



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *ESCHERICHIA COLI* EN CRÍAS DE LOBO  
MARINO DEL OCÉANO PACÍFICO**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

**PRESENTA:**

**MARÍA FERNANDA RAMÍREZ ECHENIQUE**

**ASESORES**

**DR. FRANCISCO SUÁREZ GUEMES**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA - UNAM**

**DR. RIGOBERTO HERNÁNDEZ CASTRO**

**HOSPITAL GENERAL DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ**

**CDMX**

**2021**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## Índice

Resumen	3
1. Introducción	5
1.1. Características generales de <i>E. coli</i>	5
1.2 Clasificación	5
1.2.1 Cepas comensales	6
1.2.2 Patotipos de <i>E. coli</i>	6
1.2.3 Patotipos Intestinales de <i>E. coli</i>	7
1.2.3.1 <i>E. coli</i> enteropatógena EPEC	7
1.2.3.2 <i>E. coli</i> enterotoxigénica ETEC	7
1.2.3.3 <i>E. coli</i> enteroagregativa EAEC	7
1.2.3.4 <i>E. coli</i> enterohemorrágica EHEC	8
1.2.3.5 <i>E. coli</i> enteroinvasiva EIEC	8
1.2.4 Cepas patógenas extraintestinales	8
1.2.4.1 <i>E. coli</i> uropatógena UPEC	8
1.2.4.2 <i>E. coli</i> asociada a meningitis MNEC	9
1.3 Técnicas de identificación de <i>Escherichia coli</i>	9
1.3.1 Identificación molecular por medio del gen <i>gadA</i>	10
2. Papel de <i>Escherichia coli</i> en el ambiente	10
3. Grupos filogenéticos	12
4. Tipificación por secuencias multilocus (MLST)	14
5. Generalidades de lobos marinos de California	17
5.1 Anatomía del lobo marino de California	18
5.1.2 Información poblacional	19
5.1.3 Situación actual del lobo marino de California ( <i>Zalophus californianus</i> )	21
5.1.4 <i>Escherichia coli</i> en lobos marinos	21
6. Justificación	23
6.1 Hipótesis	24
6.2 Objetivo general	24
6.3 Objetivos específicos	24
7. Material y métodos	25

<b>7.1 Áreas de estudio</b>	<b>25</b>
<b>7.1.2 Muestras</b>	<b>26</b>
<b>7.1.3 Aislamiento, identificación bacteriológica y molecular</b>	<b>26</b>
<b>7.1.4 Tipificación molecular</b>	<b>27</b>
<b>7.1.5 Purificación del ADN</b>	<b>28</b>
<b>7.1.6 Determinación de grupos filogenéticos</b>	<b>28</b>
<b>8. Resultados</b>	<b>30</b>
<b>8.1 Tipificación por secuencias multilocus (MLST)</b>	<b>31</b>
<b>9. Discusión</b>	<b>31</b>
<b>10. Conclusión</b>	<b>38</b>
<b>11. Referencias bibliográficas</b>	<b>39</b>

## RESUMEN

*Escherichia coli* (*E. coli*) es un microorganismo de importancia en animales domésticos, de vida silvestre y para la salud humana, ya que es una de las principales causantes de enfermedades infecciosas intestinales y extra-intestinales; además es utilizado como un importante modelo biológico en investigaciones en diversas áreas como la evolución, ecología, epidemiología médica y veterinaria, entre otras. Un ejemplo de ello es el estudio de la ecología de las enfermedades relacionada con la contaminación ambiental, en donde se puede evaluar la vida silvestre, en la que *E. coli* puede actuar como un centinela de la contaminación medioambiental. El lobo marino de California es uno de los mamíferos marinos con mayor distribución en el Pacífico mexicano y que comparte hábitat de manera muy cercana con el ser humano; esto lo hace muy susceptible de verse afectado y funge como un excelente sujeto de estudio; los mamíferos marinos son considerados especies centinelas por lo que medir o relacionar el grado de contaminación antropogénica en ellos nos da una idea de la salud del ecosistema que habitan. El objetivo de este trabajo fue la identificación molecular de *E. coli* proveniente de 10 crías de lobo marino (*Zalophus californianus*) de la isla de Natividad del Pacífico mexicano. Las muestras fueron obtenidas de hisopos rectales y posteriormente sembradas y cultivadas en agar MacConkey. Los aislamientos fueron identificados bioquímicamente mediante el sistema automatizado Vitek2; al mismo tiempo se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) de 17 antimicrobianos utilizando el mismo sistema. La identificación molecular de *E. coli* fue realizada por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando el gen *gadA* y se determinaron grupos filogenéticos por PCR múltiple. Por otro lado, se utilizó el método de genotipificación "Multilocus sequence typing" (MLST). Con esta metodología se obtuvieron las siguientes secuencias tipo (ST): (1) ST92, (2) ST80 del complejo ST568, (3) ST73 del complejo ST73, (2) ST491, (2) ST843, todas pertenecieron al grupo filogenético B2, el cual está altamente relacionado con cepas extraintestinales (ExPEC). La información obtenida con el presente estudio nos indica que algunos de los lobos marinos de la colonia muestreada presentan cepas potencialmente patógenas que pueden estar relacionadas con infecciones extraintestinales en humanos a nivel mundial y con esto valorar el grado de contaminación antropogénica del área de estudio.

En este estudio se reporta por primera vez en México el hallazgo de cepas pertenecientes al ST73 provenientes de lobos marinos en vida silvestre y aparentemente forma parte de su microbiota normal.

La habilidad para identificar complejos clonales o filogrupos de *E. coli* es crucial para conocer el tipo de cepas que existen en un nicho ecológico y con esto poder entender e identificar su fuente de origen; adicionalmente, este tipo de estudios permite complementar la base de datos ya existente a nivel mundial.

**PALABRAS CLAVE:** *E. coli*, MLST, ST, *Zalophus californianus*, centinelas ambientales, identificación molecular.

## INTRODUCCIÓN

### ***Características generales de E. coli***

*Escherichia coli* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, es un bacilo Gram negativo, lactosa positivo, oxidasa negativa, catalasa positiva y generalmente móvil. Puede crecer en condiciones de anaerobiosis o aerobiosis a una temperatura de 37°C (Croxen *et al.*, 2013). Es considerada parte de la microbiota del tracto gastrointestinal de la mayoría de las especies, puede encontrarse en suelo, agua y vegetación (Puerta y Mateos, 2010). *E. coli* es la causante de diversas enfermedades en humanos y animales tales como enteritis, infección del tracto urinario, meningitis neonatal y está altamente asociada a diarreas en humanos, animales de compañía y de producción (Allocati *et al.*, 2013). También puede afectar a nivel sistémico y el sistema nervioso central (Croxen *et al.*, 2013). Diversos estudios muestran que *E. coli* se ha adaptado al suelo, sal, sedimentos, algas tropicales y subtropicales, así como a la temperatura de diversos ecosistemas, además de ser capaz de sobrevivir por largos periodos y eventualmente multiplicarse (Ishii y Sadowsky, 2008).

### **Clasificación**

*Escherichia coli* cuenta con una extensa diversidad entre sus cepas, tanto fenotípica como genéticamente; esto les permite diferenciarse unas de otras en su comportamiento, apariencia, metabolismo, así como en su capacidad de causar enfermedad; de hecho, una cepa de *E. coli* comparte solo una pequeña parte de sus genes con otra cepa de la misma especie de *E. coli* (Rasko *et al.*, 2008; Markey *et al.*, 2013). Existen cepas comensales y patógenas, estas últimas se clasifican por patotipos (Donnenberg, 2013; Kaper *et al.*, 2004).

Las cepas comensales corresponden a la mayoría de las poblaciones de *E. coli* que han logrado adaptarse al hospedero sin causar enfermedad, las cepas patógenas son aquellas capaces de producir enfermedad y se clasifican en patotipos dependiendo de sus factores de virulencia y el tipo de daño que provocan. Las cepas patógenas se originan generalmente a partir de cepas comensales.

El proceso por el cual una cepa comensal puede convertirse en un patotipo capaz de causar un cuadro clínico, se debe a una serie de procesos adaptativos que involucran la adquisición, activación o inactivación de ciertos genes de factores de virulencia localizados en transposones, bacteriófagos y/o islas de patogenicidad (Ji Youn Lim *et al.*, 2010; Rasko *et al.*, 2008; Caugant *et al.*, 1985).

### **Cepas comensales**

Las cepas comensales de *E. coli*, colonizan el tracto gastrointestinal de mamíferos a las pocas horas de haber nacido (Kaper *et al.*, 2004; Kalita *et al.*, 2014). Mantienen una relación de homeostasis con el hospedero en donde los organismos se benefician de la interacción entre ellos. En esta relación el hospedero se encarga de proporcionarle un ambiente estable a la bacteria para que ésta se multiplique satisfactoriamente, la bacteria coexiste armoniosamente con el hospedero. La microbiota normal del intestino de varias especies de mamíferos está constituida por varias especies de bacterias, entre ellas las cepas comensales de *E. coli* (Donnenberg, 2013; Thielman, 1994).

Existen un gran número de cepas de *E. coli* que han logrado adquirir factores de virulencia permitiéndoles adaptarse a nuevos nichos y provocar una infección. La habilidad de las bacterias para adquirir estos factores de virulencia frecuentemente está relacionada con la transferencia de elementos genéticos que pueden ser movilizados hacia otra bacteria creando nuevas combinaciones, pero solo las combinaciones capaces de persistir pueden convertirse en patotipos capaces de causar una infección en individuos sanos (Croxen *et al.*, 2013; Kaper *et al.*, 2004).

### **Patotipos de *E. coli***

Los patotipos de *E. coli* están agrupados dependiendo de sus mecanismos de patogenicidad y los signos clínicos que provocan. Los patotipos intestinales son: enteropatogénica (EPEC), enterohemorrágica (EHEC), enterotoxigénica (ETEC), enteroagregativa (EAEC), enteroinvasiva (EIEC), adherente difusa (DAEC), y recientemente se ha descrito un nuevo patotipo, la adherente invasiva (AIEC). Los patotipos extraintestinales son: *E. coli* uropatogénica (UPEC), *E. coli* patógena aviar



(APEC) y *E. coli* asociada a meningitis (MNEC) (Croxen *et al.*, 2013; Donnenberg, 2013; Kalita *et al.*, 2014).

## **Patotipos Intestinales de *E. coli***

### ***E. coli* enteropatógena EPEC**

Éste fue el primer patotipo en describirse, es la causante de diarrea en humanos y animales. La identificación de EPEC se hace en función a la presencia de la isla de la patogenicidad LEE, el plásmido *bfp* bundle-forming pilus y por la ausencia de genes *stx* que codifican la toxina Shiga (Brüssow, 2014). Causa adherencia íntima y esfacelamiento (A/E), basándose en la capacidad que tiene de producir lesiones altamente distintivas en la superficie de las células epiteliales del intestino (Croxen *et al.*, 2013; Kaper, 2004; Kalia, 2014).

### ***E. coli* enterotoxigénica ETEC**

Es la causante de infecciones diarreicas en humanos y animales, ETEC coloniza la superficie de la mucosa del intestino delgado y elabora enterotoxinas que dan lugar a la secreción intestinal. La colonización está mediada por uno o más fimbrias proteicas o de colonización fibrilar (CFS) que se designan por un antígeno del factor de colonización, antígeno de superficie de *E. coli* (CS) o un factor de colonización putativa (PCF) (Donnenberg, 2013). Las enterotoxinas de ETEC pertenecen a uno de dos grupos: las enterotoxinas termolábiles (LTS) y las enterotoxinas termoestables (STS) o ambos. (Croxen *et al.*, 2013; Kaper, 2004).

### ***E. coli* enteroagregativa EAEC**

EAEC se define como una *E. coli* que no secreta LTS o STS. La estrategia básica que este patotipo para provocar una infección es la colonización de la mucosa del intestino predominando el colon, seguido de la secreción de enterotoxinas y citotoxinas (Donnenberg, 2013; Croxen *et al.*, 2013; Kaper, 2004).

### ***E. coli* enterohemorrágica EHEC**

Causante de diarrea sanguinolenta y el síndrome urémico hemolítico (HUS). El principal reservorio de EHEC es el tracto gastrointestinal de bovinos, también está asociado a brotes por la toma de agua accidental en actividades recreativas, transmisiones humano-humano, por animales de zoológico o visitas a granjas. La cepa con mayor importancia de *E. coli* perteneciente a este patotipo es O157:H7 siendo el patógeno más importante transmitido por alimentos y causante de severas enfermedades en humanos en todo el mundo (Croxen *et al.*, 2013; Kaper, 2004).

### ***E. coli* enteroinvasiva EIEC**

EIEC es el patotipo que se encuentra genéticamente y fenotípicamente más relacionado con el género *Shigella* en comparación con otros patotipos de *E. coli*. Utiliza el mismo sistema de invasión que *Shigella*. EIEC es el único patotipo que puede invadir y multiplicarse en las células epiteliales del hospedador causando inflamación, colitis y disentería, el signo más característico que produce es la diarrea acuosa que se distingue claramente de las diarreas producidas por otros patotipos (Donnenberg, 2013; Kaper, 2004).

### **Cepas patógenas extra intestinales**

#### ***E. coli* uropatogénica UPEC**

Éstas son bacterias que al encontrarse en el tracto gastrointestinal no produce ninguna enfermedad aparentemente, pero si se localiza en el tracto urinario se vuelve altamente patógena. Las cepas que no se encuentran en el tracto gastrointestinal se denominan cepas extraintestinales (ExPEC). UPEC ha logrado colonizar el tracto urinario gracias a la expresión de factores de virulencia e islas de patogenicidad. (Terlizzi *et al.*, 2017). La mayoría de las UPEC pertenecen a los grupos filogenéticos B2 y D, y se estima que alrededor de 150 millones de personas en el mundo desarrollan una enfermedad del tracto urinario al año y la principal causa es UPEC (Flores *et al.*, 2015; Donnenberg, 2013).

### ***E. coli* asociada a meningitis (MNEC)**

La meningitis provocada por *E. coli* es la causante de una alta mortalidad y morbilidad en humanos en el mundo, principalmente en neonatos. Aún no se entiende muy bien como *E. coli* logra traspasar las barreras hemáticas y llegar al cerebro, se cree que anterior a esto tiene que existir un alto grado de bacteriemia (Kim *et al.*, 2002).

Dentro de la gran cantidad de serotipos de *E. coli*, las cepas que poseen el polisacárido capsular K1 en su mayoría (80% aproximadamente) pertenecen a los aislamientos de meningitis neonatal y la mayoría de estos aislamientos K1 están asociados con un número limitado de serotipos O (O18, O7, O16, O1, O45) (Glode *et al.*, 1977).

### **Técnicas de identificación de *Escherichia coli***

Existen diferentes métodos o pruebas para la identificación de *E. coli*, los convencionales involucran las pruebas fenotípicas, bioquímicas y serológicas; sin embargo, pueden ser identificadas por sus mecanismos de patogenicidad y por medio de técnicas moleculares.

1. Pruebas fenotípicas: donde la base de identificación se fundamenta en la utilización de diferentes sustratos en medios de cultivo selectivos y cromogénicos.  
Los medios de cultivo más utilizados para la identificación de *E. coli* son el MacConkey, y eosina- azul de metileno (EMB), además de una gran variedad de agares cromogénicos para *E. coli*, así como para patotipos específicos como STEC.
2. Pruebas bioquímicas: existe una serie de pruebas de asimilación de carbohidratos y producción de enzimas donde destaca el citrato de Simmon's, MR-VP (Rojo de Metilo–Voges Proskauer), reducción de nitratos, TSI (triple azúcar hierro), O-nitrofenil-b-D-galactopiranosido (ONPG) y urea.
3. Serotipificación: determinación de los antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (K).

4. Identificación molecular: se cuenta con una gran variedad de protocolos de PCR punto final y tiempo real para la identificación de *E. coli* y de sus diversos patotipos. Uno de los más utilizados para determinar el género y especie se realiza mediante la detección del gen *gadA* por medio de PCR punto final y tiempo real.

Otra de las metodologías que es utilizada para la identificación de genotipos de *E. coli* es la tipificación por secuencias multilocus (MLST por sus siglas en inglés); de esta técnica se hablará más adelante.

### **Identificación molecular por medio del gen *gadA***

Uno de los marcadores genéticos altamente específico para la identificación de *E. coli* es la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD), codificada por dos genes homólogos *gadA* y *gadB* (Mc Daniels *et al.*, 1996; Grant *et al.*, 2001). *E. coli* coloniza el epitelio del tracto gastrointestinal y para generar una relación de mutualismo con el hospedero requiere de esta enzima para sobrevivir a pH ácido (Penfound *et al.*, 1999; Tucker *et al.*, 2002). El gen *gadA* permite identificar a *E. coli* con una especificidad del 97% a un 99%, estando presente tanto en cepas patógenas como en comensales (Waterman y Small, 2003; Salcedo, 2012).

### **Papel de *Escherichia coli* en el ambiente**

*Escherichia coli* habita en el intestino grueso de la mayoría de los mamíferos marinos y terrestres incluyendo al humano, es la causante de varias enfermedades de alta importancia en salud pública. *E. coli* es un excelente modelo indicador de contaminación fecal en diversas fuentes de agua, alimentos y el medio ambiente, se ha descrito que puede permanecer y sobrevivir en ambientes marinos por largos periodos de tiempo (Ishii *et al.*, 2007).

Aproximadamente un millón de *E. coli* están presentes en un gramo de materia fecal en el colon, y está continuamente siendo liberada al ambiente (Ishii y Sadowsky, 2008). Diferentes factores ayudan a estas bacterias a sobrevivir en el ambiente, como la temperatura, los nutrientes presentes en éste, entre otros (Figura 1).

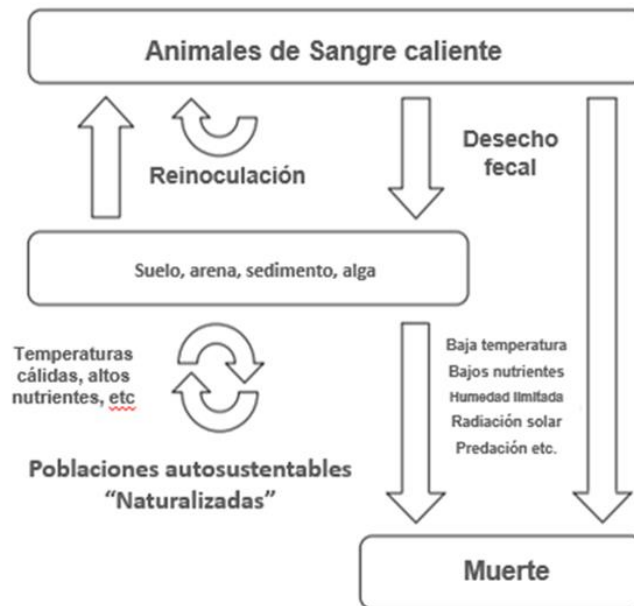


Figura 1: Diagrama del ciclo de vida de *E. coli*, modificado de Ishii y Sadowsky., 2008.

La agencia de protección ambiental de los Estados Unidos (USEPA, por sus siglas en inglés) reportaron que *E. coli* está relacionada con una alta incidencia de enfermedades gastrointestinales en playas de California (Ishii y Sadowsky., 2008).

Los coliformes y *E. coli* pueden provenir de muchas fuentes como aguas residuales, empresas ganaderas y hospitales que estén eliminando sus desechos al mar, pero también la fauna terrestre y marina local son una gran fuente de contribución a las concentraciones de coliformes en el ambiente.

Adicionalmente, el océano se convierte en una fuente de enfermedades que pueden impactar directamente al ser humano y a las especies que lo habitan, ya sea patógenos provenientes de especies marinas o saprofitas del mar o de microbiota introducida por contaminación (Stewart *et al.*, 2008).

## Grupos Filogenéticos

Las poblaciones de cepas de *E. coli* pueden ser clasificadas en 8 grupos filogenéticos A, B1, B2, D, C, E, F y el octavo grupo *Escherichia* clado críptico 1 (Clermont *et al.*, 2013). Numerosos estudios han demostrado que la distribución de las cepas en los diferentes grupos filogenéticos presenta patrones de acuerdo a su nicho ecológico, área geográfica, clima y dieta (Donnenberg, 2013). Los grupos filogenéticos A y B1 parecen colonizar una amplia gama de huéspedes vertebrados, al contrario de los grupos B2 y D que comúnmente son aislados de aves y mamíferos (Donnenberg, 2013).

El análisis por medio de MLST, aunado al análisis de grupos filogenéticos han permitido clasificar las cepas de *E. coli* en diferentes grupos y correlacionarlos con las características de virulencia, preferencia de hospederos, y sitios de colonización, entre otros.

De acuerdo a los análisis de MLST uno de los grupos filogenéticos de *E. coli* más comunes es el B2, que generalmente incluye cepas extraintestinales. Dentro del grupo D se incluyen cepas comensales y en el grupo A y B1, las cepas patógenas intestinales (Donnenberg, 2013).

Clermont y colaboradores desarrollaron un método por PCR múltiple en el cual se asignan a las cepas de *E. coli* un grupo filogenético basados en los marcadores genéticos *arpA*, *chuA* y *yjaA* y un fragmento de DNA TspE4.C2. Estos cuatro genes se encuentran repetidos en la filogenia de *E. coli*, el proceso en el que se le asigna un grupo filogenético a las cepas se basa en la presencia o ausencia de los mismos (Figura 2). La descripción de la función de los genes utilizados en el PCR múltiple se muestra en la tabla 1.

GEN	FUNCIÓN
<i>arpA</i>	Es una proteína regulatoria tipo ankirina
<i>chuA</i>	Es un gen requerido para el transporte hemo, actúa como receptor de hemoglobina en la membrana
<i>yjaA</i>	Actúa como gen regulador de ácido y el pH
TspE4.C2	Fragmento de ADN, se desconoce su función

Tabla 1. Función de los genes en la reacción de PCR múltiple.

Esta PCR es utilizada extensamente para asignar a las cepas de *E. coli* un grupo filogenético, y demostrar que las cepas de los distintos grupos difieren genotípicamente dependiendo del nicho ecológico de donde provienen y su habilidad para causar enfermedad.

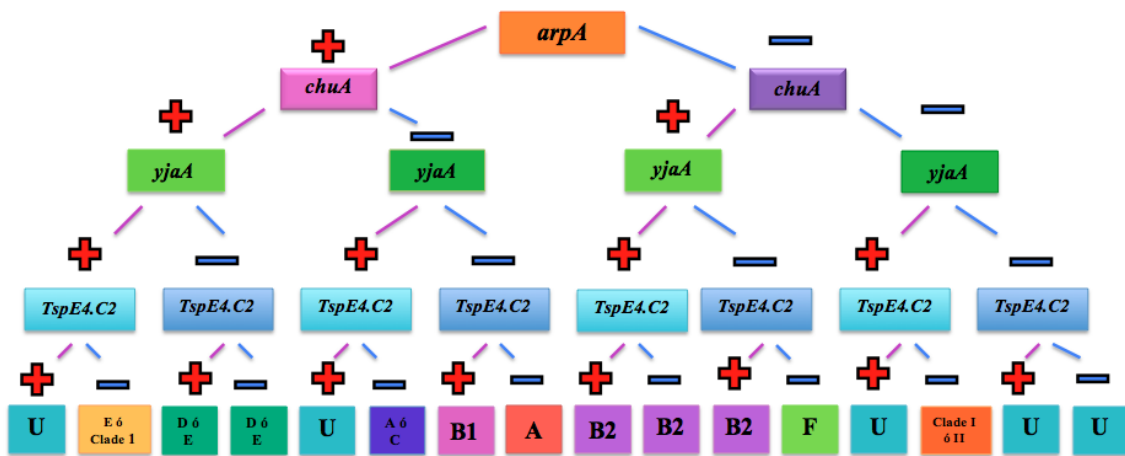


Figura 2: Diagrama o árbol de decisión para la clasificación de los grupos filogenéticos de *E. coli* (Clermont *et al.*, 2013).

### Tipificación por secuencias multilocus (MLST)

Es una técnica de genotipificación molecular que utiliza la secuenciación de fragmentos internos de 7 genes constitutivos que participan en el metabolismo básico de la bacteria (Tabla 2), a cada gen se le asigna un alelo, la secuencia de los 7 alelos da como resultado un perfil alélico o secuencia Tipo (ST) (Figura 3). (Vázquez y Berrón, 2004; Maiden, 2006; Ibarz *et al.*, 2009).

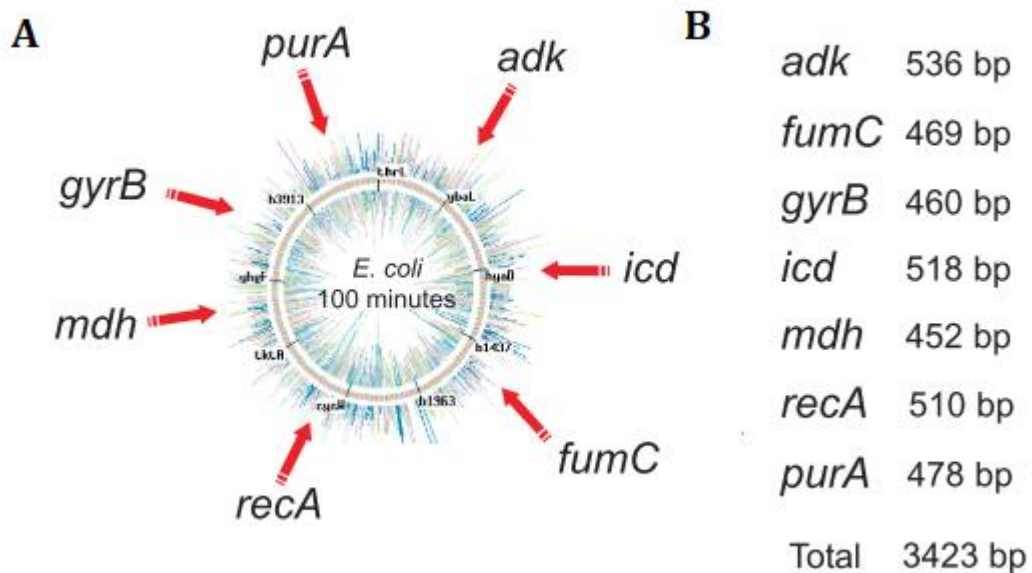


Figura 3. A. Mapa de localización genómica de los diferentes locus utilizados en la técnica de MLST. B. Numero de pares de bases de los genes utilizados en la técnica de MLST. Imagen tomada y modificada de Wirth *et al.*, 2006.

Los genes se encuentran distribuidos en diferentes locus y son altamente conservados, y contienen diferencias importantes que permiten identificar microorganismos que se encuentran altamente relacionados entre sí (Maiden *et al.*, 1998; Ibarz *et al.*, 2009).



GEN	FUNCIÓN
Malato deshidrogenasa ( <i>mdh</i> )	Cataliza la oxidación reversible de malato a oxalacetato
Isocitrato deshidrogenasa ( <i>icd</i> )	Es una oxidoreductasa que se une a NAD, Mg y Mn
ADN girasa subunidad B ( <i>gyrB</i> )	Ayuda al cierre de la doble hebra circular de ADN con un superenrollamiento negativo, de una manera independiente de ATP. Cataliza la interconversión de otros isómeros topológicos de los anillos de doble cadena de ADN
Adenilato kinasa ( <i>adk</i> )	Cataliza la transferencia reversible del grupo fosfato entre ATP y AMP. Juega un papel importante en la homeostasis de la energía celular y en el metabolismo de nucleótidos de adenina
Adenylosuccinate deshidrogenasa ( <i>purA</i> )	Juega un papel importante en la biosíntesis de <i>novo</i> de nucleótidos de purina. Cataliza el primer paso en la biosíntesis de AMP a IMP
Proteína ( <i>recA</i> )	Se requiere para la recombinación homóloga y la derivación de las lesiones del ADN mutagénicos para la respuesta S.O.S
Fumarato hidratasa ( <i>fumC</i> )	Cataliza la hidratación reversible de fumarato a L-malato y participa en el ciclo de ácido cítrico, así como también en otros procesos metabólicos

Tabla 2: Descripción de la función de los genes utilizados en MLST.

En el MLST los alelos de los genes conservados o *housekeeping* son asignados directamente mediante el análisis de la secuencia que varían en promedio en 450 pb. Para cada fragmento de un gen se asigna un diferente alelo ya que la recombinación es frecuente en las diferentes especies bacterianas. La secuencia de los diferentes genes es sometida a una base de datos ([www.mlst.net](http://www.mlst.net)), donde mediante un análisis bioinformático se asignan el alelo de cada gen y a cada microorganismo o aislamiento se le asigna una secuencia tipo o ST (Maiden, 2006) (Figura 4).

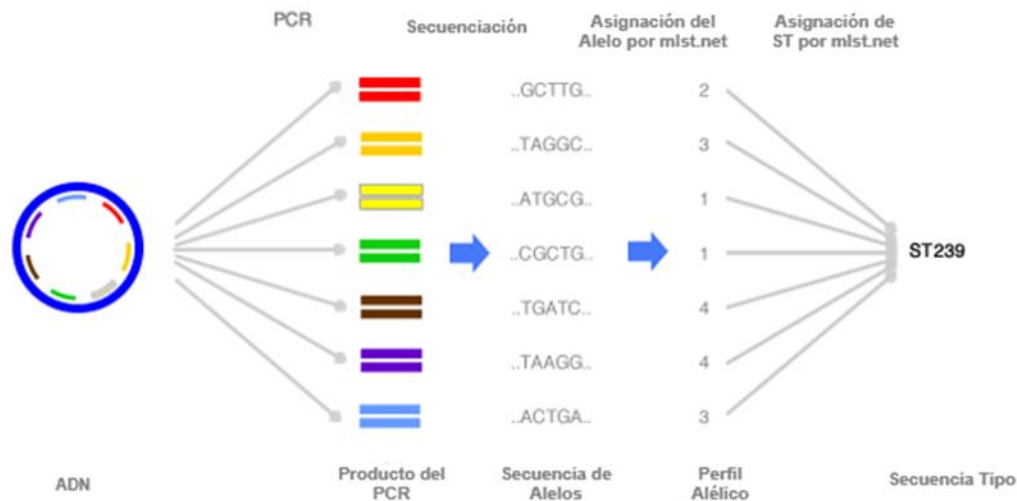


Figura 4: Representación del proceso de la técnica del MLST, obtenido y modificado de <http://beta.mlst.net/Instructions/default.html>, 2019.

El proceso de análisis de MLST consiste en la amplificación y posteriormente la secuenciación de los fragmentos variables de los genes seleccionados. La secuencia de cada uno de los loci se alinea con las secuencias ya existentes en la base de datos centralizada, si la secuencia coincide, el programa le asigna uno de los alelos ya identificados, en el caso contrario se le asigna un nuevo número a ese

alelo. La asignación de los alelos se realiza de forma inequívoca al secuenciar ambas cadenas de ADN, por lo que las variaciones en la secuencia de ADN son de esta forma autenticadas. (Maiden, 2006; MLST data base, Warwick).

Una vez asignado un número a cada alelo y siempre en el mismo orden de genes se genera un perfil alélico; que consta de la combinación de los genes asignados.

Una ventaja del método es el acceso a la base de datos compartida que puede ser utilizada por cualquier laboratorio a nivel global, la secuenciación de estos 7 genes en varias cepas de distintas especies se archiva y esto permite observar los aspectos a nivel poblacional y evolución biológica a nivel mundial (Maiden, 2006; MLST data base, Warwick; Ibarz *et al.*, 2009).

### **Generalidades de lobos marinos de California**

<b>Reino</b>	<b>Animalia</b>
<b>Filo</b>	<b>Cordados</b>
<b>Subfilo</b>	<b>Vertebrados</b>
<b>Clase</b>	<b>Mammalia</b>
<b>Orden</b>	<b>Carnivora</b>
<b>Suborden</b>	<b>Pinipedos</b>
<b>Familia</b>	<b>Otariidae</b>
<b>Género</b>	<b><i>Zalophus</i></b>
<b>Especie</b>	<b><i>californianus</i></b>
<b>Nombre científico</b>	<b><i>Zalophus californianus</i></b>
<b>Nombre común</b>	<b>Lobo marino de California</b>

Tabla 3. Clasificación taxonómica del lobo marino *Zalophus californianus*

## Anatomía del Lobo marino

El lobo marino californiano es un mamífero marino miembro de la familia *Otariidae* que al igual que otros Pinípedos pueden pararse sobre sus miembros anteriores y asumir diferentes posturas al tener la capacidad de rotar la pelvis y colocar sus aletas caudales por debajo de su cuerpo, esto les permite poder desplazarse o poder caminar sobre sus cuatro aletas sobre tierra; presentan pabellones auditivos asociados con las aberturas del oído externo, de ahí que también se les conoce como focas con orejas (Dierauf y Gulland., 2001).

Se caracteriza por presentar un cuerpo robusto, cuello alargado y un rostro estrecho. Los individuos presentan un marcado dimorfismo sexual (Figura 5). (Odell *et al.*, 1975; Sentiel A. y Lowenstine J., 2001) Los machos llegan a medir hasta 2.4 m y pesar 300 kg, a diferencia de las hembras que alcanzan un peso de 150 kg y una longitud de 1.8 m. Los machos adultos se distinguen por la presencia de una cresta sagital que se desarrolla en el cráneo, la cual puede medir casi 4 cm de alto. Esta cresta comienza a crecer cuando los machos alcanzan los 5 años de edad y se desarrolla completamente al alcanzar los 10 años de vida. Las crías nacen con una talla promedio de 0.8 m y un peso de 4 a 6 kg (Orr *et al.*, 1970; [https://simec.conanp.gob.mx/pdf\\_monitoreo/25-martin\\_lobo\\_marino.pdf](https://simec.conanp.gob.mx/pdf_monitoreo/25-martin_lobo_marino.pdf) ).



A



B

Figura 5. A. Hembra adulta de lobo marino californiano. B. grupo de lobos marinos californianos.

Obtenida de <https://sites.google.com/site/arodriszalophuscalifornianus>.

## Información Poblacional

La población mundial de lobos marinos *Zalophus californianus* está compuesta por 3 subespecies: la subespecie norteamericana *Z. californianus californianus* cuya distribución se extiende desde el Pacífico norte en la costa occidental de la península de Baja California que abarca el golfo, el interior del mar de Cortés (Aurioles y Reynoso., 2011) y el Océano Pacífico central en las zonas costeras de Jalisco, Colima y Michoacán (Olivos *et al.*, 2012; [https://simec.conanp.gob.mx/pdf\\_monitoreo/25-martin\\_lobo\\_marino.pdf](https://simec.conanp.gob.mx/pdf_monitoreo/25-martin_lobo_marino.pdf)). La subespecie *Z. californianus wollebaeki* se encuentra en las islas Galápagos, y la subespecie del archipiélago japonés ya extinta *Z. californianus japonicus* (Aramis *et al.*, 2012).

El Lobo marino californiano es el pinnípedo con mayor distribución y abundancia en México. Se distribuye en el Pacífico nororiental, a lo largo de la península de Baja California y en todo el Golfo de California. Hay reportes de avistamientos de lobos marinos en el sur este de Alaska hasta la frontera de Guatemala con México (Elorriaga *et al.*, 2014). Se han observado individuos en Punta Mita, Nayarit y Acapulco, Guerrero (Aurioles y Zavala., 1994; Aurioles y Reinoso., 2011). En el Golfo de California abunda en la región de las grandes Islas (Aurioles y Zalavala, 1994). En la Parte Norte del Golfo de California incluida la Región de las grandes Islas, se conocen hasta 22 áreas de la agrupación de los lobos marinos o loberas, 11 de ellas presentan actividad reproductiva y concentran el mayor número de animales del Golfo (Aurioles y Zalavala, 1994; García, 2003). Por su amplia distribución y alto número de individuos, el lobo marino de California (*Z. californianus*) en México funciona como una especie sombrilla, la cual refleja el estado de salud de especies que comparten el mismo hábitat y alimentación. Por lo tanto, el lobo marino de California destaca por ser la especie más abundante y tener la distribución geográfica más amplia alrededor de la península de Baja California (Aurioles y Zalavala, 1994; Aurioles, 2010) (Figura 6).

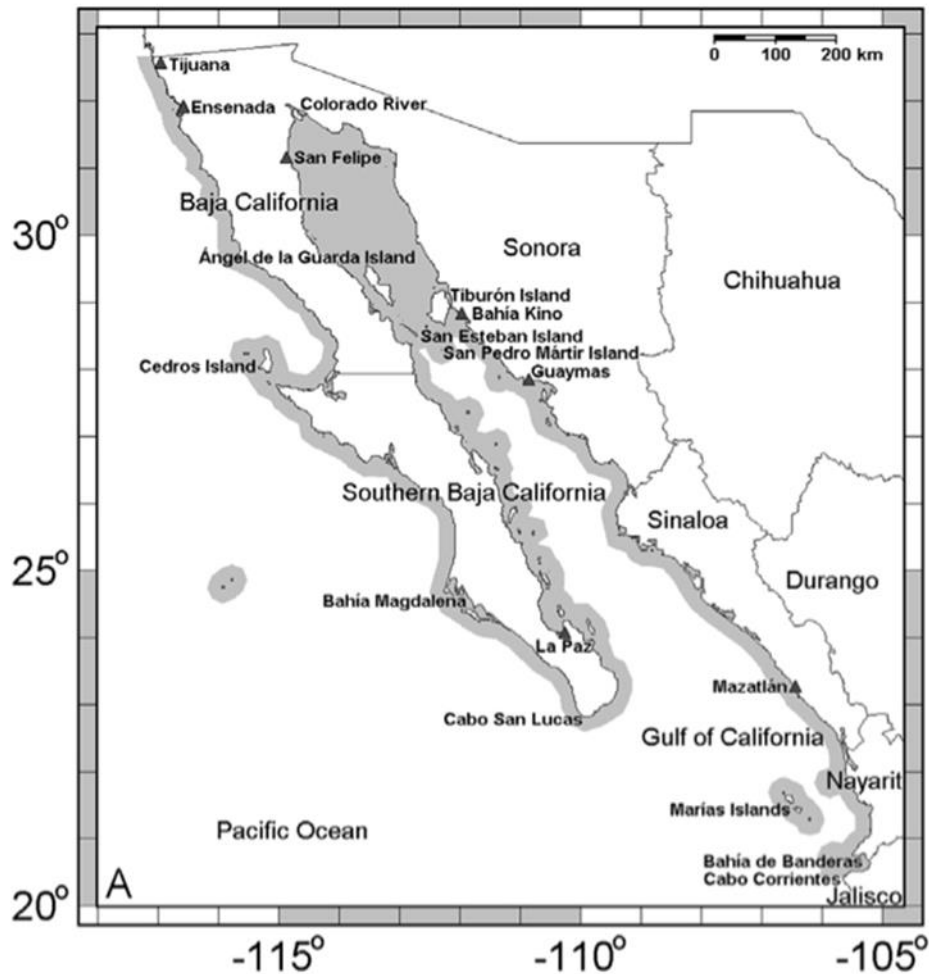


Figura 6. Distribución del lobo marino (*Zalophus californianus*) en la península de Baja California, México (Indicado en color gris).

Es una especie vivípara y homeoterma, llega a formar grupos de algunos cientos o incluso miles de individuos en tierra. Las hembras tienen una sola cría por temporada reproductiva, después de un período de gestación de 9 meses. Las hembras son fértiles a partir de los 4 años de edad y hasta los 14 años. La cría es destetada al año de vida. El macho dominante defiende activamente su territorio acuático-terrestre y se aparea preferentemente en tierra con las hembras que ya han parido y están en celo o con aquellas que no tienen cría (Peterson y Bartholomew, 1967; Auriolés y Zalavala, 1994). Es una especie que no se caracteriza por realizar migraciones; sin embargo, suele realizar algunos

movimientos locales estacionales relacionados con la reproducción y la distribución de sus presas (King, 1983).

Adame Fernández realizó una estimación de la población de los lobos marinos californianos en el 2016 estimando que la abundancia de la población del golfo de california sería de 20,651- 22,806 lobos marinos de california durante la temporada reproductiva del 2016 (Adame, 2018).

### **Situación actual del lobo marino de California (*Zalophus californianus*)**

Las islas que se localizan dentro del Golfo de California se encuentran en la categoría de reserva por lo que están protegidas por la NOM-059-SEMARNAT-2010 así como el lobo marino de California está sujeto a protección especial y en el estatus de la lista roja UICN (Unión internacional para la conservación de la naturaleza) como en preocupación menor.

Sin embargo, existen establecimientos pesqueros y turísticos, así como tráfico de embarcaciones pesqueras y turísticas que han llegado a impactar negativamente algunas regiones (Auriolles, 2003). Esta relación que tiene la especie con las diferentes actividades pesqueras de manera frecuente da como resultado una alta tasa de enmalle de hasta el 10 % de la población observada en tierra (Harcourt *et al.*, 1994; Elorriaga *et al.*, 2015). Existe evidencia de que las poblaciones de lobos marinos han ido en declive en los últimos 19 años (1997-2016) (Adame, 2018).

### ***Escherichia coli* en lobos marinos**

Los estudios que se han realizado en el lobo marino (*Z. californianus*) que conciernen a enfermedades infecciosas relacionadas con bacterias en México son muy escasos, los trabajos que existen de la presencia de *E. coli* en lobos marinos en su mayoría provienen de otros países.

Se han reportado endocarditis asociadas a *E. coli* en un lobo marino de dos años (Kim *et al.*, 2002), meningitis focal causada por *Escherichia coli* var. hemolítica y *Clostridium perfringens* (Lang *et al.*, 2014); Carrasco y colaboradores muestrearon 356 crías de lobo marino de steller (*Eumetopias jubatus*) de los cuales los

aislamientos provenientes de las muestras rectales revelaron que el 46.7% pertenecen a *E. coli*, y el 32.4% a *E. coli* beta hemolítica (Carrasco *et al.*, 2011).

En cuanto a estudios realizados en México, existen informes en 2014 donde comprueban la resistencia a antibióticos en bacterias aisladas en lobos marinos de california provenientes de islas ubicadas en Baja California Sur. Los estudios de López K, en el 2014 ponen en evidencia la presencia de cepas bacterianas provenientes de lobos marinos de Baja California Sur con resistencia a antimicrobianos y genes de virulencia, donde también se identificaron grupos filogenéticos, de los cuales predominaron las cepas pertenecientes al grupo filogenético D, A y en menor proporción el grupo B2.

Otro estudio realizado por Ávalos R. (2017), constata la presencia de genes de resistencia a antibióticos en 35 cepas identificadas como *E. coli*, en lobos marinos que habitan en las costas de Baja California Sur. También detectó la presencia de anticuerpos contra *Brucella* spp., en suero y mediante una PCR, se encontró que dos animales de su estudio mostraron la amplificación de ADN de *Brucella* de origen terrestre y otra de origen marino. También logró detectar por serología y pruebas moleculares *Leptospira* spp., en crías de lobo marino provenientes del Golfo de California y del Océano Pacífico, bacteria antes reportada en esta especie por Acevedo *et al.*, 2003.

El lobo marino de california es uno de los mamíferos marinos con mayor distribución en el pacífico mexicano y que comparte hábitat de manera muy cercana con el ser humano; esto lo hace muy susceptible de verse afectado negativamente y funge como un excelente sujeto de estudio de su hábitat; los mamíferos marinos son considerados especies centinelas por lo que medir o relacionar el grado de contaminación antropogénica en ellos nos da una idea de la salud del ecosistema que habitan.



## JUSTIFICACIÓN

*Escherichia coli* es una de las bacterias más abundantes tanto en el ambiente como en mamíferos marinos y terrestres, causante de enfermedades de alto impacto en salud humana. A nivel mundial existen pocos reportes de *E. coli* en mamíferos marinos y en especial en el lobo marino de California. Por lo que es de gran importancia conocer su distribución, genotipos, tipo de cepas y perfiles de resistencia presentes en esta especie, así como su relación con cepas patógenas y ambientales, este conocimiento servirá de apoyo para implementar medidas de control y prevenir posibles brotes en las zonas donde habita éste y otros pinípedos así como en humanos.

Los mamíferos marinos funcionan como centinelas del mar por lo que el realizar estudios utilizándolos como base de este trabajo nos da una idea de la salud de ecosistema que habitan y como se encuentra al presentarse en constante exposición a la contaminación antropogénica y así mismo explorar la forma en la cual estas especies se están adaptando.

El MLST es una de las técnicas más confiables y altamente específicas de epidemiología molecular, que permite aportar resultados definitivos, que funcionan como indicadores de las características genéticas de *E. coli*, asimismo ubica en un contexto global los genotipos presentes en la especie en estudio, así como su relación con otros genotipos. Estos datos son de gran importancia para contribuir en el desarrollo de una base de datos de cepas de *E. coli* existentes del tracto gastrointestinal en lobos marinos en vida silvestre a nivel mundial. Por otro lado, esta información se puede complementar de manera exitosa identificando los grupos filogenéticos presentes en esta especie.

De esta manera esta información servirá para trazar una ruta donde podamos identificar el tipo de bacterias que están en el medio ambiente, el tipo de contaminación humana y animal existente en un nicho ecológico y constituirá una guía en la toma de decisiones, tanto para el manejo animal, como para la implementación de medidas preventivas y de control. En México las investigaciones relacionadas a este tema son muy escasas y en menor proporción en lo que refiere a mamíferos marinos, este trabajo es el primero en realizar la identificación de *E. coli* en lobos marinos californianos con este método y esto contribuirá a los estudios ya existentes a nivel mundial.

## **HIPÓTESIS**

Los aislamientos de *E. coli* procedentes de lobos marinos del Pacífico mexicano, pertenecerán al mismo grupo filogenético, diferente genotipo y no presentarán variación en la susceptibilidad a antimicrobianos.

## **OBJETIVO GENERAL**

Identificar genéticamente los aislamientos de *E. coli* de lobo marino *Zalophus californianus* del Pacífico mexicano.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Identificación y determinación de la concentración mínima inhibitoria de aislamientos de *E. coli*.
2. Identificación molecular de *E. coli* mediante la detección del gen *gadA*.
3. Determinación de grupos filogenéticos de aislamientos de *E. coli*.
4. Determinación genotípica de aislamientos de *E. coli*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Áreas de estudio

El área de estudio comprendió la Isla Natividad localizada en el Océano Pacífico (N 27° 53'35.7'' W 115° 13'20.3'') dentro de la Reserva de la Biosfera del Vizcaíno (Figura 7).

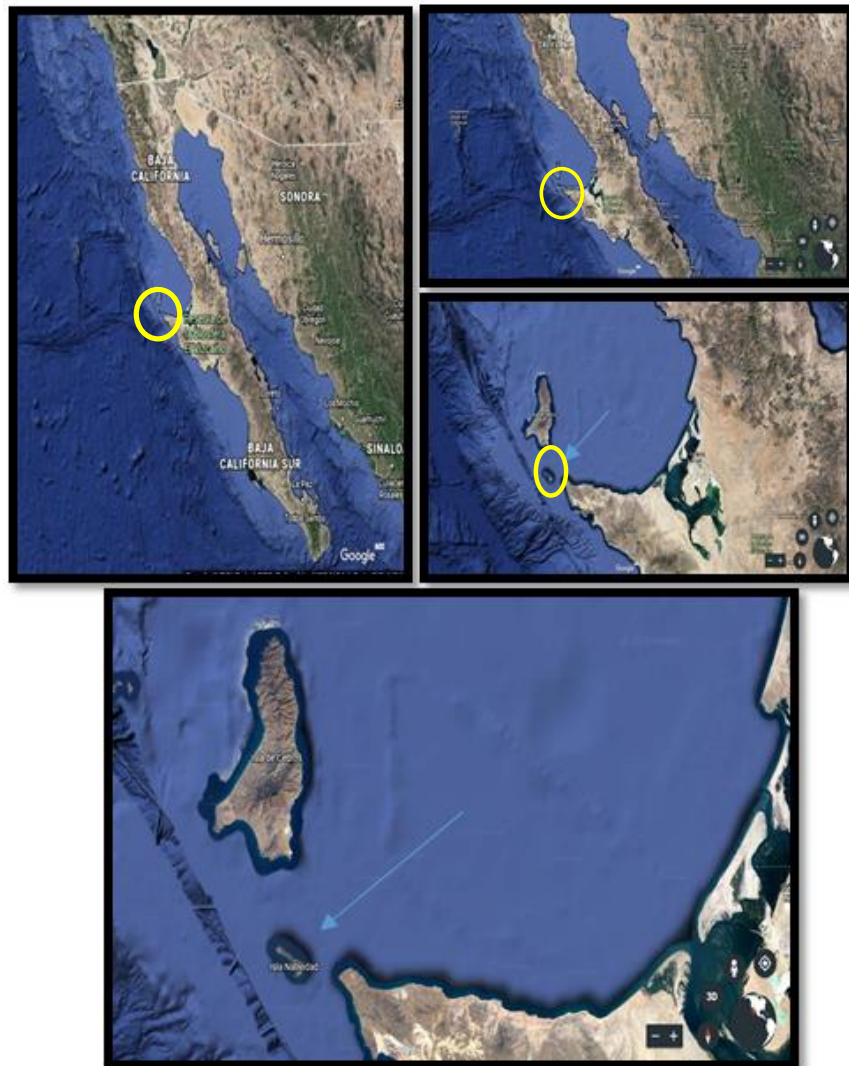


Figura 7: Mapas de localización del sitio de muestreo de colonias de lobos marinos, Imágenes obtenidas y modificadas de: <https://www.google.com/intl/es/earth/>.

## **Muestras**

Se colectaron 10 muestras del recto de crías de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) de un mes a 3 meses de edad, aproximadamente. Cada animal fue capturado con red y contenidas máximo por 5 min, donde se tomaron las características morfométricas de cada espécimen, se midió de la punta de la nariz a la punta de la cola, así como la circunferencia de tórax y cadera.

Se utilizaron hisopos estériles en medio AMIES con carbón activado (COPAN), se rotularon con fecha, lugar, sexo, y número del animal. El hisopo fue introducido en el recto y se colectó la muestra mediante movimientos rotatorios. Los hisopos se conservaron a 4°C y fueron enviados al laboratorio de Microbiología e Inmunología de la FMVZ de la UNAM donde se conservaron a -70°C hasta su utilización.

## **Aislamiento, identificación bacteriológica y molecular**

Las muestras se sembraron en agar MacConkey y agar sangre y se incubaron a 37°C por 24 h en condiciones de aerobiosis.

Las colonias lactosa positivas se seleccionaron para su identificación en el sistema automatizado Vitek2 (BioMerieux), el sistema de identificación tiene como fundamento una serie de pruebas bioquímicas en tarjetas miniatura de 64 pozos, donde cada pozo cuenta con pruebas diferenciales: nivel de acidificación, alcalinización, hidrólisis enzimática y crecimiento en presencia de sustancias inhibitoras. Al mismo tiempo se realizó la determinación de la concentración mínima inhibitoria mediante el mismo sistema ante los siguientes antimicrobianos: amikacina, amoxicilina y ácido clavulánico, ampicilina, cefazolina, cefepime, ceftazidima, ceftriazona, ciprofloxacina, ertapenem, fosfomicina, imipenem, meropenem, nitrofloxacina, norfloxacina, tigeciclina, y trimetoprim/sulfametoxazol. Adicionalmente, todos los aislamientos fueron identificados molecularmente por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés PCR) utilizando el marcador genético *gadA*, de acuerdo al protocolo descrito por McDaniels *et al.*, 1996, con los iniciadores *gadA1* (5' - ACCTGCGTTGCGTAAATA-3') y *gadA2* (5'-GGGCGGGAGAAGTTGATG-3') que amplifican un producto de 670 pb. Los productos de amplificación fueron visualizados en gel de agarosa al 1 %

teñidos con SYBR safe DNA gel stain (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) y visualizados en un fotodocumentador Gel Logic 2200 (Carestream 212 PRO).

### Tipificación Molecular

La extracción de ADN de las cepas de *E. coli* fue realizada por la técnica de tiocianato de guanidina descrita por Pitcher *et al.*, 1989. Para la determinación de las secuencias multilocus (MLST) se usaron los iniciadores descritos por Wirth *et al.*, 2006, los cuales se muestran en la tabla 4.

GEN	SECUENCIA	TAMAÑO
<i>adk</i> (adenosina quinasa)	adk-P1 (ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG) adk-P2 (CCGTCAACTTTTCGCGTATTT)	536 pb
<i>fumC</i> (fumaratohidratasa)	fumC-P1 (TCACAGGTCGCCAGCGCTTC) fumC-P2 (GTACGCAGCGAAAAAGATTC)	469 pb
<i>gyrB</i> (DNA girasa)	gyrB-P1 (TCGGCGACACGGATGACGGC) gyrB-P2 (ATCAGGCCTTCACGCGCATC)	460 pb
<i>icd</i> (isopropil malato deshidrogenasa )	icd-P1 (ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA) icd-P2 (GGACGCAGCAGGATCTGTT)	518 pb
<i>Mdh</i> (malato deshidrogenasa)	mdh-P1 (ATGAAAGTCGCAGTCCTCGGCGCTGCTGGCGG) mdh-P2 (TTAACGAACTCCTGCCCCAGAGCGATATCTTTCTT)	452 pb
<i>purA</i> (adenylosuccinato deshidrogenasa )	purA-P1 (CGCGCTGATGAAAGAGATGA) purA-P2 (CATACGGTAAGCCACGCAGA)	478 pb
<i>recA</i> (ATP/GTP binding motif)	icd-P1 (ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA) icd-P2 (GGACGCAGCAGGATCTGTT)	510 pb

Tabla 4. Características de los genes utilizados en la técnica de MLST para *E. coli*.

Las reacciones de amplificación para todos los genes fueron realizadas bajo el siguiente protocolo: desnaturalización inicial de 94°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 5 min; alineación a 57°C por 45 s; una extensión a 72°C por 45 s y una extensión final a 72°C por 5 min. Los productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 1.5 % teñidos con SYBR safe DNA gel stain (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) en un fotodocumentador de luz UV Gel Logic 2200 (Carestream 212 PRO).

### **Purificación del ADN**

Los productos de PCR se purificaron por columna de afinidad QIAquick (Qiagen, Ventura CA, USA), para posteriormente ser secuenciados en ambos sentidos con los mismos iniciadores, por electroforesis capilar por el método de terminador fluorescente en el sistema BigDye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystem, Foster city, CA, USA). En cada reacción se utilizaron de 40 a 50 ng de cada producto purificado y se analizaron en el equipo de secuenciación automatizada Applied Biosystem 3730 DNA Analyzer.

Las secuencias obtenidas de los 7 genes fueron analizadas con el programa bioinformática BioEdit. versión 7.2.5 y se editaron en el programa Vector NTI advance, versión 11.5.1 de (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Una vez analizadas estas secuencias se subieron y compararon con los fragmentos de referencia pertenecientes a *E. coli* K12 MG1655 documentados en la base de datos de MLST ([http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli/documents/primersColi\\_html](http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli/documents/primersColi_html)), esta página funciona como base de datos que nos permite definir el origen y distribución de las cepas estudiadas. Esta base de datos contiene la información genética de diversos microorganismos como *E. coli*, *Salmonella*, y *Moraxella* spp, entre otras.

### **Determinación de grupos filogenéticos**

La determinación de los grupos filogenéticos se realizó de acuerdo con el protocolo descrito por Clermont *et al.*, 2013, en el que se utilizan cuatro genes: *arpA*, *chuA*, *yjaA* Y *Tspe4.C2* Las condiciones de amplificación fueron; desnaturalización inicial a 94°C por 4 min seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 5 s;

alineamiento a 58°C por 20 s y una extensión a 72°C por 40 s y una extensión final a 72°C por 5 min. Los genes e iniciadores se muestran en la tabla 5.

<b>GEN</b>	<b>SECUENCIA</b>	<b>TAMAÑO</b>
<i>arpA</i>	AceK.f (AACGCTATTCGCCAGCTTGC) ArpA1.r (TCTCCCCATACCGTACGCTA)	400 pb
<i>chuA</i>	chuA-1 (GACGAACCAACGGTCAGGAT) chuA-2 (TGCCGCCAGTACCAAAGACA)	279 pb
<i>yjaA</i>	YjaA-1 (TGAAGTGTGTCAGGAGACGCT) yjaA-2 (ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC)	211 pb
<i>Tspe4.C2</i>	Tspe4.C2. -1 (GAGTAATGTGCGGGGCATTCA) Tspe4.C2.-2 (CGCGCCAACAAAGTATTACG)	152 pb

Tabla 5. Genes utilizados en las reacciones de PCR cuádruplex para la determinación de los grupos filogenéticos de las cepas aisladas de lobos marinos.

## Resultados

Se obtuvieron un total de 10 aislamientos de *E. coli* de hisopos rectales de 10 crías de lobo marino de California (*Zalophus californinus*) del Pacífico mexicano en la Isla de Natividad.

Los aislamientos fueron identificados por el sistema automatizado Vitek 2 (BioMerieux) con el 99.9 % de identidad con *E. coli*, al mismo tiempo se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) ante los siguientes antimicrobianos: amikacina, amoxicilina y ácido clavulánico, ampicilina, cefazolina, cefepime, ceftazidima, ceftriazona, ciprofloxacina, ertapenem, fosfomicina, imipenem, meropenem, nitrofloxacina, norfloxacina, tigeciclina, y trimetoprim/sulfametoxazol a los cuales todos los aislamientos fueron sensibles.

Para la confirmación de *E. coli* se utilizó el gen *gadA* que codifica para una de las subunidades de la enzima ácido glutámico descarboxilasa (*gad*) mediante reacciones de PCR donde se obtuvieron productos de 670 pb (Figura 8).

El 100% de los aislamientos resultaron positivos al gen *gadA*, lo cual corrobora su identificación bioquímica como *Escherichia coli*.

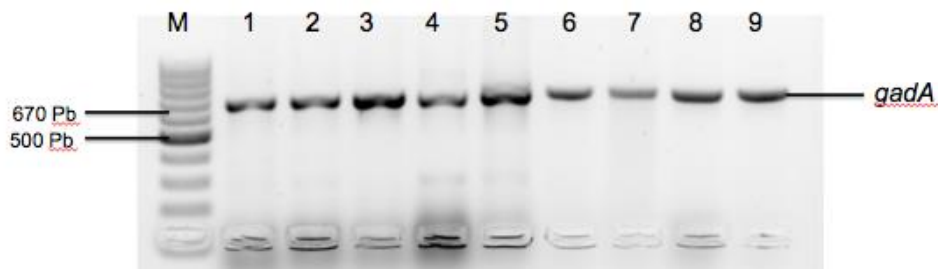


Figura 8. Identificación molecular de *E. coli* mediante la detección del gen *gadA*. Carril M: marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder; Carriles 1-9: producto de amplificación de 670 pb.

En la determinación de los grupos filogenéticos se utilizaron los marcadores genéticos *arpA* de 400 pb, *chuA* de 288 pb, *yjaA* de 211 pb y el fragmento de DNA *Tspe4.C2* de 152 pb, siguiendo el protocolo de PCR cuádruplex modificado de



Clermont en el 2013, el cual permitió identificar que el total de las cepas pertenecen al grupo filogenético B2 (Tabla 6 y Figura 9).

Aislamientos	Perfil de grupo filogenético
1-6, 8-10	B2 - + + +
7	B2 + + -

Tabla 6. Distribución de grupos filogenéticos.

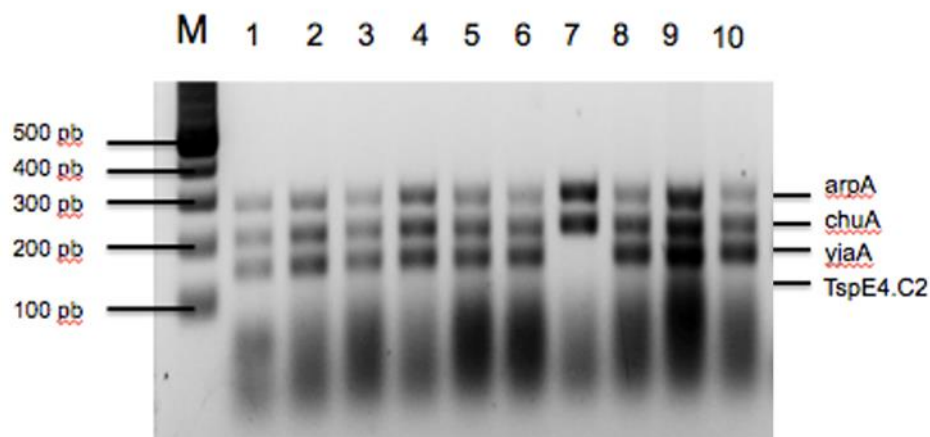


Figura 9. Perfil genético de grupos filogenéticos. Carril M: Marcador de peso molecular de 100 pb DNA ladder; Carriles 1-10: Identificación de grupos filogenéticos de cepas de *E. coli*.

### Tipificación por secuencias multilocus (MLST)

Las secuencias editadas de todos los genes fueron sometidas a la base de datos del sistema *Enterobase* de la Universidad de Warwick (<http://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/ecoli>), donde se definieron los ST presentes en el total de los aislamientos. Se identificaron seis secuencias tipo (ST's) diferentes de las 10 muestras obtenidas: un aislamiento con la ST92, dos aislamientos con la ST843, dos aislamientos con la ST491, dos aislamientos con la ST80 del complejo ST 568, y tres aislamientos con la ST73 del complejo ST73.

Aislamientos	<i>adk</i>	<i>fumC</i>	<i>gyrB</i>	<i>icd</i>	<i>mdh</i>	<i>purA</i>	<i>recA</i>	ST	ST complex
4, 7, 9	36	24	9	13	17	11	25	ST73	Cplx73
5, 6	13	24	19	14	23	1	10	ST80	Cplx568
3, 10	40	24	19	14	23	1	10	ST843	Cplx 73
2	40	14	19	36	23	11	10	ST92	-
1, 8	13	39	19	36	30	24	82	ST491	-

Tabla 7. Secuencias tipo y sus perfiles alélicos encontrados.

## Discusión

*Escherichia coli* ha sido identificada en varias especies de mamíferos marinos en vida silvestre, crías de lobo marino australiano (*Neophoca cinerea*) (Fulham *et al.*, 2008; Delport *et al.*, 2015), foca común (*Phoca vitulina*), elefante marino (*Mirounga angustirostris*), y lobo marino de california (*Zalophus californianus*) (Thornton *et al.*, 1998; Gulland *et al.*, 1996). En esta última especie, se ha reportado un caso de endocarditis asociadas a *E. coli* en un lobo marino de dos años (Kim *et al.*, 2002), y meningitis focal causada por *Escherichia coli* var. hemolítica (Lang *et al.*, 2014).

Carrasco y colaboradores analizaron 356 muestras rectales de crías de lobo marino de steller (*Eumetopias jabatus*) y encontraron que el 46.7% pertenecían a *E. coli*, y el 32.4% a *E. coli* betahemolítica (Carrasco *et al.*, 2011), también existen informes de bacterias Gram negativas incluyendo *E. coli* entre otras bacterias con resistencia antimicrobiana en pinnípedos incluidos lobos marinos californianos (Johnson *et al.*, 1998). En nuestro país existen trabajos de *E. coli* en lobos marinos tanto en crías como en adultos y juveniles. Hernández *et al.*, 2005 reporta a *E. coli* como parte de las bacterias presentes en fosas nasales de crías de lobo marino de California.

El objetivo de este trabajo fue la genotipificación, determinación de grupos filogenéticos y susceptibilidad a los antibióticos de cepas de *E. coli*, procedentes de crías de lobo marino (*Zalophus californianus*) de la isla de Natividad del Pacífico mexicano.

La resistencia a los antibióticos es uno de los mayores problemas de salud pública en el mundo, hoy en día se puede encontrar resistencia a gran variedad de antibióticos en la mayoría de las cepas de diferentes especies bacterianas distribuidas a nivel mundial y las bacterias presentes en fauna silvestre pueden funcionar como distribuidor de estos microorganismos resistentes a diferentes áreas geográficas y hábitats (Jobbins y Alexander, 2015). Como parte de este estudio, se realizó la determinación de la concentración mínima inhibitoria de 16 antimicrobianos, ninguno de los aislamientos mostró resistencia a los antibióticos utilizados, esto se puede deber al tipo de zona geográfica de muestreo, ya que se trata de un área aislada y no existe tanto contacto con zonas urbanizadas o con una alta contaminación antropogénica directa, así mismo en este estudio se muestrearon solo crías menores a 6 meses que no han tenido contacto directo con otras zonas con mayor contaminación antropogénica, esto es una diferencia importante en comparación con otros estudios realizados en México donde varios de los muestreos fueron realizados en animales adultos y se encontró resistencia antimicrobiana a varios grupos de antimicrobianos (Avalos, 2017; López, 2014). En este sentido, López K, 2014, reporta cepas de *E. coli* resistentes a antibióticos, obtenidas de muestras rectales de lobos marinos adultos (*Zalophus californianus*) del Pacífico, así como una variedad heterogénea de grupos filogenéticos como A, B1, B2 y D, estos resultados son discrepantes a los del presente estudio donde todas las cepas muestreadas formaron parte del grupo B2, esta anomalía es claramente atribuible a la diferencia en la edad de los animales. De igual manera, Avalos, 2017, informa de cepas de *E. coli* procedentes de muestras rectales de lobos marinos adultos del Océano Pacífico mexicano con presencia de resistencia a diversos grupos de antibióticos; sin embargo, en este estudio no se identificaron grupos filogenéticos, al igual que el estudio previo la gran diferencia radicó en la edad de los animales, adultos versus crías. Recientemente, Hernández-Castro *et al.*, 2020, identificaron resistencia a colistina en dos aislamientos de *E. coli* provenientes de lobos marinos adultos (*Zalophus californianus*) en el Pacífico y Golfo de California México; en ambas cepas se secuenció el genoma y se determinaron mutaciones en los genes *pmrB* y *phoQ* que

generan resistencia a colistina, este mecanismo diferente a los reportados (plasmídicos y cromosomales) sugiere que podría estar relacionado de manera específica en mamíferos marinos y ambiente acuático. Asimismo, se identificó que ambas cepas pertenecían al grupo filogenético B2 con ST8259 y ST4218, las cuales no están relacionadas con resistencia a colistina (Hernández-Castro *et al.*, 2020). Estos resultados de los grupos filogenéticos son similares a nuestros resultados, al igual que algunos reportados por López, 2014, lo que demuestra que este grupo filogenético B2 se encuentra en crías y en menor proporción en animales adultos, lo que podría estar influenciado por la edad, cambio de dieta, o vida terrestre versus acuática, entre otros.

En el presente estudio se identificaron molecularmente a 10 aislamientos intestinales de *E. coli* provenientes de crías de lobos marinos de California (*Zalophus californianus*) de isla Natividad. Todos los aislamientos pertenecieron al grupo filogenético B2, lo cual fue un hallazgo muy interesante ya que generalmente este grupo filogenético está relacionado con cepas patógenas extraintestinales (Le Gall *et al.*, 2007; Nowrouzian *et al.*, 2005) aunque también se han encontrado en intestino de humanos y otras especies sanas (Le Gall T *et al.*, 2007; Blyton *et al.*, 2014; Unno *et al.*, 2009).

El grupo filogenético B2 está altamente relacionado con humanos (Gordon *et al.*, 2003) y esto podría ser un indicador de contaminación antropogénica y así explicar el riesgo que representan los diferentes tipos de interacción entre el humano y los ecosistemas marinos. Una hipótesis para este tipo de hallazgo podría ser que, con el paso del tiempo y la presencia de estas cepas en el ambiente, lograron adaptarse a los lobos marinos y ahora forman parte de su microbiota normal.

Un estudio realizado con humanos de tres meses de edad demostró que, a esta edad ya presentaban cepas de *E. coli* pertenecientes al grupo filogenético B2 y que probablemente fueron adquiridas de la madre vía vaginal o perianal (Nowrouzian *et al.*, 2005), además se ha constatado que *E. coli* coloniza la vagina de mujeres embarazadas sanas y el grupo filogenético predominante al que pertenecen es el B2 (Obata *et al.*, 2002).

Estudios realizados en Australia muestran resultados similares a los de la presente investigación donde en crías de lobo marino australiano, la mayoría de los aislamientos de *E. coli* pertenecen al grupo filogenético B2 (Fulham *et al.*, 2020). Este grupo también fue predominante en estudios realizados con lobos marinos australianos adultos (Delport *et al.*, 2015). Esto llama la atención debido a que el grupo filogenético B2 es el dominante en crías donde su única fuente de alimentación es leche materna, mientras que los adultos tienen una dieta más variada. Estos datos apoyan la teoría de que estas cepas bacterianas han logrado formar parte de la microbiota normal de estas especies en diferentes áreas geográficas, donde existe interacción con los humanos o contaminación antropogénica. El lobo marino australiano al igual que el *Zalophus californianus* son especies migratorias y esto las expone a diferentes zonas geográficas donde pueden estar en contacto con estas cepas.

Las cepas comensales de intestino generalmente pertenecen a los grupos filogenéticos A y B1 y las cepas patógenas encontradas en intestino suelen encontrarse en los grupos A, B1 y D (Gordon *et al.*, 2003); por lo que este hallazgo nos brinda nueva información acerca de la microbiota de esta especie y del ambiente que están habitando, ya que en estudios realizados por diferentes investigadores mencionan que las diferencias entre los grupos filogenéticos está relacionadas con el tipo de dieta del huésped, el área geográfica, clima e incluso el uso de antibióticos (Unno *et al.*, 2009; Le Gall *et al.*, 2007).

Unno *et al.*, 2009, reportaron que las cepas del grupo B2 han desarrollado la capacidad para persistir en el intestino humano sin causar enfermedad (Nowrouzian *et al.*, 2005), el presente estudio muestra que también en las crías de los lobos marinos (*Zalophus californianus*) sucede lo mismo. El estudio realizado por Nowrouzian *et al.*, 2005 demostró que el 60% de las cepas de *E. coli* residentes del intestino de humanos pertenece a cepas del grupo filogenético B2 y probablemente también en los lobos marinos de California; sin embargo, se requieren estudios adicionales que incluyan muestras rectales y vaginales de madres y crías en diferentes temporadas para la comprobación de esta hipótesis.

Asimismo, se realizó la tipificación de secuencias multilocus (MLST) donde se identificaron cinco ST's diferentes de las 10 muestras obtenidas: un aislamiento con la ST92, dos aislamientos con la ST843, dos aislamientos con la ST491, dos aislamientos con la ST80 del complejo ST568, y tres aislamientos con la ST73 del complejo ST73. Una de las ventajas de MLST es el poder rastrear los hallazgos de otras partes del mundo y comparar con los obtenidos en nuestra área de estudio.

Dentro de los resultados obtenidos en este estudio los únicos ST que ya se habían reportado en lobos marinos son el ST73 y el ST491 de acuerdo a la base de datos de la Universidad de Warwick (<http://mlstwarwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>), existen 2 trabajos del ST491 en lobos marinos en Estados Unidos, de igual forma se ha encontrado en humanos, animales de compañía, fauna silvestre y en el ambiente.

El presente estudio es el primero en reportar el ST92, ST843 y el ST80 en crías de lobos marinos de acuerdo a la base de datos de la universidad de Warwick; del ST92 existen otros 2 reportes en humanos en Brasil y Alemania de muestras obtenidas de un paciente con meningitis y el otro con infección de vías urinarias (<http://mlstwarwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>). En cuanto al ST843 solo existe 1 reporte en humanos de Reino Unido donde el paciente muestreado presentaba una infección de vías urinarias y el aislamiento pertenece al patotipo UPEC. (<http://mlstwarwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>)

Del ST80 existen varios estudios en animales de compañía, humanos, fauna silvestre y uno de una muestra de un río en Reino Unido (<http://mlstwarwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>). El ST80 ha sido reportado en cepas obtenidas de perros con infecciones extraintestinales (Kidsley *et al.*, 2020) al igual que en humanos, la mayoría de los trabajos en humanos provienen de aislamientos de pacientes con infecciones de vías urinarias de acuerdo a la base de datos de la Universidad de Warwick; así mismo se hizo un estudio donde muestrean diferentes tipos de carne para consumo humano y a personas de la misma zona geográfica con sospechas de infección en vías urinarias y demostraron que los aislamientos de ambas muestras compartían varias secuencias tipo y dentro de ellas se encuentra la ST80, ambos aislamientos compartían la misma resistencia a antibióticos, dicho estudio sugiere que la fuente de transmisión de las cepas causantes de las

infecciones extraintestinales en esta población provienen de la ingesta de la carne contaminadas con *E. coli* pertenecientes al patotipo UPEC; demostrando que una de las fuentes mediante la cual se adquieren estas bacterias (genotipo) es la dieta que consumimos (Yamaji *et al.*, 2018).

El hallazgo más importante fue la ST73 debido a que es de las más frecuentes a nivel mundial en humanos como causante de infecciones extraintestinales y septicemia; en EEUU ha sido reportado como la tercera ST más común en casos de bacteremias (Vieira *et al.*, 2017). También se ha reportado como el causante de infecciones urinarias en animales de compañía como perros y gatos (Johnson *et al.*, 2008).

Asimismo, la ST73 se ha reportado en varias especies de vida silvestre como primates, aves, elefantes, jirafas, animales de compañía como perros, gatos y caballos; existen 2 reportes de ST73 en animales acuáticos en Reino Unido ([https://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/search\\_strains?query=st\\_search](https://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/search_strains?query=st_search)).

De igual manera, la ST73 ha sido reportada en *E. coli* aisladas de orcas (*Orcinus orca*) con resistencia antimicrobiana a diferentes antibióticos (Melendez *et al.*, 2019), así como en diferentes muestras de humanos y animales de compañía. (Lena *et al.*, 2018; Vieira *et al.*, 2017; Souza *et al.*, 2017). Estudios recientes en la Antártica demuestran la presencia de ST73 en pinnípedos, con una alta resistencia a antibióticos en una zona relativamente aislada de los humanos (Mora *et al.*, 2018). Por lo que se puede observar la ST73 se encuentra altamente distribuida a nivel mundial y se ha logrado aislar de diferentes especies, tanto marinas como silvestres. El presente estudio es el primero en reportar la presencia de ST73 en *Zalophus californianus* en México.

El continuar monitoreando estas colonias de lobos marinos californianos nos ayudaría a observar cómo van evolucionando estas cepas en sus huéspedes y si en algún momento los pueden afectar.

El presente estudio nos ayuda a darnos una idea del grado de impacto antropogénico en esta zona, cómo se están viendo afectadas las colonias de mamíferos marinos y así poder entender cómo puede esto afectar a otras especies incluyendo al ser humano en el futuro; se considera importante el continuar

monitoreando estas colonias para poder detectar nuevas cepas o mutaciones en las bacterias presentes en ellas. Adicionar nuevas investigaciones como la detección de factores de virulencia, análisis filogenéticos de las cepas y resistencia antimicrobiana.

## **Conclusión**

Todos los aislamientos de *Zalophus californianus* en este estudio pertenecen al grupo filogenético B2 de *E. coli* y ningún aislamiento presentó resistencia a antimicrobianos estudiados.

El presente estudio es el primero en reportar el ST 92, ST 843 y el ST80 en lobos marinos de acuerdo a la base de datos de la Universidad de Warwick; los únicos ST que ya se habían reportado en lobos marinos son el ST 73 y el ST491.

El ST843 y ST92 solo se han reportado en humanos y en pacientes sospechosos a UTI y meningitis, mientras que los ST491 y ST80 se han reportado en diferentes especies domésticas, fauna silvestre y en humanos.

Estos ST están altamente relacionados con infecciones extraintestinales en diferentes especies a nivel mundial.

La ST73 se encuentra formando parte de un complejo ST y varios de sus integrantes son responsables de numerosos casos de infecciones extraintestinales en humanos y animales, así como parte de la microbiota normal de diferentes especies animales y el humano.

Este estudio ayuda a complementar la base de datos existente con nueva información, toda vez que ninguno de los ST obtenidos en esta investigación había sido descrito en lobos marinos de California en México; éste constituye el primer estudio en identificar el ST73 en crías de *Zalophus californianus* en México



## Referencias bibliográficas

1. Acevedo Whitehose K., de la Cueva H., Gulland M.D.F., Auriolles Gamboa D., Carbajal A.F. and Suarez Güemes F. Evidence of *Leptospira interrogans* infection in California sea lion pups from the Gulf of California. *J Wildlife Dis.* 2003, 39(1): 145-151.
2. Adame Fernández K., Abundancia y hábitat terrestre del lobo marino de California en el Golfo de California (Tesis de maestría en ciencias en manejo de recursos marinos), La Paz Baja California Sur. IPN. 2018.
3. Allocati N, Masulli M, Alexeyev MF, Di Ilio C. *Escherichia coli* in Europe: An overview. *Int J Environ Res Public Health.* 2013; 10(12):6235–54.
4. Aramis O-O, Christian D O-O, Ariadna Eréndira J-R, Fernando E-V. Presencia de lobos marinos de California (*Zalophus californianus*) en el Pacífico Central Mexicano y su reacción con variables oceanográficas. XXXIII Reun Int para el Estudio los Mamíferos Mar. 2012; 24.
5. Auriolles G.D., Reyes Godínez R.C., Hernández C.C., Santos del Prado G.K. Taller de análisis del estado de la población de lobo marino de California *Zalophus californianus* en México, CICIMAR, CONANP, INE. La Paz, B.C.S. 2010, 78 pp.
6. Auriolles Gamboa D y Trillmich F. *Zalophus californianus*, En IUCN 2011 Red list of threatened species, Version 2011.1, (En línea). Disponible en: <http://www.iucnredlist.org/details/41666/0>.
7. Auriolles Gamboa D, Gallo Reynoso J. Monitoreo de la población del lobo marino de California (*Zalophus californianus*) en colonias reproductivas del Golfo de California y estudio de la interacción con las pesquerías artesanales; tres casos de estudio. CONANP. [Internet] 2011;(1):74. [Fecha de consulta el 19 de jul. de 2021]; Disponible desde: [https://inefectividad.conanp.gob.mx/inefectividad/NAGC/APFF%20IGC-Sinaloa/5.%20MANEJO/9.%20Manejo%20de%20Especies%20Amenazadas%20Relevantes/Lobo%20Marino/Informe\\_Final\\_PROMOBI\\_2013\\_Lobo%20Marino.pdf](https://inefectividad.conanp.gob.mx/inefectividad/NAGC/APFF%20IGC-Sinaloa/5.%20MANEJO/9.%20Manejo%20de%20Especies%20Amenazadas%20Relevantes/Lobo%20Marino/Informe_Final_PROMOBI_2013_Lobo%20Marino.pdf)

8. Auriolles Gamboa D. Interacción entre lobo marino de California y la pesquería artesanal en Bahía de La Paz, Golfo de California, México. *Cien Mar.* 2003, 29: 357-370.
9. Auriolles-gamboa D, Zavala-González. Algunos factores ecológicos que determinan la distribución y abundancia del lobo marino (*Zalophus californianus*) en el Golfo de California. *Cien Mar.* 1994; 20:535–53.
10. Avalos T.R., Bacterias como centinelas ambientales, utilizando a los mamíferos marinos de las costas de Baja California como modelos de seguimiento, (tesis de doctorado en ciencias). México, UNAM. 2017.
11. Blyton D. J. M., Cornall J.S., Kennedy K., Colligon P., Gordon M.D. Sex dependent competitive dominance of phylogenetic group B2 *Escherichia coli* strains within human hosts. *Environ Microbiol Rep.* 2014;6 (6):605-610.
12. Brüssow H. *Escherichia coli*, Enteropathogenic *E. coli*. *Encyclo Microbiol.* (Second edition). 2014, pg.722-727.
13. Carrasco E. S., Burek K. A., Beckmen K.B., Okas J.L., Davis A. M., Baker K.N.K. and Mazet K.A. J. Aerobic oral and rectal bacteria of free ranging stellar sea lions pups and juveniles (*Eumetopias jubatus*) in Alaska. *J Wildlife Dis.* 2011; 47(4): 807-820.
14. Caugant DA, Levin BR, Orskov I, Svanborg Eden C, Selander RK. Genetic diversity in relation to serotype in *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 1985; 49(2):407-13.
15. Clermont O, Christenson JK, Denamur E, 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.
16. Conanp.gob página electronica consultada Julio 2019, disponible en: [https://simec.conanp.gob.mx/pdf\\_monitoreo/25-martin\\_lobo\\_marino.pdf](https://simec.conanp.gob.mx/pdf_monitoreo/25-martin_lobo_marino.pdf).
17. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Micro. Rev.* 2013; 26(4):822–80.
18. Delport T.C., Harcourt R.G., Beaumont L.J., Webster K.N. Molecular detection of antibiotic-resistance determinants in *Escherichia coli* isolated from the

endangered australian sea lion (*Neophoca Cinerea*). *J Wildl Dis.* 2015; 51(3):555–63.

19. Donnenberg MS, editor. *Escherichia coli*. Pathotypes and principles of pathogenesis 2da ed. China. Acad Press-Elsevier. 2013.

20. Elorriaga-Verplancken F.R., Ferretto G. And Angell O. C. Estado actual del lobo marino de california (*Zalophus californianus*) y el elefante marino del norte (*Mirounga angustirostris*) en el archipiélago San Benito, México. *Cien Mar.* 2015; 41(4):269-281.

21. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary infections: epidemiology, mechanisms of infections and treatment options. *Nat Rev Microbiol.* 2015; 13(5):269–84.

22. Fulham M., Power M. and Gray R. Diversity and Distribution of *Escherichia coli* in three species of free ranging Australian pinniped pups, *Frontiers in Marine Science.* 2020.

23. Garcia A. M.C., and Gamboa A. D. Breeding season of the California sea lion (*Zalophus californianus*) in the Gulf of California, Mexico. *Aquat Mamm.* 2003; 29: 67-76.

24. Sentiel A. Rommel and Lowenstine J. Linda, *Anatomy and physiology of marine mammals, Gross and microscopic anatomy*, 200, second edition edn. CRC press: Dierauf, L. A. And Gulland F.M.D., *CRC handbook of Marine Mammal Medicine*

25. Glode M.P., Sutton A., Robbins B.J., McCracken H.G., Gotschlich C.E., Kaijser B., Hanson A.L. Neonatal meningitis due to *Escherichia coli* K1. *J infect Dis.* 1977;136:93-97.

26. Gordon M.D. and Cowling A. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiol.* 2003;149 (12).

27. Grant MA, Weagant SD, Feng P. Glutamate Decarboxylase Genes as a Prescreening Marker for Detection of Pathogenic *Escherichia coli* Groups. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67(7):3110-4.

28. Gulland F.M., Koski M., Lowenstine L. J., Colagross A., Morgan L. and Spraker T., Leptospirosis in California sea lions (*Zalophus californianus*) stranded along the central coast, 1981-1994. *J Wildl Dis.* 1996;32: 572-580.
29. Hernández-Castro R, Rodríguez-Santiago J, Téllez-Sosa J, Bravo-Romero S, Silva-Sánchez J, Sánchez-Pérez A, Avalos-Téllez R, Martínez-Chavarría LC, Xicohtencatl-Cortes J, Garza-Ramos U. Molecular and genome characterization of colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from wild sea lions (*Zalophus californianus*). *Braz J Microbiol.* 2020; 51(4):2009-2014
30. Ibarz Pavón AB, Maiden MCJ. Multilocus sequence typing. *Methods Mol Biol.* 2009; 551(99):129–40.
31. Imágenes lobo marino, consultadas en mayo 2021: disponibles en <https://sites.google.com/site/arodriszalophuscalifornianus>.
32. Ishii D.L., Hansen R.E., and Sadowsky M.J. Beach sand and sediments are temporal sinks and sources of *Escherichia coli* in Lake Superior, *Environ Sci Technol.* 2007; 41: 2203-2209.
33. Ishii S, Sadowsky MJ. *Escherichia coli* in the Environment: Implications for Water Quality and Human Health. *Microbes Environ.* 2008; 23(2):101–8.
34. Jesser KJ, Levy K. Updates on defining and detecting diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes. *J Infect Dis.* 2020; 33(5):372–80.
35. Jobbins S.E., Alexander K.A. From whence they came antibiotic resistant *Escherichia coli* in African wild life. *J Wildl Dis.* 2015;51(4): 811-820.
36. Johnson J.R., Johnson B., Clabots C.R., Kuskowski M., Roberts E., DebRoy C. Virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* serogroup O6 isolates from humans, dogs and cats. *J.Clin Microbiol.* 2008;46(12): 3987-96.
37. Johnson S.P., Nolan S. and Gulland M.D.F., Antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from pinnipeds stranded in central and northern California. *J zoo Wildl Med.* 1998, 29(3):288-294.
38. Kalita A, Hu J, Torres AG. Recent advances in adherence and invasion of pathogenic *Escherichia coli*. *Curr Opin Infect Dis.* 2014; 27(5):459–64.
39. Kaper J. B., Nataro J.P. and Mobley H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2004; 2, 123-140.

40. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2004; 2: 123-140.
41. Kidsley K.A, O'Dea M, Saptura S, Jordan D., Johnson R.J., Gordon M. D., Turni C., Djordjevic P. S., Abraham S., Trott J.D. Genomic analysis of phylogenetic group B2 extraintestinal pathogenic *E.coli* causing infections in dogs in Australia. *Vet Microbiol*. 2020;248(9).
42. Kim J. H., Lee J.K., Yoo H. S., Shin N. R., Lee K. H. and Kim D. Y. Endocarditis associated with *Escherichia coli* in sea lion (*Zalophus californianus*). *J Vet Diag Invest*. 2002; 14, 260-262.
43. King J. Seals of the world, British museum and Cornell University, 1983, 240 pp.
44. Kwang S.K., *Escherichia coli*, Pathotypes and principles pathogenesis. 2da edición, Academic Press-Elsevier. 2013.
45. Lang B., Eskens U., Hartmann A., Braun V., Schmidt M.J., Von Hegel G. Focal meningitis in a California sea lion (*Zalophus californianus*) diagnostic procedure and pathology, Case reports. *Tierztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere*. 2014; 2 (6): 368-72.
46. Le Gall T., Clermont O., Gouriou S., Bertrand P., Nassif X., Denamur E., Tenailon O. Extraintestinal virulence is a coincidental byproduct of commensalism in B2 phylogenetic group *Escherichia coli* strains. *Mol Biol Evol*. 2007; 24(11): 2373-2384.
47. Lena Z. A, Zur K, Schmitt S, Nüesch-inderbinen M, Stephan R. Antimicrobial resistance, multilocus sequence types and virulence profiles of ESBL producing and non-ESBL producing uropathogenic *Escherichia coli* isolated from cats and dogs in Switzerland. *Vet Microbiol*. 2018; 216 (2):79–84.
48. López Murillo K. A., Identificación de grupos filogenéticos y genes de virulencia en aislamientos de *Escherichia coli* comensal, en Lobos Marinos *Zalophus californianus* de la vida libre en Baja California Sur, México. (Tesis de maestría en ciencias). México, UNAM. 2014.
49. Maiden M.C.J. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol*. 2006; 60:561-588.

50. Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms (molecular typing *Neisseria meningitidis* housekeeping genes hyper-virulent clone). *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95(5):3140-5.
51. Markey BK, Culinane A, Leonard FC, Archambault M y Maguire D, editores. *Clin. Vet. Microbol.* 2da ed. China: Mosby-Elsevier. 2013.
52. McDaniels AE, Rice EW, Reyes AL, Johnson CH, Haugland RA, Stelma GN. Confirmational identification of *Escherichia coli*, a comparison of genotypic and phenotypic assays for glutamate decarboxylase and  $\beta$ -D- glucuronidase. *Appl Environ Microbiol.* 1996; 62(9):3350-4.
53. Melendez D, Roberts MC, Greninger AL, Weissman S, No D, Rabinowitz P, et al. Whole-genome analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) MDR ST73 and ST127 isolated from endangered southern resident killer whales (*Orcinus orca*). *J Antimicrob Chemother.* 2019; 2176–80.
54. MLST databases at UoW de la Universidad de Warwick y la Escuela de Medicina Warwick. Dirección: <http://mlstwarwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>.
55. Mora A., García P. F.J., Alonso P. M., Pedraza D.S., Ortega M.LM., García P.D., López C., Viso S., Ghislane D., Marzoa J., Sergeant J.M., García V. and Blanco J. Impact of human-associated *Escherichia coli* clonal groups in Antarctic pinnipeds: presence of ST73, ST95, ST141 and ST131. *Scient Rep.* 2018;8:4678.
56. Norma Oficial Mexicana Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestre- Categorías en riesgo. MON-059-SEMARNAT-2010.
57. Nowrouzian L.F., Wold E. A. and Adlerbeth I. *Escherichia coli* strains belonging to phylogenetic group B2 have superior capacity to persist in the intestinal microflora of infants. *J Infect Dis.* 2005;191 (7): 1078-1083.
58. Obata Y.M., Ba-Thein W., Tsukamoto T., Yoshikawa H., Hayashi H. Vaginal *Escherichia coli* common virulence factor profiles, serotypes and phylogeny with other extraintestinal *E. coli*. *Microbiol.* 2002;148(9): 2745-2752.
59. Odell D.K. Breeding biology of the California sea lion *Zalophus californianus*, *Rapp. P.V. Reun Cons Int Explor Mer.*1975; 169:374-394.

60. Olivos O., A.C.D, Ortiz O., Ruiz J.E. and Elorriaga V. F., Presencia de lobos marinos de California (*Zalophus californianus*) en el pacífico central mexicano y su relación con variables oceanográficas, Resúmenes de la XXXIII Reunión Internacional para el estudio de los mamíferos marinos. Melaque Jalisco, Mayo del 2012.
61. Orr R.T., Schonewald J. And Kenyon K.W. The California sea lion: Skull comparison of two populations. *Calif Acad Sci Proc.* 1970; 37:381-394.
62. Pagina electrónica: Google Earth: [google.com/intl/es/earth/](http://google.com/intl/es/earth/)
63. Página electronica: <http://beta.mlst.net/Instructions/default.html>.
64. Penfound TA, Smith D, Elliott JF, Foster JW. Control of Acid Resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1999; 181(11):3525-35.
65. Peterson R.S. and Bartholomew A.G. The natura history and behavior of the California sea lion, Spec. Pub. No. 1. American Soc of Mammalogists. 1967, 79 pp.
66. Pitcher D.G., Saunders N.A., Owen R., Owen R.J., Pitcher D. and Saunders N. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate, *Lett Appl Microbiol.* 1989;8: 1683-1688.
67. Puerta EA, Mateos F. Enterobacterias. *Medicine (Baltimore).* 2010; 10(51):3426–31.
68. Rasko DA, Rosovitz MJ, Myers GSA, Mongodin EF, Fricke WF, Gajer P, et al. The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *J Bacteriol.* 2008; 190(20):6881–93.
69. 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.
70. Souza de Siva A.P., Santos S.V., Martins N., Clayton S.R., Bonelli R.R., Riley W.L. and Meurer B. *Escherichia coli* sequence type 73 as a cause of community acquired urinary tract infection in men and women in Rio de Janeiro. Brazil, *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2017;88 (1): 69-74.
71. 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. *J Environ Heal.* 2008; 7(Suppl 2):1–14.

72. Terlizzi ME, Gribaudo G, Maffei ME. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Infections: Virulence factors, bladder responses, antibiotic and non-antibiotic antimicrobial strategies. *Front Microbiol.* 2017; 8:1566
73. Thielman N.M. Enteric *Escherichia coli* infection. *Curr Opin Infect Dis.* 1994; 7 (5): 582-591.
74. Thornton S.M., Nolan S., and Gulland D.M.F. Bacterial isolates from California sea lions (*Zalophus californianus*), harbor seals (*Phoca vitulina*), and northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*) admitted to a rehabilitation center along the central California coast 1994-1995. *J Zoo Wildl Med.* 1998, 29:171-176.
75. Tucker D.L. Tucker N. y Conway T. Gene expression profiling on the pH response in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2002; 184 (23):6551-6558.
76. Unno T., Han D., Jang J, Lee S. N., Ko G, Choi H.Y., Kim H.J., Sadowsky M. J. Hur H-G. Absence of *Escherichia coli* phylogenetic group B2 strains in humans and domesticated animals from Jeonnam province, Republic of Korea. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(17):5659–66.
77. Vazquez J.A., Berrón S. Multilocus sequence typing: el marcador molecular de la era del internet. En: Puesta al día en métodos microbiológicos para el diagnóstico clínico. *Enf Infec Microbiol Clin.* 2004; 22(2): 113-120.
78. Vieira Cunha M.P., Becker S. A., Micke M.A., Piantino F. A. J., Aparecida M.V.M., Aparecida T. G.T, Knöbl T. Pandemic extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*, (ExPEC) clonal group O6-B2- ST73 as a cause of avian colibacillosis in Brazil. *PLOS one.* 2017;12(6).
79. Waterman S.R. 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.
80. Wirth T., Falush D., Lan R., Colles F., Mensa P., Wieler H. L., Karch H., Reeves R.P., Maiden C.L.M., Ochman H. and Achtman M. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol.* 2006, 60 (5), 1136-1151.
81. Yamaji R., Friedman R.C., Rubin J., Suh J., Thys E., McDermott P., Hung-Fan M., Riley W. L., A population based surveillance study of shared genotypes of



Escherichia coli isolates from retail meat and suspect cases of urinary tract infections. *mSphere*, 2018;3(4).

82. Yin Q., Yue D., Peng Y., Liu Y., and Xiao L. Occurrence and distribution of antibiotic resistant bacteria and transfer of resistance genes in lake Taihu. *Microbes Environ.* 2013;28(4), 479-486.

83. Youn J, Yoon JW, Hovde CJ. A brief overview of Escherichia coli O157: H7 and its plasmid O157. *J Microbiol Biotechnol.* 2010; 20:1-10.