicamente en el antígeno O (lipopolisacárido).^{1,31,33} Un serotipo es una distinta variedad antigénica dentro de la especie *E. coli*; esto se basa en la combinación de los tres antígenos O, K y H siendo la combinación O:H la de mayor uso.^{15,31,36} Se ha descrito la relación entre algunos serogrupos y serotipos con patotipos y hospederos específicos.¹ En animales como los

cerdos y bovinos existen los serogrupos O8, O91, O101, O138, O139, O141 y O26, O45, O103, O111, O121 y O145, respectivamente.^{1,32,37,38,39,40,41,42,43} Además se ha encontrado que los bovinos son hospederos del serogrupo O157.^{41,42,43}

La serotipificación tradicional es una técnica que requiere mucho tiempo para realizarla y se han descrito diversos problemas para esta metodología, entre ellos: la reacción cruzada de los antisueros con diferentes serogrupos, la necesidad de una gran cantidad de antisueros que solo laboratorios especializados poseen, las variaciones entre lotes de anticuerpos y que varias cepas de *E. coli* no son tipificables.^{1,32,36,37,43,44}

Actualmente se han elaborado protocolos para la amplificación vía PCR de los genes involucrados en la síntesis de los antígenos O (*wzx*, *wzy*, *wzm* y *wzt*), y H (*fliC*) pero aún no se pueden detectar todos los posibles serotipos debido a que no se tienen todas las secuencias e iniciadores.^{15,45,46} En la actualidad existen diferentes técnicas moleculares que permiten la caracterización de las diferentes cepas de *E. coli* de una forma más rápida y precisa.^{1,22,32,36}

1.1.4.2. Clasificación por patotipos

Esta clasificación es específica para cepas patógenas. Un patotipo es una población, dentro de una misma especie, que difiere de otras por sus propiedades de virulencia y el tipo de daño que provocan.¹

En general se pueden clasificar a las cepas patógenas en dos divisiones:

- Cepas patógenas intestinales (IPEC), con 7 patotipos: enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), enterohemorrágica (EHEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC), adherente difusa (ADEC/DAEC) y adherente invasiva (AIEC).

- Cepas patógenas extraintestinales (ExPEC), con 3 patotipos: uropatógena (UPEC), patógena aviar (APEC) y asociada a meningitis neonatal (NMEC).^{1,2,3,7,11,12,16,37}

Existen numerosos reportes de la relación entre ciertos patotipos y algunos serogrupos y serotipos. Para EPEC los principales serogrupos asociados son: O26, O51, O55, O111, O119 y O145; para STEC se han reportado los llamados “seis grandes” (O26, O45, O103, O111, O121 y O145), además del serotipo O157:H7 fuertemente asociado a EHEC; para ETEC los serotipos más frecuentes son O6:H6, O8:H9, O25:NM, O78:H12, O148:H28 y O153:H45; por último se ha reportado la asociación de los serogrupos O1, O2, O4, O6, O8, O9, O18 y O83 con UPEC.^{1,32,33,37,44,38,39,40,41,42,43}

Los patotipos están determinados por una combinación de factores de virulencia, que se definen como productos microbianos no esenciales que le permiten a un patógeno causar daño (pueden incluirse algunos componentes esenciales para su viabilidad).^{1,47}

E. coli posee una gran variedad de factores de virulencia, tales como: adhesinas (fimbriales y afimbriales), cápsula, enterotoxinas, hemolisinas, sistemas de captación de hierro y un sistema de secreción tipo tres a través del cual son translocadas varias proteínas, entre las cuales se encuentra la intimina y su receptor translocado (Tir por sus siglas en inglés) y las proteínas secretadas por *E. coli* (EspA-D, codificadas por los genes *esp*).^{1,3,11,13,22,32,33,47}

Algunos de los genes asociados a enfermedad intestinal son: *eltA*, *estA*, *stx1*, *stx2* y *astA* que codifican toxinas, los genes *sat* y *pic* que codifican serin-proteasas autotransportadoras de *Enterobacteriaceae* (SPATE) y los genes *eaeA* (que codifica la intimina) y *bfp* (que codifica el pili formador de cúmulos), que participan en la adhesión.^{1,11,13,22,32,33} Algunos de los genes asociados con enfermedad extra intestinal son los que codifican adhesinas (*papG*, *sfa/focG*), el factor citotóxico necrosante (*cnfI*), el factor para invasión del endotelio

cerebral (*ibeA*), receptores de hierro-sideróforos como *fyuA*, *iroN* y la hidrolasa *ompT*.^{1,4,37,43,49}

Los genes que codifican para factores de virulencia pueden encontrarse tanto en el cromosoma como en EGM. Un ejemplo de esto es el gen *eae* contenido en la isla de patogenicidad LEE (Locus de Esfascelamiento de Enterocitos).¹ Las islas de patogenicidad (PAI) son EGM que representan regiones grandes de DNA cromosomal de 10-500 kb, que han sido adquiridas vía transmisión genética horizontal (HGT), tienen baja estabilidad genética, contienen genes que codifican factores de virulencia y generalmente están insertadas próximas a genes de RNA de transferencia (tRNA).^{1,6,50} Además una PAI típica está flanqueada por secuencias de repetición directa, posee múltiples secuencias de inserción (IS) funcionales y fragmentadas, transposasas, así como también un gen funcional de integrasa (*int*) y tiene un contenido de G+C menor al resto del genoma bacteriano, es decir, son regiones ricas en adenina y timina y están presentes solo en organismos patógenos.^{1,6,33,49,50,51} Existen elementos casi idénticos en cepas comensales, éstos son conocidos como islas genómicas y contienen un gran número de genes que codifican factores que pueden incrementar la adaptabilidad o supervivencia bajo ciertas condiciones del ambiente, además que pueden contener marcadores genéticos de algunas PAI.^{6,49,50}

En el serotipo O157:H7 de EHEC existen las llamadas islas-O, de las cuales se han contabilizado hasta 177, algunas de éstas codifican toxinas como OI#7, OI#28 y OI#122, y adhesinas como OI#47.^{1,6,51} En cepas de UPEC se conocen más de 20 PAI siendo las 8 mejores estudiadas: PAI I-IV₅₃₆, PAI I y II₉₆ y PAI I y II_{CFT073}.⁴⁹ Bateman *et al* (2013) proponen a la PAI-X, que posee el gen regulador del pili tipo 1 *fimX*, como marcador molecular para diferenciar entre UPEC y cepas comensales.^{49,51,52} Además se han

identificado otros factores de virulencia (sistemas de captación de hierro, vías de metabolismo, resistencia a antibióticos) contenidos en diferentes PAI, como los elementos tipo-profago de Sakai (SPLE), GimA, isla que confiere adherencia y resistencia a telurita (TAI), isla de alta patogenicidad (HPI) y PAI-EspC.^{6,52}

PAI-LEE es la isla más estable y estudiada de *E. coli*, tiene un tamaño de 35.6 kb y confiere a la bacteria la capacidad de inducir la llamada lesión AE (adherencia y esfascelamiento).^{1,6,52} LEE está compuesta de 41 marcos de lectura abiertos (ORFs) distribuidos en 5 operones y organizados en tres dominios funcionales: uno que contiene los genes *eae* y *tir*, un segundo dominio que codifica el sistema de secreción tipo III y un tercero en donde se ubican los genes *esp* que codifican las proteínas secretadas de EPEC.^{1,6,50,51}

Los genes que codifican para factores de virulencia se emplean como marcadores genéticos específicos para la caracterización de la cepas *E. coli* en sus diferentes patotipos.^{1,13} Así, una EPEC típica (tEPEC) posee *eae* y *bfp* (*eae*⁺, *bfp*⁺) y carece de *stx* (*stx*⁻); una EPEC atípica (aEPEC) es *bfp*⁻, *stx*⁻ y *eae*⁺; STEC/EHEC son *stx*⁺, *eae*⁺, aunque no todas las cepas poseen el gen *eae*; EIEC es *ipaH*⁺ (*invasión plasmid antigen H*) e *ial*⁺ (locus asociado a invasión); EAEC es *aatA*⁺ (gen plasmídico que codifica para la proteína AatA de membrana externa) y *aaiC*⁺ (que codifica para la proteína AaiC secretada por la cepa prototípica 042), aunque el regulador AggR y el fenotipo de adherencia agregativa siguen siendo lo más característico; ETEC es *estA*⁺ (toxina termoestable ST) y *eltA*⁺ (toxina termolábil LT); finalmente para ADEC y AIEC no se tienen marcadores genéticos establecidos, aunque para el ADEC se ha usado la presencia de la fimbria F1845 (gen *daaC*) como marcador.^{1,11,13,32,33} Los patotipos extraintestinales no se caracterizan por poseer un grupo reducido de

marcadores genéticos específicos, sino por presentar una combinación de varios factores de virulencia, como adhesinas, sistemas de captación de hierro y toxinas.^{1,12,16,34,37,44,49}

La identificación de los factores de virulencia e islas de patogenicidad permite conocer el patotipo al cual pertenece un aislamiento y por tanto su importancia clínica.

1.1.4.3. Grupos filogenéticos

La existencia de distintos filogrupos o subespecies de *E. coli* ha sido reconocida desde hace tiempo y es el resultado de varios estudios de filogenia y análisis de agrupamiento empleando enzimas o genes multilocus.^{1,12,30,53} Tradicionalmente se admitían solo los grupos filogenéticos A, B1, B2 y D^{30,54}, con el grupo E solo aceptado por pocos investigadores debido a su aparente errático agrupamiento^{1,54}, pero ahora se reconocen también los grupos C, E, F y el clado críptico I como subespecies de *E. coli*.^{1,55,56,57,58}

Los miembros de los Clados Crípticos II, III, IV y V se consideran como cepas relacionadas a estas especies de *Escherichia* que son fenotípicamente indistinguibles de *E. coli* y que tienen características genéticas similares.^{1,57,58}

Numerosos estudios han demostrado que la distribución de los grupos filogenéticos A, B1, B2 y D de *E. coli*, determinada con el método de filotipificación por PCR triplex de Clermont, no es aleatoria.^{1,8,59} Por ejemplo, entre vertebrados australianos las cepas del filogrupo B1 han sido más frecuentemente aisladas de ranas, reptiles, aves y mamíferos carnívoros; mientras que el filogrupo B2 es raro en estas especies.^{1,8}

Los filogrupos A y B1 han sido reportados como los predominantes en habitantes de países en vías de desarrollo, mientras que entre los habitantes de países industrializados, el grupo B1 es poco frecuente.¹ Tradicionalmente, se ha descrito a las cepas comensales como miembros de filogrupos A y B1 y a las cepas patógenas extraintestinales como miembros

del filogrupo B2 y en menor medida del D.¹

Para determinar los grupos filogenéticos de *E. coli*, Clermont desarrolló en el año 2000 un protocolo de filotipificación mediante el uso de PCR, que consistió en la amplificación de los fragmentos de tres genes: *chuA* (codifica un receptor de membrana externa), *yjaA* (codifica una proteína inducida por estrés) y TspE4.C2 (secuencia genética de una posible lipasa esterasa).⁵⁴ La presencia o ausencia del amplicón, auxiliada con un árbol de decisión, determina el grupo filogenético (Figura 2). Este método triplex permitía tipificar del 85% al 90% de las cepas de *E. coli*.⁵⁴

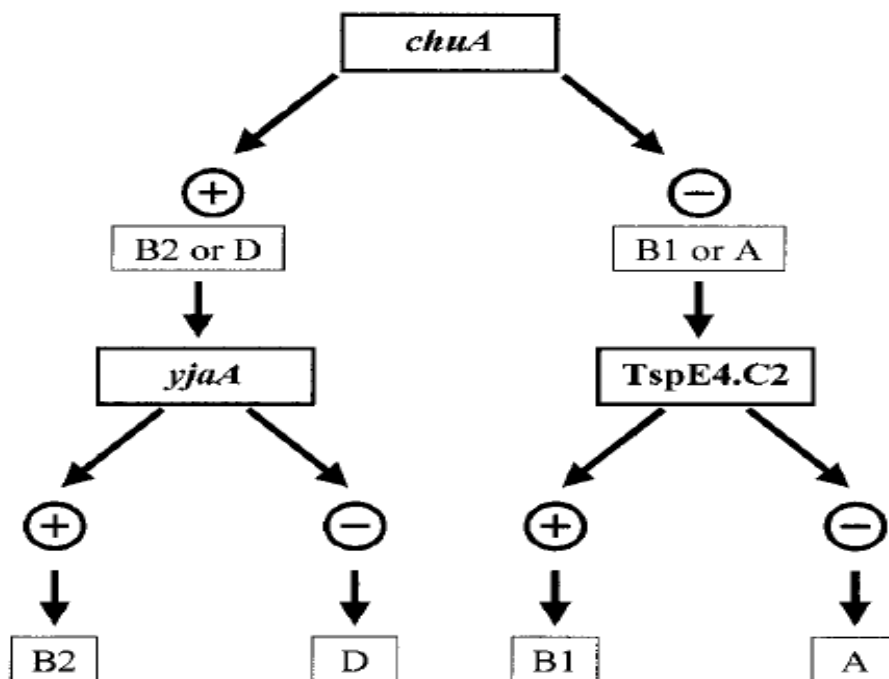


Figura 2. Árbol de decisión del método triplex de filotipificación. Se muestran los genotipos posibles. Tomado de Clermont *et al* 2000.⁵⁴

En 2013, Clermont realizó una actualización a este método de PCR triplex: se agregó el gen *arpA* como control interno, con lo que se convirtió en una PCR cuádruplex. Además, para diferenciar correctamente entre los filogrupos A y C, y D y E, se implementó un segundo

paso que consiste en la amplificación de los fragmentos *ArpgpE* y *trpBA* para discriminar entre D y E; o la amplificación de los fragmentos *TrpAgpC* y *trpBA* para los grupos A y C.⁵⁵ De igual forma, la presencia o ausencia de cada fragmento determina el grupo filogenético (Figura 3). Este método cuádruplex actualizado de filotipificación por PCR, permite asignar correctamente un filogrupa al 95% de la cepas de *E. coli*.^{11,54}

Además, se amplió la posibilidad de identificar a todos los filogrupos (A, B1, B2, C, D, E, F, Clado I), al Clado II y al grupo U.^{55,56,61}

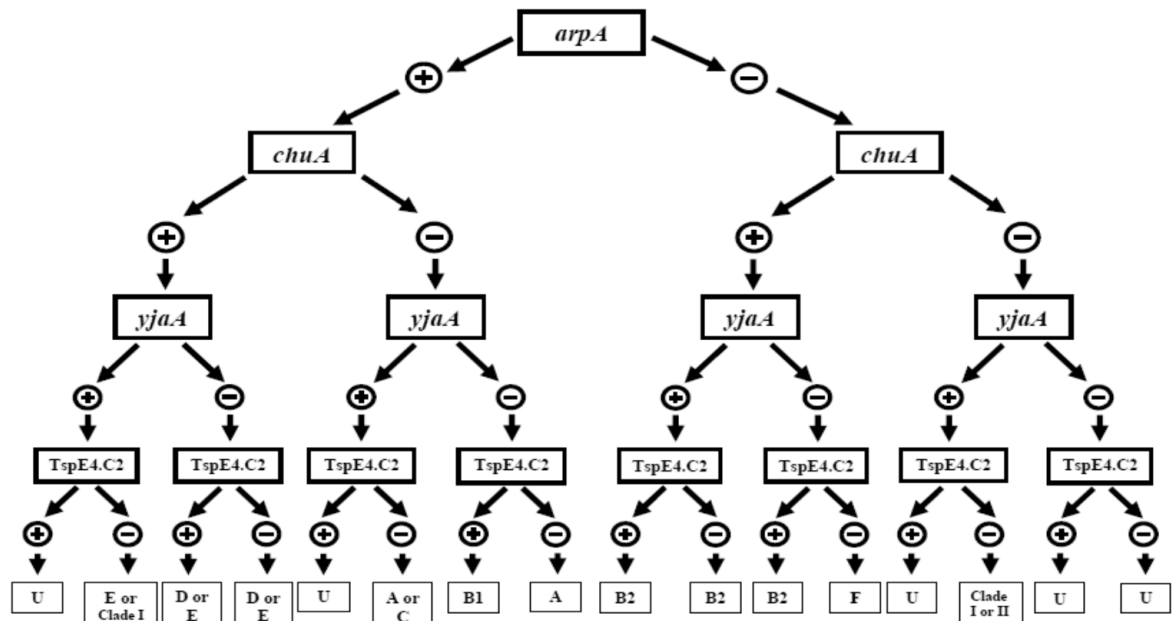


Figura 3. Árbol de decisión del método cuádruplex de filotipificación. Se muestran los genotipos posibles de la primera PCR. Tomado de Clermont *et al* 2013.⁵⁵

1.1.4.4. Tipificación por secuencias multilocus (MLST)

La Tipificación por Secuencias Multilocus (MLST por sus siglas en inglés), es un método definitivo de genotipificación de DNA bacteriano a nivel infraespecífico, en el que se detectan variaciones alélicas de fragmentos internos, de 400 a 500 pares de bases (pb), de genes conservados o de mantenimiento (*housekeeping*).⁶²⁻⁶⁹ Estos genes se encuentran

distribuidos a lo largo del cromosoma (Figura 4), forman parte del *core* del genoma, codifican proteínas que participan en procesos metabólicos fundamentales y tienen una tasa de recombinación moderada, lo que permite la identificación de grupos de microorganismos con una alta relación genética.^{65,66,67}

En MLST, los cambios de sustitución, delección o adición de cada base individual entre loci son ignoradas y a los alelos se les asignan diferentes números de perfil alélico ya sea que difieran en un solo nucleótido o en varios.^{66,69}

El argumento es que un solo evento genético resultante en un nuevo alelo puede ocurrir por mutaciones puntuales o por recombinación alterando un solo sitio o varios sitios respectivamente.⁶⁴⁻⁶⁹

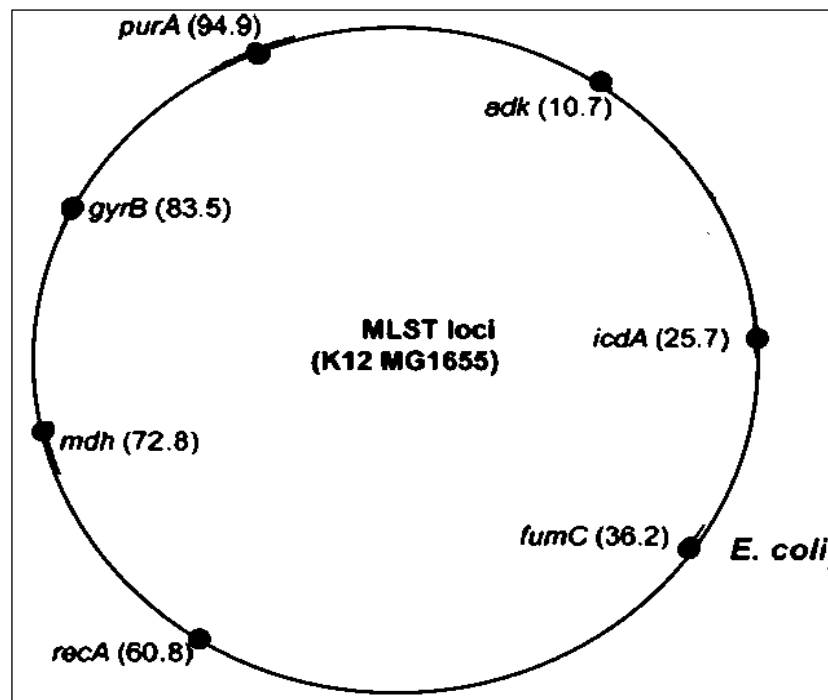


Figura 4. Posición de los genes utilizados en la MLST de Achtman en el cromosoma bacteriano. Entre paréntesis se indica el centisoma correspondiente. Modificado de Wirth *et al* 2006.⁶⁶

La variación en estas secuencias es asignada como distintos alelos en cada uno de los *loci*

empleados (2 a 15 genes), la combinación de estos da como resultado una secuencia tipo (conocida como ST).^{62,63,69} Una de las grandes ventajas de este método es que puede ser reproducido de manera eficaz en diferentes laboratorios y países.⁶²⁻⁶⁵

Esta ST permite, de manera global, rastrear el origen y la distribución de estas cepas con un 100% de precisión.^{62,63,64,65}

La secuenciación de los fragmentos internos de solo 7 genes de mantenimiento, empleados en MLST, brinda suficientes sitios polimórficos para caracterizar cepas estrechamente relacionadas de la mayoría de las especies bacterianas.^{56,66,67,68}

La accesibilidad a la información generada por los esquemas de MLST existentes es un factor que ha promovido el uso de esta técnica.^{1,61}

Actualmente MLST es el único método que puede detectar cepas pertenecientes a los grupos filogenéticos C, E, F e incluso a los clados crípticos de *E. coli*; además es útil para demostrar relaciones filogenéticas de una gran colección de linajes bacterianos.^{1,66}

Existen tres esquemas públicos de bases de datos:

1. El esquema EcMLST (<http://www.shigatox.net/ecmlst>), desarrollado y administrado por el Laboratorio de Evolución Microbiana de la Universidad Estatal de Michigan^{70,71};
2. El esquema del *Institut Pasteur* en la página electrónica de *Escherichia coli* MLST database (<http://bigsdw.web.pasteur.fr/>)⁷²;
3. El esquema de Achtman o MLST.NET albergado en la Universidad de Warwick (<http://www.mlst.net>, luego <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli> y finalmente <http://enterobase.warwick.ac.uk> activo desde diciembre 2015)⁶⁸.

1.1.4.4.1. Esquema EcMLST

EcMLST solo recopila información para cepas patógenas y ofrece tres formas de

tipificación basadas en el número de alelos a estudiar. La primera se llama st2 y emplea los genes *mdh* y *uidA*, luego st7 que incluye cinco genes más además de los utilizados en st2 (*aspC*, *clpX*, *fadD*, *icdA* y *lysP*) y finalmente st15 que suma ocho genes más (*arcA*, *aroE*, *cyaA*, *dnaG*, *grpE*, *mtlD*, *mutS* y *rpoS*).⁷¹ La opción más empleada es la tipificación st7, con poco más de 1187 secuencias tipo (ST), 84 grupos clonales y casi 4100 cepas registradas a la fecha. En los casos en que no se amplifica uno de los alelos, el curador bioinformático agrega un signo negativo antes del número de la ST.⁷⁰

1.1.4.4.2. Esquema Pasteur

El esquema Pasteur se basa en la amplificación de ocho genes: *dinB*, *icdA*, *pabB*, *polB*, *putB*, *trpA*, *trpB* y *uidA*.⁷² En esta base de datos pública se tienen registrados 749 ST y 1,032 cepas.^{72,73} La información sobre metadatos (origen del aislamiento, filogrupos, país, serotipo, etc) es muy limitada.⁷²

1.1.4.4.3. Esquema de Achtman

En el esquema de Achtman se tienen registradas 58,830 cepas, aproximadamente 7,200 ST y 55 complejos ST (STc) a la fecha (29 de junio de 2017), lo que convierte a este esquema en el más aceptado aunque no necesariamente el de mayor resolución.^{61,68} Los STc son agrupamientos de al menos tres ST con seis alelos iguales en comparaciones pareadas y que tienden a compartir características genéticas y fenotípicas.^{62,68,74}

Los siete genes de mantenimiento empleados en el esquema de Achtman son: *adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* y *recA* (Cuadro 3).^{66,68} Todos estos genes son parte del *core* del genoma y están implicados en funciones fundamentales para la célula bacteriana.^{17,48} De estos genes, tres codifican para enzimas que participan en el ciclo de Krebs: fumarasa C (*fumC*), isocitrato deshidrogenasa (*icd*) y malato deshidrogenasa (*mdh*)^{6,66,68,75}; dos

codifican para enzimas en los procesos de síntesis de bases nitrogenadas: la adenilato cinasa (*adk*) y la adenilosuccinato deshidrogenasa (*purA*)^{66,75}; los últimos dos codifican enzimas que interaccionan directamente con el DNA, ya sea para su recombinación como la recombinasa A (*recA*) o para la replicación como la DNA girasa (*gyrB*).^{6,66,75}

Cuadro 3. Genes usados en el esquema MLST de Achtman

Gen (Tamaño)	Codifica para	Función	Polimorfismo %
<i>adk</i> (645 pb)	Adenilato cinasa	Cataliza la transferencia reversible del grupo fosfato terminal entre ATP y AMP. Tiene un papel importante en la homeostasis energética celular y el metabolismo del nucleótido adenina	14%
<i>fumC</i> (1,404 pb)	Fumarato hidratasa / Fumarasa C	Cataliza la adición reversible de agua a fumarato para volverlo L-malato	20%
<i>gyrB</i> (2,415 pb)	DNA girasa	Subunidad B de la DNA girasa y cataliza la interconversión de otros isómeros topológicos de anillos de DNA de doble cadena	12.5%
<i>icd</i> (1,251 pb)	Isocitrato (isopropilmalato) deshidrogenasa	Es una óxidorreductasa que se une a NAD, Mg y Mn	13%
<i>mdh</i> (939 pb)	Malato deshidrogenasa	Cataliza la oxidación reversible de malato a oxaloacetato	11%
<i>purA</i> (1,299 pb)	Adenilosuccinato deshidrogenasa	Tiene un papel importante en la biosíntesis <i>de novo</i> de nucleótidos de purina. Cataliza el primer paso en la biosíntesis de IMP a AMP	8%
<i>recA</i> (1,062 pb)	Recombinasa A / Patrón de unión a ATP/GTP	Requerido para recombinación homóloga y para reparación de DNA por respuesta SOS	10%

Tomado y Modificado de Wirth *et al* 2006⁶⁶, MLST.NET⁶⁸ y UniProtKB⁷⁵.

En México, por medio de MLST del esquema de Achtman, se han caracterizado cepas de *E. coli* de origen humano, aves, caballos, armadillos, mono aullador, jaguar y mapaches, entre otros.⁶⁸

La caracterización de cepas mediante el esquema MLST de Achtman permanece vigente, a

pesar de que se estima que la secuenciación completa de genomas (WGS) por equipos de secuenciación de siguiente generación (NGS) reemplace a esta clase de tipificación y a la mayoría de los métodos basados en PCR. Para los equipos de NGS se han creado protocolos bioinformáticos y herramientas de análisis para tipificar cepas con base en la nomenclatura de MLST de Achtman.^{44,61,74} En la actualidad EnteroBase, el sitio sucesor a MLST.NET de la Universidad de Warwick, ha incorporado los resultados de WGS y MLST de NGS a su base datos, por lo que su acervo persistirá por mucho tiempo.^{36,61,69}

1.2. *Tursiops truncatus* (*T. truncatus*)

1.2.1. Generalidades de *T. truncatus*

Los mamíferos marinos forman un grupo heterogéneo que abarca 129 especies en tres órdenes; de éstas, 28 están consideradas amenazadas o en peligro de extinción⁷⁶, por lo que en los últimos tres años ha habido un aumento en la cantidad de estudios moleculares para entender la relación entre los miembros de este grupo, su microbioma y sus diferentes agentes patógenos.

El delfín nariz de botella (*T. truncatus*, Montagu 1821)⁷⁷, pertenece a la familia *Delphinidae* del orden *Cetacea*; es un mamífero marino de distribución mundial, que habita en aguas tropicales y cálido-templadas, y que se caracteriza por tener hábitos costeros y pelágicos.⁷⁶ Los límites de distribución de las poblaciones costeras de *T. truncatus* están demarcados por características fisiográficas como estrechos o cambios bruscos en profundidad del agua.⁷⁸ *T. truncatus* es considerada una “especie carismática o bandera” en términos de conservación, aunque no se encuentra amenazada o en peligro de extinción.^{77,79}

1.2.2. Situación de *T. truncatus* en México

Esta especie de delfín habita en aguas continentales y oceánicas mexicanas (Figura 5)⁸⁰, y

se encuentra sujeta a protección especial por la NOM-059-ECOL-2010.⁷⁷ México alberga una de las colecciones más grandes de *T. truncatus* en sus acuarios, delfinarios y parques de espectáculos, y aunque no hay un censo accesible al público, de acuerdo con un reportaje existían al menos 270 ejemplares registrados en 2013⁸¹ y se estima que esta cantidad se mantiene actualmente en la república mexicana (2017).⁸²

El manejo y cuidado de esta especie se encuentra regulado por la norma oficial mexicana NOM-135-SEMARNAT-2004, en la que se establece el monitoreo de la calidad del agua que habitan.⁸³ Además los principales delfinarios se encuentran asociados en la Alianza de Parques de Mamíferos Marinos y Acuarios (www.ammpa.org) la cual exige la revisión semanal de la cantidad de bacterias coliformes y *E. coli* presentes en el agua.



Figura 5. Distribución conocida de *T. truncatus* en México. Los puntos de color negro representan 66 registros de ejemplares colectados u observados en campo del año 1956 al 2000. Tomado y modificado de SNIB-CONABIO, 2016.⁸⁰

1.2.3. *T. truncatus* y *E. coli*

Los organismos marinos, particularmente los mamíferos, son considerados como especies centinelas sensibles que pueden advertirnos sobre problemas inminentes de salud humana originados por patógenos presentes en diferentes cuerpos de agua y hábitats.^{84,85} Esto se debe a dos factores principalmente: (1) son capaces de sondear o concentrar contaminantes, toxinas y/o patógenos de su ambiente y por lo tanto proveen más indicadores de los posibles efectos biológicos que si solo se muestreara el agua; (2) su dieta, fisiología y lugar en la cadena trófica son, al menos parcialmente, similares a los del ser humano y por ende pueden ser indicadores tempranos de los efectos potenciales que pueden tener en la salud pública, los diferentes agentes etiológicos encontrados en el ambiente estudiado.^{84,85}

El concepto de centinela marino nos aporta otra forma de evaluar la salud del ecosistema acuático y es usado para tener información sobre impactos actuales o potenciales impactos negativos en la salud animal a nivel individual y poblacional. Lo anterior se ha demostrado particularmente en delfines nariz de botella en vida libre o bajo cuidado humano.^{86,87,88,89,90}

En *T. truncatus*, *E. coli* es una de las bacterias Gram negativas más frecuentemente aisladas del recto, espiráculo, contenido gástrico y piel, tanto en poblaciones de vida libre como en colecciones bajo cuidado humano; existe evidencia de la identificación de la especie como microbiota normal, colonizando o como patógeno.^{86,91,92,93,94,95,96}

Venn-Watson y Stamper (2011) colocan a esta especie bacteriana dentro de los diez agentes patógenos de mayor importancia para la salud de cetáceos pequeños.⁹⁷

En el estudio más completo sobre microbiota en delfines bajo cuidado humano, Bik *et al* (2016), estudiaron muestras de cinco sitios anatómicos y señalan la gran riqueza de *phyla*, 30, (comparada con humanos que poseen 22 *phyla* en los mismos lugares) encontrada en *T.*

truncatus.⁹⁸ En la comunidad microbiana rectal se encontró al *phylum* Proteobacteria y en particular a la clase Gammaproteobacterias, de la cual *E. coli* es miembro, como la dominante.^{98,99} La gran mayoría de los estudios se basan en la identificación por cultivo y pruebas bioquímicas; adicionalmente buscan la posible resistencia a antibióticos de los aislamientos aunque no todos mencionan los antimicrobianos empleados y hay diferencias entre los puntos de corte usados en Europa y América.^{44,88,89,90,100}

1.2.3.1. Tipificación molecular de cepas de *E. coli* de *T. truncatus*

Existen escasas publicaciones donde se empleen técnicas moleculares o genéticas para la identificación o caracterización de cepas de *E. coli* provenientes de cetáceos. En lo concerniente a aislamientos de *E. coli* de mamíferos marinos, se han genotipificado 28 cepas de las que se tiene registro en el esquema de MLST de Achtman⁶⁸:

- 1 cepa de manatí de México;
- 2 cepas de nutrias de México;
- 4 cepas de focas (tres de la Antártida y una de Francia);
- 7 cepas de delfines nariz de botella (cinco de Francia y dos de México);
- 19 cepas de lobos marinos (catorce de Ecuador, dos de Francia y tres de la Antártida).

Además, en *T. truncatus* se ha reportado la cepa LV143 identificada en Portugal por Manageiro *et al*, que no se encuentra en la base de datos del esquema MLST de Achtman.^{68,100}

Yañez (2012) realizó la caracterización de cepas de *E. coli* provenientes de delfines usando el método original de filotipificación de Clermont.^{54,101} En la base de datos de MLST de Achtman se encontraron cinco cepas de *E. coli* de *T. truncatus* con grupos filogenéticos

caracterizados con el mismo método.⁶⁸ En 2015, Clermont *et al*⁶¹ realizaron la filotipificación mediante el método actualizado de PCR cuadrúplex de varias cepas registradas en la base de datos de MLST de Achtman, entre éstas se incluyeron las cepas provenientes de *T. truncatus*. En total, existen ocho ST de *E. coli* provenientes de *T. truncatus* (Cuadro 4).^{68,100}

Cuadro 4. Secuencias Tipo de *E. coli* procedentes de *T. truncatus*

Cepa	Genes							ST / STc	Filogrupo	Año
	<i>adk</i>	<i>fumC</i>	<i>gyrB</i>	<i>icd</i>	<i>mdh</i>	<i>purA</i>	<i>recA</i>			
EcBjDK	53	40	1	13	36	28	29	2185 /STc131	B2	2009
EcBjDK6	6	4	5	16	11	8	6	2186	B1	2009
EcBjDK11	6	4	33	16	9	8	6	2187	B1	2010
EcBjDA17	6	4	9	1	20	13	7	2188	B1	2010
EcBjDM31	34	36	78	87	67	16	4	2189	D	2010
R77	13	166	47	458	23	28	122	4283	B2	No info
R78	13	166	47	458	7	28	122	4284	B2	No info
LV143	53	40	47	13	36	28	29	131/STc131	No info	2010

ST: Secuencia Tipo. STc: Complejo ST. No info: Sin información al respecto. Con datos de Achtman, Clermont y Manageiro.^{61,68,100}

1.3. Justificación

En las instalaciones que albergan mamíferos marinos, el monitoreo de *E. coli* se hace de manera frecuente pero hay pocos estudios con respecto a la caracterización de las cepas. Mundialmente hay pocos estudios e información de aislamientos y cepas de *E. coli* en delfines, limitándose la mayoría a la identificación de la especie bacteriana y a la determinación de su resistencia a antibióticos. Debido a esto la genotipificación de cepas comensales por medio de Multilocus Sequence Typing complementará la base de datos de poblaciones genéticas preexistentes y generará la primera información de este tipo en México.

1.4. Hipótesis

Las cepas de *E. coli* comensales de delfín nariz de botella (*T. truncatus*) presentan diferentes secuencias tipo (ST).

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo general

Genotipificar mediante MLST cepas comensales de *E. coli* de delfín nariz de botella (*T. truncatus*).

1.5.2. Objetivos específicos

Identificar molecularmente las cepas comensales de *E. coli* aisladas de *T. truncatus* mediante la detección del gen *gadA*.

Determinar grupos filogenéticos mediante la detección del esquema propuesto por Clermont *et al* 2013.

Genotipificar las cepas comensales de *E. coli* aisladas de *T. truncatus* por medio de secuencias multilocus.

2. Material y Métodos

2.1. Cepas Bacterianas

Se utilizaron 19 cepas de *E. coli*, proporcionadas por el Departamento de Ecología de Agentes Patógenos del Hospital General Manuel Gea González, aisladas de respiráculo, recto, vagina y prepucio de delfín nariz de botella (*T. truncatus*) provenientes de 4 delfinarios con instalaciones cerradas y abiertas, de dos diferentes regiones de México. Estas 19 cepas fueron previamente trabajadas por Yañez en 2012¹⁰¹, quien las identificó con el sistema automatizado MicroScan™, determinó su grupo filogenético con el esquema de Clermont de 2000⁵⁴, y realizó la serotipificación por medio de los antígenos "O" y "H". Además, Yañez evaluó la susceptibilidad a diferentes agentes antimicrobianos e identificó tres factores de virulencia del patotipo enterohemorrágico de *E. coli* (EHEC) (Cuadro 5 y 6).¹⁰¹

Yañez reportó que todas las cepas fueron aisladas de individuos sanos y fueron caracterizadas como comensales para los delfines.¹⁰¹

Para fines de este trabajo, a las cepas utilizadas se les identificó con los números 1 a 19, siguiendo el orden alfabético.

Cuadro 5. Origen, filogrupo y serotipo de las cepas utilizadas en este trabajo

Cepa	Origen	Grupo Filogenético	Serotipo
1	Respiráculo	B2	O157:H7
2	Vagina	B2	ONT:H31
3	Recto	B1	O163:H19
4	Respiráculo	B1	O163:H19
5	Recto	B2	O75:H2
6	Recto	A	O140:H32
7	Respiráculo	D	ONT:H2
8	Vagina	D	O153:H2
9	Vagina	B2	O15:H7
10	Vagina	B2	O25:H42
11	Prepucio	B2	O32:H42
12	Respiráculo	A	O32:H42
13	Respiráculo	A	O101:HNT
14	Vagina	B2	O25:H4
15	Vagina	A	ONT:H42
16	Prepucio	B2	O15:H7
17	Recto	B1	O71:H14
18	Prepucio	A	O170:H16
19	Respiráculo	A	O170:H16

Tomado y modificado de Yañez 2012.¹⁰¹

Cuadro 6. Factores de virulencia y evaluación de la resistencia antimicrobiana de las cepas del estudio

Cepas	<i>eae</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	Resistencia completa	Resistencia intermedia
1	+	+	+	A/S, Am, Cp, Gat, Gm, Lvx, Pi	Aug, Cf, To
2	-	-	+	Ninguna	Ninguna
3	-	-	+	Ninguna	Ninguna
4	-	-	-	Ninguna	Ninguna
5	-	-	+	Ninguna	Ninguna
6	-	+	+	Ninguna	Ninguna
7	-	+	+	Am, Gm, Pi, T/S, To	A/S, Aug
8	-	+	+	Am, Gat, Lvx, T/S, To	A/S, Aug, Cf, Pi
9	-	-	+	Ninguna	Ninguna
10	-	-	+	A/S, Am, Cp, Gat, Gm, Lvx, Pi	Cf, To
11	-	-	+	BLEE (Cax, Caz) Am, Aug, Cf, Cfz, Crm, Gm	A/S, Ctn, Pi, To
12	-	-	+	BLEE (Azt, Cax, Caz) Am, Aug, Cf, Cfz, Crm, Gm	A/S, Pi, To
13	-	-	+	A/S, Am, Cp, Gat, Lvx, Pi, T/S	Aug, Cf
14	-	-	+	A/S, Am, Cf, Cp, Gat, Lvx, Pi	Aug, Cfz
15	-	-	+	Ninguna	Ninguna
16	-	-	+	Ninguna	Cf
17	-	+	+	Ninguna	Ninguna
18	-	-	+	Ninguna	Cf
19	-	-	+	Cf	Ninguna

Se muestran los resultados obtenidos por Yañez (2012). Am: ampicilina, A/S: ampicilina/sulbactam, Aug: amoxicilina/clavulanato, Azt: aztreonam, Cax: ceftriaxona, Caz: ceftazidima, Cf: cefalotina, Cfz: cefazolina, Cp: ciprofloxacino, Crm: cefuroxima, Gat: gatifloxacino, Gm: gentamicina, Lvx: levofloxacino, Pi: piperacilina, To: tobramicina, T/S: trimetoprim/sulfametoxazol, BLEE: Betalactamasa de espectro extendido, -: no detectado, +: detectado. Tomado de Yañez 2012.¹⁰¹

2.2. Identificación molecular por medio de la amplificación del gen *gadA*

La identificación molecular como *E. coli* de las 19 cepas utilizadas, se realizó mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) usando el marcador genético *gadA*, siguiendo

el protocolo de McDaniels *et al*, 1996.²⁰ Los oligonucleótidos utilizados fueron *gadA1* (5'-ACCTGCGTTGCGTAAATA-3') y *gadA2* (5'-GGGCGGGAGAAGTTGATG-3'), y el producto de amplificación esperado fue de 670 pb.²⁰ El protocolo de PCR incluyó una desnaturalización inicial a 94°C por 4 minutos (min) seguida por 30 ciclos de desnaturalización a 94° C por 1 min, alineamiento a 57°C por 1 min y extensión a 72°C por 1 min y por último una extensión final a 72°C por 5 min. Los productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 1% teñidos con el colorante para DNA SYBR[®] safe (Thermo Fisher Scientific[®], Waltham, MA, USA) en un fotodocumentador Gel Logic 2200, con el programa Carestream 212 PRO (Carestream[™], Rochester, NY, USA). Se utilizó a la cepa de *E. coli* K12 como control positivo y como control negativo a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*).

2.3. Determinación de grupos filogenéticos

Para la determinación de grupos filogenéticos se utilizó el método de filotipificación actualizado de Clermont.⁵⁵ Los genes y fragmentos de DNA utilizados fueron: *arpA*, *chuA*, *yjaA*, TspE4.C2, *trpAgpC*, *ArpAgpE*, *trpBA* (Cuadro 7).

Para la PCR cuádruplex inicial se amplificaron los genes *arpA*, *chuA*, *yjaA* y TspE4.C2 bajo las siguientes condiciones de amplificación: desnaturalización inicial a 94°C por 4 min, luego 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 5 segundos (s), alineamiento a 58°C por 20 s y extensión a 72°C por 40 s y una extensión final a 72°C por 5 min. Para la PCR dúplex de diferenciación entre el filogrupo D y E, se emplearon los oligonucleótidos *ArpAgpE* y *trpBA*; las condiciones fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 4 min; seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 5 s, alineamiento a 57°C por 20 s y extensión a 72°C por 45 s; y una extensión final a 72°C por 5 min.⁵⁵

Para la PCR dúplex de diferenciación entre el filogrupa A y C, se emplearon los oligonucleótidos *trpAgpC* y *trpBA*; las condiciones fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 4 min; después 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 5 s, alineamiento a 58°C por 20 s y extensión a 72°C por 45 s; y una extensión final a 72°C por 5 min.

Cuadro 7. Características de los genes y fragmentos utilizados en el método Clermont 2013^{54,55}

Gen	Función	Tamaño amplicón	Oligonucleótidos	Nota
<i>arpA</i>	Proteína reguladora tipo Ankirina	400 pb	5'-AACGCTATTCGCCAGCTTGC-3' 5'-TCTCCCCATACCGTACGCTA-3'	Cuádruplex. Control interno y determinación de grupo F
<i>chuA</i>	Receptor de membrana externa del grupo heme	288 pb	5'-ATGGTACCGGACGAACCAAC-3' 5'-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3'	Cuádruplex
<i>yjaA</i>	Proteína inducida por estrés, resistencia a ácidos y peróxidos	211 pb	5'-CAAACGTGAAGTGTCAGGAG-3' 5'-AATGCGTTCCTCAACCTGTG-3'	Cuádruplex
TspE4.C2	Secuencia de DNA específica de cepas NMEC. Posible lipasa esterasa	152 pb	5'-CACTATTCGTAAGGTCATCC-3' 5'-AGTTTATCGCTGCGGGT CGC-3'	Cuádruplex
trpAgpC	Fragmento del gen <i>trpA</i>	219 pb	5'-AGTTTTATGCCAGTGCGAG-3' 5'-TCTGCGCCGGTCACGCC-3'	Dúplex Determinación de grupo C
ArpAgpE	Fragmento del <i>arpA</i>	301 pb	5'-GATTCCATCTTGTCAAAAT ATGCC-3' 5'-GAAAAGAAAAAGAATTC CCAAGAG-3'	Dúplex Determinación de grupo E
<i>trpBA</i>	<i>trpA</i> Triptofano sintetasa	489 pb	5'-CGGCGATAAAGACATCTTAC-3' 5'-GCAACGCGGCCTGGCGGAAG-3'	Dúplex Control interno

Tomado y modificado de Clermont 2000⁵⁴ y 2013⁵⁵ y de la página electrónica UnitProKB⁷⁵.

Los productos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa al 2%, teñidos con el colorante para DNA *SYBR® safe* (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, USA) o bromuro de etidio. Por medio del patrón de bandas visualizadas en el gel se determinó el filogrupa empleando el árbol de decisión de Clermont *et al.*⁵⁵

2.4. Extracción de DNA

En algunos casos se usó DNA extraído de las muestras mediante la técnica de tiocianato de guanidina.¹⁰² Brevemente, una suspensión de colonias sembradas en medio de cultivo infusión cerebro corazón (BHI) se centrifugó a 400 rpm para obtener una pastilla a la cual se le agregaron 550 µl de amortiguador de lisis (tiocianato de guanidina 5M, EDTA 0.1M y Sarkosyl 0.5% P/V), se homogenizó la muestra por 10 min; luego se adicionaron 250 µl de acetato de amonio 7.4M, se mezclaron con el vórtex y se dejaron en congelación por 10 min. Se adicionaron 500 µl de alcohol-cloroformol (24:1 v/v), se agitaron vigorosamente con el vórtex para luego centrifugar por 5 min a 10,000 rpm. Después se recuperó la fase acuosa en otro tubo y se repitió el paso anterior. Tras recuperar nuevamente la fase acuosa, se le agregó etanol absoluto y se mezcló hasta observar un precipitado blanco (DNA) el cual se extrajo y colocó en otro tubo. Se centrifugó para formar una pastilla y se lavó con etanol al 75% tres veces; posteriormente, se dejó secar durante al menos 8 horas. Se reconstituyó la muestra de DNA con 50-200 µl de agua libre de DNAsas. Finalmente se colocó el tubo con la muestra por 30 min a 56°C en baño María.¹⁰²

2.5. Tipificación por secuencias multilocus (MLST)

Para la determinación de las secuencias multilocus se utilizaron los oligonucleótidos descritos por Wirth *et al* (2006), para amplificar los genes: *adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* y *recA* (Cuadro 8).⁶⁶

Para todos los genes las reacciones de amplificación, con un volumen final de 25 µl, contenían TopTaq™ *Master Mix* (Qiagen®, Ventura, CA, USA) (1.8 U de *Taq* polimerasa, 1.5 mM MgCl₂, 1x de amortiguador para PCR, 200 µM de cada deoxinucleótido trifosfatado (dNTPs)), 0.4 µM de cada oligonucleótido, aproximadamente 200 ng de DNA

cromosómico y agua libre de nucleasas cbp.

Cuadro 8. Oligonucleótidos y amplicón de los genes empleados en el esquema MLST de Achtman

Gen	Oligonucleótidos	Amplicón (pb)
<i>adk</i>	5'-ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG-3' 3'-CCGTCAACTTTCGCGTATTT-5'	583 pb
<i>fumC</i>	5'-TCACAGGTCGCCAGCGCTTC-3' 3'-GTACGCAGCGAAAAAGATTC-5'	805 pb
<i>gyrB</i>	5'-TCGGCGACACGGATGACGGC-3' 3'-ATCAGGCCTTCACGCGCATC-5'	880 pb
<i>icd</i>	5'-ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA-3' 3'-GGACGCAGCAGGATCTGTT-5'	878 pb
<i>mdh</i>	5'-ATGAAAGTCGCAGTCCTCGGCGCTGCTGGCGG-3' 3'-TTAACGAACTCCTGCCCCAGAGCGATATCTTTCTT-5'	932 pb
<i>purA</i>	5'-CGCGCTGATGAAAGAGATGA-3' 3'-CATACGGTAAGCCACGCAGA-5'	817 pb
<i>recA</i>	5'-CGCATTGCTTTACCCTGACC-3' 3'-TCTCGATCAGCTTCTCTTTT-5'	734 pb

Tomado y modificado de Wirth *et al* 2006⁶⁶ y de la página electrónica MLST.NET⁶⁸.

El protocolo para reacciones con volumen final de 50 µl fue: 3 U de una mezcla de GoTaq[®] Flexi y Pfu DNA polimerasa, 1.5 mM de MgCl₂, 1x amortiguador de PCR, 0.4 µM de cada oligonucleótido, 100 µM de dNTPs, 200 ng de DNA y agua libre de nucleasas cbp. Las condiciones de amplificación para todos los genes, (excepto *gyrB* y *mdh*) fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguida de una desnaturalización a 94°C por 45 s, alineamiento a 57°C por 45 s y una extensión a 72°C por 45 s por 35 ciclos y por último una extensión final a 72°C por 5 min. Para los genes *gyrB* y *mdh* se trabajó con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 94°C por 5 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, alineamiento a 61°C por 30 s y extensión a 72°C por 30 s y finalmente una extensión a 72°C por 5 min.

Los productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 1%, teñidos con

colorante para DNA SYBR[®] *safe* (Thermo Fisher Scientific[®], Waltham, MA, USA) o bromuro de etidio, en un fotodocumentador de luz UV Gel Logic 2200 con el programa Carestream[™] 212 PRO (Carestream[™], Rochester, NY, USA). Los productos de PCR de los diferentes genes se purificaron utilizando los kits comerciales QIAquick PCR Purification[®] o Gel Extraction[®] (Qiagen, Ventura CA, USA).

La cuantificación del DNA purificado se determinó usando espectrofotometría de rayos ultravioleta con el equipo Gen5[™] y el programa informático Take3[™] (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA), esto con la finalidad de realizar los cálculos necesarios para llevar a cabo la secuenciación. Las muestras fueron enviadas a la Unidad de síntesis y secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM para su posterior secuenciación.

2.6. Análisis de las secuencias genéticas

Las secuencias se visualizaron en el programa BioEdit[®] versión 7.2.5 y se editaron en el programa Vector NTI Advance[®] versión 11.5.1 de (Invitrogen[®], Carlsbad, CA, USA). Esta edición consistió en compararlas con los fragmentos de referencia pertenecientes a la cepa K12 MG1655 de *E. coli* documentados en la base de datos del esquema de Achtman (http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli/documents/primersColi_html)⁶⁸ y ajustarlas a la longitud requerida. De esta forma se obtuvieron los productos editados de entre 452 y 536 pb: *adk* (536 pb), *fumC* (469 pb), *gyrB* (460 pb), *icd* (518 pb), *mdh* (452 pb), *purA* (478 pb), y *recA* (510 pb). Estas secuencias editadas se sometieron a la página electrónica de la base de datos del esquema de Achtman para la asignación automática de un número de alelo por fragmento registrado (por ejemplo: *adk10* y *gyrB4* fueron los alelos que

designaron a los fragmentos de los genes *adk* y *gyrB* de la cepa de referencia K12 MG1655).

En los casos en que la secuencia no concuerda con los alelos ya registrados, el algoritmo del sitio computa el alelo de mayor similitud e indica a partir de qué número de base nitrogenada es éste idéntico al sometido. La combinación de estos siete alelos, identificados cada uno con un número, se denomina perfil alélico (por ejemplo, 10/11/4/8/8/8/2 corresponde al perfil alélico de *adk/fumC/gyrB/icd/mdh/purA/recA* de la cepa K12 MG1655).^{66,68}

Finalmente, los perfiles alélicos se sometieron a la misma página electrónica y se obtuvo la secuencia tipo o ST de cada una de las cepas. Cuando el perfil alélico no resultó en una ST previamente descrita en el sitio, se contactó al agente bioinformático asignado o curador para registrarla y obtener una nueva ST.^{66,68}

2.7. Análisis genético de las ST

Para determinar la divergencia genética entre las muestras, las secuencias de los siete genes de cada cepa se concatenaron para producir un constructo final de 3,423 pb. Este constructo se elaboró para todas las muestras del estudio, para las 8 ST previamente reportadas de delfines, para la cepa de referencia K12 MG1665 y para una cepa típica de ST131. Se realizó un alineamiento de estas 29 secuencias concatenadas.

Para los análisis evolutivos filogenéticos y moleculares de este alineamiento se empleó el programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) versión 6.0, y se obtuvo un dendrograma construido por el método de Vecino Más Cercano (Neighbor-Joining).^{103,104}

Las distancias genéticas fueron calculadas con el modelo de Kimura de 2 parámetros.¹⁰⁵ La distancia genética es una medida de la divergencia genética entre especies, individuos de una

especie o entre poblaciones; esta distancia se representa con números.¹⁰⁶ Los individuos o poblaciones con gran cantidad de genes similares tienen distancias genéticas pequeñas (el número será menor), lo que indica que son cercanos y tienen un ancestro común reciente.¹⁰⁶

2.8. Análisis genético global de las ST

Para el análisis de resultados se utilizó el algoritmo eBURST¹⁰⁷ optimizado globalmente (goeBURST) versión 1.2.1 y desarrollado por el grupo *Knowledge Discovery and Bioinformatics* (KDBIO, Lisboa, Portugal).¹⁰⁸ Esta herramienta de clusterización o agrupamiento permite la relación entre ST y STc por medio de la creación de un gráfico matriz. Esta matriz (bosque) se compone de grupos de ST (árboles) en los que cada ST es un nodo y dos ST se conectarán si tienen un solo locus de variación (SLV), aunque podemos reducir el criterio de asociación a dos (DLV) o tres loci (TLV) de variación, lo que genera menos árboles pero más densos. A través de códigos de color y tamaños de líneas y círculos podemos ver de manera rápida la relación entre los ST, la formación de STc y hasta la cantidad de cepas con el mismo ST.^{74,107,108}

Para la construcción de este bosque se utilizó la totalidad de cepas registradas en el esquema MLST de Achtman y las cepas de este estudio.⁶⁸

3. Resultados

3.1. Identificación molecular de las cepas por medio de la amplificación del gen *gadA*

En todas las cepas se amplificó el producto esperado de 670 pb (Figura 6), lo que las confirmó como miembros *E. coli*.

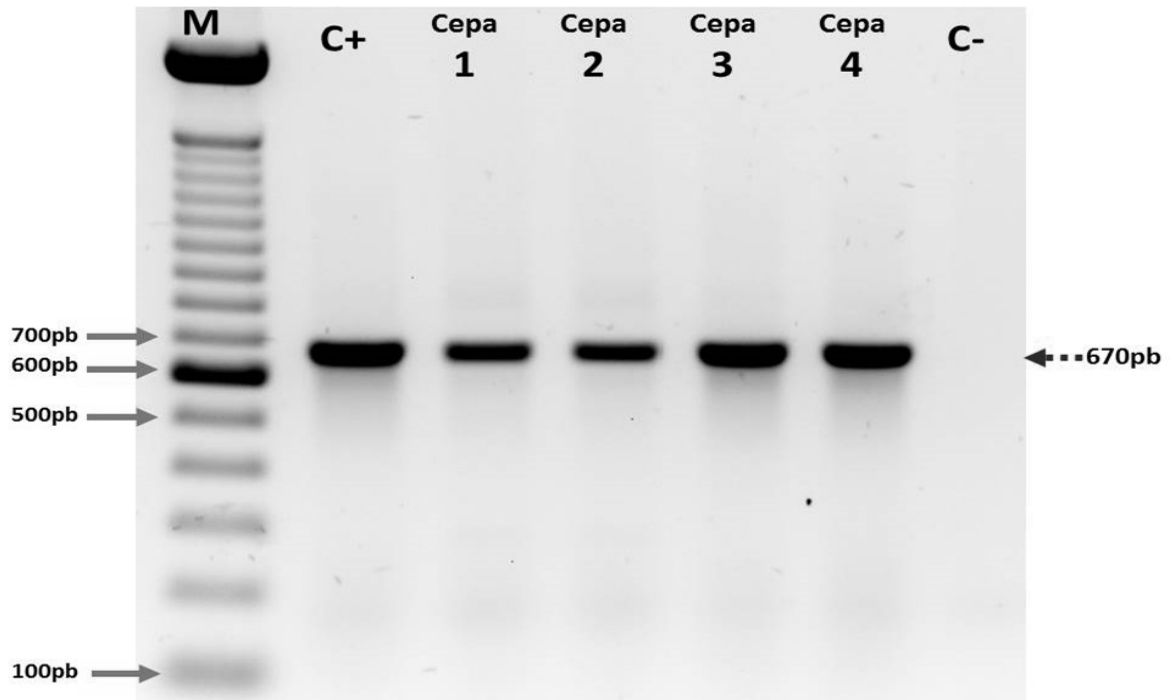


Figura 6. Amplificación del gen *gadA*. M: Marcador de peso molecular 100 pb DNA. C+: Control positivo, *E. coli* K-12. Cepa 1-4: Cepas del estudio. C-: Control negativo, *Salmonella enterica*. Electroforesis en gel de agarosa al 1%.

3.2. Grupos filogenéticos

La determinación de los grupos filogenéticos de las 19 cepas presentó resultados heterogéneos (Cuadro 9 y Figura 7). El grupo filogenético B2 fue el de mayor frecuencia con un 36.8% (7/19), las muestras de este grupo presentaron el genotipo *arpA*-, *chuA*+, *yjaA*+ y TspE4.C2+ (o -+++ según la nomenclatura utilizada en las publicaciones de Clermont).^{54,55}

Cuadro 9. Resultados de la determinación de grupos filogenéticos

Cepa	Primer Cuádruplex Grupo Filogenético (genotipo)	Segundo Dúplex Grupo Filogenético o procedimiento a seguir
1	B2 (-+++)	NA
2	B2 (-+++)	MLST
3	U (----)	MLST
4	B1 (+--+)	NA
5	B2 (-+++)	NA
6	Clado I o II (--+-)	MLST
7	D o E (++)	D
8	D o E (++)	D
9	B2 (-+++)	NA
10	B2 (-+++)	NA
11	F (-+--)	MLST
12	U (----)	MLST
13	Clado I o II (--+-)	MLST
14	B2 (-+++)	MLST
15	U (----)	MLST
16	B2 (-+++)	NA
17	U (----)	MLST
18	U (---+)	MLST
19	U (----)	MLST

NA: No aplica. MLST: Realizar análisis de secuencias multilocus.

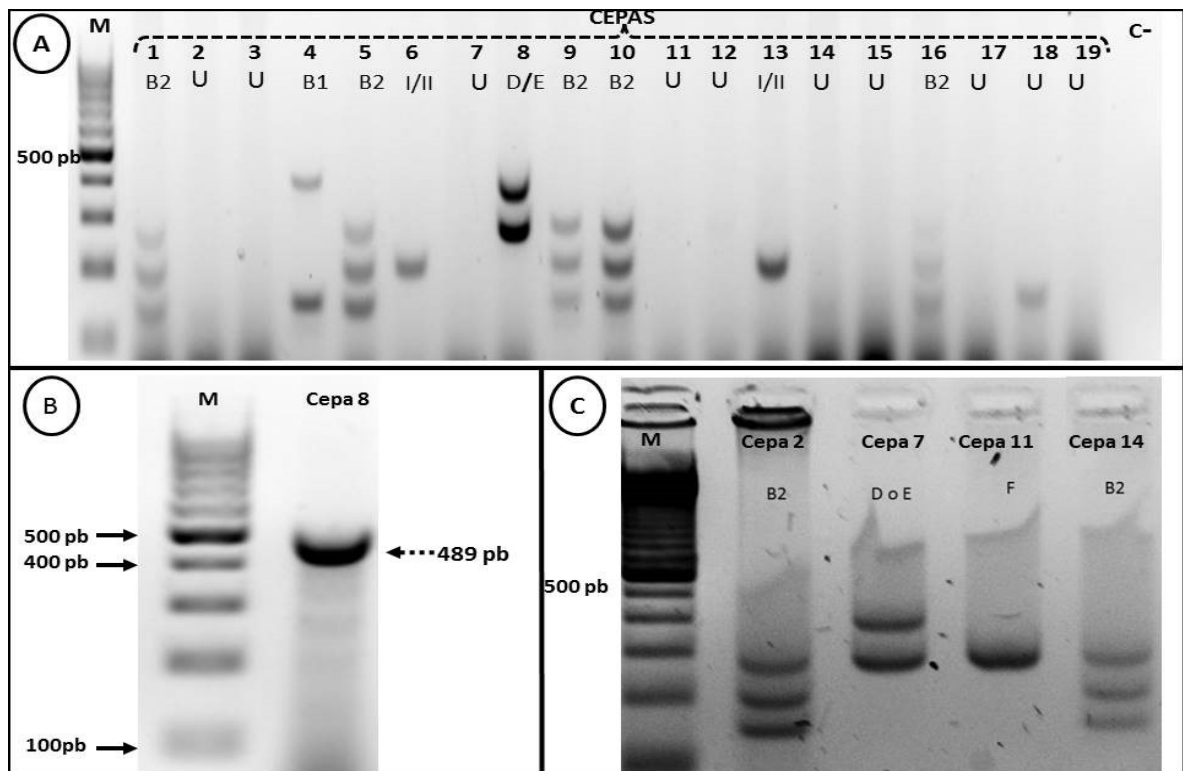


Figura 7. Determinación de grupos filogenéticos por el método Clermont 2013. A. PCR cuádruplex. M: Marcador de peso molecular. Carriles 1-19: Cepas del estudio. C-:Control negativo. Amplicones de la PCR cuádruplex en orden descendente *arpA* (400 pb), *chuA* (288 pb), *yjaA* (211 pb) y TspE4.C2 (152 pb). B. Diferenciación entre grupos D y E, PCR dúplex de genes *trpBA* (489 pb) y *ArpAgpE* (301 pb, no amplificado). M: Marcador de peso molecular. C. Cuádruplex con grupos B2, D o E, F y B2, M: Marcador de peso molecular. B1: *arpA*+, *chuA*-, *yjaA*-, TspE4.C2+ (+--+); B2: -+++; Clado I o II: --+; D: ++-, *trpBA*+ y *ArpAgpE*-; F: -+++; U ---+ o ----. Electroforesis en gel de agarosa al 2%.

El 31.6% de las cepas (6 de 19), mostraron un perfil como grupo filogenético desconocido U (o “unknown”). Se observaron dos de los cinco posibles genotipos reportados para U, no amplificación (----) y amplificación solo del fragmento TspE4.C2 (---+); en ambos casos Clermont *et al* recomienda la genotipificación por medio de MLST y confirmación de la especie usando los genes *uid* o *gadA/B* como paso previo a la MLST.⁵⁵

Dos de las muestras (10.5%) fueron identificadas como posibles miembros de los Clados I o II; en estos casos Clermont *et al* recomiendan el uso de oligonucleótidos para Clados Crípticos o genotipificación por MLST.^{55,57} Esto se debe a la escasez de cepas estudiadas

pertenecientes al Clado II y a reportes de incorrecta identificación del Clado I por el contenido genético altamente variable de *E. coli*.^{1,54,57,58,61}

De igual forma, para dos muestras (10.5%) fue necesario realizar el dúplex para diferenciar entre los grupos D y E, dando como resultado el filogrupo D al no haberse amplificado el fragmento *ArpAgpE* y sí el *trpBA*. En el filogrupo B1 y el genotipo (+--+) se encontró una sola muestra (5.3%), lo mismo sucedió con el grupo filogenético F y su genotipo (-+--) (Figura 8).

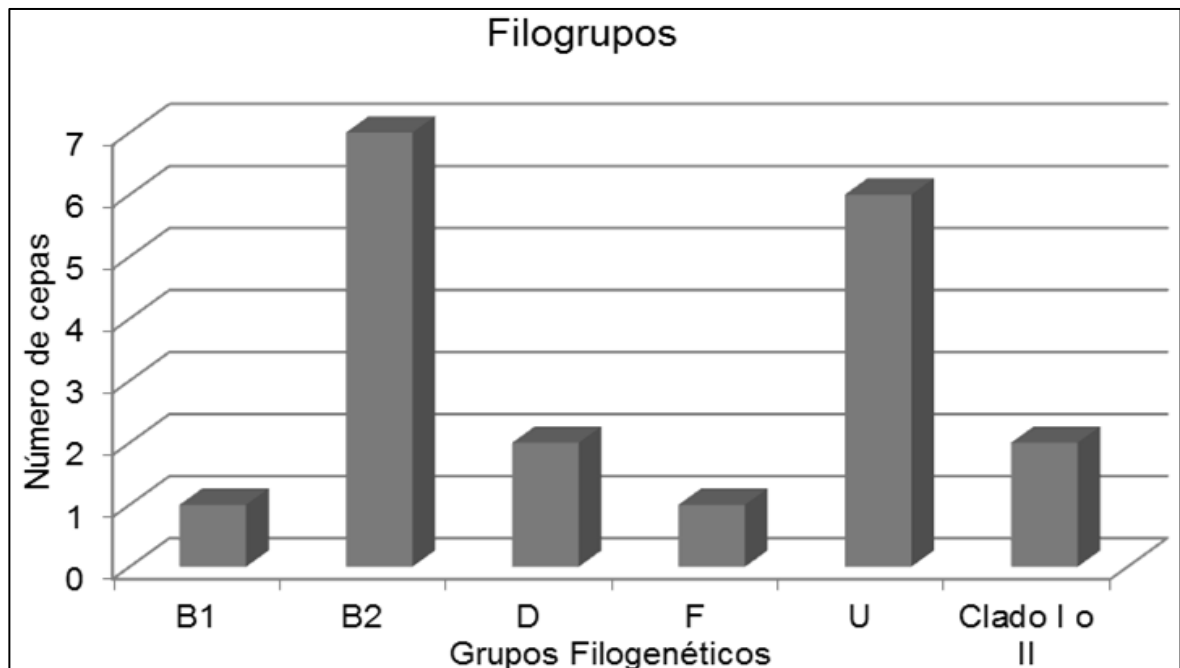


Figura 8. Representación gráfica de los grupos filogenéticos obtenidos.

3.3. Tipificación por secuencias multilocus (MLST)

Una vez establecida la identificación molecular y filogenética de los aislamientos se procedió con la tipificación por secuencias multilocus, para lo cual se estandarizaron las condiciones de la PCR para la amplificación de los 7 genes de mantenimiento de todas las cepas, siguiendo las condiciones descritas anteriormente. Luego de la amplificación por PCR se visualizaron los amplicones en un gel de agarosa al 1% (Figura 9). Se amplificaron

todos los genes del esquema MLST de Achtman de todas las muestras. Para obtener la cantidad necesaria de DNA para su secuenciación, las reacciones de PCR se elaboraron por triplicado. Los productos de PCR que solo presentaron la banda específica del gen esperado se purificaron empleando el kit comercial QIAquick PCR Purification[®], mientras que en aquellas reacciones en donde se visualizaran bandas inespecíficas, el fragmento esperado se cortó del gel y posteriormente se purificó empleando el kit QIAquick Gel Extraction[®] (Qiagen, Ventura CA, USA). Los productos purificados se observaron en un gel de agarosa al 1%, previo a la cuantificación.

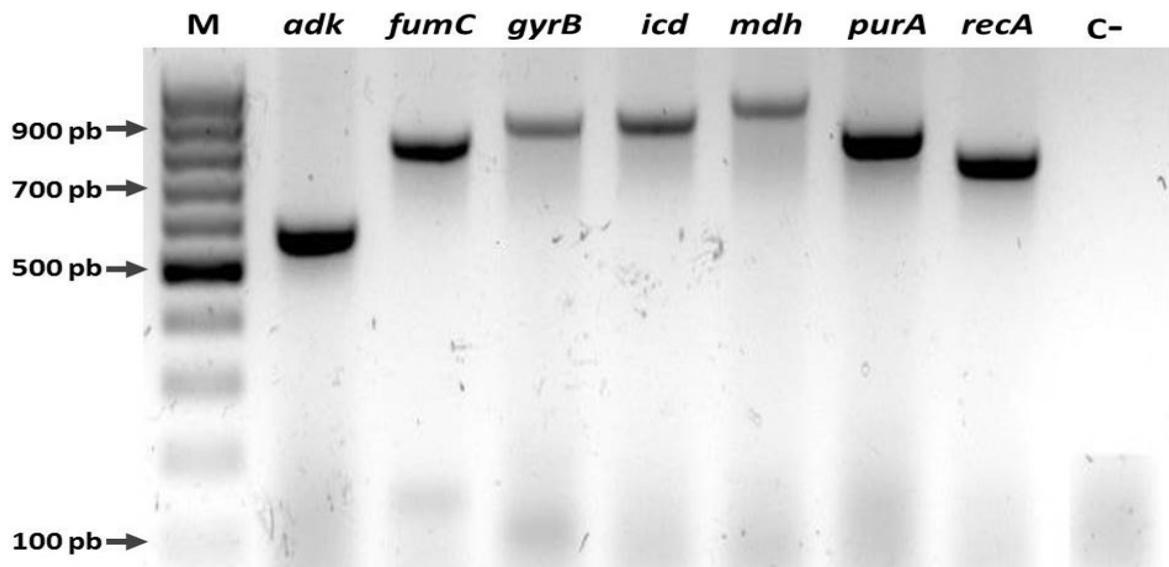


Figura 9. Amplificación de los genes de MLST de Achtman de la cepa 1. M: Marcador de peso molecular. *adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* y *recA*: genes amplificados. C-: Control negativo. Electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Después de realizar la cuantificación de cada uno de los productos purificados correspondientes a los siete genes de cada cepa, éstos se enviaron a secuenciar en ambos sentidos. Una vez obtenidas las secuencias, se usaron los programas BioEdit[®] y Vector NTI Advance[®] 11.5.1 de Invitrogen, para alinearlas y editarlas tomando como referencia los fragmentos proporcionados por la base de datos del esquema de Achtman.⁶⁸

Todas las secuencias editadas de los fragmentos de cada gen fueron sometidas a la base de datos de Achtman en la Universidad de Warwick y resultaron en alelos previamente identificados. Los resultados de la MLST fueron heterogéneos al obtener 14 ST diferentes, ocho de las cuales pertenecieron a cuatro STc ya reportados (Cuadro 10).

Cuadro 10. Perfiles alélicos, secuencias tipo y complejos ST obtenidos

Cepa	<i>adk</i>	<i>fumC</i>	<i>gyrB</i>	<i>icd</i>	<i>mdh</i>	<i>purA</i>	<i>recA</i>	ST	STc
1	53	40	47	13	36	28	29	131	STc131
2	88	103	19	36	23	44	26	372	No STc
3	6	4	22	18	9	26	7	99	No STc
4	6	4	22	18	9	26	7	99	No STc
5	13	14	10	14	17	11	85	1858	No STc
6	10	134	4	8	8	8	2	986	No STc
7	21	35	27	6	5	5	4	69	STc69
8	21	35	27	6	5	5	4	69	STc69
9	13	43	19	14	23	11	10	1946	No STc
10	53	4	87	13	70	58	29	5098	No STc
11	92	4	87	96	70	58	2	648	STc648
12	92	4	87	96	70	58	2	648	STc648
13	10	11	4	8	8	8	2	10	STc10
14	53	40	1	13	36	28	29	2185	STc131
15	10	11	4	8	8	13	73	617	STc10
16	13	43	19	14	23	11	10	1946	No STc
17	6	95	178	18	11	8	41	5166	No STc
18	6	23	32	88	9	26	7	2016	No STc
19	6	23	32	88	9	26	7	2016	No STc

STc: Complejo ST; No STc: No perteneció a algún STc.

Las cepas 10 y 17 no pertenecieron a ninguna ST ya reportada y se les asignó una nueva, la ST5098 y la ST5166, respectivamente.

El cuadro 11 resume la información obtenida por la determinación de grupos filogenéticos con el método actualizado de Clermont⁵⁵ y la MLST con el esquema de Achtman⁶⁸, así como la presentada por Yañez en 2012¹⁰¹ (Cuadro 11).

Cuadro 11. Filogrupos, serotipos, factores de virulencia, resistencia a antimicrobianos y ST obtenidas

Cepa	Filogrupo	O	H	<i>eae</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	Resistencia completa	Resistencia intermedia	ST
1	B2	O157	H7	+	+	+	A/S, Am, Cp, Gat, Gm, Lvx, Pi	Ninguna	131
2	B2	ONT	H31	-	-	+	Ninguna	Ninguna	372
3	U	O163	H19	-	-	+	Ninguna	Ninguna	99
4	B1	O163	H19	-	-	-	Ninguna	Ninguna	99
5	B2	O75	H5	-	-	+	Ninguna	Ninguna	1858
6	Clado I o II	O140	H32	-	+	+	Ninguna	Ninguna	986
7	D	ONT	H2	-	+	+	Am, Gm, Pi, T/S, To	A/S, Aug	69
8	D	O153	H2	-	+	+	Am, Gat, Lvx, T/S, To	A/S, Aug, Cf, Pi	69
9	B2	O15	H7	-	-	+	Ninguna	Ninguna	1946
10	B2	O25	H42	-	-	+	A/S, Am, Cp, Gat, Gm, Lvx, Pi	Cf, To	5098
11	F	O32	H42	-	-	+	BLEE (Cax, Caz), Am, Aug, Cf, Cfz, Crm, Gm	Ninguna	648
12	U	O32	H42	-	-	+	BLEE (Azt, Cax, Caz), Am, Aug, Cf, Cfz, Crm, Gm	Ninguna	648
13	Clado I o II	O101	HNT	-	-	+	A/S, Am, Cp, Gat, Lvx, Pi, T/S	Ninguna	10
14	B2	O25	H4	-	-	+	A/S, Am, Cf, Cp, Gat, Lvx, Pi	Ninguna	2185
15	U	ONT	H42	-	-	+	Ninguna	Ninguna	617
16	B2	O15	H7	-	-	+	Ninguna	Cf	1946
17	U	O71	H14	-	+	+	Ninguna	Ninguna	5166
18	U	O170	H16	-	-	+	Ninguna	Cf	2016
19	U	O170	H16	-	-	+	Ninguna	Cf	2016

Am: ampicilina, A/S: ampicilina/sulbactam, Aug: amoxicilina/clavulanato, Azt: aztreonam, Cax: ceftriaxona, Caz: ceftazidima, Cf: cefalotina, Cfz: cefazolina, Cp: ciprofloxacino, Crm: cefuroxima, Gat: gatifloxacino, Gm: gentamicina, Lvx: levofloxacino, Pi: piperacilina, To: tobramicina, T/S: trimetoprim/sulfametoxazol, BLEE: Betalactamasa de espectro extendido, (-): no detectado, (+): detectado. Tomado y modificado de Yañez.¹⁰¹

3.4. Análisis genético de las secuencias obtenidas

Los constructos de 3,423 pb elaborados con las secuencias concatenadas de los 7 genes amplificados para llevar a cabo la MLST de cada cepa, junto con las ST reportadas de delfines, la cepa de referencia K12 MG1665 y una cepa ST131, fueron alineados usando la

herramienta bioinformática ClustalW¹⁰⁹. Dicha alineación se empleó para formar un dendrograma usando el método vecino más cercano¹⁰⁴ usando 1,000 bootstraps¹¹⁰ no paramétricos para el contraste de hipótesis y el modelo evolutivo de dos parámetros de Kimura¹⁰⁵ con el programa MEGA 6.¹⁰³ Una vez reconstruido el árbol se usó la rama de la cepa de referencia K-12 MG1655 como raíz del mismo (Figura 10).

En este dendrograma se observó que, usando a la cepa de referencia K-12 (denominada K12-MG1655) como raíz, las cepas con menor distancia a la cepa de origen fueron la cepa 6 del estudio (denominada 06-BONO-ST986-CladoIoII y la cepa 13 (13-KUXIP-ST10-CladoIoII), seguida de la cepa 15 (15-Maya-ST617-U) a 0.001 y 0.004, respectivamente. A una distancia de 0.011 se encontraron la cepa 18 (18-ZeusIP-ST2016-U) y la cepa 19 (19-Zeus2R-ST2016-U), y las cepas de delfines de Francia EcBjDK6, EcBjDK11 y EcBjDK17. Estas 9 cepas y la cepa 17 (17-Xcaret-ST5166-U) (0.013) se agruparon en el árbol 0 creado por el algoritmo goeBURST (Figura 11). Las cepas más cercanas a K12 MG1655 (Filogrupo A, ST98), con distancia de 0.001 a 0.013, pertenecieron a los grupos filogenéticos U, A, Clados I o II, B1, F y una sola B2, esta última fue la cepa 10 (10-IVO-ST5098-B2) en un árbol *singleton*. Las más distantes fueron de los grupos D y B2, con distancia de 0.015 a 0.02 que se ubicaron en los árboles 1, 3, 7, 30 y 38. La cepa 2 (02-4VT-ST372-B2) fue la más alejada de K12, a 0.02 de distancia.

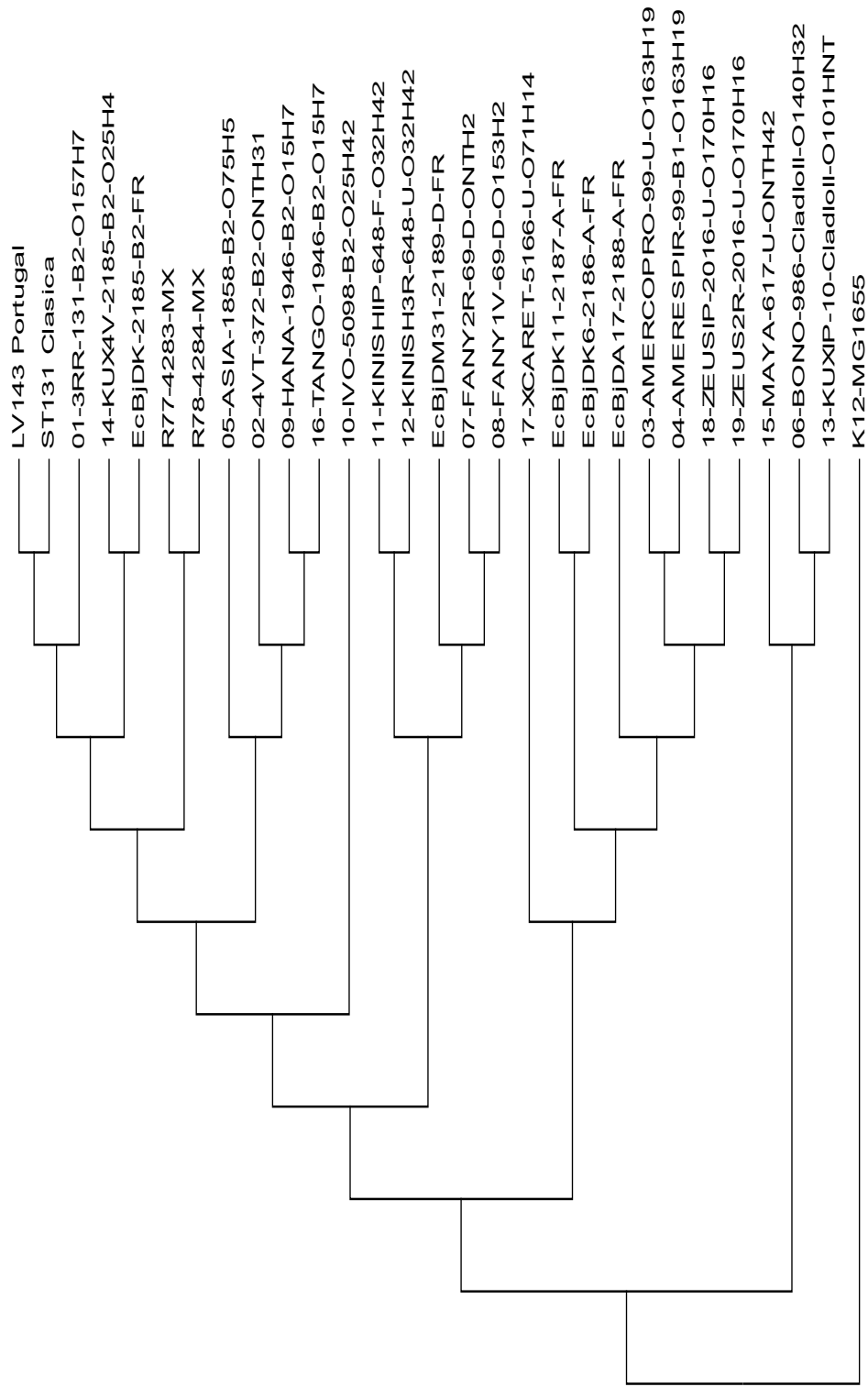


Figura 10. Dendrograma de las secuencias de los siete genes de la MLST de Achtman.⁶⁸ Se utilizó el método Vecino más Cercano¹⁰⁴ El árbol consenso fue inferido luego de 1000 replicados.¹¹⁰ Las distancias evolutivas se computaron con el modelo de dos parámetros de Kimura.¹⁰⁵ El análisis involucró 29 secuencias de 3,423 nucleótidos. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA6.¹⁰³

Debido a la cercanía de las cepas 6 y 13 con la cepa de referencia K12 y con la finalidad de determinar su grupo filogenético, según lo recomendado por Clermont *et al*⁵⁵, se realizó el mismo tipo de análisis filogenético empleado anteriormente pero ahora con los constructos de estas dos cepas (6 y 13) y de las ST de cepas reconocidas de los grupos filogenéticos A, B2, Clado I y el Clado II.^{1,54,57,58,61}

Los 10 constructos (de 3,423 bases) que se emplearon, fueron de las siguientes cepas:

- Filogrupo A, cepa K12 MG1655-ST10 y cepa ECOR18-ST48, miembros del STc10;
- Filogrupo B2, cepa IMT19336-ST131, miembro del STc131;
- Clado I, cepa TW10509- ST747, cepa M863-ST2715 y cepa E1492-ST3720;
- Clado II, cepa B1147-ST4961 y cepa ROAR019-ST4963;
- Cepas del estudio, 6-ST986 y 13-ST10, posibles Clado I o Clado II.

En este dendrograma (Figura 12), las cepas 6 y 13 de este trabajo se ubicaron entre las cepas del filogrupo A a 0.001 de distancia de la cepa K12 MG1655 y a 0.003 de la ST48. Las ST de ambos Clados Crípticos se encontraron muy alejadas de las cepas del estudio; la más cercana de éstas fue la ST4963 del Clado II (a 0.012 de distancia) y la más lejana fue la ST2715 del Clado I (a 0.026). Este análisis genético nos hizo descartar a las cepas 6 y 13 como posibles miembros del Clado I y del Clado II y nos permitió caracterizarlas como parte del grupo filogenético A (Cuadro 12). Esto ya ha sido reportado por diferentes revisiones del método de filotipificación por PCR.^{55,56,57,61}

Cuadro 12. Filogrupos finales y origen de las cepas estudiadas

Cepa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Filogrupo	B ₂	B ₂	U	B ₁	B ₂	A*	D	D	B ₂	B ₂	F	U	A*	B ₂	U	B ₂	U	U	U
Origen	Rs	V	R	Rs	R	R	Rs	V	V	V	P	Rs	Rs	V	V	P	R	P	Rs

A*: Filogrupo A después del análisis MLST. P: Prepuccio. R: Recto. Rs: Respiráculo. V: Vagina.

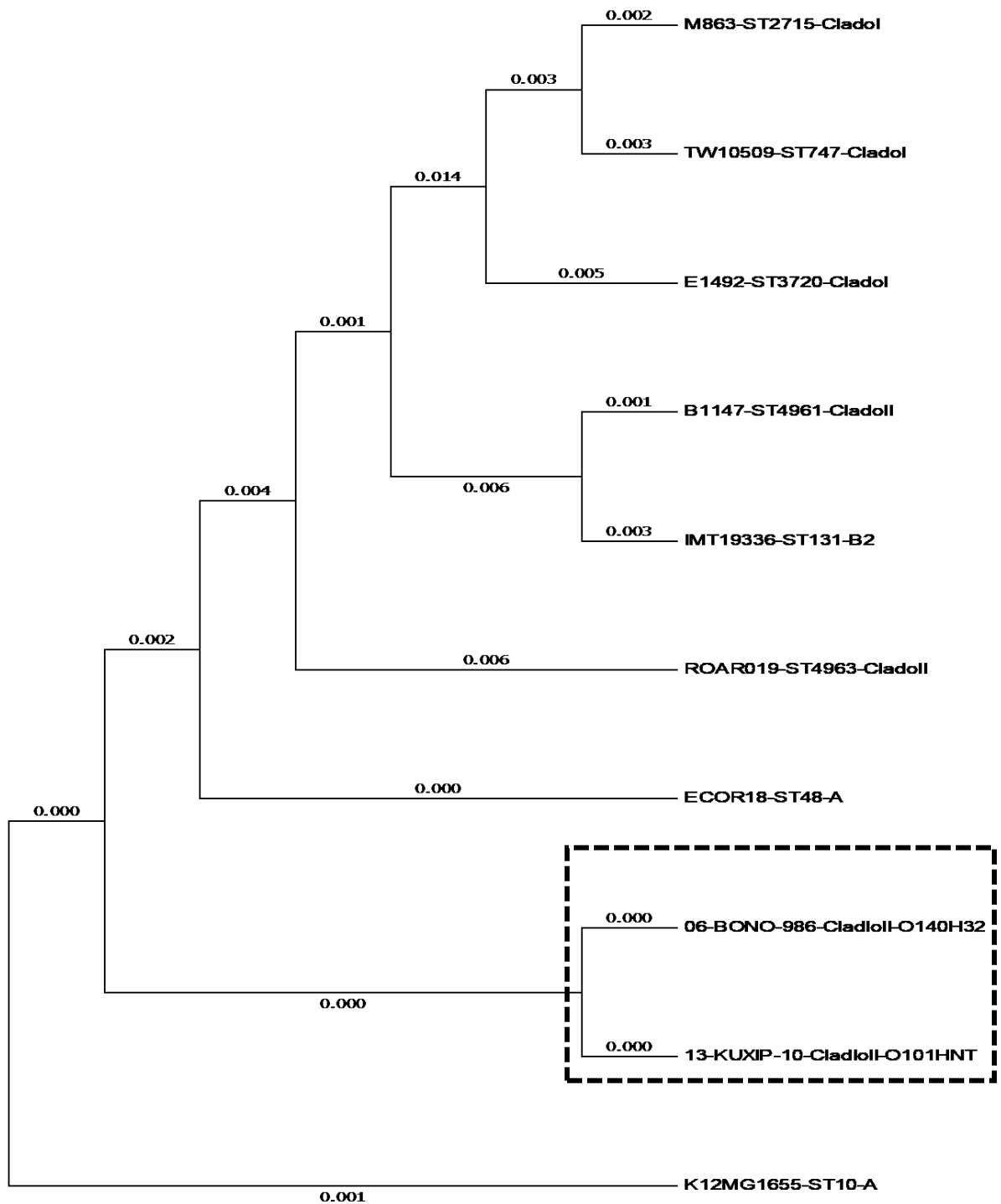


Figura 12. Dendrograma de las ST confirmadas como filogrupo A, Clado I y II. Estas cepas se registraron en la base de datos de MLST de Achtman.⁶⁸ En el recuadro se muestran las cepas 6 y 13 del estudio. Método de Vecino más Cercano.¹⁰⁴ El árbol consenso fue inferido luego de 1000 replicados.¹¹⁰ Las distancias genéticas fueron computadas con el modelo de dos parámetros de Kimura.¹⁰⁵ Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA6.¹⁰³

3.4.1. Análisis genético global de las secuencias obtenidas

Francisco *et al* (2009)¹⁰⁸ realizaron una optimización al algoritmo eBURST¹⁰⁷ con la cual una población estudiada se puede separar en varios grupos de ST relacionadas, lo que simplifica y agiliza su análisis al discriminar de mejor manera los árboles de interés.¹⁰⁸ Para este análisis se empleó, además de las ST de nuestra población, el acervo completo disponible de la base de datos de MLST del esquema de Achtman. Por medio de esta herramienta bioinformática (goeBURST¹⁰⁸) se generó un bosque de 1,371 árboles, obtenido al computar las 30,616 cepas y 5,890 ST de la base de datos MLST del esquema Achtman, de éstos solo se seleccionaron los nueve que agruparon a las cepas de nuestra población. Estos 9 árboles de interés fueron: 0, 1, 3, 6, 7, 30, 31, 38 y 1314, que agruparon a 3,582 cepas, 1,929 ST y 25 STc, lo que significó el 6.1% de la base de datos (Figura 13). Cada árbol agrupó a ST con características genéticas similares. La complejidad de cada árbol varió con respecto a la cantidad de ST diferentes que agrupó; por ejemplo, el número de ramificaciones del árbol 0 constituido por 1,571 ST fue mucho mayor al del árbol 1 formado por 122 ST diferentes. Clermont *et al* (2015), en su revisión de los métodos de tipificación y subtipificación de *E. coli*, realizaron el mismo análisis con goeBURST de las 4,386 ST existentes al momento del estudio.⁶¹ Al igual que en nuestro estudio, encontraron a las ST10, ST617 y ST986 como miembros del árbol 0 con la ST10 como genotipo central; sin embargo, por la diferencia en la cantidad de ST y cepas computadas, todas las demás ST de nuestro estudio se agruparon de forma diferente a lo reportado por Clermont:⁶¹

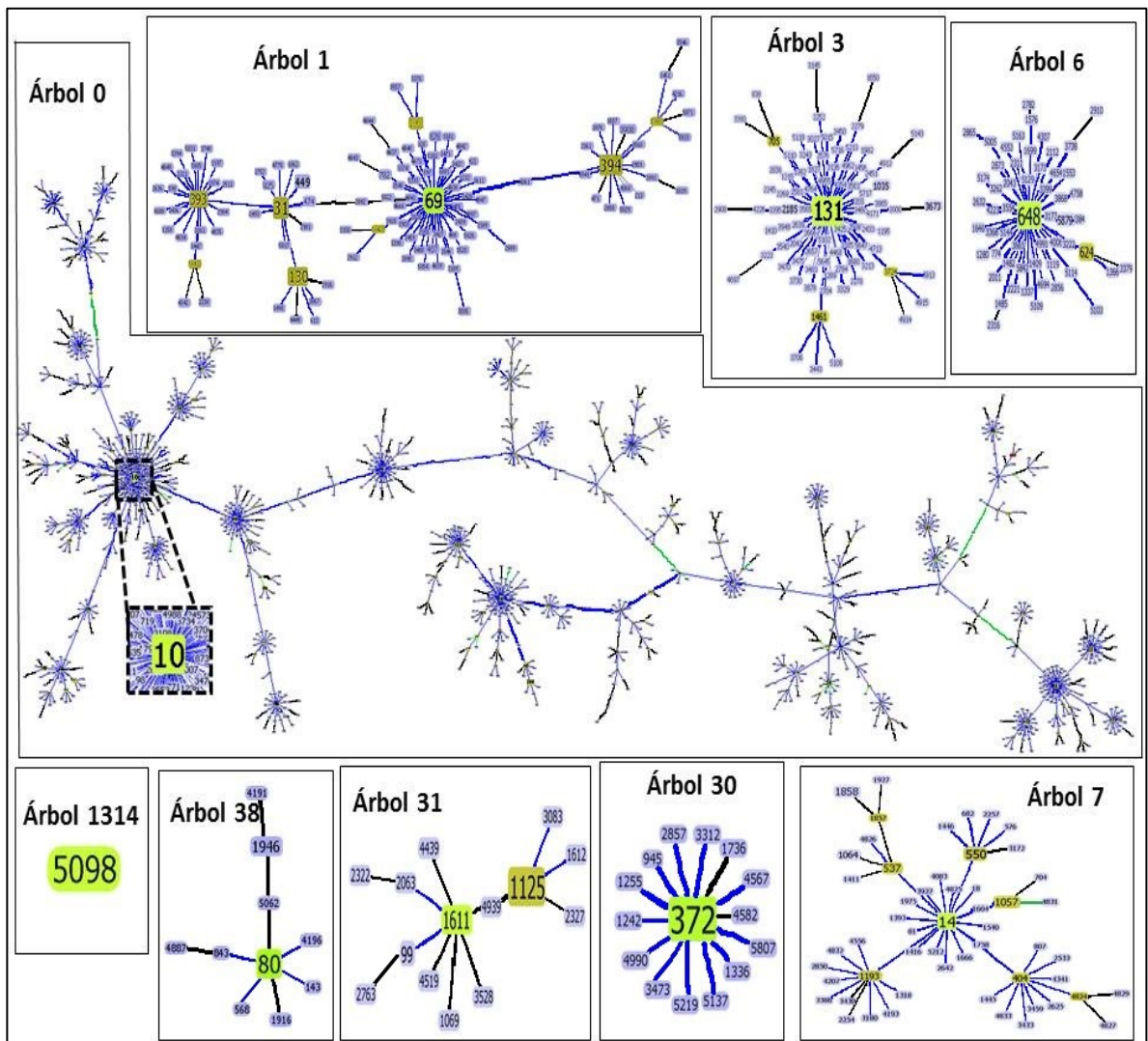


Figura 13. Árboles de interés. En verde claro se representa el genotipo central de cada árbol. En verde oscuro las ST fundadoras de subgrupos. En gris las demás ST. Las líneas de color negro representan la SLV más común que une a dos ST. Las líneas azules significan que la SLV que une a dos ST es de un alelo diferente al dominante en el árbol. Las líneas verdes representan DLV entre dos ST. En el recuadro punteado se señala un acercamiento al genotipo central del árbol 0. Figura no representada escala real por motivos de tamaño. Árboles generados con el programa goeBURST bajo el criterio de variación de un solo locus (SLV).

De las cepas que conformaron estos árboles, solo el 47% tuvieron información sobre su patotipo (Figura 14). En el bosque se identificaron los siete patotipos intestinales y los tres extraintestinales; el patotipo EAEC fue el de mayor frecuencia con 27.6%, seguido de UPEC con 19.4% del total de cepas patotipificadas.

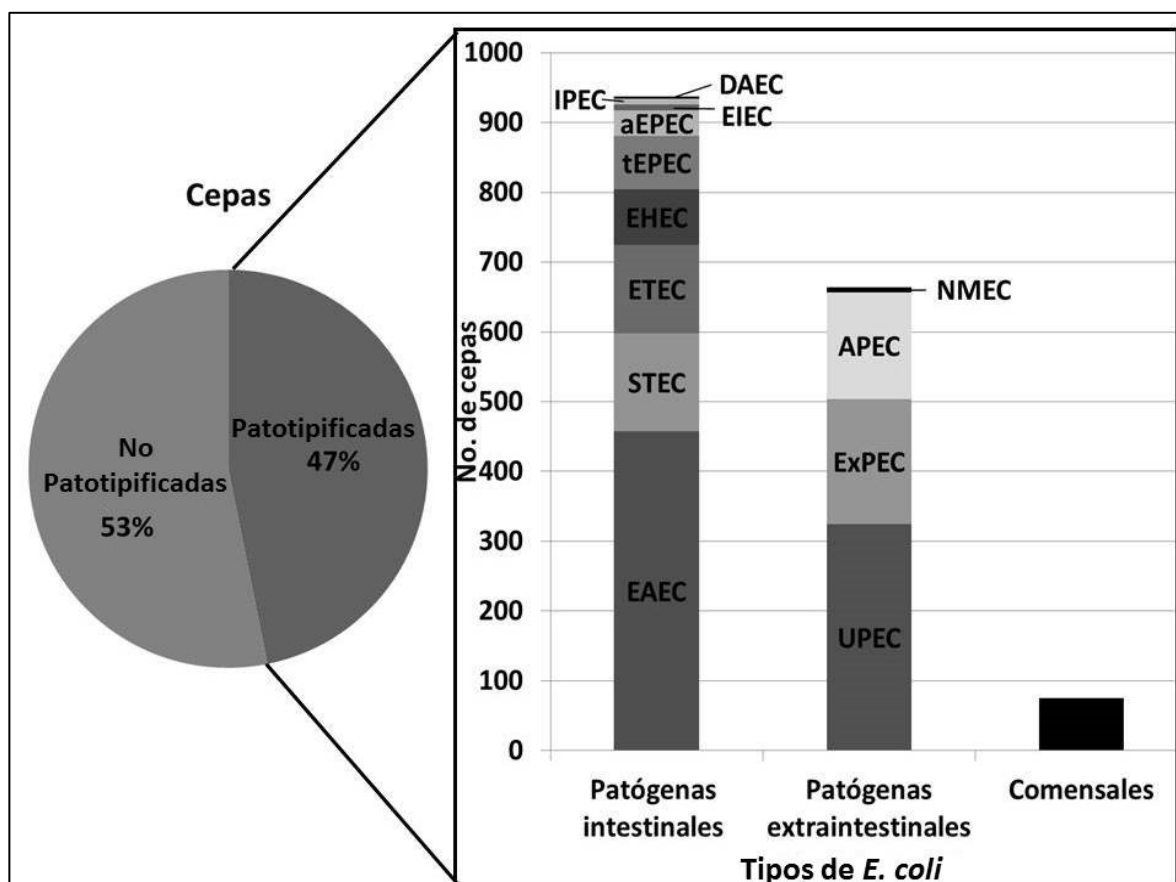


Figura 14. Patotipos de las cepas de *E. coli* en los árboles de interés. aEPEC: *E. coli* enteropatogena atípica; APEC: *E. coli* patogena aviar; DAEC: *E. coli* adherente difusa; EAEC: *E. coli* enteroagregativa; EHEC: *E. coli* enterohemorrágica; EIEC: *E. coli* enteroinvasiva; ETEC: *E. coli* enterotoxigénica; ExPEC: *E. coli* patogena extraintestinal; IPEC: *E. coli* patogena intestinal; NMEC: *E. coli* asociada a meningitis neonatal; STEC: *E. coli* productora de toxina shiga; tEPEC: *E. coli* enteropatogena típica; UPEC: *E. coli* uropatogena.

3.4.1.1. Árbol 0

El árbol 0 fue el más complejo y diverso de todos. Fue conformado por 2,776 cepas, 1,571 ST y 18 STc. Esto se debió a que la ST10 del STc (el genotipo central del árbol) es la clona con mayor número de registros en la base de datos de MLST de Achtman, lo que permitió al algoritmo agrupar una gran cantidad de ST con SLV de distancia al STc10. Por lo que al final 155 ST (174 cepas) se relacionaron directamente a la ST10 (Figura 15).

En el árbol 0 se encontraron seis de las cepas del estudio:

1. La cepa 6 ST986 que no perteneció a algún STc (Figura 16);
2. La cepa 13 ST10, fundadora del STc10 (Figura 16);
3. La cepa 15 ST617, miembro del STc10 (Figura 16);
4. La cepa 17 ST5166, ST inédita que no perteneció a ningún STc (Figura 17);
5. La cepa 18 ST2016, que no perteneció a algún STc (Figura 17);
6. La cepa 19 ST2016, que no perteneció a algún STc (Figura 17).

Además, en el árbol 0 se agruparon ocho ST previamente identificadas en mamíferos marinos (Figura 15): de delfines, ST2186 y ST2188; de nutrias, ST4281 y ST4282; de pinnípedos, ST10 (dos cepas), ST155 y ST166 miembros de STc10, STc155 y STc469 respectivamente; y de manatí la ST4293.

Estas 15 cepas representaron el 31% de los registros de mamíferos marinos existentes en el esquema de Achtman.⁶⁸

En el árbol 0, los patotipos dominantes fueron EAEC (366 cepas) y ExPEC (360 cepas), seguidos por ETEC (122 cepas) y ETEC (106 cepas). La distribución de grupos filogenéticos fue la siguiente: A 642 cepas, B1 426 cepas, B2 9 cepas, D 4 cepas, U 4 cepas (todas cepas del estudio), C 4 cepas y Clado I o II 3 cepas (dos cepas del estudio).

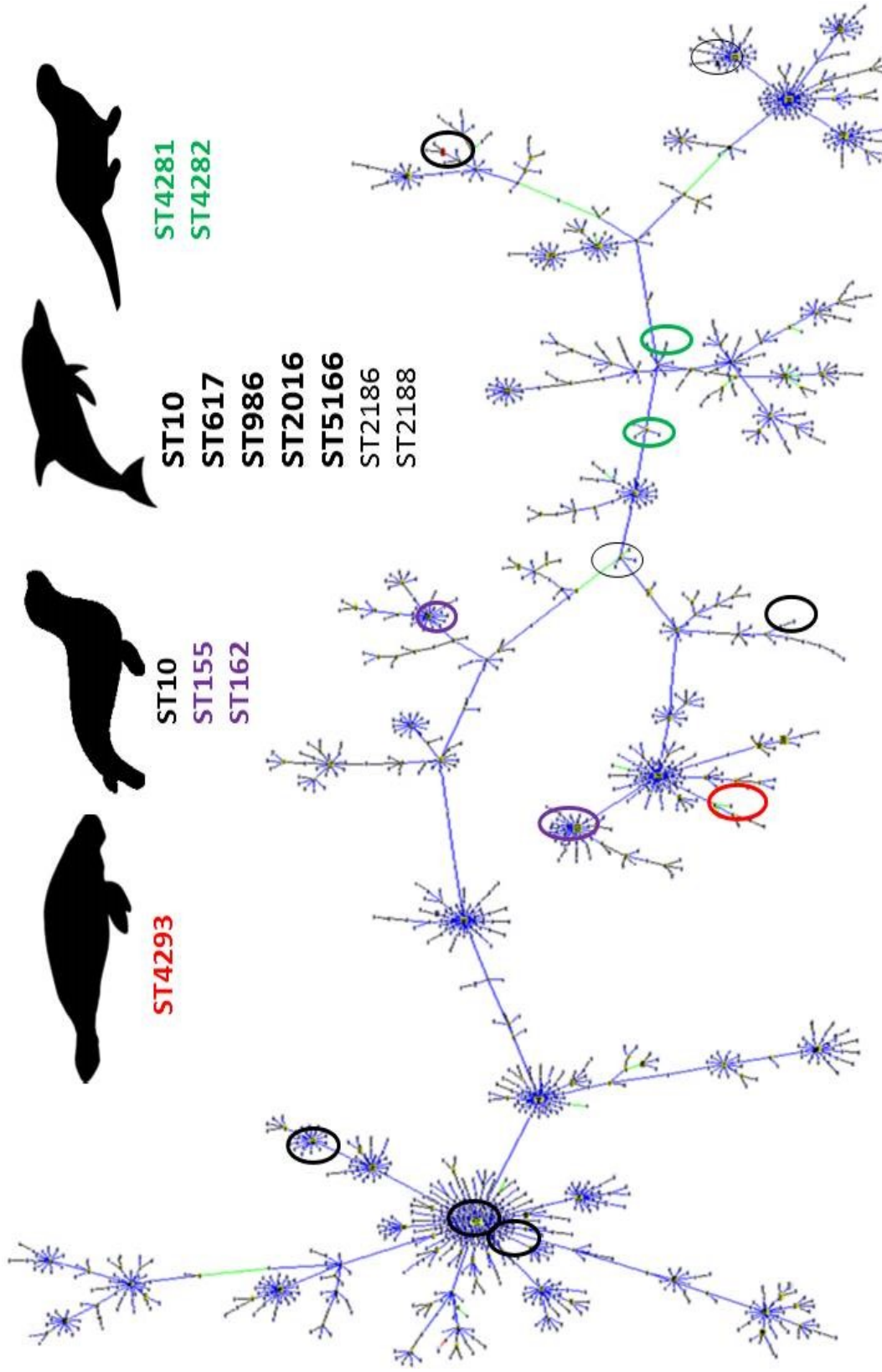


Figura 15. Posición de las ST de interés en el Árbol 0. En negro y negritas: ST de delfines del estudio. En negro línea delgada: ST de delfines. En verde: ST de nutria. En morado: ST de lobo marino (además de la ST10 en negritas); Círculo rojo: ST de manatí. Árbol generado con el programa goeBURST¹⁰⁸

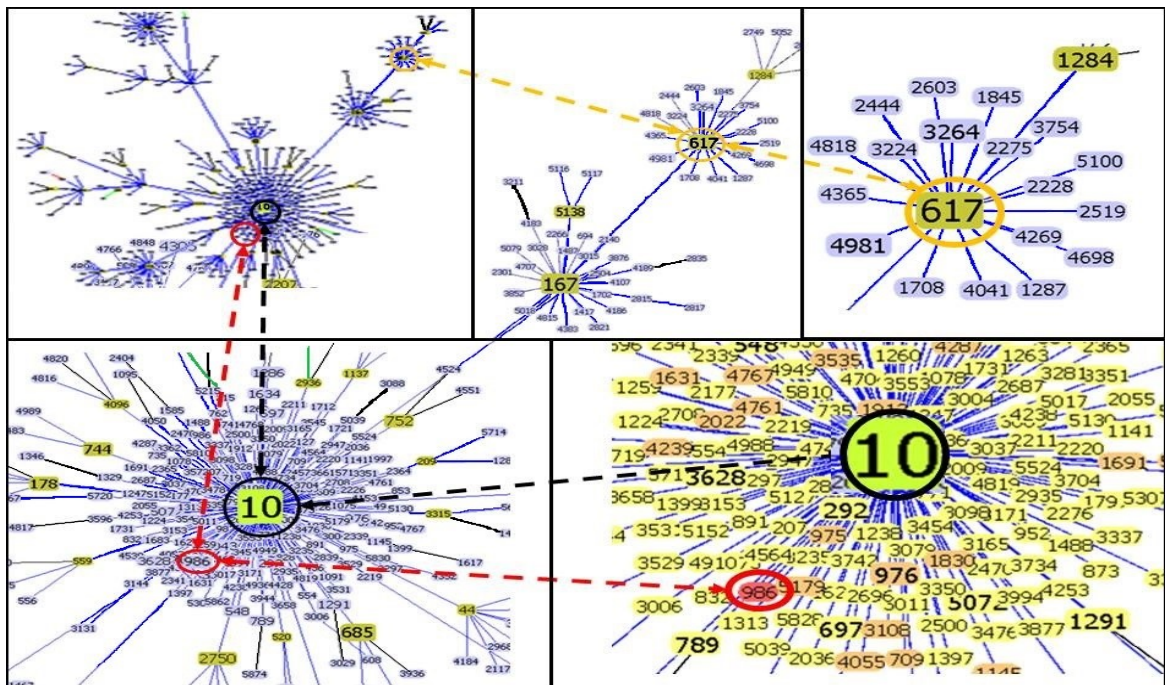


Figura 16. Posición de ST10, ST617 y ST986 en el Árbol 0. ST de cepas del estudio: Círculo negro: el genotipo central ST10 (cepa 13); Círculo amarillo: ST617 (cepa 15); Círculo rojo: ST986 (cepa 6). Acercamiento del árbol 0 generado con el programa goeBURST¹⁰⁸.

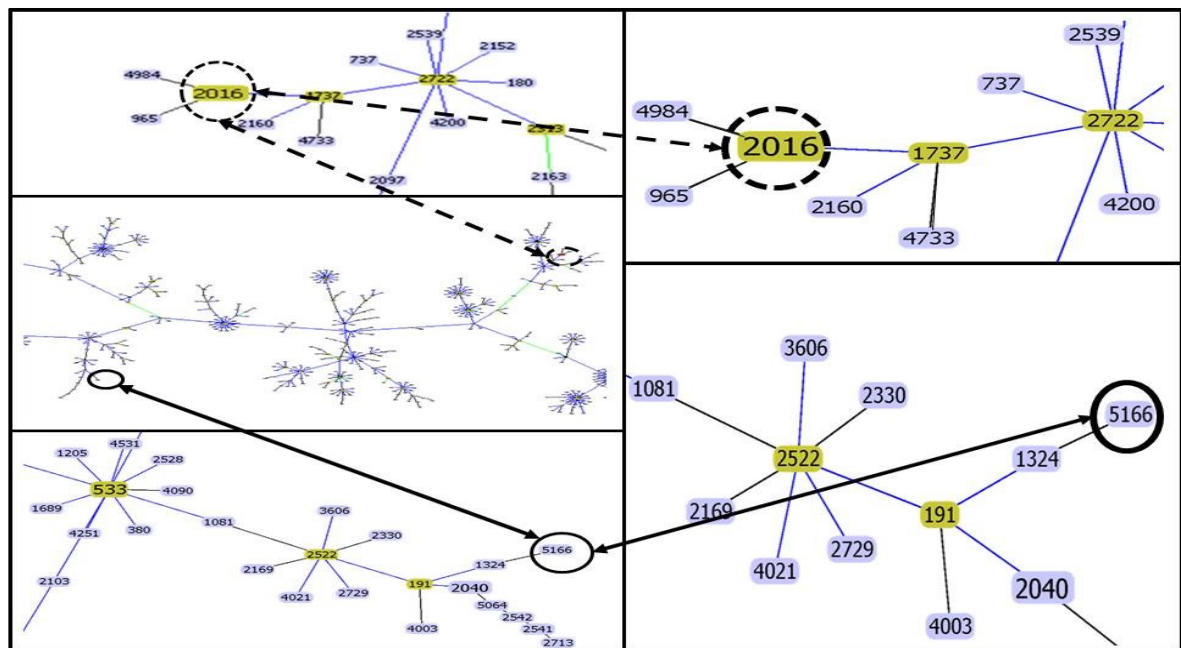


Figura 17. Posición de ST2016 y ST5166 en el Árbol 0. ST de cepas del estudio. Círculo y flechas punteadas: ST2016 (cepas 18 y 19). Círculo y flechas sólidas: ST5166 (cepa 17). Líneas negras: SLV común. Líneas azul-grisáceas: SLV no común. Línea verde: DLV. Acercamiento del árbol 0 generado con el programa goeBURST.

La cepa 13 ST10 presentó similares características a lo reportado anteriormente para otras cepas ST10 en la literatura; debido a esto la comparación con otras ST10 de la base de datos de Achtman no produjo resultados diferentes.⁶⁸

La cepa 15 ST617 formó parte del STc10 con DLV respecto a la ST10 y fue fundadora de un subgrupo conformado por 19 ST y 20 cepas no asociadas a ningún STc (Figura 18).

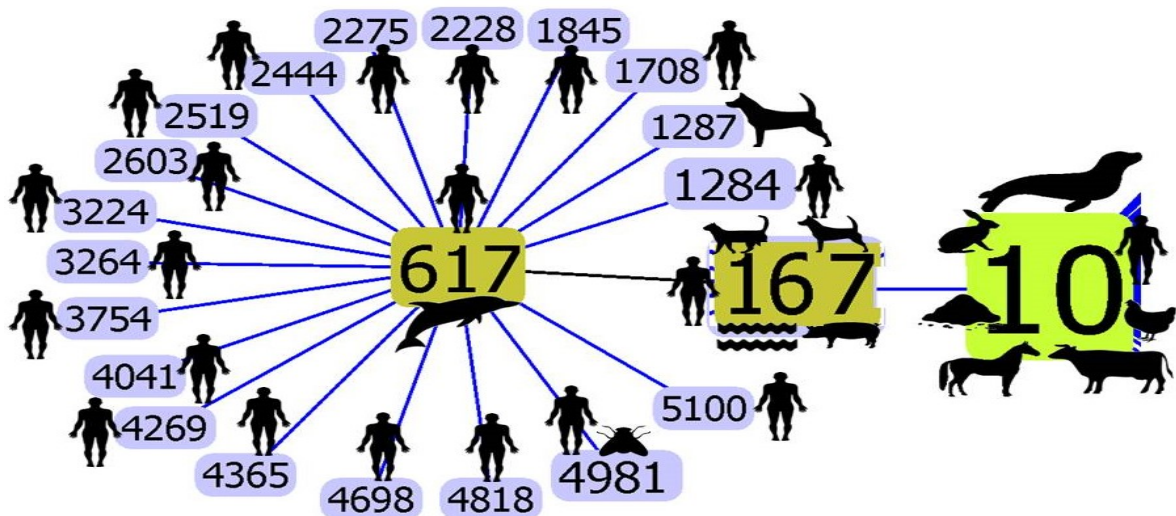


Figura 18. Subgrupo fundado por la ST617 en el Árbol 0. Se muestra con una silueta la especie origen de las cepas del subgrupo; se incluyen las ST10 (genotipo central) y la ST167 que se ubica entre la ST617 y la ST10. ST10: bovino, caballo, conejo, humano, lobo marino, pollo y lobo marino; ST167: agua, cerdo, gato, humano y perro; ST617: humano y *T. truncatus*; ST1287: perro; ST4981: humano y mosca; todas las demás cepas de las ST del grupo fueron aisladas de humanos. En verde claro se representa el genotipo central de cada árbol. En verde oscuro las ST fundadoras de subgrupos. En gris las demás ST. Líneas negras: SLV más común. Líneas azules: SLV no común.⁶⁸

En total, se agruparon 28 cepas (incluidas las cepas ST617) en este subgrupo; el 72.4% de éstas fue catalogado como patógeno y el 89.2% fue aislado de humanos, principalmente las cepas ST617.

La cepa 6 ST986-filogrupo A solo varía por un locus (*fumC*) del genotipo central, por lo que se ubicó directamente asociado a la ST10, pero no es considerado como parte del STc10. Para su análisis se compararon las ST con SLV con respecto a la ST986 y se

encontraron 22 ST como las más cercanas. El programa goeBURST identifica con el color rojo a la ST analizada, con el color naranja claro a las ST con SLV y con el color amarillo claro a las ST con DLV con respecto a la ST986 en este caso (Figura 19).

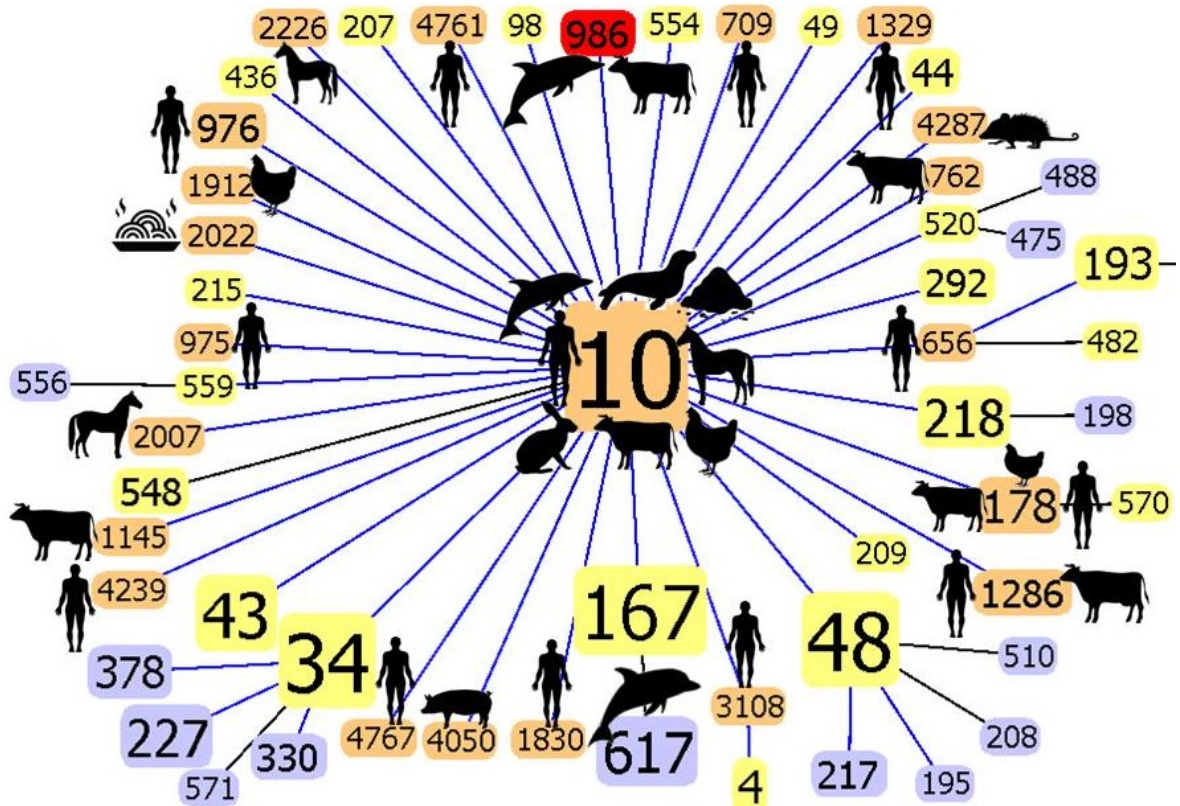


Figura 19. ST cercanas a la ST986, sección del Árbol 0. En color rojo: ST986; en color naranja: ST con SLV; en color amarillo: ST con DLV; en color gris: ST no relacionadas. Se muestra con una silueta la especie origen de las cepas del subgrupo; se incluyen las ST10 (genotipo central) y la ST167 que se ubica entre la ST617 y la ST10. ST10: bovino, caballo, conejo, humano, lobo marino, pollo y lobo marino; ST167: agua, cerdo, gato, humano y perro; ST617: humano y *T. truncatus*; ST1287: perro; ST4981: humano y mosca; todas las demás cepas de las ST del grupo fueron aisladas de humanos. En verde claro se representa el genotipo central de cada árbol. En verde oscuro las ST fundadoras de subgrupos. En gris las demás ST. Líneas negras: SLV más común. Líneas azules: SLV no común.⁶⁸

El 57.6% de las cepas a SLV de distancia de la ST986 aisladas de animales fueron catalogadas como comensales o no patógenas; sin embargo, si solo incluimos a las ST sin STc asociado (como la ST986) este porcentaje aumenta a 70%. Como ejemplo de esto se encontró la cepa ST4287 procedente de una zarigüeya mexicana. En cepas de origen

humano el 50% son catalogadas como no patógenas.

Las cepas 18 y 19, ambas ST2016 y miembros del grupo U, se ubicaron en el árbol 0 sin asociarse a ningún STc y a más de TLV del genotipo central. Al igual que con la cepa 6 ST986, se realizó el análisis de las ST con SLV con respecto a la ST2016 (Figura 20).

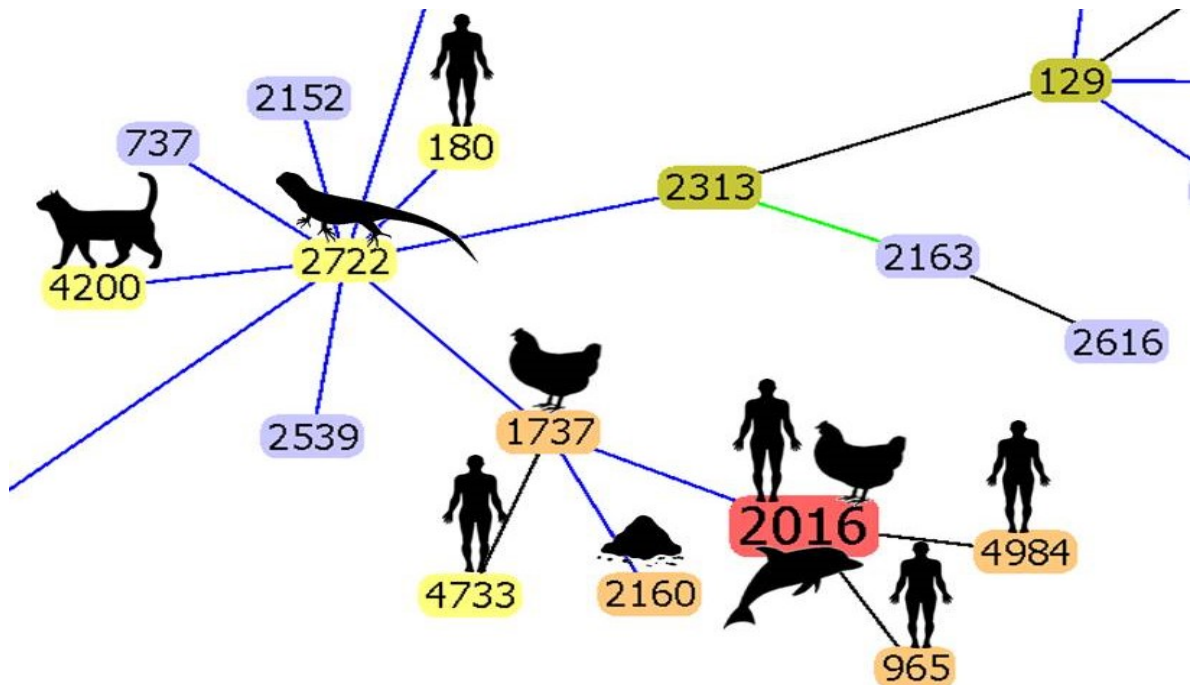


Figura 20. ST cercanas a la ST2016, sección del Árbol 0. En color rojo: ST2016; En color naranja: ST con SLV; en color amarillo: ST con DLV; en color gris y verde: ST no relacionadas. Se muestra con una silueta la especie origen de las cepas del subgrupo con SLV y DLV con respecto a la ST2016. ST180: humano; ST965: humano; ST1737: pollo; ST2016: humano, pollo y *T. truncatus*; ST2160: suelo; ST2722: reptil; ST4200: gato; ST4733: humano; ST4984: humano. Líneas negras: SLV más común. Líneas azules: SLV no común. Línea verde: DLV.⁶⁸

La ST2016 fue fundadora de un subgrupo formado por la ST965 y la ST4984, ambas aisladas de humanos. La ST1737 y ST2160 también se ubicaron a una SLV de nuestras cepas 18 y 19 ST2016. Cuatro ST más se incluyeron en la comparación, aunque se ubicaron a DLV de nuestra ST de interés, entre éstas la ST2722 aislada de un reptil australiano y que sirve como fundadora del subgrupo del cual se deriva la ST2016. En total 11 cepas fueron comparadas con nuestras cepas 18 y 19, incluidas las 3 cepas ST2016 registradas en la base

de datos. El 55% fueron catalogadas como patógenas; 5 de las 7 cepas más cercanas a las nuestras fueron patógenas, dos fueron de origen animal.⁶⁸ La última cepa de este árbol que sometimos al análisis por goeBURST, fue la cepa 17 con la inédita ST5166 que se ubicó en un subgrupo no relacionado con ningún STc del árbol 0 y que se fundó por la ST191 y 7 ST más (Figura 21). En este subgrupo, la ST191 y la ST2040 se encontraron a DLV de distancia y solo la ST1324 se encontró a una SLV de la ST5166.⁶⁸

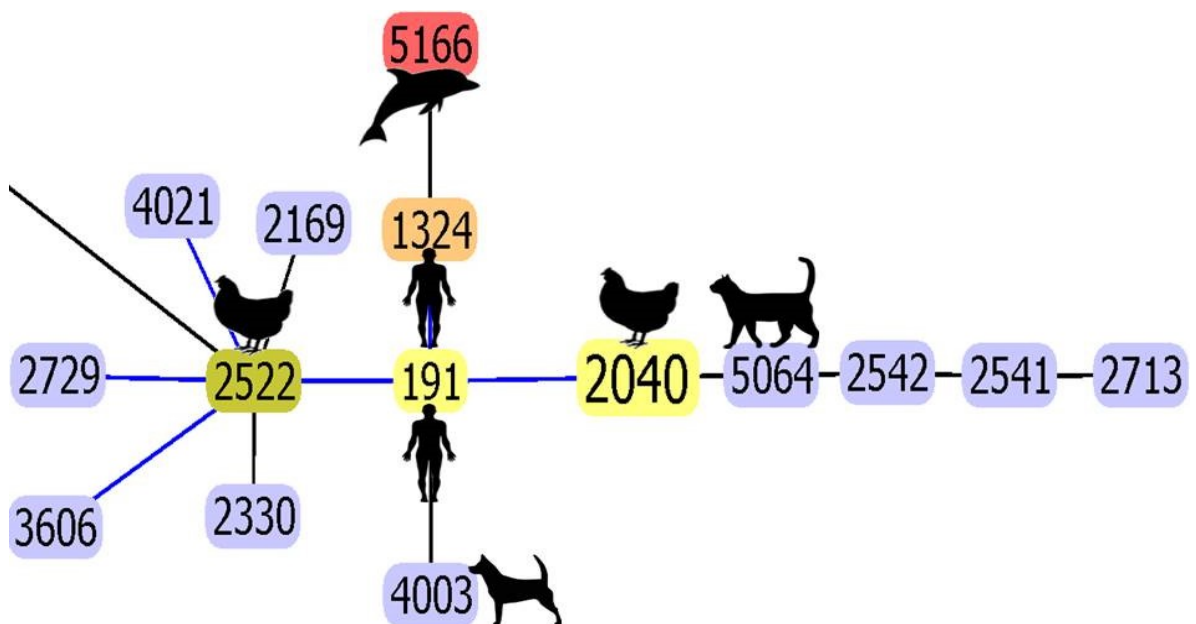


Figura 21. ST cercanas a la ST5166, sección del Árbol 0. En color rojo: ST5166; en color naranja: ST con SLV; en color amarillo: ST con DLV; en color gris y verde: ST no relacionadas. Se muestra con una silueta la especie origen de las cepas del subgrupo con SLV y DLV con respecto a la ST5166. ST191: humano; ST1324: humano; ST2040: pollo; ST5166: *T. truncatus*. Líneas negras: SLV más común. Líneas azules: SLV no común.⁶⁸

Este subgrupo se deriva de otro subgrupo donde la ST2522 aislada de un pollo fue la fundadora. Ninguna de las cepas relacionadas con la ST5166 fue catalogada como patógena.⁶⁸

3.4.1.2. Árbol 1

El árbol 1 se conformó por 306 cepas, 122 ST y 3 STc: el STc31, el STc69 y el STc394. El genotipo central fue la ST69, la mayoría de las ST pertenecieron al STc69. Las cepas 7 y 8 de nuestro estudio formaron parte del genotipo central ST69 (Figura 22). El principal grupo filogenético del árbol fue el D.

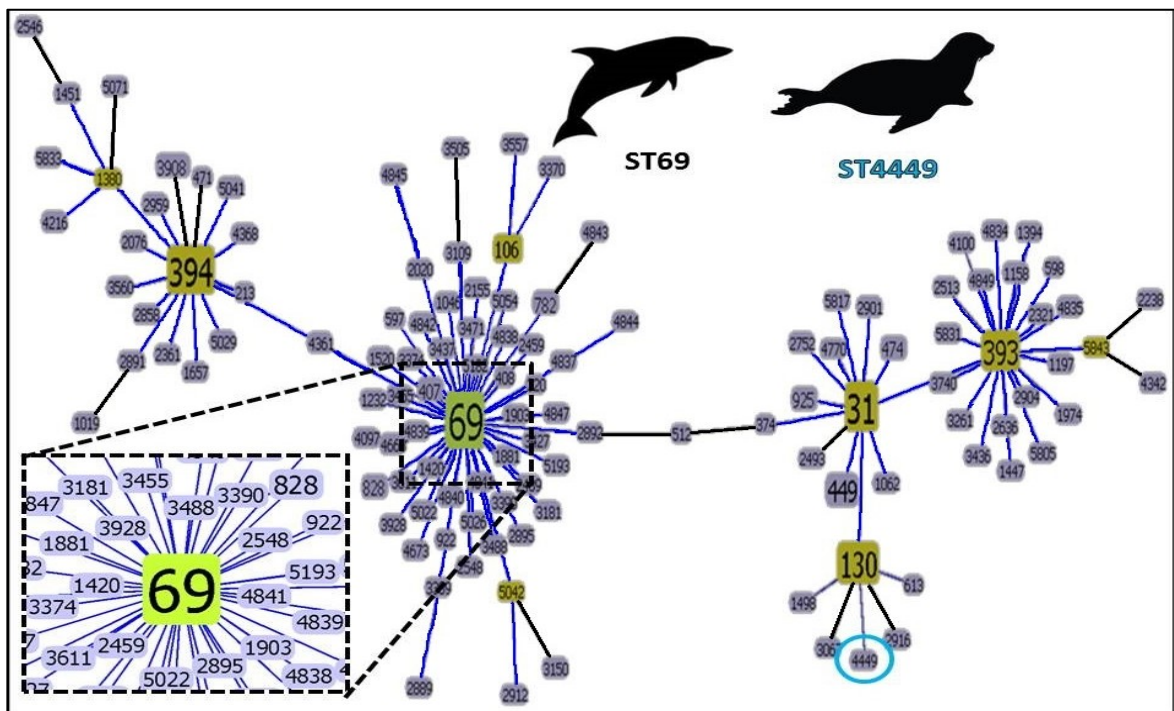


Figura 22. Posición de las ST de interés en el Árbol 1. Recuadro en línea punteada: ST69 cepas del estudio. Círculo azul: ST4449 de foca. Líneas negras: SLV común. Líneas azules: SLV no común. Árbol generado con el programa goeBURST.

De las cepas que contaban con información sobre grupos filogenéticos y patotipos, el 99.9% se caracterizó como filogrupo D (dos cepas del estudio) y los patotipos principales fueron EAEC 40% y ExPEC 55% (UPEC 44%).

La ST4449 proveniente de un foca de la Antártida se ubicó a más de TLV de nuestras cepas de *T. truncatus*, cercana al STc31 (Figura 23).

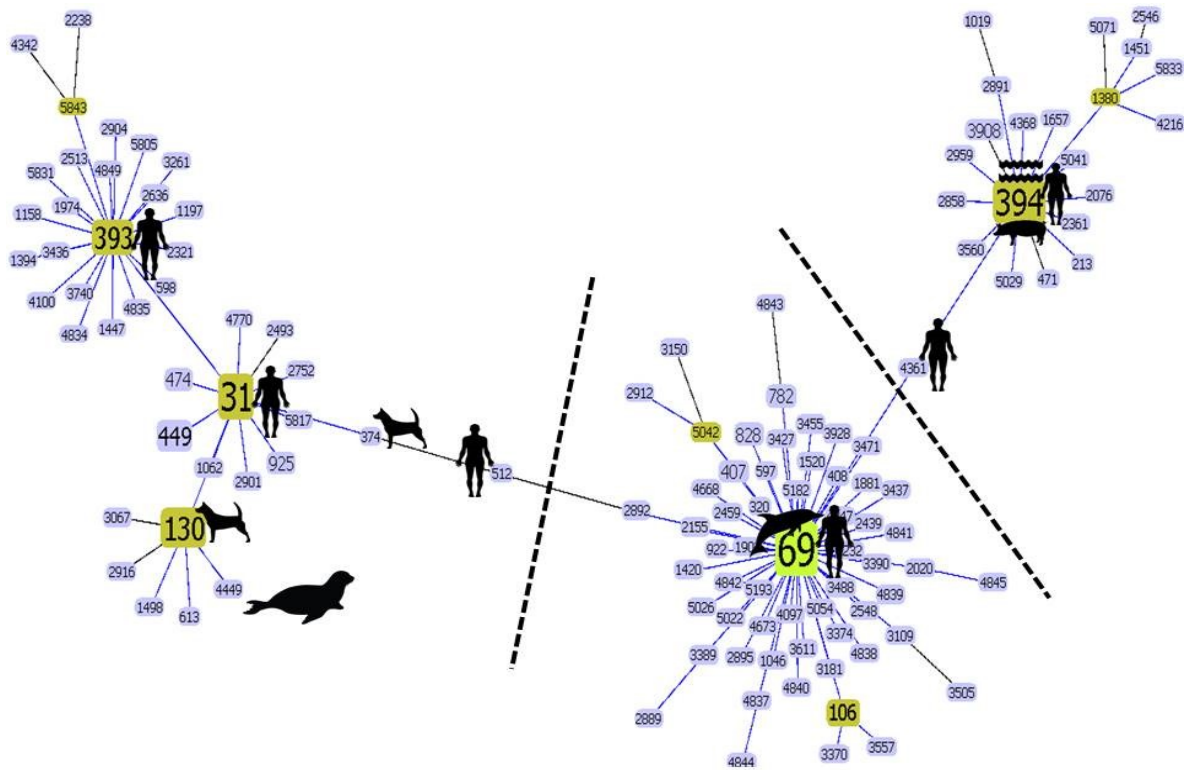


Figura 23. Origen de las cepas del Árbol 1. Se muestra con una silueta la especie origen de las ST del genotipo central, las fundadoras de subgrupos, las de mamíferos marinos y las que unen a los diferentes STc. ST31: humano; ST69: humano y *T. truncatus*; ST130: perro; ST374: perro; ST393: humano; ST394: agua, cerdo y humano; ST512: humano; ST4361: humano; ST4449: foca. Con líneas punteadas se marca la separación entre STc. Líneas negras: SLV común. Líneas azules: SLV no común.⁶⁸

El grupo clonal específico en donde se ubicaron las cepas 7 y 8 ST69 se formó por el STc69 (ST69, ST106, ST320, ST407, ST408 y ST597) y 53 ST más, lo que significó un total de 155 cepas. Solo el 11% de las cepas fueron aisladas de animales (incluidas las cepas 7 y 8 del estudio) o del medio ambiente; el resto fue aislado de humanos (Figura 24).

El 73.6% de las cepas integrantes de este subgrupo fue catalogado como patógeno. Solamente nueve cepas fueron reportadas como comensales, y de éstas, ocho fueron de origen aviar.⁶⁸

3.4.1.3. Árbol 3

El genotipo central del árbol 3 fue la ST131 y el STc131; solo cinco ST no fueron miembros ni se relacionaron directamente con este STc. Un total de 224 cepas y 87 ST conformaron este árbol (Figura 25). Dos cepas del estudio se agruparon en este árbol 3:

1. La cepa 1 ST131, fundadora del STc131;
2. La cepa 14 ST2185, miembro del STc131.

De las 67 cepas caracterizadas filogenéticamente, el 98.7% pertenecieron al filogrupo B2 (dos cepas del estudio), una sola cepa al grupo D y una al Clado IV. De las cepas con información sobre patotipos, el 95% fueron ExPEC y 65% del total se tipificaron como UPEC.

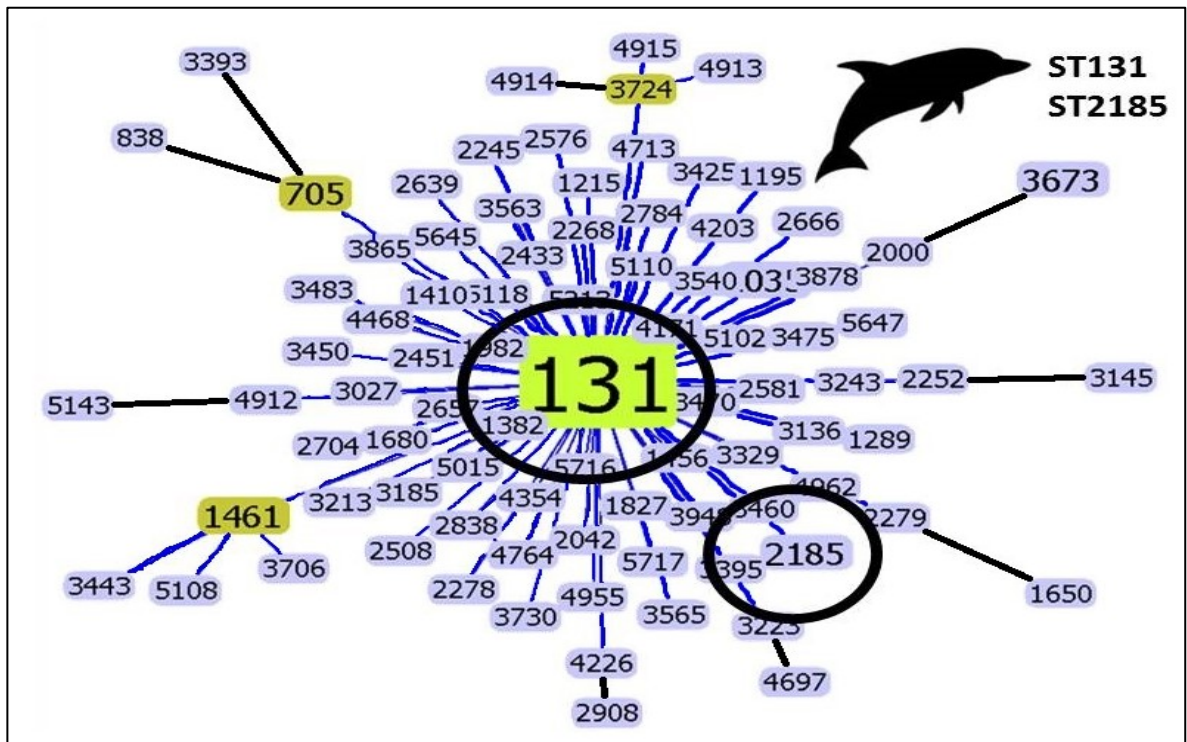


Figura 25. Posición de las ST de interés en el Árbol 3. En círculo negro: ST131 y ST2185 cepas del estudio. En verde claro se representa el genotipo central de cada árbol. En verde oscuro las ST fundadoras de subgrupos. En gris las demás ST. Líneas negras: SLV más común. Líneas azules: SLV no común. Árbol generado con el programa goeBURST.

El 92% de las cepas agrupadas en éste árbol fueron de origen humano. El 91% de las cepas pertenecieron al STc131, incluidas nuestra cepa 1 ST131 (genotipo central) y nuestra cepa 14 ST2185 (Figura 26). El 91% de las cepas fueron clasificadas como patógenas.

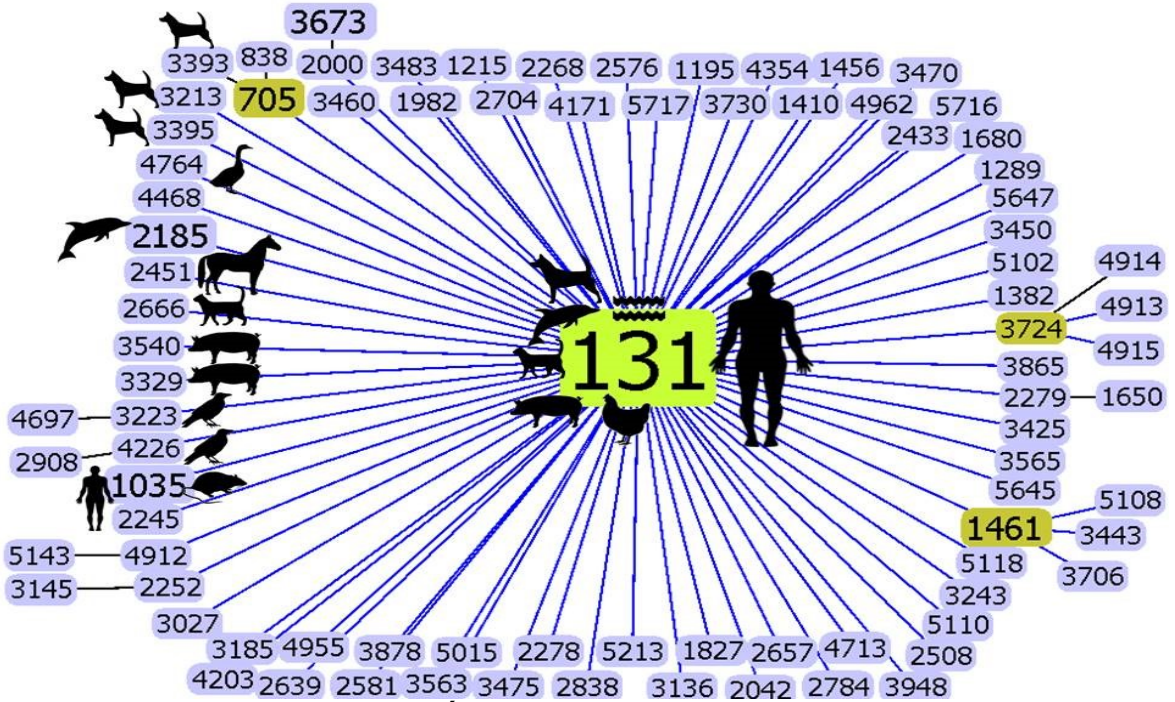


Figura 26. Origen de las cepas del Árbol 3. Todas la ST del árbol 3 fueron únicamente de origen humano, con excepción de las señaladas. ST131: agua, cerdo, gato, humano, perro, pollo y *T. truncatus*; ST1035: humano y rata; ST2185: *T. truncatus*; ST2451: caballo; ST2666: gato; ST3213: perro; ST3223: cuervo; ST3329: cerdo; ST3393: perro; ST3395: perro; ST3540: cerdo; ST4226: cuervo; ST4468: fauna silvestre no identificada; ST4764: ganso. En verde claro se representa el genotipo central de cada árbol. En verde oscuro las ST fundadoras de subgrupos. En gris las demás ST. Líneas negras: SLV más común. Líneas azules: SLV no común.⁶⁸

Al igual que la cepa 1, todas las cepas ST131 del árbol pertenecieron al filogrupo B2. Esto se observó también con la ST2185 original, la cepa EcBjDK proveniente de un delfin en cautiverio en Francia, que fue filotipificada como B2 al igual que nuestra cepa 14 ST2185.⁶⁸ Además, en este árbol 3 se ubicó la cepa ExPEC mexicana A8-24Mex ST4713 que no fue parte del STc131 y que se encontró a SLV de la cepa 1 ST131 y a DLV de la cepa 14 ST2185; con esta última compartió el mismo serotipo (O25:H4).

3.4.1.4. Árbol 6

El árbol 6 estuvo compuesto por 97 cepas y 56 ST, donde el genotipo central fue la ST648 y el STc648, éste fue el único STc del árbol y solo una ST no se relacionó directamente con él (Figura 27). Las dos cepas de este estudio que se encontraron en este árbol 6 fueron:

1. La cepa 11 ST648, ST fundadora del STc648;
2. La cepa 12 ST648, ST fundadora del STc648.

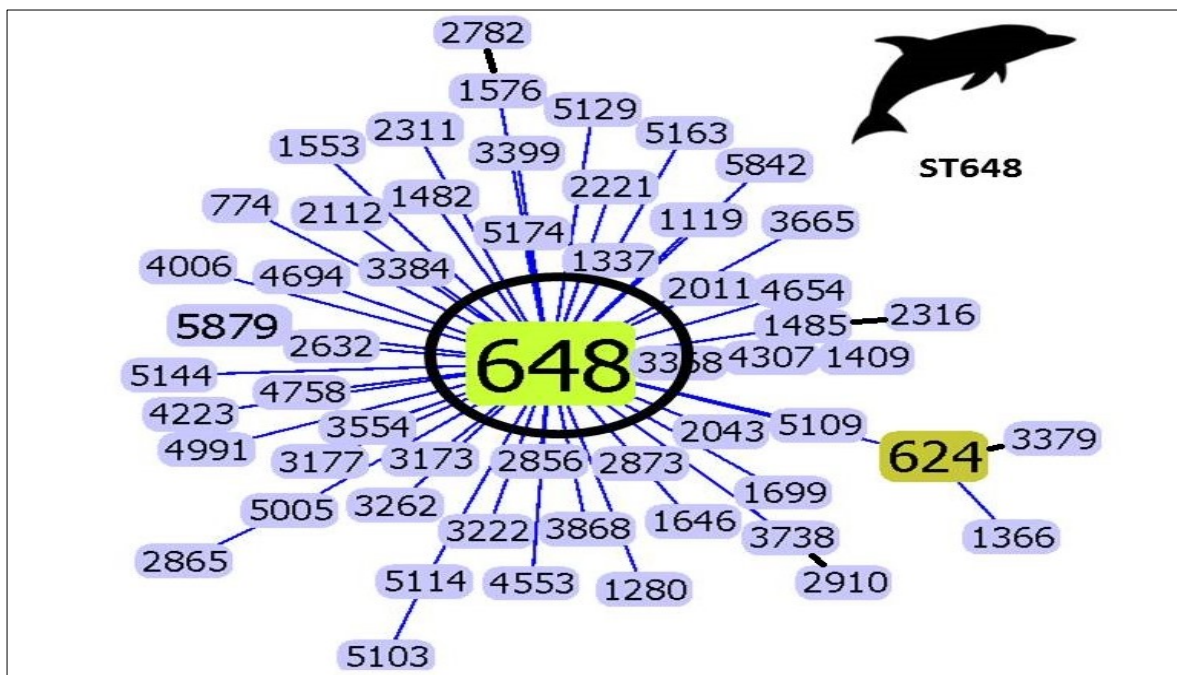


Figura 27. Posición de las ST de interés en el Árbol 6. En el círculo negro: ST648 de cepas del estudio. En verde claro se representa el genotipo central de cada árbol. En verde oscuro las ST fundadoras de subgrupos. En gris las demás ST. Líneas negras: SLV más común. Líneas azules: SLV no común. Árbol generado con el programa goeBURST.

El 35% de las cepas que constituyeron este árbol 6 tuvo información sobre patotipos; de esta cantidad, el 72% fueron caracterizadas como UPEC, 19% fueron cepas comensales, 6% EAEC y 6% EPEC. Solo el 28% de las cepas integrantes de éste árbol fueron filotipificadas. El grupo filogenético principal fue el D (92.3%), las cepas del estudio fueron del grupo F y U, lo que representan los únicos otros filogrupos del árbol 6.

El 55% de las cepas del árbol 6 se aislaron de humanos. El 58% de las cepas integrantes de este árbol fueron clasificadas como patógenas, la mayoría de humanos. En este árbol se encontró la cepa C4424 aislada de un pollo en México, con la ST3379 miembro del STc648 y catalogada como no patógena (al igual que nuestras cepas 11 y 12) (Figura 28).

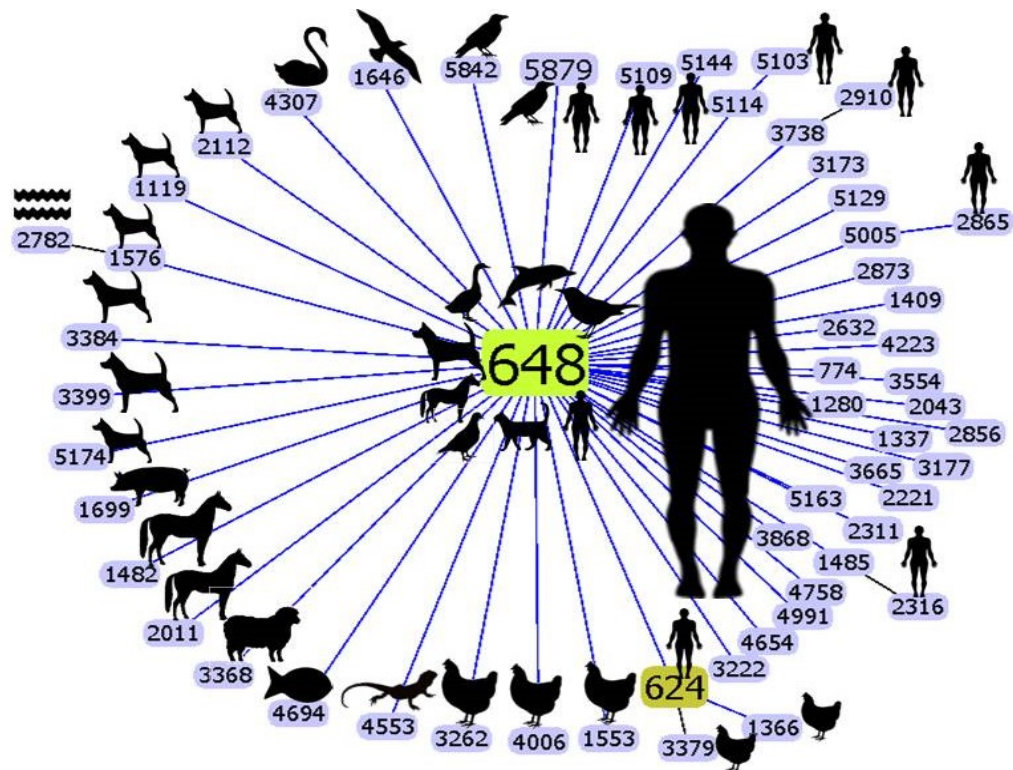


Figura 28. Origen de las cepas del Árbol 6. Se muestra con una silueta las especies de donde se han aislado las cepas integrantes del árbol 6. Agama: ST4553; Agua: ST2782; Ave no identificada: ST1646; Caballo: ST648, ST1482 y ST2011; Cerdo: ST1699; Cisne: ST4307; Cuervo: ST5842 y ST5879; Humano: ST624, ST648, ST774, ST1280, ST1337, ST1409, ST1485, ST2043, ST2221, ST2311, ST2316, ST2632, ST2856, ST2865, ST2873, ST2910, ST3173, ST3177, ST3222, ST3554, ST3665, ST3738, ST3868, ST4223, ST4654, ST4758, ST4991, ST5005, ST5103, ST5109, ST5114, ST5129, ST5163 y ST5879; Ovino: ST3368; Perro: ST648, ST1119, ST1576, ST2112, ST3384, ST3399 y ST5174; Pez: ST4694; Pollo: ST1633, ST1553, ST3262, ST3379 y ST4006; Ganso, Gato, Paloma, Tordo y *T. truncatus*: ST648. En verde claro se representa el genotipo central de cada árbol. En verde oscuro las ST fundadoras de subgrupos. En gris las demás ST. Líneas negras: SLV más común. Líneas azules: SLV no común.⁶⁸

La gran mayoría de las cepas cuyas ST no formaron parte del STc648 tuvieron características similares a este, lo que nos habla de la cercanía de las clonas agrupadas en este árbol 6.

3.4.1.5. Árbol 7

La cepa 5 ST1858 se ubicó en el árbol 7 formado por 54 ST y 82 cepas. El genotipo central del árbol 7 fue la ST14, fundadora del STc14 que es uno de los principales complejos de UPEC-UTI en humanos.^{158,150,159} Nuestra cepa ST1858 no fue miembro del STc14 y se encontró a TLV con respecto al genotipo central (Figura 29).

El principal patotipo fue ExPEC con 72 cepas, 35 de estas fueron UPEC. El único filogrupo reportado fue B2 (24 cepas, 1 cepa del estudio).

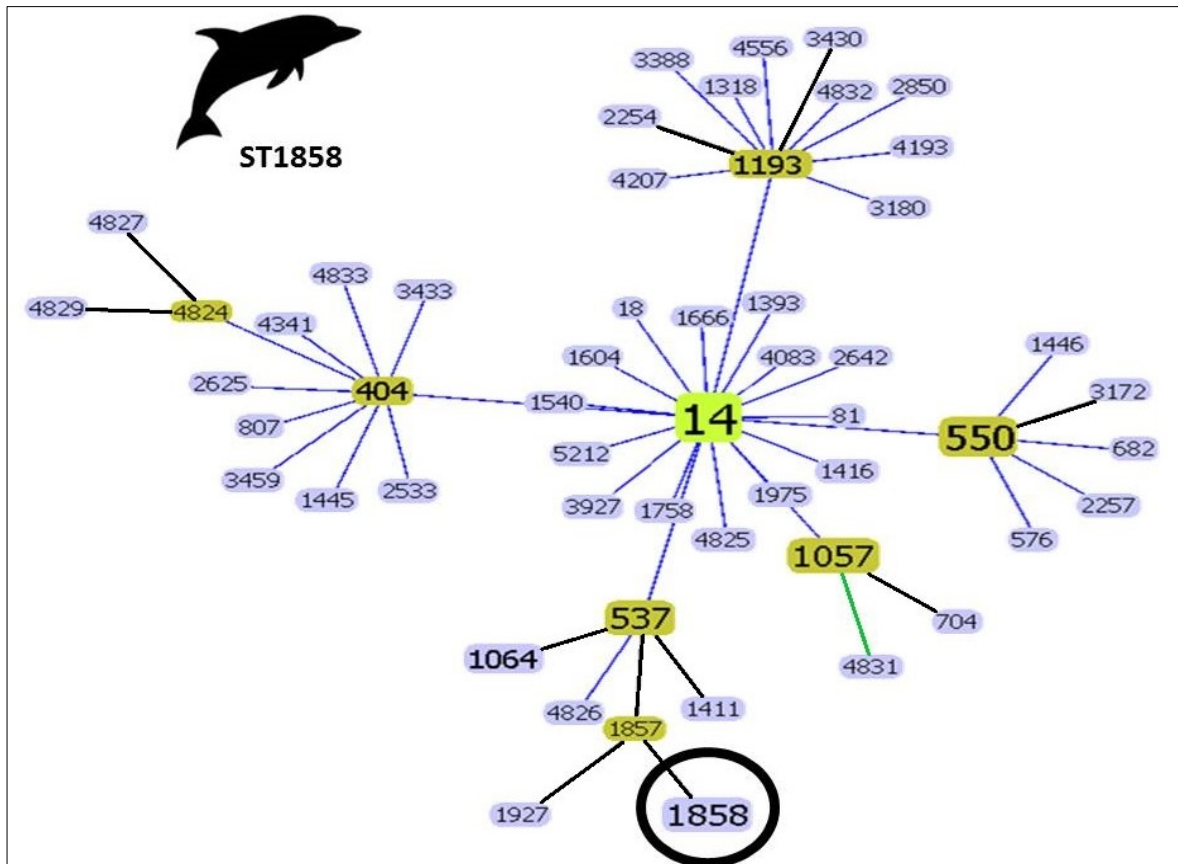


Figura 29. Posición de la ST de interés en el Árbol 7. En el círculo negro: ST1858 cepa del estudio. En verde claro se representa el genotipo central de cada árbol. En verde oscuro las ST fundadoras de subgrupos. En gris las demás ST. Líneas negras: SLV más común. Líneas azul-grisáceas: SLV no común. Línea verde: DLV. Árbol generado con el programa goeBURST.

Todas las cepas pertenecientes al STc14 fueron aisladas únicamente de humanos, con

excepción de la ST537 que fue aislada de humanos y animales (Figura 30). El 90% de las cepas integrantes del árbol 7 son de origen humano.⁶⁸

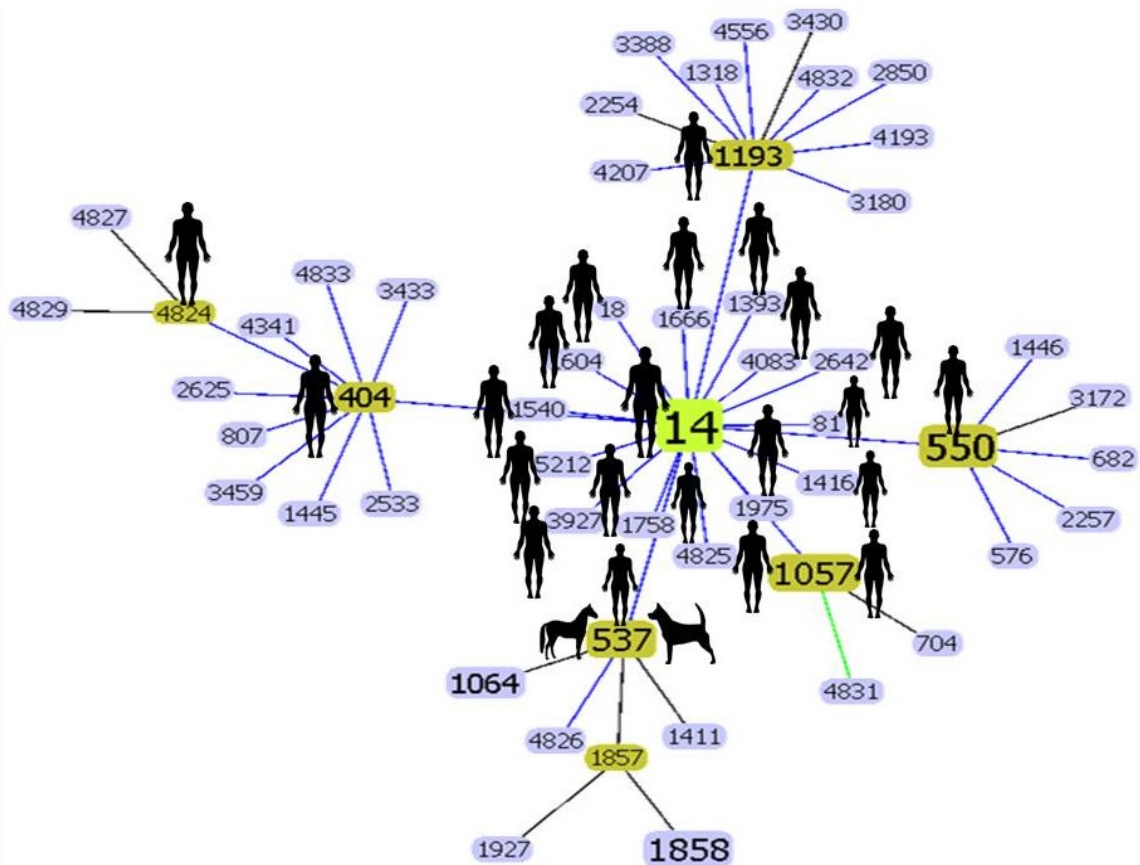


Figura 30. Origen de las cepas del Árbol 7. Se muestra con una silueta las especies de donde se han aislado el genotipo central y todas las ST a una SLV. Todas la ST a una SLV del genotipo central fueron aisladas sólo de humanos, con excepción de la ST537 (caballo, humano y perro). En verde claro se representa el genotipo central de cada árbol. En verde oscuro las ST fundadoras de subgrupos. En gris las demás ST. Líneas negras: SLV más común. Líneas azules: SLV no común. Línea verde: DLV.⁶⁸

La ST537 fue la cepa fundadora del subgrupo clonal al que pertenece la ST1858 (cepa 5) y en donde se agruparon la mayoría de las ST de origen animal. El subgrupo se compuso de tres cepas de origen humano: ST1064, ST1411 y ST4826, y la ST1857 aislada de un ave (*Manorina melanophrys*). La ST1857 estuvo a SLV de la ST537 y a DLV del genotipo central ST14 (Figura 31). La cepa ST1857 es la fundadora del subgrupo específico en el

que se ubica la ST1858.

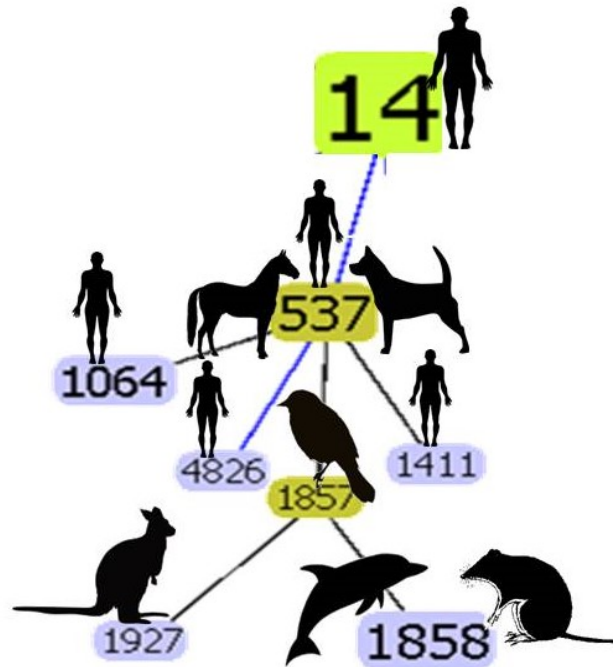


Figura 31. Acercamiento del Árbol 7. Se muestra con una silueta las especies de donde se han aislado las cepas del subgrupo clonal en el que se agrupa la ST1858. ST14: humanos; ST537: caballo, humano y perro; ST1064: humano; ST1411: humano; ST1857: *Manorina melanophrys*; ST1857: *Isoodon obesulus* y *T. truncatus*; ST1927: *Onychogalea fraenata*; ST4826: humano. En verde claro se representa el genotipo central de cada árbol. En verde oscuro las ST fundadoras de subgrupos. En gris las demás ST. Líneas negras: SLV más común. Líneas azules: SLV no común.⁶⁸

De las ocho cepas de origen animal, solo las dos ST537 provenientes de animales domésticos fueron reportadas como patógenas, mientras que las demás fueron reportadas como no patógenas o comensales.⁶⁸ Las cuatro cepas que formaron el subgrupo fundado por ST1857, fueron filotipificadas como filogrupo B2, incluida nuestra cepa 5 ST1858.⁸

3.4.1.6. Árbol 30

El árbol 30 se constituyó por 50 cepas y 15 ST, sin STc. El genotipo central fue la ST372 y todas las ST se relacionaron directamente por SLV (Figura 32); esta cercanía en el agrupamiento significa que comparten características genéticas similares, a pesar de no pertenecer a un mismo STc. La cepa 2 ST372 de este trabajo se localizó en este árbol 30.

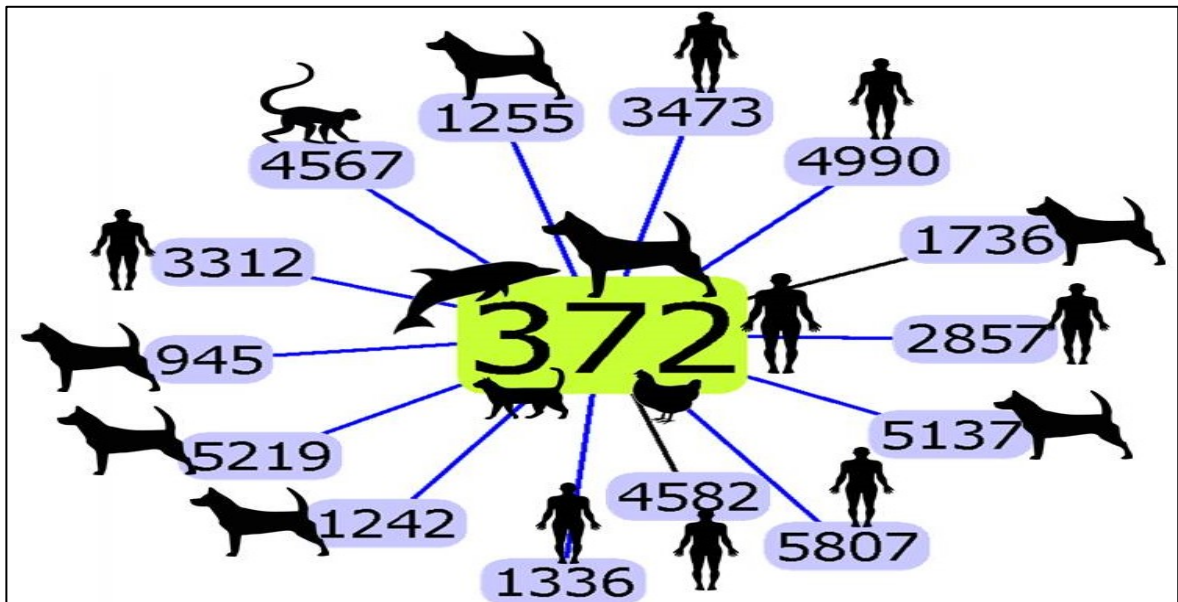


Figura 32. Origen de las cepas del Árbol 30. En verde claro se representa el genotipo central de cada árbol. En gris las demás ST. Líneas negras: SLV común. Líneas azules: SLV no común. Se muestra con una silueta las especies de donde se han aislado las ST integrantes de este árbol. ST372: perros, humanos, gato, pollo y *T. truncatus*; ST945: perro; ST1242: perro; ST1244: perro; ST1336: humano; ST1736: perro; ST2857: humano; ST3312: humano; ST3473: humano; ST4567: mono; ST4582: humano; ST4990: humano; ST5137: perro; ST5219: perro; ST5807: humano.⁶⁸ Árbol generado con el programa goeBURST.

La mayoría de las cepas de la ST372 y del árbol pertenecieron al patotipo UPEC 75%, mientras que 37 cepas (70%) fueron caracterizadas como ExPEC. Solo cinco cepas de este árbol fueron catalogadas como no patógenas: nuestra cepa 2 STEC ST372, la ST1336 de origen humano, la ST4567 de origen animal, la ST4582 y la ST4990 ambas de origen humano. Todas las cepas ST372 del árbol 30 y en la literatura han sido ExPEC.^{68,129,148,150,159}

3.4.1.7. Árbol 31

El genotipo central del árbol 31 fue la ST1611 que tuvo SLV de diferencia con nuestras cepas 3 y 4 ST99 (*gyrB* fue diferente); aunque el alelo de variación común fue *mdh* y por eso se aprecia una línea azul entre estas dos ST (Figura 33). Se agruparon 25 cepas y 14 ST en este árbol sin STc asociado. Solo cuatro cepas (tres B1 y una U) presentaron tipificación filogenética y únicamente cinco cepas tuvieron información con respecto al patotipo: tres ExPEC y dos comensales.

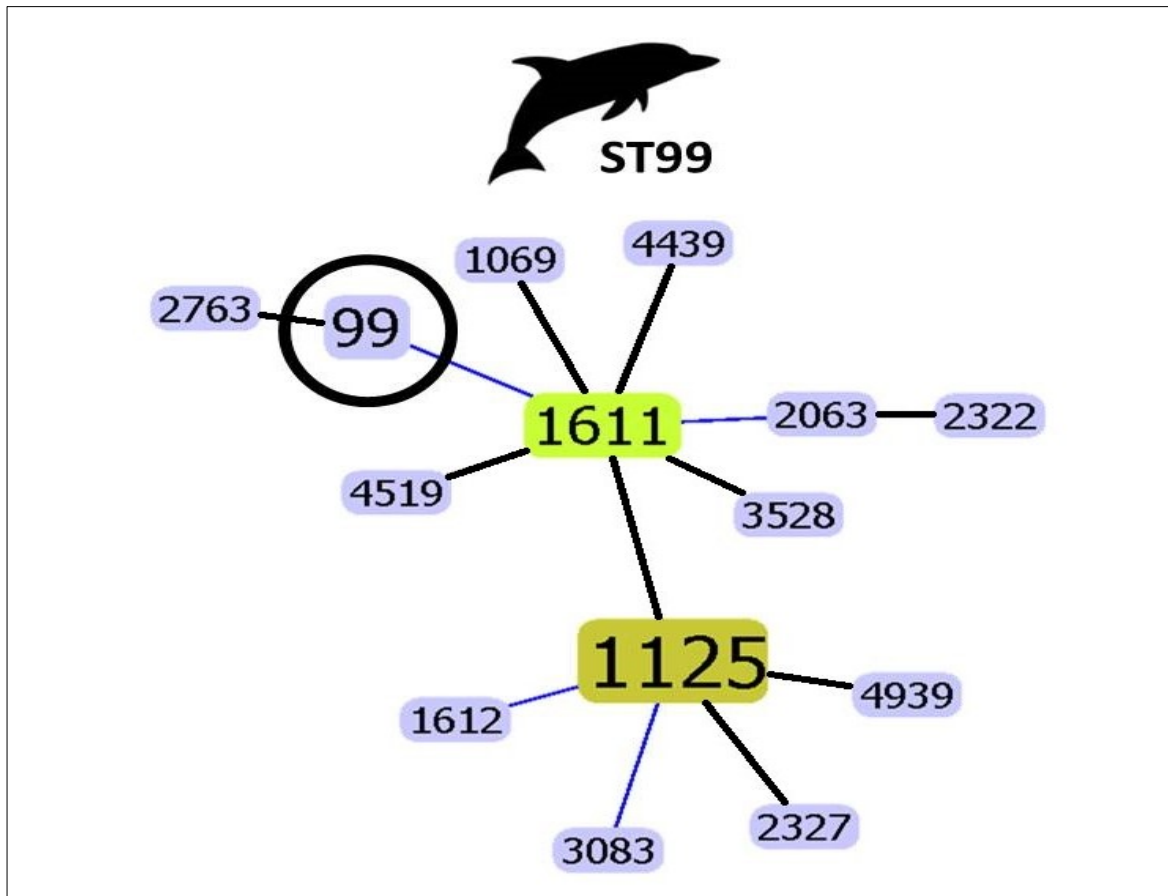


Figura 33. Posición de la ST de interés en el Árbol 31. En el círculo negro: ST99 cepas de delfines del estudio. En verde claro se representa el genotipo central de cada árbol. En verde oscuro las ST fundadoras de subgrupos. En gris las demás ST. Líneas negras: SLV más común. Líneas azules: SLV no común. Árbol generado con el programa goeBURST.

La gran mayoría de las cepas que formaron este árbol 31 se aislaron de animales; solo una

fue aislada de humanos y dos fueron de muestras de agua (Figura 34).⁶⁸ 11 de las 26 cepas que conformaron el árbol 31 fueron clasificadas como comensales o no patógenas, entre estas la ST2763, una cepa ST1611 (ambas a una SLV de nuestras cepas 3 y 4) y la ST99 original.

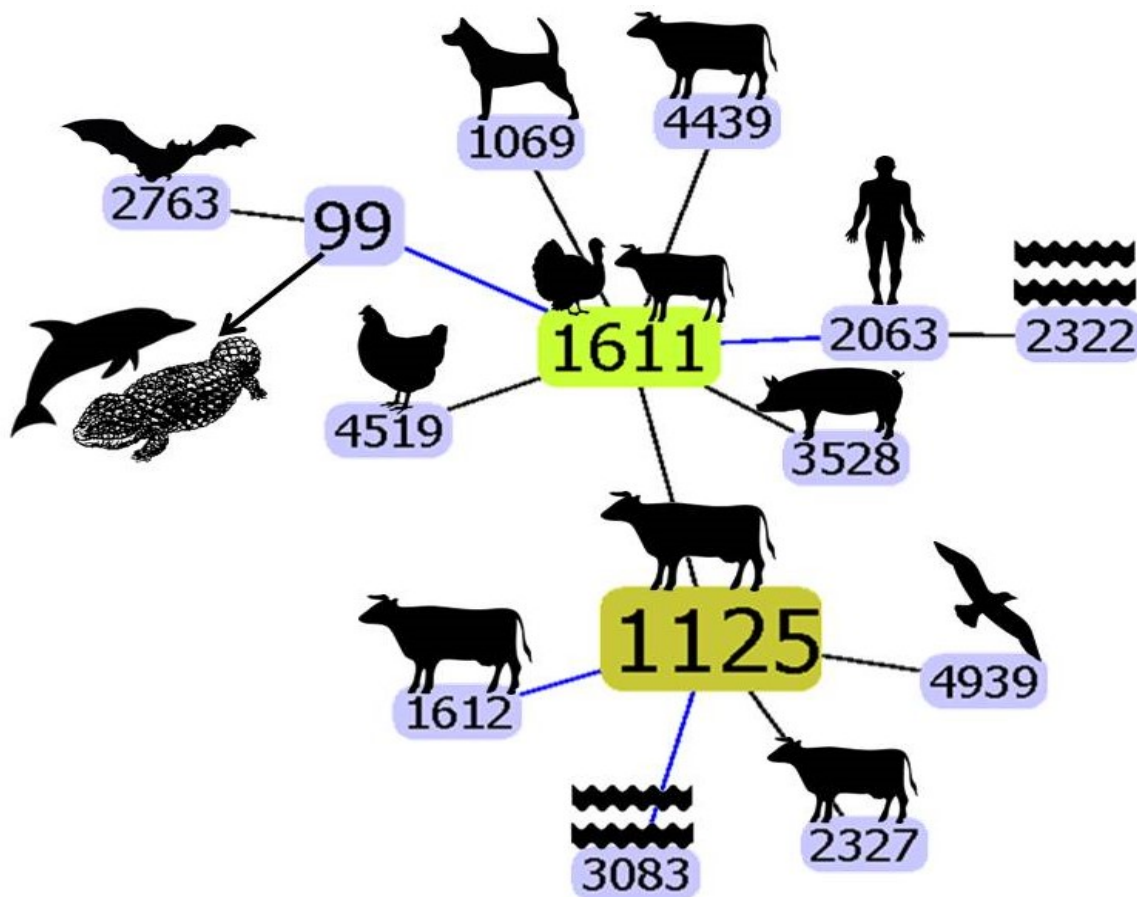


Figura 34. Origen de las cepas del Árbol 31. Se muestra con una silueta las especies de donde se han aislado las ST integrantes de este árbol. ST99: humanos, *T. rugosa* y *T. truncatus*; ST1069: perro; ST1125: bovinos; ST1611: pavo doméstico y bovinos; ST1612: bovino; ST2063: humano; ST2322: agua; ST2327: bovino; ST2763: murciélago; ST3083: agua; ST3528: cerdo; ST4439: bovino; ST4519: pollo; ST4939: ave desconocida.^{68,181} En verde claro se representa el genotipo central de cada árbol. En verde oscuro la ST fundadora de subgrupo. En gris las demás ST. Líneas negras: SLV más común. Líneas azules: SLV no común.

Una cepa ST1611 APEC tuvo el mismo antígeno flagelar H19 que las cepas ST99 de nuestro estudio. Las demás cepas integrantes del árbol 31 no tuvieron información con respecto a serotipo o filogrupo.

3.4.1.8. Árbol 38

El árbol 38 tuvo como genotipo central a la ST80 que perteneció al STc568; este árbol agrupó a 30 cepas en 10 ST. Las cepas 9 y 16 con la ST1946 se ubicaron en este árbol. La ST1946 presentó dos loci de variación (DLV), los alelos *fumC* y *purA*, con respecto al genotipo central (Figura 35).

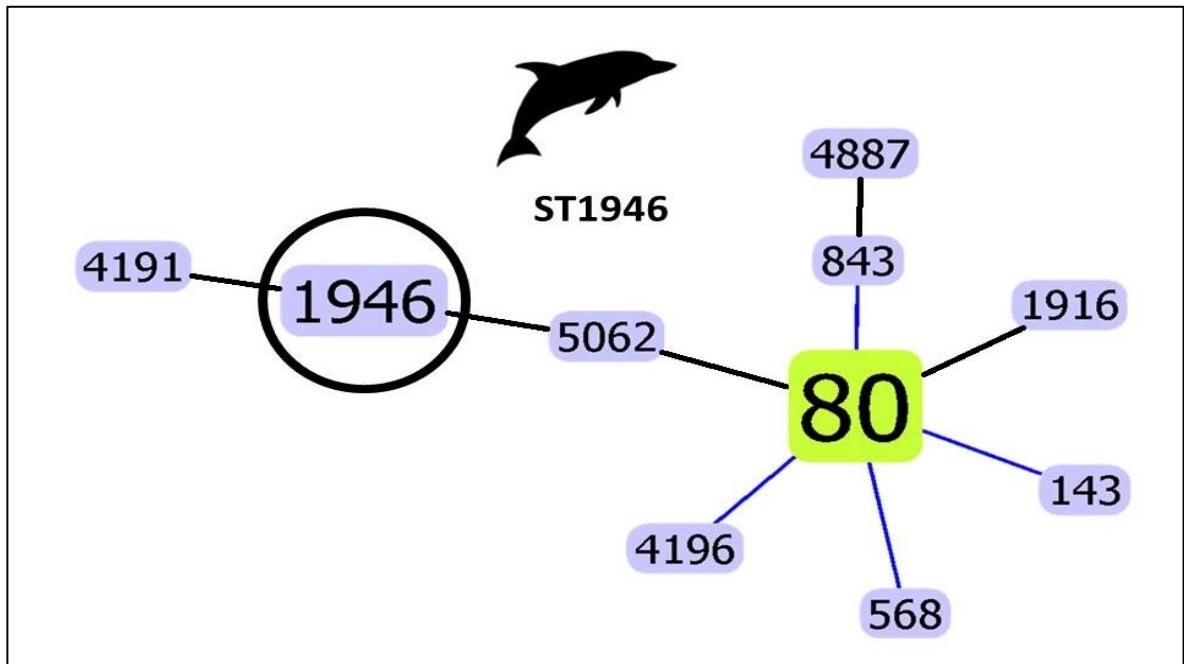


Figura 35. Posición de la ST de interés en el Árbol 38. En el círculo negro: ST1946 cepas de delfines del estudio. Líneas negras: SLV común. Líneas azules: SLV no común. Árbol generado con el programa goeBURST.

El 73% de las cepas de éste árbol 38 fueron identificadas con el filogrupo B2; el resto no tuvo información al respecto. El patotipo principal fue UPEC con 18 cepas (60%), ExPEC (67%), cepas no determinadas (27%) y cepas comensales 7%. La mayoría de las cepas integrantes del árbol 38 fueron aisladas de humanos o animales en estrecha cercanía con el ser humano (Figura 36).⁶⁸

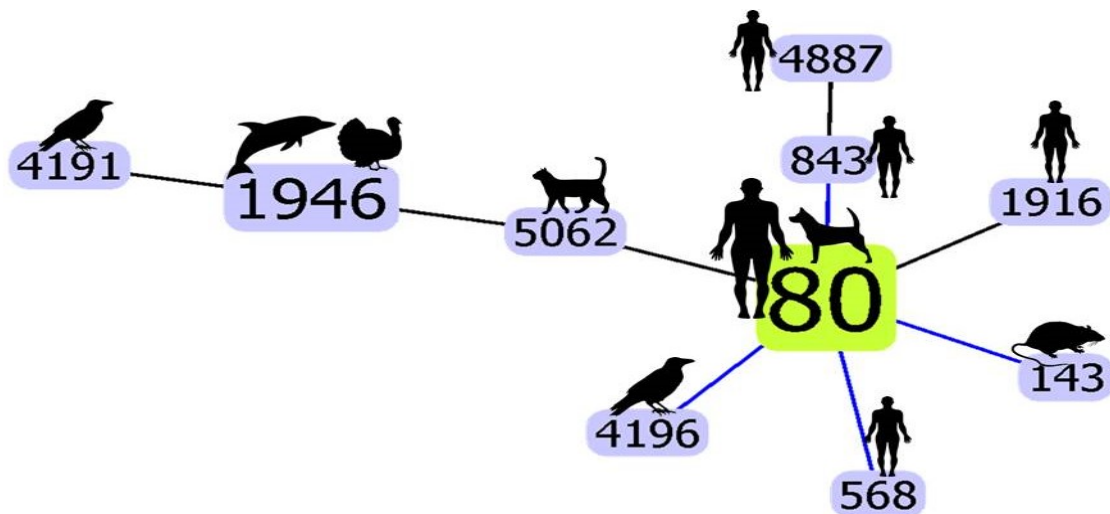


Figura 36. Origen de las cepas del Árbol 38. Se muestra con una silueta las especies de donde se han aislado las ST integrantes de este árbol. ST80: humanos y perros; ST143: rata; ST568: humano; ST843: humano; ST1916: humano; ST1946: *T. truncatus* y pavo doméstico; ST4191: cuervo; ST4196: cuervo; ST4887: humano; ST5062: gato doméstico. En verde claro se representa el genotipo central de cada árbol. En verde oscuro las ST fundadoras de subgrupos. En gris las demás ST. Líneas negras: SLV más común. Líneas azules: SLV no común.⁶⁸

La mayoría de las cepas del árbol 38 fueron aisladas de sitios anatómicos extraintestinales al igual que las cepas 9 y 16 de nuestro estudio.⁶⁸ Con excepción de la cepa ECOR63, todas las cepas registradas como ST80 (DLV con respecto a ST1946) fueron tipificadas como patógenas o aisladas de individuos con alguna afección clínica.^{68,135,148,159} Las cepas ST1946 fueron catalogadas como comensales¹⁰¹ en los dos delfines de los cuales se aislaron; sin embargo, la cepa ST1946 original aislada de un pavo fue clasificada como patógena. La cepa ST5062, ubicada entre la ST80 y nuestras cepas ST1946, fue catalogada como UPEC. Por el contrario, la cepa ST4191 que también se encuentra a una SLV fue clasificada como comensal.

3.4.1.9. Árbol 1314

El último árbol de interés fue el *singleton* 1314 (Figura 37), en donde se ubicó la cepa 10 con la segunda secuencia tipo inédita de este estudio, la ST5098. El *singleton* es la representación de las ST que no fueron asociadas con otras por diferir en más de tres loci (TLV) con la ST más cercana. Esto nos habla de un genotipo muy diferente al resto de la población estudiada. Gráficamente goeBURST lo representó igual que a un genotipo central, es decir, un rectángulo redondeado de color verde brillante.

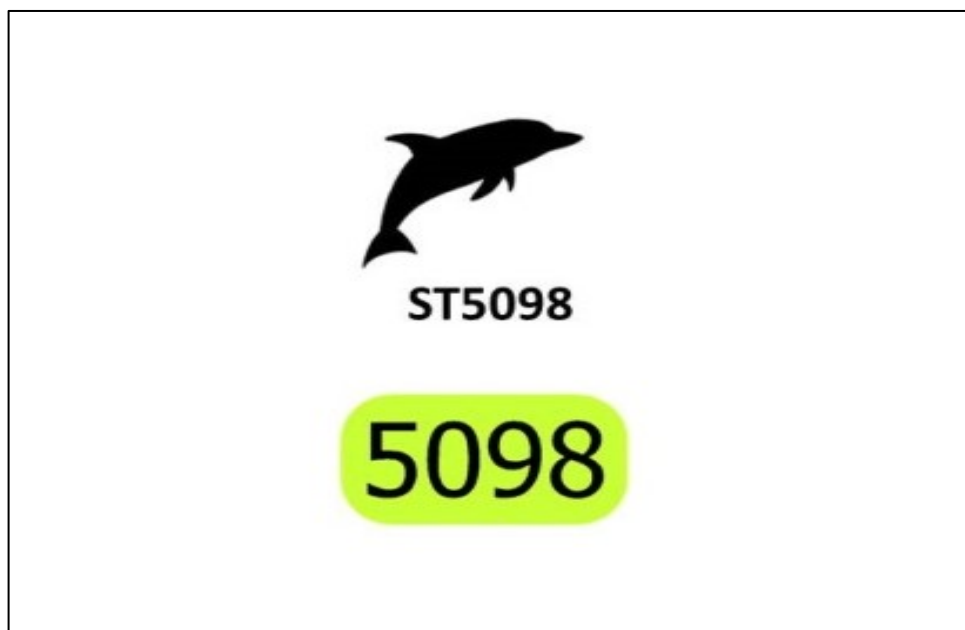


Figura 37. Árbol *singleton* 1314. Se muestra la ST5098 de interés. *Singleton*: una sola ST sin asociación a otras. Árbol generado con el programa goeBURST.

4. Discusión

4.1. Identificación molecular de *E. coli*

En delfines nariz de botella se ha detectado molecularmente a *E. coli* en diferentes estudios con ejemplares de vida libre y bajo cuidado humano. Lima *et al* en 2012 lograron identificar *E. coli* en muestras de exudado respiratorio de *T. truncatus* y *T. aduncus* en individuos sanos bajo cuidado humano mediante pirosecuenciación de las regiones V1-V3 del gen 16S RNA ribosomal (rRNA); la clase dominante fue *Gammaproteobacteria* y la familia mejor representada fue *Cardiobacteraceae*.⁹⁹

Jaing *et al* en 2015 realizaron aislamientos microbiológicos, microarreglos y PCR del plásmido pIGAL1 en muestras de hisopados de respiráculo, contenido gástrico y ano de delfines de vida libre; y solo identificaron a *E. coli* en los aislamientos microbiológicos y en la PCR.⁹¹ Por otra parte, Bik *et al* en 2016 detectaron a *E. coli* al secuenciar el gen de 16S rRNA de las comunidades bacterianas de la cavidad oral, el contenido gástrico, el recto, el exudado respiratorio y el respiráculo de delfines de vida libre y bajo cuidado humano.⁹⁸

En lo concerniente a aislamientos identificados como *E. coli* por medio de la PCR, nuestros resultados fueron similares a los reportados por Higgins *et al* (2007)¹¹¹ y Grant *et al* (2001)¹¹² quienes detectaron el 100% de las cepas de *E. coli* estudiadas. En el estudio de Higgins *et al* se empleó esta técnica en muestras de animales de zoológico y medioambientales¹¹¹, mientras que Grant *et al* (2001) trabajaron con muestras de una planta de tratamiento de agua, aguas residuales de granjas de ganado bovino, quesos contaminados y cepas patógenas aisladas de brotes en humanos.¹¹²

4.2. Grupos filogenéticos de *E. coli*

La distribución de los grupos filogenéticos de las cepas estudiadas fue: B2 (36.8%), U

(31.6%), A (10.5%), D (10.5%), B1 (5.3%) y F (5.3%), este patrón fue similar a lo reportado por otros investigadores en cepas ExPEC^{113,114}; nuestro estudio se constituyó de 4 (21%) cepas intestinales y 15 (79%) cepas extraintestinales.

Estos resultados fueron diferentes a los encontrados con el método empleado anteriormente por Yañez (2012)¹⁰¹; el cambio principal fue la reclasificación de 4 cepas del filogrupo A y 2 cepas de B1 al grupo U, y una cepa B2 a F. En las cepas de delfines registradas en la base de datos de MLST de Achtman, el filogrupo A fue el de mayor frecuencia (3 cepas) seguido de B2 y D (1 cepa cada uno); sin embargo, con la actualización del método de Clermont, estos resultados podrían cambiar. Los cambios en la designación de grupos filogenéticos ya han sido reportados en la revisión del método en 2013⁵⁵ y en trabajos en donde se emplearon ambos protocolos. Al igual que en nuestro estudio, Alonso en su publicación de 2014, encontró cambios similares en cepas de pacientes humanos, en donde aislamientos del filogrupo A pasaron a ser B1 y C, cepas de B1 pasaron a U (reportado como ND); una cepa de B2 pasó a D y cepas de D pasaron a E y F.¹¹⁵ Müştak *et al* (2015) encontraron que en cepas provenientes de casos de mastitis en bovinos y de piometra e infecciones urinarias en perros, varias cepas del filogrupo A se reclasificaron como B1, B2, C, D, E y U (al igual que nuestro resultado de las cepas 12, 15, 18 y 19); algunas cepas pasaron de B2 a B1 y E y pocas cepas pasaron de D a B2, C, E y F.¹¹⁶

En lo concerniente a la distribución de grupos filogenéticos en nuestro estudio, la proporción de los grupos filogenéticos clásicos (A, B1, B2 y D) concuerda con publicaciones anteriores.^{1,8,11,33,37} El grupo filogenético dominante fue B2, lo que fue similar a lo encontrado por otros autores que emplearon el método cuádruplex: Müştak *et al* reportaron al filogrupo B2 como el predominante (84%), seguido de B1 (12%), A (2%) y E

(2%), pero no encontraron cepas del grupo U en muestras de infecciones de tracto urinario de perros; Iranpour *et al* (2015) reportaron que, en cepas provenientes de pacientes humanos con infección de tracto urinario, el grupo filogenético dominante fue B2 (39.3%), seguido de U (27.1%), C (6.4%), Clado I (6.4%), B1 (5%), F (2.9%), D (2.9%) y A (0.7%).¹¹³

El filogrupo B2 de *E. coli* está altamente asociado a los patotipos extraintestinales.^{1,117}

La cepa 11 fue la única perteneciente al grupo filogenético F en nuestro estudio. El filogrupo F se encuentra reportado como un linaje estrechamente relacionado con los grupos filogenéticos B2 y D¹. En un inicio, el principal y único miembro del grupo filogenético F fue el serotipo de EHEC O157:H7-ST11, pero en los últimos 3 años se han descrito otros serotipos, patotipos y ST pertenecientes a este filogrupo.^{1,118} En Australia, Vangchhia *et al* (2016) identificaron a este filogrupo en muestras de heces y sitios extraintestinales de humanos, animales de compañía, animales nativos, carne de pollo y agua; además, al igual que la cepa 11, reportaron resistencia a cefalosporinas de espectro extendido.¹¹⁸

En este trabajo, el grupo U fue detectado en proporción similar (31.6%) a la encontrada por Iranpour *et al* (27.1%)¹¹³, pero aún son pocos los reportes de este grupo que hayan realizado la identificación por la amplificación de *gadA* y la caracterización por MLST como lo recomienda Clermont *et al*.^{55,56}

4.3. Genotipificación de *E. coli* de *T. truncatus* por MLST

En la base de datos de MLST de Achtman se tiene registro de 7 cepas de delfines genotipificadas por este esquema: cinco provenientes de Francia y dos de México.⁶⁸ Estas 7 cepas tuvieron ST no reportadas anteriormente (ST4284, ST4283, ST2189, ST2188,

ST2187, ST2186 y ST2185 [esta última miembro del STc131]). En nuestro trabajo tuvimos la ST5098 de la cepa 10 y la ST5166 de la cepa 17, ambas ST inéditas.

4.3.1. STc648

La cepa 11 (filogrupo F) y la cepa 12 (grupo U) del presente estudio fueron tipificadas como ST648, ST fundadora del STc648. Además, estas dos cepas fueron las únicas que Yañez (2012) reportó como productoras de Beta-lactamasa de espectro extendido (BLEE)¹⁰¹, lo que concuerda con lo que se ha reportado sobre esta ST.¹¹⁹

El STc648 está constituido por 42 ST⁶⁸, de éstas, la más estudiada es la ST648. Los primeros reportes de cepas STc648 se originaron en Canadá^{120,119} de pacientes humanos con bacteremia y/o septicemia.⁶⁸ Peirano *et al* realizaron la caracterización molecular de cepas productoras de BLEE causantes de bacteremia en una región de Canadá, de 2000 a 2010, y encontraron 11 cepas ST648¹²¹, mientras que Pitout en 2007, registró otras 7 cepas canadienses ST648^{68,119}; ambos autores detectaron la presencia de al menos un tipo de BLEE en estas cepas.^{68,119,121} El STc648 está considerado como uno de los nuevos linajes pandémicos internacionales de ExPEC, con la característica de presentar resistencia a múltiples antimicrobianos por la presencia de diferentes BLEE.^{68,122,123}

En medicina humana, se han reportado cepas de ST648 principalmente en casos de infección de tracto urinario (ITU), bacteremias e infecciones extraintestinales en América^{119,121,123,124,125}, Europa^{68,123,126,127,128,129}, África^{68,130}, Asia^{68,122,131,132,133,134} y Oceanía¹¹⁸.

En muestras medioambientales se han detectado cepas ST648 en sedimentos marinos en Italia¹³⁵ y en muestras de agua en Bangladesh¹³⁶ y China¹³¹.

En medicina veterinaria se ha aislado a la ST648 en animales de granja^{123,124,127,137,138},

animales de compañía^{118,123, 137,139,140,141} y animales de vida libre⁶⁸. Las cepas 11 y 12 del presente trabajo representan las primeras cepas ST648 (STc648) reportadas aisladas de mamíferos marinos.

Originalmente se asoció a la ST648 con el filogrupo D mediante el método de PCR triplex.^{54,121,125} Este filogrupo es el reportado como predominante entre las ST648, con aproximadamente 37% de un total de 327 cepas encontradas en la literatura.^{123,136,122,139} En su revisión de grupos filogenéticos, Clermont *et al* asociaron a la ST648 con el filogrupo B1⁶¹ mediante el método de PCR cuádruplex⁵⁵; sin embargo, en las publicaciones más recientes en las que se ha filotipificado a cepas ST648 mediante el método de PCR cuádruplex, solo se ha reportado al filogrupo F (Wakeham 2015¹⁴¹ y Vangchhia 2016¹¹⁸). Esto concordó con el resultado obtenido de la caracterización de la cepa 11 del presente estudio.

La cepa 12 de nuestro estudio perteneció al grupo U; no se encontraron registros ni referencias de otras cepas grupo U ST648 en la literatura.^{68,118,136,141}

Ambas cepas ST648 de nuestro trabajo (cepas 11 y 12) se ubicaron en el árbol 6, en el cual el STc648 fue el genotipo central y único STc presente. De las 97 cepas que se agruparon en este árbol 6, el 38% se registraron como productoras de BLEE, la mayoría ST648 (incluyendo las cepas 11 y 12), pero también 13 ST miembros del STc648 y 6 ST sin STc.

Aunque estas dos cepas (11 y 12) fueron caracterizadas como comensales por Yañez¹⁰¹ (2012) y a la ST648 se le ha aislado en individuos asintomáticos de diferentes especies^{68,123,131,137}, también se le ha encontrado como agente etiológico de infecciones extraintestinales en animales con estrecho contacto con humanos, en especial infecciones del tracto urinario. Vangchhia *et al* en 2016 aislaron de un perro con ITU en Australia, una

cepa con características similares a nuestra cepa 11 aislada del área genital de un macho: ST648, filogrupo F, productora de BLEE, resistente a cefalosporinas y gentamicina.¹¹⁸

La gran mayoría de las cepas ST648 aisladas en animales, asintomáticos o no, tienen la característica de presentar resistencia a diferentes antimicrobianos y de producir BLEE. Esto último es de vital importancia para la salud pública, en lo referente a la propagación de la resistencia a antimicrobianos a nivel mundial.

De acuerdo a las características encontradas de filogrupo y ST y a las reportadas de serotipo y genes de virulencia, las cepas 11 y 12 pueden considerarse como un riesgo zoonótico. Además de que se ha reportado que los aislamientos de ST648 tienen mayor probabilidad que otros para causar infecciones extraintestinales.¹⁴² La presencia del factor de virulencia *stx2* en cepas de *E. coli* de origen extraintestinal, ya ha sido reportada por Wester *et al* (2013) en muestras de humanos con bacteremia.¹⁴³

4.3.2. STc131

La cepa 1 y la cepa 14 del presente estudio, ambas miembros del grupo filogenético B2, pertenecieron al STc131, el cual es el tercer STc más numeroso de ExPEC en la base de datos de MLST y es uno de los principales linajes pandémicos de ExPEC.^{34,44,68,144,145} El STc131 está compuesto de 65 ST, de las cuales la ST131 es la más conocida.^{1,68,146}

La cepa 1 fue tipificada como ST131, fundadora del STc131, mientras que la cepa 14 fue ST2185, miembro del STc131.

4.3.2.1. ST131

La ST131 es la clona de *E. coli* más estudiada de la actualidad a partir de su aislamiento en diferentes brotes por Europa en 2008.^{1,68,144,146} Se considera que su reservorio principal es el ser humano.^{144,145,146}

Yañez serotipificó a la cepa 1 como O157:H7 y determinó que su patotipo fue EHEC (*eae+*, *stx1+* y *stx2*), un tipo de STEC, aunque fue comensal en el individuo estudiado.¹⁰¹

El primer registro de una cepa ST131 en la base de datos de MLST se remonta a 1992 (ave doméstica), mientras que la primera cepa ST131 de humanos data de 2001.^{44,68} Desde entonces existen 3,388 cepas ST131 registradas en la base de datos de MLST (la 3ra ST más abundante en este sitio).⁶⁸

Se han registrado diferentes variedades de ST131, por ejemplo: 170 pulsotipos¹⁴⁷, 7 *f*-tipos (tipos de *fimH*)¹⁴⁸, más de 5 virotipos^{44,144,149}, y 9 ST diferentes en que esta clona de *E. coli* se subdivide por el esquema MLST Pasteur.^{72,144} A pesar de esta gran variedad de subclonas ST131, existen características bacterianas distintivas de esta clona de *E. coli* como son: poseer una gran cantidad de genes que codifican factores de virulencia^{44,144,149}, tener un alto potencial metabólico^{120,128}, que la vasta mayoría de las cepas ST131 reportadas han pertenecido al grupo filogenético B2^{1,61,150,151} (al igual que la cepa 1 ST131 de nuestro estudio) y que existen dos serogrupos principales, el más importante O25^{125,144} (serotipo O25:H4^{123,152}, en especial el O25b:H4^{44,153,154}) y el O16¹⁴⁶ (serotipo O16:H5^{44,124}), aunque en los últimos cuatro años se han reportado varias cepas ST131 como ONT.^{44,144}

Tres características fenotípicas han sido identificadas como comunes a las cepas intercontinentales de *E. coli* ST131: la capacidad de causar infecciones en humanos tanto en la comunidad como intrahospitalarias, la resistencia a fluoroquinolonas y la posible resistencia a cefalosporinas de espectro extendido (ESC) por la BLEE's; (como la BLEE CTX-M-15), aunque en otros estudios se encontró un mayor número de cepas ST131 no-productoras de BLEE, lo que es común en las cepas de *E. coli* filogrupo B2.^{1,120,144,145,148,149,152}

La cepa 1 B2-ST131 de nuestro estudio fue serotipificada por Yañez como O157:H7¹⁰¹; el serogrupo O157 ha sido reportado en una cepa B2-ST131 de humano en Australia por Platell en 2011¹²⁰, pero éste es el primer registro de una cepa proveniente de *T. truncatus* con esta combinación de serotipo y genotipo. El serotipo O157:H7 ha sido reconocido por ser responsable de la mayoría de los casos severos de Síndrome Urémico Hemolítico (HUS por sus siglas en inglés) de origen bacteriano a nivel mundial.¹ Además, se ha reportado que las cepas de este serotipo tienen la capacidad de sobrevivir en el ambiente acuático (natural o artificial) tanto en la columna de agua como en los sedimentos, así como de colonizar e infectar diferentes especies de animales domésticos y de fauna silvestre.^{41,42,135,155} Yañez¹⁰¹ además patotipificó a la cepa 1 (B2-ST131) como EHEC, el cual es el patotipo principal asociado al serotipo O157:H7.¹ Las cepas con patotipo EHEC tienen una dosis infectante baja, menor a 100 células bacterianas, incluso se ha estimado que puede causar infección con 4 a 24 células bacterianas.¹

La cepa 1 fue muy similar a la cepa LV143 reportada por Manageiro *et al* (2015) en Portugal: ambas fueron aisladas del respiráculo de un ejemplar de *T. truncatus* bajo cuidado humano; fueron resistentes a ampicilina, ciprofloxacino y gentamicina (Cuadro 6) y tuvieron un genotipo similar al ser filogrupo B2 y ST131.¹⁰⁰ En la misma publicación, Manageiro *et al* compararon la cepa LV143 con aislamientos de ST131 de humanos de la misma región y concluyeron (al igual que nosotros) que existe un potencial zoonótico para cepas con este genotipo.¹⁰⁰

De acuerdo a las características de la cepa 1 del estudio (filogrupo B2, ST131, STc131, serotipo O157:H7 y patotipo EHEC [*ea*+, *stx1*+, *stx2*+]) se puede sugerir que esta clona es un potencial riesgo para la salud animal y “verdaderamente patógena para los seres

humanos” como lo menciona Nicolas-Chanoine en su revisión de ST131.¹⁴⁴

4.3.2.2. ST2185

La cepa 14 ST2185, miembro del STc131, perteneció al filogrupo B2. Yañez serotipificó a esta cepa como O25:H4, serotipo principal asociado al STc131¹⁴⁴, además detectó la presencia del gen *stx2*.¹⁰¹

Esta ST2185 fue anteriormente reportada en *T. truncatus* en la base de datos de MLST⁶⁸; el registro previo corresponde a la cepa francesa EcBjDK B2-ST2185, STc131. Hasta la fecha no existe otra referencia de la ST2185.

La cepa 14 (B2-ST2185) presentó el serotipo clásico del STc131, O25:H4 y mostró resistencia a 7 antimicrobianos de dos grupos diferentes.¹⁰¹ El serotipo O25:H4 ha sido reportado en México en pacientes humanos con ITU y aislamientos de UPEC.¹⁵²

4.3.3. STc69

Las cepas 7 y 8 de nuestro estudio (ambas filogrupo D) fueron tipificadas como ST69, ST fundadora del STc69. Yañez serotipificó a estas cepas como ONT:H2 y O153:H2, respectivamente.¹⁰¹

El STc69 es una clona de *E. coli* de distribución mundial, que deriva del grupo filogenético D y se estima que surgió en la última década del siglo pasado como un importante agente etiológico de infecciones extraintestinales en humanos.^{1,44,156,157} El STc69 está formado por seis ST (ST69, ST106, ST320, ST407, ST408 y ST597); el registro más temprano de una cepa miembro del STc69 (ST106) en la base de datos de MLST de Achtman es de 1985, procedente de un humano con ITU y septicemia.⁶⁸ En animales, la ST69 se aisló por primera vez en el año 2000 de pollos en Alemania.⁶⁸ Se considera que la ST69 no tiene un nicho especializado¹⁵⁷ pues se le ha aislado tanto de animales domésticos^{61,137,139,152} como

de vida libre^{44,158} y de humanos con infecciones extraintestinales^{124,128,132,148,150,159,160} y asintomáticos¹, además de cuerpos de agua^{153,161} y alimentos^{156,157,162} incluyendo agua clorada para beber¹⁶³. La gran mayoría de las cepas ST69 se caracterizan por pertenecer al grupo filogenético D^{1,61} y por ser subtipificadas como grupo clonal A (CgA)¹⁶⁴ no existe un único serogrupo asociado a ST69; se han reportado más de 20.^{44,68,159,161,162,165} Los serotipos principales detectados en cepas ST69 son O11:HNT, O11:H18, O17:H18 y O77:H18^{68,127,165}; además se ha reconocido una fuerte asociación del antígeno flagelar H18^{68,127,153,156} y del capsular K52^{44,156,157}, lo cual difiere a lo reportado en nuestras cepas. Las cepas ST69 fueron reportadas originalmente como resistentes a varios antimicrobianos, especialmente a sulfametoxazol/trimetoprima^{81,119,171,183}, pero la producción de BLEE por parte de estas cepas era poco común, lo cual es similar a lo reportado en las cepas 7 y 8.^{1,34,44,68,148,166} En años recientes se han identificado cepas ST69 productoras de diferentes BLEE¹²⁹ y carbapenemasas, como KPC¹⁶⁰ en humanos y CTX-M en humanos^{132,137} y animales¹⁵⁸. Los serotipos de estas dos cepas O11:H2 (cepa 7) y O153:H2 (cepa 8) no están asociados a enfermedad grave en animales o humanos; sin embargo, se ha relacionado al serogrupo O153 con el patotipo ETEC en conejos de laboratorio y de granjas interactivas, y en humanos en México, Argentina, Brasil y España.^{167,168,169}

El genotipo D-ST69 encontrado en las cepas 7 y 8, sugiere su potencial zoonótico.

4.3.4. STc10

La cepa 13 ST10 y la cepa 15 ST617 pertenecieron al STc10. El STc10 es el cuarto STc más numeroso de la base de datos de MLST con más de 3,300 cepas registradas y 38 ST, además es considerado como uno de los linajes pandémicos emergentes de ExPEC.^{44,68} El registro más antiguo (1922) del STc10 también es el mejor conocido; es la cepa K12

(ST98).⁶⁸ Filogenéticamente, el STc10 se ha asociado mayormente al filogrupo A^{34,61,66} aunque existen registros de cepas pertenecientes a los grupos B2^{124,140} y D^{139,174}. STc10 es un grupo clonal importante asociado a zoonosis, es de distribución global y se le ha aislado de animales de compañía^{68,139,140}, de producción^{131,166,170,175} y de vida libre^{68,137}, ya sea como comensales (por ejemplo las cepas de la colección ECOR: 3, 16, 17, 18, 19, 20, 21 y 25)^{39,61} o produciendo enfermedad^{138,139}. Tres diferentes ST del complejo STc10 han sido reportadas en lobos marinos.⁶⁸ En humanos, STc10 es reconocido como uno de los principales grupos clonales tanto de cepas intestinales comensales^{34,131,150} como de ExPEC^{144,148,150,165}. Además, se han detectado cepas miembros del STc en diversas muestras medioambientales.^{131,135,170,174}

4.3.4.1. ST10

La cepa 13 fue tipificada como ST10, ST fundadora del STc10, y su filogrupo fue A. Yañez serotipificó a esta cepa como O101:HNT¹⁰¹, detectó la presencia del gen *stx2* y determinó su resistencia a tres grupos diferentes de antibióticos (MDR).¹⁰¹ Estos resultados son similares a otras cepas ST10-filogrupo A aisladas de sitios extraintestinales o catalogadas como ExPEC (la cepa 13 se aisló de respiráculo¹⁰¹). En perros con ITU, Wagner *et al* (2014) encontraron cepas de *E. coli* ST10 MDR a ampicilina, ciprofloxacino y a otros antibióticos, al igual que nuestra cepa 13.¹⁴⁰ Röderova *et al* (2017), también encontraron cepas ST10 con resistencia a varios antimicrobianos en muestras de aves de corral y agua residual.¹⁷⁵ Aunque la gran mayoría de las cepas ST10 son de origen intestinal, se ha reportado que, cuando son recuperadas de sitios anatómicos extraintestinales, es más probable que tengan mayor cantidad de factores de virulencia y que presenten resistencia antimicrobiana.¹⁵⁶ En los últimos 7 años, la clona ST10-filogrupo A se ha considerado

como un linaje emergente de ExPEC, productor de BLEE, al ser aislada de ITU y bacteremias en humanos y animales de diferentes países.^{44,121,156,176,177}

En mamíferos marinos, la ST10 ha sido previamente detectada en dos lobos marinos en la Isla de San Cristobal, Ecuador, sin que exista mayor información al respecto.⁶⁸

No existe un serogrupo ni serotipo específico asociado a la ST10 y se han reportado más de 50 serogrupos y serotipos en cepas ST10-filogrupo A.^{44,68,124,150,156} Yañez asignó el serotipo O101:HNT a esta cepa 13.¹⁰¹ Este serotipo ya ha sido reportado en otra cepa ST10-filogrupo A por Maluta *et al* (2014) que identificaron en Brasil una cepa APEC-O101:HNT, con capacidad de producir de producir onfalitis y síndrome de cabeza hinchada en pollos.¹²⁴ Por su parte, el serogrupo O101 ha sido reportado en otras cepas ST10-filogrupo A: Harnett y Gyles (1984) identificaron este serogrupo en cepas ETEC de cerdos y bovinos con diarrea en Canadá¹⁷⁸; además de estas 4 cepas mencionadas, en la base de datos del esquema MLST de Achtman se tienen registradas 2 cepas más ST10-filogrupo A-serogrupo O101, una cepa EHEC proveniente de un cerdo en Italia (1993) y una cepa EAEC de un humano del Reino Unido (2013).⁶⁸ Además el serogrupo O101 se ha encontrado en cepas STEC aisladas de cerdos^{41,172,173} y humanos¹⁷¹ sanos. En México, se ha reportado el serogrupo O101 en cepas UPEC de humanos.¹⁵² Al igual que nuestra cepa ST10-filogrupo A, se ha reportado en cepas STEC comensales en otros animales (como bovinos⁴¹ y cerdos^{172,173}) y en humanos con ITU en Europa y México.^{86,120,152}

Las características genéticas (ST10-filogrupo A-STEC) y fenotípicas (O101:HNT y MDR) de la cepa 13 de nuestro estudio nos sugiere que esta clona puede ser un riesgo zoonótico, además, existen reportes de cepas de origen animal con genotipo y fenotipo similares como agentes etiológicos de enfermedades en seres humanos.^{1,68}

4.3.4.2. ST617

La cepa 15 de nuestro estudio fue genotipificada como ST617-filogrupo U, esta ST difiere por dos *loci* de la ST10, fundadora del STc10, y se considera como una clona de reciente aparición. Los primeros registros de la ST617 son de los últimos 17 años, todas pertenecientes a humanos de Europa y África.⁶⁸ Sin embargo, en los últimos 5 años se han aislado cepas ST617 de humanos y animales de América y Asia.^{121,122,132,137,179}

Yañez reportó a nuestra cepa 15 ST617 como miembro del filogrupo A¹⁰¹ mediante el método de PCR tríplex de Clermont (2000)⁵⁴, lo que concuerda con lo publicado sobre ST617 en diferentes estudios en animales^{123,179} y humanos^{121,122,150,176,180}; Clermont *et al* (2013), en su revisión del método de filotipificación por PCR, asociaron a esta ST al filogrupo A por el método de PCR cuádruplex.⁶¹

Nosotros filotipificamos a esta cepa ST617 como miembro del grupo U, lo que no había sido reportado hasta la fecha. En medicina veterinaria, se han aislado cepas ST617 productoras de BLEE de animales de vida libre, de compañía y de producción sanos en América^{137,179}, África¹⁵¹ y Europa^{137,174}. En México Rocha-Gracia *et al* (2015) reportaron la presencia de cepas de *E. coli* ST617 en heces de perros sanos y con al menos un año sin tratamiento de antimicrobianos además, encontraron que estas cepas fueron productoras de BLEE y presentaban el fenotipo de multirresistencia a antimicrobianos.¹⁷⁹ Nuestra cepa 15 ST617-filogrupo U fue aislada de un hisopado vaginal¹⁰¹; la presencia de ST617 en sitios extra intestinales ha sido previamente reportada en humanos. Peirano *et al* (2012), identificaron cepas ST617-filogrupo A productoras de BLEE en muestras de sangre de pacientes con bacteremia en Canadá.¹²¹ Aibuni *et al* (2012) encontraron cepas ST617 productoras de BLEE en muestras de orina de humanos en Nigeria.¹⁴² Toval *et al* (2014)

identificaron 2 cepas ST617-filogrupo A UPEC en humanos con ITU en Alemania.¹⁵⁰ Miao *et al* (2017) reportaron cepas ST617 productoras de BLEE en muestras de esputo y orina de humanos en China.¹³² Röderova *et al* (2017), aislaron una cepa ST617 productora de BLEE de un hisopado de una herida de un paciente en la República Checa.¹⁷⁵

La cepa 15 ST617-filogrupo U de nuestro estudio fue serotipificada como ONT:H42 y patotipificada como STEC por Yañez.¹⁰¹ El serotipo ONT:H42 se ha detectado en cepas STEC aisladas de ganado vacuno sin producir enfermedad.⁴¹ La posibilidad de colonización de humanos y animales por cepas de *E. coli* con ST encontradas en ambas especies ya ha sido demostrada por otros autores.^{100,124,174} Aunque se precisan de estudios específicos para determinar todos los genes de virulencia y otras características bacterianas asociadas a daño, las características genotípicas y fenotípicas de la cepa 15 ST617 grupo U nos permiten sugerir que existe un riesgo de transmisión al humano, ya que se ha detectado a la ST617 en humanos asintomáticos y sanos en Mauritania¹⁸⁰ y Túnez¹⁷⁶. Además, se observó durante la agrupación de ST por goeBURST que el subgrupo al cual se asoció la ST617 estuvo compuesto en su mayoría por cepas patógenas aisladas de humanos, lo que nos sugiere que nuestra cepa 15 (ST617) podría ser un riesgo zoonótico.

4.3.5. Cepas sin STc asociado

4.3.5.1. ST99

La cepa 3 y la cepa 4 del presente trabajo fueron genotipificadas como ST99 y pertenecieron a los filogrupos U y B1, respectivamente. Ambas cepas fueron aisladas de un mismo ejemplar, serotipificadas como O163:H19 y patotipificadas por Yañez (2012).¹⁰¹

La relación del filogrupo B1 con la ST99 de nuestra cepa 4 ya ha sido reportada por otros autores; Clermont *et al* (2015) asociaron la ST99 al filogrupo B1⁶¹; en la base de datos de

MLST se registró la cepa R171 (aislada del reptil australiano *Tiliqua rugosa*) con el genotipo ST99-filogrupo B1^{8,68} y por último, Michelacci *et al* (2015) reportaron 3 clonas ST99-filogrupo B1 aisladas de pacientes humanos: una de un brote de diarrea sanguinolenta en Italia en 2012, otra de un caso aislado de Diarrea del Viajero en España en 2013 y una más de un brote de enfermedad gastrointestinal en Reino Unido en 2014.¹⁸¹

El serotipo de ambas cepas ST99 de nuestro estudio fue O163:H19. La infección por STEC O163:H19 en humanos es rara, pero se le ha reportado en casos esporádicos de HUS, colitis hemorrágica y diarrea en asociación con *stx2* en diferentes partes del mundo.^{171,182,183}

Además, el serotipo O163:H19 se ha detectado en cepas STEC aisladas de bovinos, cerdos, cabras y ovinos sanos, así como de carne cruda de res y cerdo.^{41,45,172,183,184} Córtes *et al* (2010) mencionan que existe una mejor asociación entre ST y antígeno H que entre ST y serogrupo¹²⁷, lo que coincide con lo reportado con el antígeno flagelar H19 en las cepas ST99 de nuestro estudio, las reportadas en la literatura¹⁸¹ y una cepa APEC ST1611 relacionada directamente (SLV) en el árbol 31.

El genotipo de la cepa 3, ST99, filogrupo U, su serotipo O163:H19 y su patotipo STEC¹⁰¹; nos permite sugerir que esta cepa puede ser transmisible al humano.

Con las características encontradas de la cepa 4 (ST99, filogrupo B1 y serotipo O163:H19¹⁰¹), podríamos catalogar a esta cepa como comensal y de muy bajo riesgo para la salud de animales y humanos.

4.3.5.2. ST372

La cepa 2 (de origen vaginal) del presente estudio fue la única caracterizada como ST372. Nuestra caracterización de la cepa 2 de origen extraintestinal como ST372 y filogrupo B2, es similar a lo descrito en trabajos anteriores. Adams-Sapper *et al* (2013) reportaron 3 cepas

de ST372 en su estudio de 539 cepas de *E. coli* provenientes de infecciones de torrente sanguíneo¹⁴⁸; Toval *et al* (2014) identificaron a una sola ST372 de un total de 265 aislamientos de UPEC de humanos¹⁵⁰; Lau *et al* (2008) encontraron una cepa ST372 en 88 aislamientos de UPEC de humanos¹⁵⁹; Tartof *et al* (2005) encontraron una cepa ST372 de un caso de septicemia en humanos¹⁶¹; Blyton y Gordon (2017) reportaron una cepa miembro del filogrupo B2, ST372 y con 16 genes de virulencia asociados a cepas extraintestinales en una muestra de agua clorada para beber en Australia¹⁶³ y en la base de datos de MLST se registró una cepa ST372 que perteneció al filogrupo B2 y fue aislada de humanos.⁶⁸ En animales se ha reportado a la ST372 en cepas ExPEC de perros, aves y gatos.⁶⁸ Hasta el momento, existen escasos registros de cepas ST372 con resistencia a algún antimicrobiano, lo cual es similar a nuestra cepa 2 (ST372).^{34,68,137,148,161} Hertz *et al* (2016) realizaron un estudio en Dinamarca de 3 poblaciones de *E. coli* (n=286) con diferente susceptibilidad a antibióticos en muestras de orina de pacientes humanos no hospitalizados y encontraron una sola cepa ST372 que catalogaron como no-productora de BLEE y resistente a al menos un antibiótico.¹²⁹ El serotipo reportado de la cepa 2 (ONT:H31¹⁰¹) fue reportado en una cepa UPEC ST372 registrada en esta base de datos y originaria de un perro de Dinamarca. El antígeno flagelar H31 se ha reportado en otras 12 cepas ST372 en la base de datos de MLST.⁶⁸ Todas las ST372 en la literatura (incluida la cepa 2) han sido reportadas como ExPEC o aisladas fuera del tracto gastro intestinal.^{68,129,148,150,159,161,163}

Aunque la cepa 2 está considerada como comensal en este ejemplar de *T. truncatus*, su agrupamiento con cepas patógenas y su genotipo ST372-filogrupo B2-STEC nos permite catalogarla como un posible riesgo para la salud de los ejemplares y de transmisión al humano bajo las condiciones adecuadas.

4.3.5.3. ST986

La cepa 6 (filogrupo A) fue genotipificada como ST986. Aunque la base de datos de MLST no incluye a esta ST en ningún STc, Rosser (2010) describió en su trabajo de Doctorado una cepa STEC ST986-filogrupo A aislada del recto de un bovino en Escocia como parte del STc10; esto se debió a que la ST10 y la ST986 solo difieren por el alelo de *fumC*.^{68,166} Estas características fueron similares a las de nuestra cepa 6; al igual que las reportadas por Eichhorn *et al* (2015) en un aislamiento de una cepa EHEC ST986-O26:H11 proveniente de otro bovino.¹⁸⁵

El serotipo O140:H32 de la cepa 6 ST986 se ha encontrado en cepas STEC de bovinos clínicamente sanos.⁴¹ El serogrupo O140 se ha reportado en otras cepas STEC de camellos sanos y con diarrea, además se le ha aislado de pollos de engorda, cerdos, humanos y productos animales^{45,186,187}. Ninguna cepa ST986 reportada en la base de datos de MLST o en la literatura ha sido catalogada como patógena en humanos o animales; debido a esto y a las características encontradas en nuestro estudio, podemos sugerir que la cepa 6 de nuestro estudio presenta poco riesgo para la salud de los ejemplares y el ser humano.

4.3.5.4. ST1858

La cepa 5 (filogrupo B2) fue genotipificada como ST1858; este resultado fue similar al único registro de ST1858 en la base de datos de MLST, la cepa TA152 aislada de un bandicut marrón meridional (*Isodon obesulus*)^{8,68} y filotipificada como B2.⁶¹ Un caso similar fue reportado por Borges *et al* (2016) en un ejemplar de loro de frente azul (*Amazona aestiva*) en Brasil, de donde aislaron dos cepas ST1858-filogrupo B2 y serogrupo O75¹⁹⁰ (mismas características que tuvo nuestra cepa). Otras cepas ST1858 se han aislado en humanos; Toval *et al* (2014) reportaron en Alemania una cepa UPEC

ST1858, filogrupo B2 y serotipo O6:H1 de un paciente con cistitis y urolitos¹⁵⁰; Papagiannitsis *et al* (2015) aislaron una cepa de *E. coli* ST1858 productora de BLEE, de un hisopado rectal de un paciente de cuidados intensivos en Italia¹⁸⁸ (mismo sitio anatómico del cual se aisló nuestra cepa 5¹⁰¹); adicionalmente, Hertz *et al* (2016) reportaron una sola cepa ST1858, de un total de 286 aislamientos de *E. coli* de muestras de orina de pacientes no hospitalizados y catalogados con base en su susceptibilidad a antimicrobianos en 3 poblaciones; la ST1858 solo se encontró en el grupo de cepas susceptibles¹²⁹ (característica similar a nuestra cepa).

En total se han reportado 7 cepas ST1858 (incluida la cepa 5 de nuestro estudio); 5 fueron miembros del grupo filogenético B2 y dos no fueron filotipificadas. De las 3 cepas ST1858 de origen animal, una cepa no fue serotipificada y 2 de ellas pertenecieron al serogrupo O75, al igual que nuestra cepa. En humanos se ha reportado al serogrupo O75 asociado principalmente a ExPEC^{138,164,165}, en particular a UPEC^{152,192}. En medicina veterinaria se ha reportado al serogrupo O75 en conejos de laboratorio y de granjas interactivas¹⁶⁸ además de cepas STEC en bovinos sanos y enfermos.^{41,191} En México, se han aislado cepas UPEC O75 en infecciones de tracto urinario de pacientes en la Ciudad de México.¹⁵² Adicionalmente, el serotipo O75:H5 de nuestra cepa se ha reportado en cepas ExPEC-filogrupo B2 de humanos^{156,189,193} y perros¹⁵⁶ alrededor del mundo.

De acuerdo a las características encontradas de ST y filogrupo, las reportadas de serotipo y genes de virulencia de la cepa 5, además de las características de las cepas del subgrupo clonal del árbol 7 en el cual se agrupó esta cepa (Figura 31, ST1857, ST1858 y ST1927) y a lo reportado la literatura sobre la ST1858^{129,150,188,190}, podemos sugerir que nuestra cepa ST1858 puede ser un riesgo para la salud de otros animales y del ser humano, aunque hacen

falta otros estudios para analizar esto a fondo.

4.3.5.5. ST1946

La cepa 9 y la cepa 16 del presente trabajo fueron genotipificadas como ST1946 y como miembros del filogrupo B2. Ambas cepas ST1946 fueron patotipificadas como STEC (*stx2*) y serotipificadas como O15:H7 (*flic_{H7}*) por Yañez (2012).¹⁰¹

El único registro previo de un aislamiento de *E. coli* ST1946 perteneció a la cepa APEC IMT14939, proveniente de un pavo doméstico en Alemania con el serotipo O40:NM.⁶⁸ El serogrupo O15 de las cepas 9 y 16 de nuestro estudio ya ha sido reportado asociado a cepas STEC aisladas de animales domésticos^{40,41,167,172}, animales marinos¹⁷⁰ y humanos enfermos en el continente americano.^{1,41,167} Además, se ha asociado fuertemente el serogrupo O15 a cepas de ETEC^{13,32}, EPEC³⁹ y EAEC^{13,32} en humanos y animales. Genotípicamente, las cepas 6 y 19 de nuestro estudio tienen un potencial patógeno moderado para animales, debido a que la ST1946 solo había sido reportada como patógeno en otra especie y a que las cepas del filogrupo B2 tienen la capacidad de acarrear gran número de factores de virulencia. De igual manera, las características de las cepas agrupadas en el árbol 38 nos sugieren que las cepas ST1946 de nuestro estudio poseen un potencial patógeno.

4.3.5.6. ST2016

Se determinó que las cepas 18 y 19, ambas provenientes de un solo ejemplar localizado en la Ciudad de México, son la misma clona, esto debido a que pertenecen al mismo grupo U, presentaron el mismo serotipo O170:H16, *stx2*, resistencia a cefalotina e idéntica ST2016. La ST2016 fue aislada previamente de otro animal por Dissanayake *et al* (2014), quienes reportaron un aislamiento de una cepa APEC ST2016-filogrupo B1 de un pollo en Sri Lanka.¹⁹⁴ Casos similares se encontraron en humanos: Toval *et al* (2014) aislaron en

Alemania otra cepa ST2016-filogrupo B1 con el mismo antígeno flagelar H16 que las cepas 18 y 19 de nuestro estudio.¹⁵⁰ Además, en la base de datos de MLST se registró otra cepa ST2016, identificada como *E. coli* y con el patotipo UPEC, misma que perteneció al filogrupo B1 y fue aislada de un paciente humano en Alemania.⁶⁸ Todas las cepas ST2016 reportadas en la literatura han sido filotipificadas como B1, lo que fue diferente a lo encontrado en las cepas 18 y 19 ST2016 que fueron miembros del grupo U. El serogrupo O170¹⁰¹ de ambas cepas ST2016 de nuestro estudio era denominado anteriormente como OX1³⁵ y este serogrupo ha sido reportado en casos de diarrea en conejos de laboratorio y humanos.^{35,195}

La evidencia genética de la clona ST2016-grupo U de las cepas 18 y 19 de nuestro estudio, nos permite catalogarla como un posible patógeno.

4.3.5.7. ST5098

Al igual que la mayoría de los aislamientos previos de *E. coli* provenientes de *T. truncatus*⁶⁸, la cepa 10 de nuestro estudio presentó una nueva combinación de alelos MLST por lo que le fue asignada la nueva ST5098, esta cepa perteneció al filogrupo B2. Yañez aisló a esta cepa de un hisopado vaginal y la serotipificó como O25:H42.

El serotipo O25:H42 se ha reportado previamente en cepas ETEC aisladas en humanos.¹⁹⁶

El grupo filogenético B2, la presencia del gen *stx2* y su fenotipo de multirresistencia a antimicrobianos hacen de la nueva ST5098 un posible riesgo patógeno.

4.3.5.8. ST5166

Del mismo modo que la cepa 10, la cepa 17 de nuestro estudio también presentó una nueva combinación de alelos MLST, por lo que le fue asignada la ST inédita ST5166. Esta cepa ST5166 tuvo como grupo filogenético el grupo U. La cepa 17 fue previamente

serotipificada como O71:H14.

El serogrupo O71 se ha asociado con algunas cepas de STEC.⁴³ Esta cepa ST5166-grupo U, que se aisló del recto, parece tener un bajo potencial patógeno y zoonótico.

La identificación de dos cepas de *Escherichia coli* con dos nuevas ST en esta especie, nos habla del trabajo que falta por realizar en el estudio de la microbiota en mamíferos marinos.

La estructura de la comunidad bacteriana intestinal *core* de los delfines aún no está definida y se necesita caracterización molecular adicional para inferir la prevalencia microbiana bajo cuidado humano y saber si estas cepas con potencial zoonótico son propias de la microbiota de *T. truncatus* o su hábitat. Con excepción de la cepa 4 ST99-filogrupo B1, es imposible descartar como patógenos potenciales (en humanos o en animales) a todas las cepas estudiadas. Esto se debió al patotipo STEC o EHEC reportado¹⁰¹ y a que pertenecieron a alguna ST fuertemente asociada a patogenicidad.

4.5. Posible origen de las clonas encontradas

Diferentes estudios de aislamientos de *E. coli* en delfines han determinado la resistencia antimicrobiana en individuos de vida libre y colecciones privadas. De manera general se han encontrado cepas de *E. coli* de delfines resistentes a penicilina, ampicilina, amoxicilina, cefalotina, ceftriaxona, cefoxitina, imipenem, sulfatiazol, trimetoprim, sulfametoxazol/trimetoprim, ácido nalidíxico, ciprofloxacino, moxifloxacino, ofloxacino, gentamicina, estreptomycin, apramicina, tetraciclina, oxitetraciclina, eritromicina, azitromicina, cloranfenicol y nitrofurantoina.^{87,88,95,100}

El origen de estas clonas aparentemente comensales en el delfín y patógenas en el humano, puede ser variado: i) Todos los ejemplares en el estudio conviven cercanamente con humanos (manejador, entrenador y huéspedes); ii) Los ejemplares en instalaciones abiertas

están expuestos a escorrentía de aguas residuales sin tratar por lo que puede ser una vía para la transferencia de bacterias derivadas del humano; iii) La introducción de bacterias y/o cepas atípicas a través de presas no naturales puede contribuir a variaciones en la diversidad microbiana de los animales bajo cuidado humano. En el agua, las bacterias de diferentes orígenes (humano, animal, ambiental) son capaces de intercambiar información genética entre bacterias de diferente o de la misma especie. Se ha reportado que *E. coli* es capaz de sobrevivir en el ambiente marino, en agua de río, lluvia y potable por periodos prolongados, dependiendo de las condiciones.^{1,2}

Aunque se requieren mayores estudios en estas cepas (factores de virulencia, tipificación FH¹⁵⁴ o MLST extendido^{55,56}) para tener una idea aún más clara de su filogenia y su patotipo, el posible potencial zoonótico de las caracterizadas con ST asociados a enfermedades en humanos es innegable.

Debido a esto último, consideramos que es necesario que las instalaciones que albergan *T. truncatus* para actividades de interacción o rehabilitación realicen monitoreos microbiológicos regulares tanto de sus ejemplares, su hábitat, alimento y descargas de las instalaciones.

5. Conclusiones

Este es el primer trabajo de epidemiología molecular a partir de cepas de *Escherichia coli* provenientes de ejemplares de *Tursiops truncatus* bajo cuidado humano.

Las cepas analizadas de *Escherichia coli* provenientes de ejemplares de *T. truncatus* bajo cuidado humano pertenecieron con mayor frecuencia los filogrupos B2 y U.

El análisis por MLST nos permitió asignar correctamente el grupo filogenético de dos cepas filogrupo A, previamente identificadas como posibles Clado I o II.

Se identificaron 5 de los principales linajes pandémicos patógenos extraintestinales actuales de *E. coli*: STc10 (ST10 y ST617), stc69, STc131 y STc648 (los cuales se caracterizan por su multiresistencia a los antimicrobianos).

Este es el primer reporte a nivel mundial de una cepa de *Escherichia coli* ST131 O157:H7 filogrupo B2 extraintestinal proveniente de mamíferos marinos.

La ST5098 y la ST5166 representan las primeras ST aisladas únicamente de *T. truncatus* bajo cuidado humano en el continente americano. La descripción de dos nuevas ST nos permite avanzar en el conocimiento microbiano de esta especie.

La mayoría de las cepas de *E. coli* provenientes de *T. truncatus* en estrecha relación con el ser humano en este estudio, deben ser consideradas como alto riesgo de infección en el humano.

6. Referencias

1. Donnenberg MS, editor. *Escherichia coli*. Pathotypes and principles of pathogenesis. 2da ed. China: Academic Press-Elsevier, 2013.
2. Markey BK, Culinane A, Leonard FC, Archambault M y Maguire D, editores. Clinical veterinary microbiology. 2da ed. China: Mosby-Elsevier, 2013.
3. Puño-Sarmiento J, Medeiros L, Chiconi C, Martins F, Pelayo J *et al*. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats in Brazil. *Vet Microbiol* 2013; 166: 676-680.
4. Álvarez BR. Caracterización de cepas de *Escherichia coli* de importancia clínica humana aisladas de ecosistemas dulceacuícolas de la Habana (tesis de Doctorado). La Habana, Cuba: Universidad de La Habana, 2012.
5. Woese CR, Kandler O y Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. *Proc Natl Acad Sci Unit States Am* 1990; 87: 4576-4579.
6. Madigan M, Martinko JM, Bender KS, Buckley DH y Stahl DA, editores. Brock biology of microorganisms. 14ta ed. Estados Unidos: Pearson Education Incorporated, 2015.
7. McVey DS, Kennedy M y Chengappa MM, editores. Veterinary microbiology. 3ra ed. Nueva Delhi. India: Wiley-Blackwell, 2013.
8. Gordon DM y Cowling A. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiol* 2003; 149: 3575-3586.
9. Tenailon O, Skurnik D, Picard B y Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8 (3): 207-217.

10. Conway T y Cohen PS. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* metabolism in the gut. *Microbiol Spec* 2015; 3 (3): MBP-0006-2014. doi:10.1128/microbiolspec.MBP-0006-2014.
11. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M *et al.* Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 2013; 26 (4): 822-880.
12. Caugant DA, Levin BR, Selander RK. Genetic diversity and temporal variation in the *E. coli* population of a human host. *Genetics* 1981; 98: 467-490.
13. Rodríguez-Ángeles G. Principales características y diagnóstico de los grupos filogenéticos de *Escherichia coli*. *Salud Publ Mex* 2002; 44 (5): 464-475.
14. Srivastava S, editor. *Genetics of bacteria*. India: Springer India, 2013.
15. Frost LS, Leplae R, Summers AO y Toussaint A. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3: 722-732.
16. Levin BR. Periodic selection, infectious gene exchange and the genetic structure of *E. coli* populations. *Genetics* 1981; 99: 1-23.
17. Rasko DA, Rosovitz MJ, Myers GSA, Mongodin EF, Fricke WF *et al.* The pangenome structure of *Escherichia coli*: Comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *J Bacteriol* 2008; 190 (20): 6881-6893.
18. Página electrónica Hardy Diagnostics[©] "a culture service"TM. Consultada el 20 de Junio de 2014. <http://www.hardydiagnostics.com/>.
19. Página electrónica de la American Society for Microbiology[©] ASM Microbe Library. Consultada el 20 de Junio de 2014. <https://www.microbelibrary.org/>.

20. McDaniels AE, Rice EW, Reyes AL, Johnson CH, Haugland RA *et al.* Confirmational identification of *Escherichia coli*, a comparison of genotypic and phenotypic assays for glutamate decarboxylase and β -D-glucuronidase, *Appl Environ Microbiol* 1996; 62 (9): 3350–3354.
21. Tucker DL, Tucker N y Conway T. Gene expression profiling on the pH response in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2002; 184 (23): 6551-6558.
22. Rivas L, Mellor GE, Gobius K y Fegan N. Editores en Springer Briefs in food, health and nutrition: detection and typing strategies for pathogenic *Escherichia coli*. Estados Unidos: Springer, 2015.
23. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 1990; 262 (4): 56-61.
24. McPherson MJ y Møller SG. PCR. 2da edición. Reino Unido: Taylor & Francis Group, 2006.
25. Watson JD y Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 1953; 171 (4356): 737-738.
26. Maheux AF, Bissonnette L y Bergeron M. Capítulo 20; Rapid detection of the *Escherichia coli* genospecies in water by conventional and Real-Time PCR. En: Wilks M, editor. PCR detection of microbial pathogens. 2da edición. Methods in molecular biology; Springer Science. Reino Unido: Humana Press, 2013: 289-305.
27. Waterman SR y Small PLC. Transcriptional expression of *Escherichia coli* glutamate-dependent acid resistance *gadA* and *gadBC* in an *hns rpoS* mutant. *J Bacteriol* 2003; 185 (15): 4644-4647.

28. Smith DK, Kassam T, Singh B y Elliot JF. *Escherichia coli* has two homologous glutamate descarboxylase genes that map to distinct loci. J Bacteriol 1992; 174 (18): 5820-5826.
29. Salcedo IAS. Prueba del ácido glutámico descarboxilasa modificados para la rápida identificación de *Escherichia coli* aisladas en urocultivos (tesis de Licenciatura) Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2012.
30. Whittam TA, Ochman H y Selander RK. Multilocus genetic structure in natural populations of *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci 1983; 80: 1751-1755.
31. Ørskov I, Ørskov F, Jann B y Jann K. Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. Bacterol Rev 1977; 41 (3): 667-710.
32. Nataro JP y Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 1998; 11 (1): 142-201.
33. Kaper JB, Nataro JP y Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol 2004; 2: 123-140.
34. Köhler CD y Dobrindt U. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? Int J Med Microbiol 2011; 301: 642-647.
35. Ørskov I, Ørskov F y Rowe B. Six new *E. coli* O groups: O165, O166, O167, O168, O169 y O170. Acta Pathol Microbiol Scand B 1984; 92 (4): 189-193.
36. Fratamico PM, DebRoy C, Liu Y, Needleman DS, Baranzoni GM y Feng P. Advances in molecular serotyping and subtyping of *Escherichia coli*. Front Microbiol 2016; 7: 644.
37. Álvarez VE. Identificación de grupos filogenéticos, serotipos y factores de virulencia en cepas de *Escherichia coli* uropatógena y *E. coli* patógena aviar (tesis de maestría). Ciudad de México, México: UNAM, 2012.

38. Francis DH. Colibacillosis in pigs and its diagnosis. *Swine Health Prod* 1999; 7 (5): 241-244.
39. Blanco M, Lazo L, Blanco JE, Dahbi G, Mora A, Lopez C *et al.* Serotypes, virulence genes, and PFGE patterns of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from Cuban pigs with diarrhea. *Int Microbiol* 2006; 9: 53-60.
40. Zweifel C, Schumacher S, Blanco M, Blanco JE, Tasara T, Blanco J *et al.* Phenotypic and genotypic characteristics of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from wiss cattle. *Vet Microbiol* 2005; 105: 37-45.
41. Hussein HS. Prevalence and pathogenicity of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. *J Anim Sci* 2007; 85: 63-72.
42. García-Sánchez A, Sánchez SRR, Rubio R, Pereira G, Alonso JM, Hermoso de Mendoza *et al.* Presence of shiga toxin-producing *E. coli* O157:H7 in a survey of wild artiodactyls. *Vet Microbiol* 2007; 121: 373-377.
43. De la Garza JAG. Caracterización fenotípica y molecular de *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* en tres etapas de la cadena productiva de carne de bovino. (Tesis de Maestría en Ciencias). Ciudad de México, México: UNAM 2015.
44. Riley LW. Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20: 380-390.
- 45.105. Liu Y, Yan X, DebRoy C, Fratamico PM, Needleman DS, Li RW *et al.* *Escherichia coli* O-antigen gene clusters of serogroups O62, O68, O131, O140, O142 and O163: DNA sequences and similarity between O62 and O68, and PCR-based serogrouping. *Biosensors* 2015; 5: 51-68.

46. Anklam KS, Kanankege KS, Gonzales TK, Kaspar CW y Döpfer D. Rapid and reliable detection of shiga toxin-producing *Escherichia coli* by real-time multiplex PCR. *J. Food Prot* 2012; 75 (4): 643-650.
47. Croxen MA y Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8: 26-38.
48. Cross AS. What is a virulence factor? Commentary. *Crit Care* 2008; 12 (6): 196.
49. Sabaté M, Moreno E, Pérez T, Andreu A y Prats G. Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 880-886.
50. Dobrindt U, Hochhut B, Hentschel U y Hacker J. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2: 414-424.
51. Schmidt H y Hensel M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17 (1): 14-56.
52. Bateman SL, Stapleton AE, Stamm WE, Hooton TM y Seed PC. The type 1 pili regulator gene *fimX* and pathogenicity island PAI-X as molecular markers of uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol* 2013; 159: 1606-1617
53. Ochman H y Selander RK. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J Bacteriol* 1984; 157 (2): 690-693.
54. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66 (10): 4555-4558.
55. Clermont O, Christenson JK, Denamur E y Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep* 2013; 5 (1): 58-65.

56. Gordon DM, Clermont O, Tolley y Denamur E. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environ Microbiol* 2008; 10 (10): 2484-2496.
57. Walk ST, Alm EW, Gordon DM, Ram JL, Toranzos GA, Tiedje JM *et al.* Cryptic lineages of the genus *Escherichia*. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75 (20): 6534–6544.
58. Clermont O, Gordon DM, Brisse S, Walk ST y Denamur E. Characterization of the cryptic *Escherichia* lineages: rapid identification and prevalence. *Environ Microbiol* 2011; 13 (9): 2648-2477.
59. Luo C, Walk ST, Gordon DM, Feldgarden M, Tiedje JM y Konstantinidis KT. Genome sequencing of environmental *Escherichia coli* expands understanding of the ecology and speciation of the model bacterial species. *Proc Natl Acad Sci Unit States Am* 2011; 108 (17): 7200-7205.
60. Souza V, Rocha M, Valera A y Eguiarte LE. Genetic structure of natural populations of *Escherichia coli* in wild hosts on different continents. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65 (8): 3373-3385.
61. Clermont O, Gordon D y Denamur E. A guide to the various phylogenetic classification schemes for *Escherichia coli* and the correspondence among schemes. *Microbiol* 2015; 161: 980-988.
62. Siripattanapipong S, Mungthin M, Tan-ariya P, Leelayoova S. Capítulo 5. Multilocus sequence typing (MLST) and its applications in epidemiological studies for parasitic infections. En: De Bruyn O, Peters S, editores. *Parasitology research trends*. Nova science publishers inc. Tailandia 2010: 99-117.

63. Applied Biosystems. A fast, accurate, and automated workflow for multi locus sequence typing of bacterial isolates. Application note MLST. California, USA, 2005.
64. Pérez-Losada M, Cabezas P, Castro-Nallar E, Crandall KA. Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. *Infect, Gen and Evol* 2013; 16: 38-53.
65. Vázquez JA, Berrón S. Capítulo 9. Multilocus sequence typing: el marcador molecular de la era de Internet. En: Puesta al día en métodos microbiológicos para el diagnóstico clínico. *Enf Infec Microbiol Clín* 2004; 22 (2): 113-120.
66. Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler LH *et al.* Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol* 2006; 60 (5): 1136-1151.
67. Maiden MCJ. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2006; 60: 561- 588.
68. Página electrónica de la MLST databases at UoW de la Universidad de Warwick y la Escuela de Medicina Warwick. Consultada el 10 de Junio de 2014. Dirección: <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>.
69. Gevers D, Cohan FM, Lawrence JG, Spratt BG, Coenye TC, Feil EJ *et al.* Re-evaluating prokaryotic species. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3: 733-739.
70. Página electrónica del STEC Center de la Universidad Estatal de Michigan y su Departamento de Microbiología y Genéticas Moleculares. Consultada el 10 de Junio de 2014. Dirección: <http://www.shigatox.net/new/>.
71. Qi W, Lacher DW, Bumbaugh AC, Hyma KE, Ouellette LM, Tarr CL *et al.* EcMLST: an online database for multi locus sequence typing of pathogenic *Escherichia coli*.

Memorias de la Conferencia de 2004 IEEE Computational Systems Bioinformatics. CSB California, USA, 2004.

72. Página electrónica del Institut Pasteur. Consultada el 10 de Junio de 2014. Dirección: <http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/>.

73. Jaureguy F, Landraud L, Passet V, Diancourt L, Frapy E, Guigon G *et al.* Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. BMC Genom 2008; 9: 560.

74. Jolley KA y Maiden MCJ. Using multilocus sequence typing to study bacterial variation: prospects in the genomic era. Future Microbiol 2014; 9 (5): 623-630.

75. Página electrónica de la Universal Protein Resource Knowledgebase (UniProtKB). Consultada el 27 de mayo de 2014. Dirección: <http://www.uniprot.org/help/uniprotkb>.

76. Reeves RR, Stewart BS, Clapham PJ, Powell JA y Folkens PA. National Audubon Society: Guide to marine mammals of the world. China: Andrew Stewart Publishing Inc, 2008.

77. Norma Oficial Mexicana Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. NOM-059-SEMARNAT-2010 (Diciembre 6, 2010).

78. Wells RS y Scott MD. Bottlenose dolphins. En: Perrin WF, Würsig B y Thewissen JGM, editores. Encyclopedia of marine mammals. Academic Press, Estados Unidos 2002: 122–128.

79. Leader-Williams N y Dublin HT. Charismatic megafauna as ‘flagship species’. En: Entwistle A y Dunstone N, editores. Priorities for the conservation of mammalian diversity: has the panda had its day? Cambridge University Press, Reino Unido 2000: 53-81.

80. México. *Tursiops truncatus* (delfín nariz de botella). Distribución conocida, 2012 [mapa de registros]. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad (CONABIO): Sistema Nacional de Información sobre Biodiversidad (SNIB), Portal de Geoinformación; 2016.
81. Norma Anaya. Laguna azul: Delfines en México. Latitud 21, 2013 septiembre 1. Disponible para consulta en <http://www.latitud21.com.mx/laguna-azul/>
82. Redacción El Universal. Discuten diputados por ley de delfinarios. El Universal, 2017 marzo 31. Disponible para consulta en: <http://www.eluniversal.com.mx/articulo/nacion/sociedad/2017/03/31/discuten-diputados-por-ley-de-delfinarios>
83. Norma Oficial Mexicana Para la regulación de la captura para investigación, transporte, exhibición, manejo y manutención de mamíferos marinos en cautiverio en riesgo. NOM-135-SEMARNAT-2004 (Agosto 27, 2004).
84. Stewart JR, Gast RJ, Fujioka RS, Solo-Gabriele HM, Meschke JS, Amaral-Zettler LA *et al.* The coastal environment and human health: microbial indicators, pathogens, sentinels and reservoirs. *Environ Health* 2008; 7 (Supl 2): S3.
85. Bossart GD. Marine mammals as sentinels species for oceans and human health. *Oceanography* 2006; 19: 44–47.
86. Schaefer AM, Goldstein JD, Reif JS, Fair PA y Bossart GD. Antibiotic-resistant organisms cultured from atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) inhabiting estuarine waters of Charleston, SC and Indian River Lagoon, FL. *EcoHealth* 2009; 6: 33-41.
87. Greig TW, Bemiss JA, Lyon BR, Bossart GD y Fair PA. Prevalence and diversity of antibiotic resistant *Escherichia coli* in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the

Indian River Lagoon, Florida, and Charleston Harbor area, South Carolina. *Aquat Mamm* 2007; 33: 185-194.

88. Stewart JR, Townsend FI, Lane SM, Dyar E, Hohn AA *et al.* Survey of antibiotic-resistant bacteria isolated from bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* in the southeastern USA. *Dis Aquat Org* 2014; 108: 91-102.

89. Schaefer AM, Bossart GD, Mazzoil M, Fair PA y Reif JS. Risk factors for colonization of *E. coli* in atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the Indian River Lagoon, Florida. *J Environ Public Health* 2011: 1-8.

90. Jaing C, Thissen JB, Gardner S, McLoughlin K, Slezak T, Bossart GD *et al.* Pathogen surveillance in wild bottlenose dolphins *Tursiops truncatus*. *Dis Aquat Org* 2015; 116: 83-91.

91. Van Elk CE, Van Dep Bildt MWG, Martina BEE, Osterhaus ADME, Kuiken T. *Escherichia coli* septicemia associated with lack of maternally acquired immunity in a bottlenose dolphin calf. *Vet Pathol* 2007; 44: 88-92.

92. Ávalos TR. Bacterias asociadas al aparato respiratorio y al área genital del delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*) en cautiverio (tesis de maestría). Distrito Federal, México: UNAM, 2005.

93. Ávalos TR. Determinación de bacterias aerobias y levaduras del tracto respiratorio y el área genital del delfín tonina (*Tursiops truncatus*) en instalaciones cerradas y abiertas (tesis de maestría). Ciudad de México, México: UNAM, 2007

94. Morris PJ, Johnson WR, Pisani J, Bossart GD, Adams J *et al.* Isolation of culturable organisms from free-ranging bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the southeastern United States. *Vet Microbiol.* 2011; 148: 440-447.

95. Wong S, US Navy marine mammal program. Ciprofloxacin resistance associated with marine mammals. SPAWAR Space and naval warfare systems command Boletín #C2-118 2002 septiembre, San Diego, California, USA.
96. Venn-Watson S, Smith CR y Jensen ED. Primary bacterial pathogens in bottlenose dolphins *Tursiops truncatus*: needles in haystacks of commensal and environmental microbes. *Dis Aquat Org* 2008; 79: 87-93.
97. Venn-Watson S y Stamper A. Working Group on Marine Mammal Unusual Mortality Events. Sondeo piloto de la priorización de patógenos, resultados para cetáceos. Reporte al Comité Científico de la International Whaling Commission. 2011, SC/62/E4.
98. Bik EM, Costello EK, Switzer AD, Callahan BJ, Holmes SP, Wells RS *et al.* Marine mammals harbor unique microbiotas shaped by and yet distinct from the sea. *Nat Comm* 2016; 7 (#10516).
99. Lima N, Rogers T, Acevedo-Whitehouse y Brown MV. Temporal stability and species specificity in bacteria associated with the bottlenose dolphins respiratory system. *Environ Microbiol Repo* 2012; 4 (1): 89-96.
100. Manageiro V, Clemente L, Jones-Dias D, Albuquerque T, Ferreira E *et al.* CTX-M-15-producing *Escherichia coli* in dolphin, Portugal. *Emerg Infect Dis* 2015; 21 (12): 2249-2251.
101. Yañez VA. Identificación molecular de cepas comensales de *Escherichia coli* en el delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*) (tesis de licenciatura). Ciudad de México, México: UNAM, 2012.
102. Luque JC y Herráez AS, editores. *Biología molecular e ingeniería genética: Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud*. España: Elsevier España, 2002.

103. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A y Kumar Sudhir. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013; 30: 2775-2729.
104. Saitou N y Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987; 4 (4): 406-425.
105. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980; 16: 111-120.
106. Piñero D, Barahona A, Eguiarte L, Olivares AR y Lizana RS. Capítulo 14. La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México. En Díaz P, Guillaumin EM, Zizumbo-Villarreal D, revisores. *Capital natural de México, vol.1: Conocimiento actual de la biodiversidad*. CONABIO México 2008: 415-435.
107. Feil JE, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP y Spratt BG. eBURST: Inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol* 2004; 186 (5): 1518-1530.
108. Francisco AP, Bugalho M, Ramirez M, Carriço J. Global optimal eBURST of multilocus typing data using a graphic matroid approach. *BMC Bioinformatics* 2009; 10: 152.
109. Thompson JD, Higgins DG y Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994; 22 (22): 4673-4680.
110. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evol* 1985; 39: 783-791.

111. Higgins J, Hohn C, Hornor S, Frana M, Denver M y Joerger R. Genotyping of *Escherichia coli* from environmental and animal samples. *J Mic Meth* 2007; 70: 227-235.
112. Grant MA, Weagant SD y Feng P. Glutamate decarboxylase genes as a prescreening marker for detection of pathogenic *Escherichia coli* groups. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67 (7): 3110-3114.
113. Iranpour D, Hassanpour M, Ansari H, Tajbakhsh S, Khamisipour G y Najafi A. Phylogenetic groups of *Escherichia coli* strains from patients with urinary tract infection in Iran based on the new Clermont phylotyping method. *Biomed Res Intl* vol 2015, Article ID 846219, 7 páginas, 2015. doi:10.1155/2015/846219
114. Mushtaq S, Irfan S, Sarma JB, Doumith M, Pike R, Pitout J *et al.* Phylogenetic diversity of *Escherichia coli* strains producing NDM-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66 (9): 2002-2005.
115. Alonso LN. Caracterización molecular de los genes *bla*-*AmpC* cromosómicos y adquiridos en aislados clínicos de *Escherichia coli* en el área de Barcelona [tesis de Doctorado]. Barcelona, España: Universitat autònoma de Barcelona, 2014.
116. Müştak HK, Günaydin E, Kaya IB, Salar MÖ, Babacan O, Önat K *et al.* Phylo-typing of clinical *Escherichia coli* isolates originating from bovine mastitis and canine pyometra and urinary tract infection by means of quadruplex PCR. *Vet Quart* 2015; 35 (4): 194-199.
117. Escobar-Páramo P, Clermont O, Blanc-Potard AB, Bui H, Le Bouguéne C y Denamur E. A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol* 2004; 21 (6): 1085-1094.

118. Vangchhia B, Abraham S, Bell JM, Collignon P, Gibson J, Ingram PR *et al.* Phylogenetic diversity, antimicrobial susceptibility and virulence characteristics of phylogroup F *Escherichia coli* in Australia. *Microb Soc* 2016; 162: 1904-1912.
119. Pitout JDD. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance. *Front Microbiol* 2012; 3 (9): 1-7.
120. Platell JL, Cobbold RN, Johnson JR, Heisig A, Heisig P, Clabots C *et al.* Commonality among fluoroquinolone-resistant sequence type ST131 extraintestinal *Escherichia coli* isolates from humans and companion animals in Australia. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55 (8): 3782-3787.
121. Peirano G, van der Bij AK, Gregson DB y Pitout JDD. Molecular epidemiology over an eleven-year period (2000-10) of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* causing bacteraemia in a centralized Canadian region. *J Clin Microbiol* 2012; 50 (2): 294-299.
122. Sherchan JB, Hayakawa K, Miyoshi-Akiyama T, Ohmagari N, Kirikae T, Nagamatsu M *et al.* Clinical epidemiology and molecular analysis of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Nepal: Characteristics of sequence type 131 and 648. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59 (6): 3424-3432.
123. Ewers C, Bethe A, Stamm I, Grobbel M, Kopp PA, Guerra B *et al.* CTX-M-15-D-ST648 *Escherichia coli* from companion animals and horses: Another pandemic clone combining multiresistance and extraintestinal virulence? *J Antimicrob Chemother* 2014; 69: 1224-1230.
124. Maluta RP, Logue CM, Casas MRT, Meng T, Guastalli EAL, Rojas TCG *et al.* Overlapped sequence types (STs) and serogroups of avian pathogenic (APEC) and human

extra-intestinal pathogenic (ExPEC) *Escherichia coli* isolated in Brazil. Proc Natl Acad Sci 2014; 9 (8): e105016.

125. Sidjabat HE, Paterson DL, Adams-Haduch JM, Ewan L, Pasculle AW, Muto CA *et al.* Molecular epidemiology of CTX-M-producing *Escherichia coli* isolates at a tertiary medical center in western Pennsylvania. Antimicrob Agents Chemother 2009; 54 (11): 4733-4739.

126. Brisse S, Diancourt L, Laouénan C, Vigan M, Caro V, Arlet G *et al.* Phylogenetic distribution of CTX-M- and non-extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates: group B2 isolates, except clone ST131, rarely produce CTX-M enzymes. J Clin Microbiol 2012; 50 (9): 2974-2981.

127. Córtes P, Blanc V, Mora A, Dahbi G, Blanco JE, Blanco M *et al.* Isolation and characterization of potentially pathogenic antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains from chicken and pig farms in Spain. Appl Environ Microbiol 2010; 76 (9): 2799-2805.

128. Gibreel TM. Molecular epidemiology of uropathogenic *Escherichia coli* in North West England and characterisation of the ST131 clone in the region (tesis de Doctorado). Manchester, Inglaterra: University of Manchester, 2011.

129. Hertz FB, Nielsen JP, Schønning K, Littauer P, Knudsen JD, Løbner-Olesen A *et al.* Population structure of drug -susceptible, -resistant and ESBL-producing *Escherichia coli* from community-acquired urinary tract. BMC Microbiol 2016; 16: 63.

130. Mshana SE, Imirzalioglu C, Hain T, Domann E, Lyamuya EF y Chakraborty T. Multiple ST clonal complexes, with a predominance of ST131, of *Escherichia coli* harbouring blaCTX-M-15 in a tertiary hospital in Tanzania. Clin Microbiol Infect 2011; 17: 1262-1282.

131. Hu YY, Cai JC, Zhou HW, Chi D, Zhang XF, Chen WL *et al.* Molecular typing of CTX-M-producing *Escherichia coli* isolates from environmental water, swine feces, specimens from healthy humans and human patients. *Appl Environ Microbiol* 2013; 79 (19): 5988-5996.
132. Miao Z, Li S, Wang L, Song W y Zhou Y. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from outpatients in town hospitals of Shandong province, China. *Front Microbiol* 2017; 8 (63): 1-8.
133. Zhang H, Seward CH, Wu Z, Ye H y Feng Y. Genomic insights into the ESBL and MCR-1-producing ST648 *Escherichia coli* with multi-drug resistance. *Sci Bull* 2016; 61 (11): 875-878.
134. Zong Z y Yu R. *Escherichia coli* carrying the blaCTX-M-15 gene of ST648. *J Med Microbiol* 2010; 59: 1536-1537.
135. Vignaroli C, Luna GM, Rinaldi C, Di Cesare A, Danovaro R y Biavasco F. New sequence types and multidrug resistance among pathogenic *Escherichia coli* isolates from coastal marine sediments. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78 (11): 3916-3922.
136. Bugert JJ, Nizam SA y Toleman MA. Abrupt emergence of *E. coli* ST-405, ST-648 and ST-101 encoding NDM-1 and variants in the Bangladesh environment modulated by specific environmental bacteriophages. 24th European congress of clinical microbiology and infectious diseases (poster session); 2014 Mayo 10-13; Barcelona, España. P-1173.
137. Ewers C, Bethe A, Semmler T, Guenther S y Wieler LH. Extended-spectrum β -lactamase-producing and *AmpC*-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18: 646-655.

138. Pires-dos-Santos T, Bisgaard M y Christensen H. Genetic diversity and virulence profiles of *Escherichia coli* causing salpingitis and peritonitis in broiler breeders. *Vet Microbiol* 2013; 162: 873-880.
139. Sato T, Yokota S, Okubo T, Usui M, Fujii N y Tamura Y. Phylogenetic association of fluoroquinolone and cephalosporin resistance of D-O1-ST648 *Escherichia coli* carrying *bla*CMY-2 from faecal samples of dogs in Japan. *J Med Microbiol* 2014; 63: 263-270.
140. Wagner S, Gally DL y Argyle SA. Multidrug-resistant *Escherichia coli* from canine urinary tract infections tend to have commensal phylotypes, lower prevalence of virulence determinants and *ampC*-replicons. *Vet Microbiol* 2014; 169: 171-178.
141. Guo SY, Wakeham D, Brouwers HJM, Cobbold RN, Abraham S, Mollinger JL *et al.* Human-associated fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* clonal lineages, including ST354, isolated from canine feces and extraintestinal infections in Australia. *Microb Infect* 2015; 17 (4): 266-274.
142. Aibuni I, Odugbeni T, Koenig W y Ghebremedhin B. Sequence type ST131 and ST10 complex (ST617) predominant among CTX-M-15-producing *Escherichia coli* isolates from Nigeria. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18 (3): E49-E51.
143. Wester AL, Brandal LT y Dahle UR. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* carrying the shiga toxin gene *stx2*. *J Clin Microbiol* 2013; 51 (12): 4279-4280.
144. Nicolas-Chanoine MH, Bertrand X y Madec JY. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clin Microbiol Rev* 2014; 27 (3): 543-574.
145. López-Cerero L, Navarro MD, Bellido M, Martín-Peña A, Viñas L, Cisneros JM *et al.* *Escherichia coli* belonging to the worldwide emerging epidemic clonal group O25b/ST131: risk factors and clinical implications. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69: 809-814.

146. Poolman JT y Wacker M. Extraintestinal-pathogenic *Escherichia coli*, a common human pathogen: Challenges for vaccine development and progress in the field. *J Infect Dis* 2016; 213 (1): 6-13.
147. Johnson JR, Nicholas-Chanoine M, DebRoy C, Castanheira M, Robicsek A, Hansen G *et al.* Comparison of *Escherichia coli* ST131 pulsotypes, by epidemiologic traits, 1967-2009. *Emerg Inf Dis* 2012; 18 (4): 598-607.
148. Adams-Sapper S, Diep BA, Perdreau-Remington F y Riley LW. Clonal composition and community clustering of drug-susceptible and -resistant *Escherichia coli* isolates from bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57 (1): 490-497.
149. Petty NK, Zakour NLB, Stanton-Cook M, Skippington E, Totsika M, Forde BM *et al.* Global dissemination of multidrug resistant *Escherichia coli* clone. *Proc Natl Acad Sci* 2014; 111 (15): 5694-5699.
150. Toval F, Köhler C, Vogel U, Wagenlehner F, Mellmann A, Fruth A *et al.* Characterization of *Escherichia coli* isolates from hospital inpatients or outpatients with urinary tract infection. *J Clin Microbiol* 2014; 52 (2): 407-418.
151. Seni J, Falgenhaur L, Simeo N, Mirambo MM, Imirzalioglu C, Matee M *et al.* Multiple ESBL-producing *Escherichia coli* sequence types carrying quinolone and aminoglycoside resistance genes circulating in companion and domestic farm animals in Mwanza, Tanzania, harbor commonly occurring plasmids. *Front Microbiol* 2016; 7 (142): 1-7.
152. Molina-López J, Aparicio-Ozores G, Ribas-Aparicio RM, Gavilanes-Parra S, Chávez-Berrocal ME, Hernández-Castro R *et al.* Drug resistance, serotypes, and phylogenetic

- groups among uropathogenic *Escherichia coli* including O25-ST131 in Mexico City. J Infect Dev Ctries 2011; 5 (12): 840-849.
153. Colomer-Lluch M, Mora A, López C, Mamani R, Dahbi G, Marzoa J *et al.* Detection of quinolone-resistant *Escherichia coli* isolates belonging to clonal groups O25b:H4-B2-ST131 and O25b:H4-D-ST69 in raw sewage and river water in Barcelona, Spain. J Antimicrob Chemoter 2013; 68: 758-765.
154. Weissman SJ, Johnson JR, Tchesnokova V, Billig M, Dykhuizen D, Riddell K *et al.* High-Resolution two-locus clonal typing of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol 2012; 78 (5): 1353-1360.
155. Ferens WA y Hovde CJ. *Escherichia coli* O157:H7: animal reservoir and sources of human infection. Foodborne Pathog Dis 2011; 8 (4): 465-487.
156. Manges AR y Johnson J. Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. Clin Infect Dis 2012; 55 (5): 712-719.
157. Johnson JR, Menard ME, Lauderdale T, Kosmidis C, Gordon D, Collignon P *et al.* Global distribution and epidemiologic associations of *Escherichia coli* Clonal Group A, 1998-2007. Emerg Inf Dis 2011; 17 (11): 2001-2009.
158. Simões RR, Poirel L, Da Costa PM y Nordmann P. Seagulls and beaches as reservoirs for multidrug-resistant *Escherichia coli*. Emerg Infect Dis 2010; 16 (1): 110-112.
159. Lau SH, Reddy S, Cheesbrough J, Bolton FJ, Willshaw G, Cheasty T *et al.* Major uropathogenic *Escherichia coli* strain isolated in the northwest of England identified by multilocus sequence typing. J Clin Microbiol 2008; 46 (3): 1076-1080.

160. Giacobbe DR, Del Bono V, Coppo E, Marchese A y Viscoli C. Emergence of a KPC-3-producing *Escherichia coli* ST69 as a cause of bloodstream infections in Italy. *Microb Drug Resist* 2015; 21 (3): 342-344.
161. Tartof SY, Solberg OD, Manges Arvy Riley LW. Analysis of an uropathogenic *Escherichia coli* clonal group by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 2005; 43 (12): 5860-5864.
162. Novais A, Vuotto C, Pires J, Montenegro C, Donelli G, Coque TM *et al.* Diversity and biofilm-production among isolates of *Escherichia coli* phylogroup D belonging to ST69, ST393 and ST405 clonal groups. *BMC Microbiol* 2013; 13: 144.
163. Blyton MDJ y Gordon DM. Genetic attributes of *E. coli* isolates from chlorinated drinking water. *PLoS ONE* 2017; 12 (1): e0169445.
164. Manges AR, Johnson JR, Foxman B, O'Bryan TT, Fullerton KE y Riley LW. Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal group. *N Engl J Med* 2001; 345 (14): 1007-1013.
165. Surgers L, Bleibtreu A, Burdet C, Clermont O, Laouénan C, Lefort A *et al.* *Escherichia coli* bacteraemia in pregnant women is life-threatening for foetuses. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20: O1035-O1041.
166. Rosser T. Pathogenic potential of *Escherichia coli* O26 and sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:NM (tesis de Doctorado). Edinburgh, Escocia: University of Edinburgh, 2010.
167. Torres A, editor. Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America. Bentham eBooks University of Texas, 2010.

168. García A y Fox JG. The rabbit as a new reservoir host of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 2003; 9 (12): 1592-1597.
169. Pacheco ABF, Ferreira LCS, Pichel MG, Almeida DF, Binsztein N y Viboud GI. Beyond serotypes and virulence-associated factors: Detection of genetic diversity among O153:H45 CFA/I heat-stable enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol* 2001; 39 (12): 4500-4505.
170. Balière C, Rincé A, Blanco J, Dahbi G, Harel J, Vogeleer P *et al.* Prevalence and characterization of shiga toxin-producing and enteropathogenic *Escherichia coli* in shellfish-harvesting areas and their watersheds. *Front Microbiol* 2015; 6: 1356.
171. Ministerio de Salud de Nueva Zelanda. Panfleto de información. Non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Institute of Environmental Science and Research Limited 2001: 1-4.
172. Baranzoni GM, Fratamico PM, Gangiredla J, Patel I, Bagi LK, Delannoy S *et al.* Characterization of shiga toxin subtypes and virulence genes in porcine shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Front Microbiol* 2016; 7: 574.
173. Franke S, Harmsen D, Caprioli A, Pierard D, Wieler LH y Karch H. Clonal relatedness of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* O101 strains of human and porcine origin. *J Clin Microbiol* 1995; 33 (12): 3174-3178.
174. Vredenburg J, Varela AR, Hasan B, Bertilsson S, Olsen B, Narciso-da-Rocha C *et al.* Quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from birds of prey in Portugal are genetically distinct from those isolated from water environments and gulls in Portugal, Spain and Sweeden. *Environ Microbiol* 2014; 16 (4): 995-1004.

175. Röderova M, Halova D, Papousek I, Dolejska I, Masarikova M, Hanulik V *et al.* Characteristics of quinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and the environment in the Czech Republic. *Front Microbiol* 2017; 7: 2147.
176. Sallem RB, Slama KB, Estepa V, Jouini A, Gharsa H, Klibi N *et al.* Prevalence and characterisation of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolates in healthy volunteers in Tunisia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31: 1511-1516.
177. Castellanos LR, Donado-Gody P, León M, Clavijo V, Arevalo A y Bernal JF. High heterogeneity of *Escherichia coli* sequence types harbouring ESBL/*AmpC* genes on IncII plasmids in the Colombian poultry chain. *PLoS ONE* 2017; 12 (1): e0170777.
178. Harnett NM y Gyles CL. Resistance to drugs and heavy metals, colicin production biochemical characteristics of selected bovine and porcine *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol* 1984; 48 (5): 930-935.
179. Rocha-Gracia RC, Cortés-Cortés G, Lozano-Zarain P, Bello F, Martínez-Laguna Y y Torres C. Faecal *Escherichia coli* isolates from healthy dogs harbour CTX-M-15 and CMY-2 β -lactamases. *Vet J* 2015; 203: 315-319.
180. Sallem RB, Slama KB, Estepa V, Cheikhna O, Mohamed AM, Chairat S *et al.* Detection of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* isolates of lineages ST410-A, ST617-A and ST354-D in faecal samples of hospitalized patients in a Mauritanian hospital. *J Chemother* 2015; 27 (2): 114-116.
181. Michelacci V, Prosseda G, Maugliani A, Tozzoli R, Sanchez S, Herrera-León S *et al.* Characterization of an emergent clone of enteroinvasive *Escherichia coli* circulating in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2016; 22 (3): 287.e1 1-287.e1 9

182. Rivas L, Lake R, Cressey P, King N, Horn B y Gilpin B. New Zealand Ministry for Primary Industries. Technical paper 2015/10: Risk profile (update): Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in red meat. Nueva Zelanda: MPI, 2014.
183. Fernández D, Irino K, Sanz ME, Padola NL y Parma AE. Characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from dairy in Argentina. *Appl Microbiol* 2010; 51 (4): 377-382.
184. Beutin L, Krause G, Zimmermann S, Kaulfuss S y Gleier K. Characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. *J Clin Microbiol* 2004; 42 (3): 1099-1108.
185. Eichhorn I, Heidemanns K, Semmler T, Kinnemann B, Mellman A, Harmsen D *et al.* Highly virulent non-157 enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serotypes reflect similar phylogenetic lineages, providing new insights into the evolution of EHEC. *Appl Environ Microbiol* 2015; 81 (20): 7041-7047.
186. Ramírez GPM, Castañeda SMP, Eslava CCA, Navarro OA, Moreno DL, Morales EMR *et al.* Caracterización de cepas de *Escherichia coli* aisladas de canales de pollo obtenidas de rastro, mercados públicos y supermercados. Memorias del Symposium de procesamiento e inocuidad de productos avícolas. ANECA México, 2014.
187. El-Hewairy HM, Awad WS e Ibrahim WS. Serotyping and molecular characterization of *Escherichia coli* isolated from diarrheic and in-contact camel calves. *Egypt J Comp Path & Clinic Path* 2009; 22 (1): 216-233.
188. Papagiannitsis CC, Izdebski R, Baraniak A, Fiett J, Herda M, Hrabák J *et al.* Survey of metallo- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* colonizing patients in european ICUs and rehabilitation units, 2008-11. *J Antimicrob Chemother* 2015; 70: 1981-1988.

189. Nimmich W, Voigt W y Seltmann G. Characterization of urinary *Escherichia coli* O75 strains. J Clin Microbiol 1997; 35 (5): 1112-1117.
190. Borges CA, Beraldo LG, Maluta RP, Cardozo MV, Barboza LB, Guastalli EAL *et al.* Multidrug-resistant pathogenic *Escherichia coli* isolated from wild birds in a veterinary hospital. Avian Pathol 2016; 46 (1): 76-83.
191. Mora A, Herrera A, López C, Dahbi G, Mamani R, Pita JM *et al.* Characteristics of the shiga-toxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4 German outbreak strain and of STEC strains isolated in Spain. Int Microbiol 2011; 14: 121-141.
192. Wiles TJ, Kulesus RR y Mulvey MA. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. Exp Mol Pathol 2008; 85 (1): 11-19.
193. Wang S, He X, Yu J, Neely M, Zhang L, Peng L *et al.* Characterisation of a multidrug-resistant meningitic *Escherichia coli* strain (O75:K1:H5) isolated from an infant that is sensitive to memantine, a newly identified host-directed antimicrobial drug. Int J Antimicrob Agents 2015; 46 (5): 598-600.
194. Dissanayake DR, Octavia S y Lan R. Population structure and virulence content of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from outbreaks in Sri Lanka. Vet Microbiol 2014; 168 (2-4): 403-412.
195. Glantz PJ. Unclassified *Escherichia coli* serogroup OX1 isolated from fatal diarrhea of rabbits. Can J Comp Med 1970; 34 (1): 47-49.
196. Thomas LV, Cravioto A, Scotland SM y Rowe B. New fimbrial antigenic type (E8775) that may represent a colonization factor in enterotoxigenic *Escherichia coli* in humans. Infect Immun 1982; 35 (3): 1119-1124.