



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Identificación molecular de cepas comensales de *Escherichia coli* en el Delfín Nariz de Botella (*Tursiops truncatus*)

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

ADRIANA YAÑEZ VILLA

ASESORES:

DR. FRANCISCO SUÁREZ GÜEMES

DR. RIGOBERTO HERNÁNDEZ CASTRO



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.

“El papel de la educación es enseñarle a uno a pensar con intensidad y a pensar críticamente. La inteligencia añadida al carácter, ese es el fin de una verdadera educación”.

Martín Luther King Jr.

“El hombre nunca es demasiado viejo para aprender”.

Thomas Middleton

“El verdadero progreso social no consiste en aumentar las necesidades, sino en reducirlas voluntariamente; pero para eso hace falta ser humildes”

Mahatma Ghandi

“La violencia es el miedo a los ideales de los demás”

Mahatma Gandhi

***“Vive como si fueras a morir mañana. Aprende como si fueras a vivir
siempre”***

Mahatma Gandhi

Gracias totales.....

RESUMEN

Escherichia coli es considerada microbiota normal en mamíferos terrestres, acuáticos y aves. Se puede clasificar en tres grupos: cepas comensales, cepas patógenas intestinales y cepas patógenas extraintestinales. Para su identificación se ha utilizado diferentes metodologías, que incluyen la serología, los factores de virulencia, determinación de islas de patogenicidad, toxinas y grupos filogenéticos, entre otros. Sin embargo, existe escasa información sobre *E. coli* en mamíferos marinos y la poca información disponible procede de animales varados o muertos, por lo que es necesario ampliar el conocimiento y generar más información que servirá como base de datos para mejorar medidas preventivas y de control. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar 19 aislamientos de *E. coli* de delfines nariz de botella. Los aislamientos fueron identificados bioquímicamente por medio del sistema automatizado MicroScan, así como la presencia de beta-lactamasas de espectro extendido (ESBL) y la concentración mínima inhibitoria (MIC). Se determinó por medio de la PCR grupos filogenéticos, factores de virulencia por PCR múltiple y tipificación serológica mediante el sistema de microaglutinación en placa. Los resultados que se obtuvieron en el presente estudio fueron los siguientes; de los 19 aislamientos 4 presentaron resistencia a ampicilina/sulbactam (A/S), 8 a ampicilina (Am), 2 a amoxicilina/ácido clavulánico (Aug), 1 a aztreonam (Azt) y fue positivo a ESBL, 2 a ceftriaxona (Cax) que también fueron positivos a ESBL, 2 a ceftazidima (Caz) y presentaron ESBL, 4 a cefalotina (Cf), 2 a cefazolina (Cfz), 5 a ciprofloxacino (Cp), 2 a cefuroxima (Crm), 5 a gatifloxacino (Gat), 5 a gentamicina (Gm), 5 a levofloxacino (Lvx), 5 a piperacilina (Pi), 3 a trimetoprim/sulfametoxazol (T/S) y

2 a tobramicina (To). En la determinación de grupos filogenéticos 8 pertenecen al grupo B2 (42.10%), 6 al grupo A (31.57%), y en menor porcentaje los grupos; B1 de las cuales 3 muestras fueron positivas (15.78%) y 2 muestra al grupo D (10.52%). En cuanto a la tipificación serológica; 2 aislamientos pertenecen al serotipo O15:H7, 2 fueron O32:H42, 2 O25:H4, 2 O170:H16, 1 es O71:H14, 1 O153:H2, 1 O75:H5, 1 O140:H32 y 2 aislamientos son O163:H19. Un aislamiento pertenece al serogrupo O101; y a 3 aislamientos sólo se les determinó el antígeno flagelar (H:31, H:42, H:2); un aislamiento se determinó como rugoso (OR:H14). Con respecto a los factores de virulencia 4 aislamientos presentaron *stx1*, 17 *stx2* y 2 aislamientos presentaron el gen *fliC_{H7}*. Un aislamiento presentó la combinación de los genes *rfbE_{O157}* y *fliC_{H7}*, por lo que este aislamiento de *E. coli* es de serotipo O157:H7 determinado por tipificación molecular; que pertenece o es característico del patotipo de *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC), de igual manera presentó el gen *eae* y los dos genes de toxina shiga (*stx1* y *stx2*), característico de este patotipo. Es el primer reporte de un aislamiento O157:H7 que pertenece al patotipo EHEC y presenta los genes *eae*, *stx1*, *stx2* y los genes de tipificación molecular *rfbE_{O157}* y *fliC_{H7}*.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	8
I.I Delfín nariz de botella (<i>Tursiops truncatus</i>).....	8
I.I.I Clasificación taxonómica.....	8
I.I.II Situación actual del <i>Tursiops truncatus</i>	9
I.I.III Normatividad en México.....	10
I.I.IV Localización geográfica.....	11
I.I.V Anatomía del delfín.....	12
I.I.VI Enfermedades.....	13
I.I.VII Microbiota.....	15
I.II <i>Escherichia coli</i>.....	16
I.II.I Cepas comensales.....	17
I.II.II Cepas patógenas extraintestinales.....	18
I.II.III Cepas patógenas intestinales.....	18
I.II.IV Identificación de <i>Escherichia coli</i>	22
I.II.V Factores de virulencia de EHEC.....	25
I.II.VI Grupos filogenéticos.....	25
I.III Determinación de microorganismos bacterianos en el delfín.....	27
II. Justificación.....	28
III. Hipótesis.....	29
IV. Objetivo General.....	29
V. Objetivo Específicos.....	29
VI. Material y Métodos.....	30
VII. Resultados.....	36
VII.I Identificación y susceptibilidad.....	36

VII.II Grupos filogenéticos.....	37
VII.III Factores de virulencia.....	39
VII.IV Serotipificación.....	42
VII.V Resultados generales de grupos filogenéticos, factores de virulencia, serotipificación y antibiograma.....	44
VIII. Discusión.....	47
IX. Conclusión.....	57
X. Referencias.....	58

I. INTRODUCCIÓN

I.I Delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*)

I.I.I Clasificación taxonómica

El delfín nariz de botella es un mamífero marino que pertenece a la orden cetácea y se podría decir que es el mejor conocido de todos ellos. En la actualidad, la fauna mundial de cetáceos consta de más de 86 especies. Esta orden la integran dos principales subórdenes, los odontoceti (cetáceos dentados) que incluye a los cachalotes, los zifios, los delfines de río, los monodóntidos (belugas y narvales), los delfines oceánicos y las marsopas; formada por 10 familias, 40 géneros y al menos 76 especies, es un grupo más diversificado que el suborden de los mysticeti (cetáceos con barbas), con sólo 4 familias, 6 géneros y al menos 13 especies. Estos dos grupos evolucionaron de un grupo más antiguo de ballenas, el Archaeoceti (1, 2, 3, 4, 5).

La familia *Delphinidae*, es la más diversa del orden de los cetáceos en el mundo, se conocen como “delfines oceánicos”; comprende varias subfamilias, 17 géneros y por lo menos 36 especies. Incluye todos los delfines clásicos y los pequeños cetáceos (1, 2, 4, 5). La subfamilia *Delphininae* es muy extensa incluye por lo menos 6 géneros y 17 especies, todas ellas marinas. Como grupo, se encuentran por todo el mundo y ocupan hábitats que van desde los trópicos hasta las frías aguas subpolares y desde aguas costeras y poco hondas hasta las profundidades del océano (2). El género más conocido es el *Tursiops* al que pertenece el delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*); es de tamaño mediano que abarca de 1.9 a 3.8 m de longitud, con mucha variación entre las poblaciones. El peso promedio es de 200 kg. El tamaño máximo es de 4.3 m de longitud y 650 kg de peso (1).

Clasificación taxonómica

Reino:	Animal
Filo:	Cordados
Subfilo:	Vertebrados
Clase:	Mamíferos
Orden:	Cetácea
Suborden:	Odontoceti
Familia:	<i>Delphinidae</i>
Subfamilia:	<i>Delphininae</i>
Género:	<i>Tursiops</i>
Especie:	<i>Truncatus</i>
Nombre científico:	<i>Tursiops truncatus</i>
Nombre común:	Tonina, tursion, delfín nariz de botella, delfín mular común, bufeo, delfín oceánico y delfín nariz de botella común (4, 6).

I.I.II Situación actual del *Tursiops truncatus*

El delfín nariz de botella no se encuentra enlistado por la Unión Mundial para la Naturaleza (IUCN), pero sí lo está en el Apéndice II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES). En el Apéndice II se incluyen especies que no se encuentran necesariamente en peligro de extinción, pero cuyo comercio debe controlarse a fin de evitar una utilización incompatible con su supervivencia (7). Se ha realizado un estatuto especial en el Anexo II de la Directiva de la Unión Europea de Hábitats. En el cual se establece que la caza comercial de cetáceos del Mar Negro, incluyendo delfines nariz de botella está prohibida desde 1966 en la ex Unión Soviética, Bulgaria y Rumanía, en 1983 en Turquía (8). Las cazas dirigidas continúan en Perú, Sri Lanka y Japón para consumo humano. En Estados Unidos, México, Cuba y Japón se capturan ejemplares vivos para exhibición en acuarios (9).

I.I.III Normatividad en México

La actividad que realiza el delfín nariz de botella que se encuentra en cautiverio ya sea en sistemas abiertos o cerrados está basada en exhibición, espectáculo, nado con delfines y delfinoterapia; por lo que existen leyes, reglamentos y normas que establecen las condiciones y manejo del confinamiento de las especies y sus hábitats.

En México la Ley General de Vida Silvestre está sujeta a establecer la concurrencia del Gobierno Federal, de los Estados y de los Municipios, en el ámbito de sus respectivas competencias, relativa a la conservación y aprovechamiento sustentable de la vida silvestre y su hábitat en el territorio de la República Mexicana y en las zonas en donde la Nación ejerce su jurisdicción (10).

La preocupación por la conservación de los cetáceos en México también se ve reflejada en las Normas Oficiales Mexicanas. Las Normas que están relacionadas con la protección de los cetáceos en México son: NOM-012-PESC-1994, NOM-EM-074-ECOL-1996, NOM-ECOL-131-1998, NOM-ECOL-059-2001 que establecen la categoría de riesgo de las especies de flora y fauna de México; NOM-EM-PESC-2001, establece los lineamientos para la captura incidental de organismos juveniles de atún y delfines; NOM-EM-135-Semarnat-2001 que establece los lineamientos regulatorios para la captura, transporte, manejo y condiciones de cautiverio de mamíferos marinos, principalmente delfines y la NOM-ECOL-136-2002, que especifica las regulaciones existentes para los mamíferos marinos en cautiverio (10).

I.I.IV Localización geográfica

Europa	Este de Norte América	América Latina	América del Norte Occidental	Australia y Nueva Zelanda	Océano Indico y Asiático
<ul style="list-style-type: none"> • Gran Bretaña • Irlanda • Golfo de Vizcaya • Canarias • Madeira • Azores • Mediterráneo 	<ul style="list-style-type: none"> • Los Marítimos en Canadá • Florida (EUA) • Bahamas 	<ul style="list-style-type: none"> • Caribe • Ecuador • Islas Galápagos • Brasil • Argentina • Chile 	<ul style="list-style-type: none"> • Baja California (México) • Hawái (EUA) 	<ul style="list-style-type: none"> • Oeste, Sur y Oriente de Australia • Nueva Zelanda 	<ul style="list-style-type: none"> • Maldivas • Sri Lanka • Japón

(11)

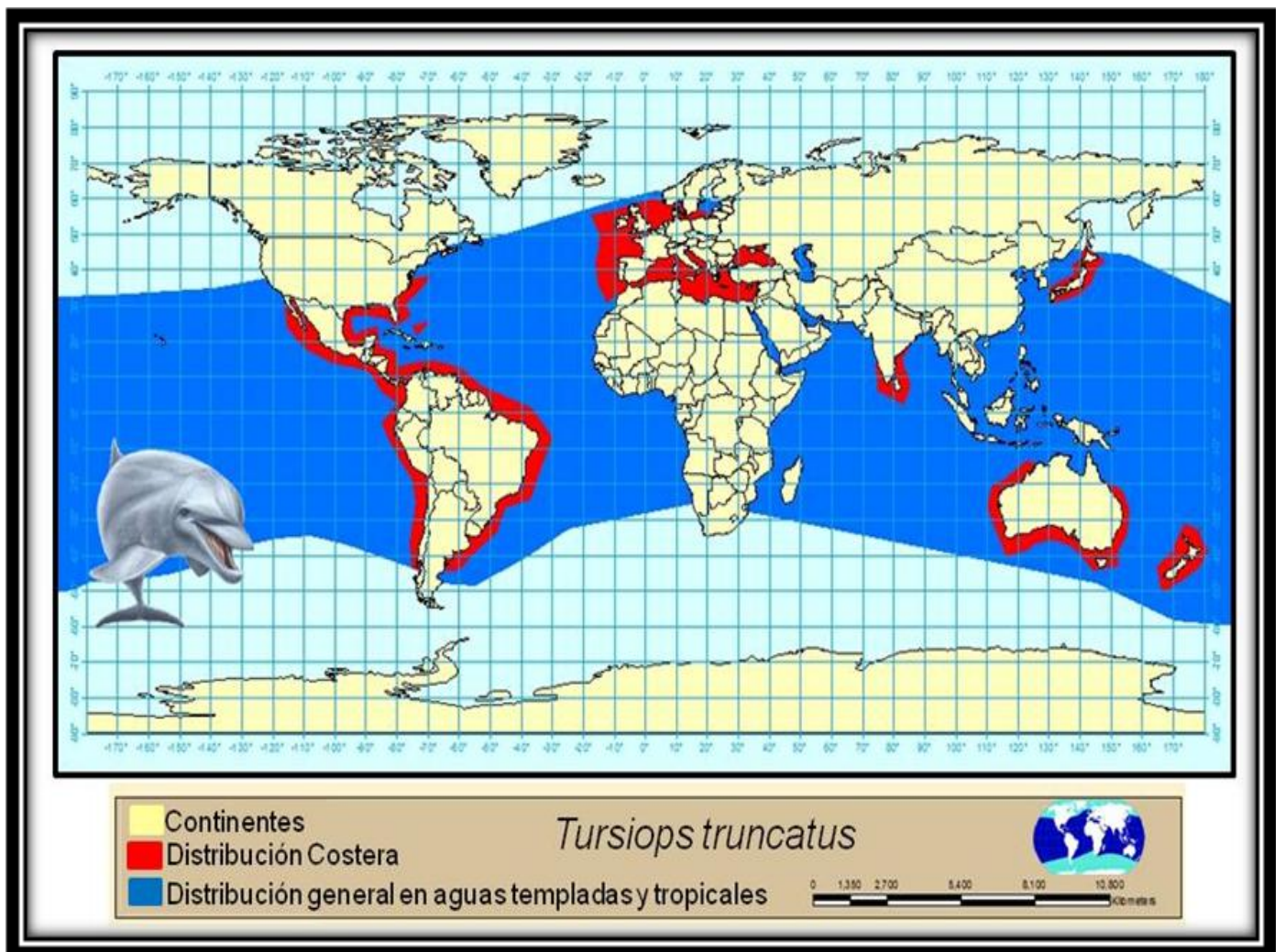


Fig. 1. Mapa de distribución geográfica. Elaborado por la Bióloga Laura Patricia Yañez Villa (ARGIS versión 9.3)

I.I.V Anatomía del delfín

Las características más evidentes debido a la evolución son la ausencia total de las extremidades posteriores y orejas, los genitales no se encuentran expuestos. El cuerpo es perfectamente liso y desprovisto de pelo. La parte caudal se ha ampliado en un par de aletas horizontales que constituyen el aparato locomotor. Las extremidades anteriores son muy reducidas y no hay dígitos separados, ya que se han modificado para formar las aletas. Las fosas nasales están situadas en la parte superior de la cabeza y se unen para formar el espiráculo; el melón se considera como una modificación del labio superior y es relacionado con el sistema de ecolocalización (12) (**Fig. 2**).

El cerebro es largo con pliegues, muy parecido al del humano a diferencia de otros mamíferos. La modificación del cráneo, esqueleto y los músculos se deben a las tensiones mecánicas a las que están expuestos en el medio marítimo, mientras que las de los sistemas respiratorio, circulatorio, digestivo y urogenital son adaptaciones a los procesos fisiológicos y mecánicos del medio acuático. La epidermis es una capa de epitelio queratinizado como en la superficie de la piel del hombre, no presenta folículos pilosos ni poros para eliminar el sudor o poder llevar a cabo la transpiración, su textura es suave. La epidermis es introducida en una serie de canales paralelos, como los de las manos y los pies de los humanos, estos no son visibles y se extienden sobre toda la superficie del cuerpo. Ya que los canales se encuentran en la dirección del flujo del agua sobre el cuerpo, se cree que es para contrarrestar el esfuerzo durante la aceleración rápida en el nado. Detrás de la dermis se encuentra una capa gruesa de grasa, actúa como aislante térmico y resulta de la formación del tejido adiposo (12).

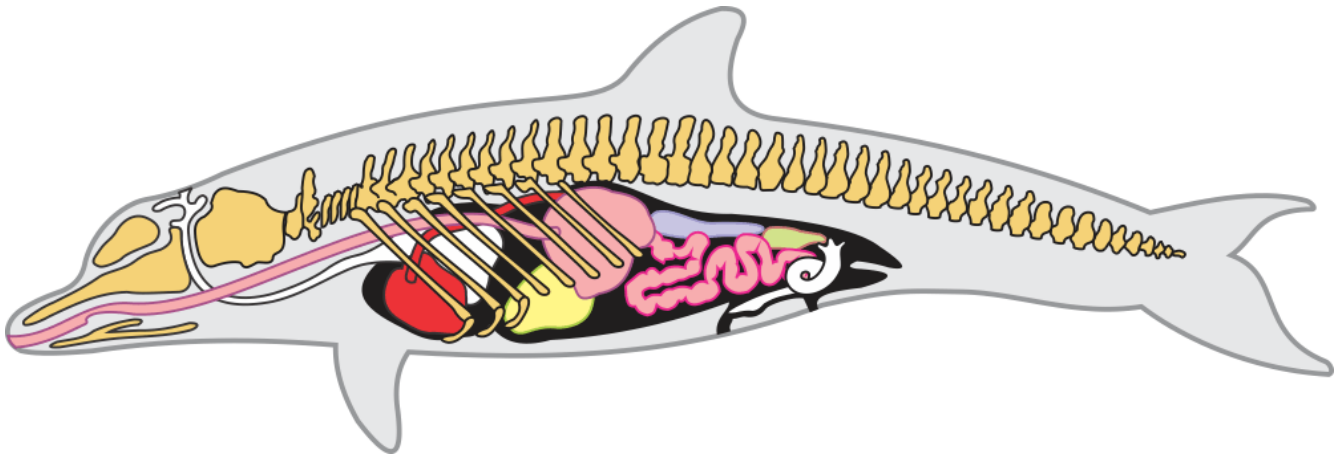


Fig. 2. Anatomía del delfín. Tomado de Neurociencia y comportamiento. Universidad de Sevilla España. http://alooptico.us.es/portaleto/sonar_delfin/PAGINA%20WEB/anatomia.htm. Modificado por el Ingeniero Adrián Santillán Carmona

I.I.VI Enfermedades

En los últimos años, se ha reconocido que la infección por morbilivirus y las fitotoxinas, son la causa principal de mortalidad en poblaciones de mamíferos marinos silvestres (13). Diversos factores como la propagación de bacterias, la contaminación relacionada a la descomposición post-mortem, la toma de muestra y el medio acuático en donde habitan los delfines, dificultan cuantificar el papel de las enfermedades bacterianas en la morbilidad y mortalidad de los mamíferos marinos en la vida silvestre (13, 14).

Se ha observado que los cetáceos tienen una alta susceptibilidad a las enfermedades respiratorias de origen bacteriano, entre ellas la neumonía ocupa el primer lugar. En una población representativa de cetáceos diagnosticados con problemas en el tracto respiratorio, se ha aislado frecuentemente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, así como *Aerobacter* spp., *Proteus mirabilis* y *Escherichia coli* (13, 15, 16, 17). La Pasteurelosis es una enfermedad relacionada con los rumiantes y conejos, sin embargo se ha llegado a presentar en delfines asociada a una

bronconeumonía (16). Distintos autores han mencionado a *Pasteurella multocida* como causante de enteritis y *Mannheimia haemolytica* se ha reportado como causante de traqueítis hemorrágica (13).

Erysipelothrix rhusopathiae, agente causal de la erisipela en cerdos y pavos, se ha observado en cetáceos en cautiverio provocado por la ingesta de pescado contaminado. La Erisipela tiene dos presentaciones; la septicémica, la cual frecuentemente culmina con la muerte del animal y la forma dermatológica, caracterizada por placas en la piel en forma de rombos grisáceos la cual se ha presentado en cetáceos (15, 16).

Brucella sp. es una bacteria que constantemente se le relaciona con rumiantes y cerdos. Sin embargo a mitad de los años noventa, fue aislada de focas, delfines, marsopas y ballenas; se relaciona con abortos y meningoencefalitis, las cepas aisladas son genéticamente distintas a las que se encuentran en mamíferos terrestres, por lo que se han propuesto dos nuevas especies, *Brucella pinnipedialis* y *Brucella ceti* (18). En el delfín nariz de botella (*T. truncatus*) en cautiverio, ha sido aislada de un caso de aborto, de lesiones cutáneas, neumonía, ganglios linfáticos e hígado, ocasionando inflamación granulomatosa multifocal (13, 15, 19).

Los vibrios se han aislado rutinariamente de heces, espiráculo y faringe de delfines sanos y enfermos (20, 21). Existen reportes de nocardias patógenas (*N. asteroides* y *N. brasiliensis*) en cetáceos (22).

Se han reportado diferentes virus que afectan al delfín, morbilivirus, papilomavirus, poxvirus y calicivirus; dentro de estos *Morbilivirus*, es considerado como un patógeno de mayor importancia en vida libre (22, 23).

Dentro de las enfermedades micóticas se ha reportado Aspergilosis pulmonar,

Candidiasis cutánea y Lobomycosis. En cuanto a los parásitos que los afectan están los protozoarios y helmitos (14).

I.I.VII Microbiota

El término microbiota normal incluye bacterias en mayor proporción, protozoos y hongos que habitan en diferentes regiones anatómicas, las cuales tienen una estrecha relación con el hospedero y de esta forma se genera una homeostasis (24, 25, 26).

La microbiota normal que habita en el intestino de mamíferos está compuesta por cinco filos; *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* y *Fusobacterias*. Las *Firmicutes* representan un 65% de la microbiota y las *Bacteroidetes* un 25%. Estas proporciones pueden variar entre individuos debido a los cambios en la composición de la misma; ya que pueden ser afectados por la dieta y exposición a antibióticos como a la ampicilina, gentamicina, metronidazol, neomicina y vancomicina, los cuales reducen bacterias del filo *Firmicutes* mientras que incrementa la proporción de las bacterias *Bacteroidetes* (27, 28, 29, 30, 31).

Las bacterias comensales que residen en el intestino tienen funciones diferentes. Dentro de las cuales está; proporcionar una capa de protección contra la colonización e invasión de agentes patógenos (32, 33) y un desarrollo apropiado del sistema inmunológico (34).

I.II *Escherichia coli*

Escherichia coli es un bacilo gramnegativo, móvil y anaerobio facultativo que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, es considerada microbiota normal, principal organismo y habitante en el tracto intestinal de humanos sanos, mamíferos terrestres, acuáticos y aves en las que el aislamiento de la bacteria en heces ha sido menor; es un habitante secundario en agua y sedimentos. Se considera una bacteria muy versátil, ya que puede ser una bacteria comensal o una patógena provocando enfermedades intestinales y extraintestinales afectando a los humanos y a otros mamíferos. La mayoría de la población de *E. coli* que se encuentra en la microbiota normal no son patógenas, pero *E. coli* productora de la toxina shiga (STEC) es considerada microbiota normal en bovinos y otros rumiantes, sin embargo en humanos es altamente patógena (EHEC). El conocimiento del papel de las bacterias es importante, para evaluar el estado de salud y la rehabilitación en animales (35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 14).

E. coli se puede clasificar en tres grupos: cepas comensales cuando no adquiere los elementos genéticos que codifican para los factores de virulencia las cuales se encuentran en un equilibrio homeostático con el huésped, cepas patógenas intestinales (ETEC, STEC/EHEC, EIEC, EAEC, EPEC y DAEC) (**Ver I.II.III**) y cepas patógenas extraintestinales (APEC, UPEC y MNEC) (**Ver I.II.II**) (38, 36). Los factores de virulencia específicos que ha adquirido *E. coli*, se deben a las adaptaciones de sus clonas que les han permitido establecerse a nuevos nichos y causar una amplia variedad de enfermedades (43). En la mayoría de las enfermedades *E. coli* patógena, se asocia con genes de virulencia codificados por plásmidos, bacteriófagos o islas de patogenicidad

(PAI). Estos genes, incluyen a los genes de plásmidos que codifican para enterotoxinas y fimbria o pili, fagos que codifican para toxina shiga (Stx) y los genes de PAI que codifican para la unión y eliminación de microvellosidades comúnmente referidas en inglés como “attaching and effacing lesions” (AE), en *E. coli* enteropatógena (EPEC) y *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) y los genes *pap*, *hly* y *cnfl* en *E. coli* uropatógena (39).

I.II.I Cepas comensales

Mantienen una relación con el huésped formando una homeostasis, donde uno de los organismos se beneficia de la interacción entre ellos. Mientras el huésped le proporciona un ambiente estable a la bacteria, esta previene la colonización por patógenos a través de la producción de bacteriocinas. Las cepas comensales de *E. coli* constituyen gran parte de la microbiota del intestino de varias especies (44, 45, 46), su concentración en intestino delgado es baja pero esta incrementa progresivamente en el intestino grueso, principalmente ciego y colón; dicha concentración está determinada por diferentes factores como son: tamaño corporal, morfología intestinal, dieta, tiempo de retención de la ingesta y microbiota, todos determinados por el tipo de hospedero (39, 44, 46).

Estas cepas están perfectamente adaptadas a la simbiosis y carecen de factores de virulencia y generalmente pertenecen a los grupos filogenéticos A y B1 (45, 46).

Debido a las diferentes interacciones que tiene con el huésped, la estructura genómica de *E. coli* resulta o se compone de un núcleo universal de genes y un acervo genético flexible, que es un clon específico el cual puede

incluir genes de virulencia. Aunque *E. coli* comensal no está relacionada con la presentación de la enfermedad estas pueden transportar algunos genes de virulencia. Es importante el entendimiento del rol de las comensales en la adquisición y mantenimiento de varios genes de virulencia, por lo que es esencial la investigación de la evolución y su origen (47).

I.II.II Cepas patógenas extraintestinales

Se denominan ExPEC y se pueden presentar en individuos de cualquier edad, involucrando diferentes órganos o sitios anatómicos; son la causa de un amplio espectro de infecciones como intrabdominales, neumonía, intravascular, osteomielitis e infección de tejido blando y colibacilosis en aves. Las cepas que pertenecen a ExPEC han sido clasificadas como *E. coli* uropatógena (UPEC), *E. coli* patógena aviar (APEC) y *E. coli* asociada a meningitis (MNEC) (48, 36, 49, 50).

I.II.III Cepas patógenas intestinales

Con base a los mecanismos de virulencia, se reconocen 6 categorías patógenas las cuales se determinan según el patotipo o patovar: cepas enterotoxigénicas (ETEC), enterohemorrágicas/productoras de la toxina Shiga (STEC/EHEC), enteroinvasivas (EIEC), enteroagregativas (EAEC), enteropatógenas (EPEC) y adherentes difusas (DAEC) (51).

***Escherichia coli* Enterotoxigénica (ETEC)** son la principal causa de diarrea secretoria en humanos y animales (52). La virulencia de ETEC se cree que está asociada con la producción de fimbrias y endotoxinas (53, 54, 55). Las fimbrias van a participar en la adhesión de la bacteria a la superficie del epitelio

celular del huésped, permitiendo la colonización bacteriana. Las fimbrias que producen las cepas de ETEC son diversas (F4, F5, F6, F18 ó F41), estas fimbrias al parecer se unen a glicoconjugados de los enterocitos, la ausencia de los glicoconjugados hace que los hospederos desarrollen resistencia a la colonización bacteriana (56, 53, 57, 58, 59, 36). Las enterotoxinas incluyen a la termoestable (STa y STb) y termolábil (LT), se ha observado que alteran la homeostasis del líquido intestinal provocando hipersecreción de líquido y electrolitos a través de la activación de la adenilato ciclasa por LT o la guanilato ciclasa por STa en células de la mucosa intestinal. Hay dos principales tipos de LT encontrada entre las cepas de *E. coli*; LT-I y LT-II. LT-I se asocia con las enfermedades diarreicas de los seres humanos y animales, mientras que LT-II se asocia típicamente con la enfermedad diarreica en los animales. ST son pequeñas moléculas monoméricas y puede estar asociada con la enfermedad humana o animal. STa y STb se diferencian entre sí tanto en su estructura y actividad de la enzima. STa es producida por ETEC y otras bacterias, mientras STb sólo se encuentra asociado con ETEC (60, 61, 62).

***Escherichi coli* enteroinvasiva** (EIEC) causa un amplia gama de enfermedades en humanos, entre ellas diarrea, disentería y colitis inflamatoria invasiva, con síntomas similares a la shigelosis en niños y adultos. Bioquímicamente y genéticamente está estrechamente relacionada con *Shigella* spp. La patogénesis de EIEC implica la invasión celular, lisis de la vacuola endocítica y la propagación dentro de las células epiteliales adyacentes. Requiere de genes específicos de virulencia los cuales se encuentran en un plásmido de 140 MDa (pInV) (36, 37, 40).

A pesar de ser un patógeno humano, hay poca investigación para identificar los factores individuales de riesgo de infección, posibles reservorios, o incluso las tasas de infección (63).

***Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)** es un patógeno asociado a diarrea persistente en humanos. Se define por su patrón de adherencia agregativa (AA) y se caracteriza por su fenotipo de “Stacked brick” (ladrillos apilados) en las superficies de las células HEP-2 y HeLa. Las EAEC son un grupo heterogéneo de bacterias que muestran una amplia gama de factores de virulencia, los cuales han sido localizados en un plásmido de 60-65MDa que recibe el nombre de adherencia agregativa (pAA), dentro de este plásmido se incluye el gen *AspU* que codifica para una proteína de 14 kDa y el gen *AggR*, el cual codifica para el activador transcripcional de la fimbria de adherencia agregativa (AAF/1) (36, 64, 65, 66, 67, 68).

***Escherichia coli* enteropatógena (EPEC)** causa diarrea en humanos y en animales. *E. coli* enteropatógena se divide en dos subgrupos: típicas y atípicas. EPEC atípica carece del plásmido factor de promoción de la adhesión (EAF) y *bfp* (conjunto formador de pili o fimbria), es positiva al gen *escv*; mientras que EPEC típica presenta EAF, *bfp* y *escv*; por lo que las cepas de EPEC atípicas pueden ser menos virulentas. La patogenia de EPEC se basa en la unión de estas bacterias con células epiteliales del intestino, así se lleva a cabo las lesiones referidas en inglés como “attaching and effacing lesions” (AE) (unión y eliminación de microvellosidades). Los factores de virulencia se encuentran en la isla de patogenicidad LEE (locus de eliminación de enterocitos) y en el plásmido EAF (37, 69, 70).

***Escherichia coli* adherente difusa** (DAEC) coloniza intestino delgado y causa un síndrome de diarrea acuosa en niños y adultos (71, 36). Es un grupo heterogéneo y se define por generar un patrón de adherencia difusa (DA), en el cual, las bacterias se adhieren de manera uniforme a la superficie de las células HEp-2 y de las células HeLa. Este patrón está mediado por proteínas codificadas por una familia de operones, incluye fimbria de superficie (Dr y F1845) las que confieren el fenotipo DA y adhesinas (AFA) (71, 48, 72, 36).

***Escherichia coli* enterohemorrágica/productora de la toxina Shiga** (STEC/EHEC) es un conjunto de *E. coli* patógenas que puede causar diarrea o colitis hemorrágica en humanos, en ocasiones la colitis deriva en síndrome urémico hemolítico (SUH). El serotipo de *E. coli* O157:H7 que pertenece a este patotipo es muy estudiada, ya que ha sido reconocida como la causa de este síndrome desde la década de 1980 (73, 74). Los reservorios naturales de la O157:H7 son los rumiantes (bovinos y ovinos), pero en estos pertenece a STEC *E. coli* productora de la toxina shiga. Estos rumiantes eliminan a la bacteria por heces y los humanos la adquieren por tener contacto directo con las heces, suelo o agua contaminados, o a través de la ingesta de carne molida mal cocida, otros productos de animales o vegetales y frutas contaminadas (73, 74, 75). La patogenicidad de esta cepas de *E. coli* es en gran parte, debido al hecho de que expresan los genes de las toxinas Shiga (*stx*) y el gen *eae* de la intimina, un factor de virulencia que es una proteína de membrana externa. El transporte de *stx* y *eae* que posee *E. coli* en los animales salvajes no ha sido investigado a fondo. Algunas aves silvestres viven en hábitats humanos y otros migran a plantas de tratamiento de residuos, mercados, zonas de pastoreo para ganado y en granjas de cerdos. Esta interacción entre humanos y aves

silvestres, hace que estas aves sirvan como vehículos para la propagación de las infecciones zoonóticas (76, 77, 78, 79).

Otros serogrupos que pertenecen a este patotipo son O157:H (no móvil), O26, O103, O111, O145, O91, O104, O113, O117, O118, O121, O128, entre otros. La O157:H7 es una cepa homogénea y presenta los factores de virulencia relacionados con colitis hemorrágica y SUH, pero los otros serogrupos pueden ser más heterogéneos, esto quiere decir que pueden presentar uno, ambos o ningún factor de virulencia, de esta forma los serogrupos difieren entre sí. Debido a que muchos factores de virulencia se llevan en los plásmidos o en bacteriófagos, pueden surgir nuevas cepas que poseen nuevos patrones de enfermedad y sean difíciles de clasificar (80, 81, 82, 83).

I.II.IV Identificación de *Escherichia coli*

La diferenciación de *E. coli* en varios tipos es importante, para distinguir los tipos patógenos de los no patógenos, así como para la realización de investigaciones epidemiológicas. La serotipificación es un método bien establecido y valioso que fue desarrollado con base en las diferencias de los antígenos O, K, F y H, determinadas por la porción polisacárida de lipopolisacárido (LPS), por el polisacárido capsular, por las fimbrias y proteínas flagelares, respectivamente. En la actualidad los antígenos K no se determinan de rutina en la serotipificación, esta generalmente se realiza con los antígenos O, del cual existen 186 variedades y el antígeno H, del cual existen 56 variedades que se han registrado oficialmente y nombrados por números

sucesivos en orden de su descripción: H1 a H12, H14 a H21, H23 a H49 y H51 a H56 (84, 85, 39, 86).

Asimismo, se menciona que para realizar una identificación completa se debe de incluir una gran variedad de factores de virulencia y grupos filogenéticos (87, 41).

I.II.V Factores de virulencia de EHEC

La toxina Shiga forma parte de la familia de proteínas citotóxicas. Esta toxina se divide en dos grupos Stx1 y Stx2; son codificados por genes (*stx1* y *stx2*) que se encuentran en fagos lambdoides lisogénicos. Stx1 es indistinguible de la toxina Shiga producida por *Shigella dysenteriae*; Stx2 es una molécula más divergente, y sólo tiene el 56% de homología de aminoácidos con la Stx1. Existen varios subtipos de Stx2 (Stx2c, Stx2v, Stx2e, etc) los cuales difieren en algunos aminoácidos, pero se ha reportado que podrían diferir en su actividad biológica (88, 89, 90, 46).

La Stx está compuesta estructuralmente por una subunidad A de 32 kDa con un fragmento A1 enzimáticamente activa de 27.5 kDa y un pentámero de subunidad B de 7.5 kDa (88, 89, 91).

Los receptores para la Stx se encuentran principalmente en las células de Paneth (mucosa intestinal y epitelio celular del riñón) en humanos, los rumiantes no presentan estos receptores en el tracto intestinal por lo que la colonización en ganado es asintomática (92, 93). El pentámero subunidad B se une al receptor específico Gb₃ (glicolípido de superficie llamado globotriaosilceramida) en el caso de Stx1 y Stx2; Gb₄ para Stx2e. La toxina

entra a través de depresiones revestidas de clatrina y continúa con el transporte por el aparato de Golgi y de ahí al retículo endoplásmico rugoso donde es liberado al citoplasma (88, 94, 95). La subunidad A inhibe la síntesis de proteínas de la célula huésped por medio de una actividad de N-glicosidasa que elimina un residuo de adenina del ARNr (96).

La producción de la Stx1 de *E. coli* y *S. dysenteriae* es reprimida por la disminución de hierro y la temperatura, sin embargo la producción de Stx2 no es afectada por estos factores (90).

La intimina es una proteína de membrana externa (94-97 kDa); es el factor de colonización intestinal ya que se encarga de la adherencia a enterocitos (97, 98). Es codificada por el gen *eae* y se expresa en EPEC y EHEC (97, 36); el cual es parte de una isla de patogenicidad llamada LEE de 36.5kb (locus de eliminación de enterocitos), junto con Tir (receptor de translocación de intimina). Tir es una proteína que se secreta por la vía de tipo III que se inserta en la membrana de la célula huésped (99, 100).

Se han realizados ensayos de PCR identificando 17 variantes genéticas de intimina ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\xi R/B$ $\beta 2$, $\delta/\kappa/\beta 2$ O, $\gamma 1$, $\theta/\gamma 2$, $\epsilon 1$, $\nu R/\epsilon 2$, ζ , η , $\iota 1$, $\mu R/\iota 2$, λ , μB , νB , ξB) (101, 102, 103, 104), estas variantes se deben a su C-terminal de la región (105, 106).

El serotipo O157:H7, incluye marcadores específicos como *rfbE*_{O157} y *fliC*_{H7}. El gen *rfbE*_{O157} codifica para la biosíntesis del antígeno lipopolisacárido O157 (107, 108). La región *rfb* está compuesto por 12 genes entre ellos cuatro genes de la vía del PIB-L-fucosa (*manB*, *manC*, *gmd*, y *fcl*), un gen perosamina sintetasa (también conocido como *rfbE*), un gen acetiltransferasa (*wbdR*), tres genes glicosilo transferasa (*wbdN*, *wbdO*, y *wbdP*), el gen de la S-unidad de

flippase (*wzx*), el gen de la polimerasa antígeno O-(*Wzy*), y una unidad de repetición H (109, 110). Estos genes codifican para la síntesis de las cadenas laterales O que otorgan la especificidad al serogrupo (46, 111).

El gen *fliC_{H7}* codifica para el antígeno flagelar H7 (107). La tipificación molecular de los genes *fliC* permiten tipificar aislamientos de *E. coli* flagelares de los no flagelares. El antígeno H de *E. coli* es específico únicamente para una subunidad estructural (flagelina) codificada por el *fliC* que a su vez determina el antígeno H (112, 46).

I.II.VI Grupos filogenéticos

Estudios filogenéticos realizados mediante electroforesis de enzimas multilocus, mostraron que las cepas de *Escherichia coli* se pueden dividir en cuatro grupos filogenéticos principales (A, B1, B2, D). Recientemente se ha propuesto un quinto grupo (E) (87, 47, 113).

Duriez *et al.*, al igual que otros autores mencionan; que los grupos filogenéticos presentan diferencias las cuales están influenciadas por las condiciones y fronteras geográficas, factores dietéticos, el uso de antibióticos y su resistencia, la capacidad para aprovechar diferentes fuentes de azúcares, los nichos ecológicos y el clima; son factores propuestos que influyen en la distribución de los grupos filogenéticos en *E. coli* (114, 115, 116).

Las cepas patógenas extraintestinales por lo general tienden a pertenecer al filo-grupo B2 y en menor número al D, las cepas comensales y patógenas intestinales pertenecen a los grupos A y B1 (117, 118, 119, 115).

La agrupación filogenética se puede realizar por electroforesis de enzimas multilocus o ribotipificación, ambas técnicas de referencia son complejas y requieren de mucho tiempo y de una colección de cepas ya descritas (84, 113), por lo que Clermont *et al*, desarrollaron un método basado en la PCR múltiple que permite asignar a las cepas de *E. coli* a un grupo filogenético, utilizando marcadores genéticos; dos genes *chuA* que codifica para una proteína de membrana externa necesario para el transporte del grupo hemo en *E. coli* enterohemorrágica O157:H7 y *yjaA* el cual se identifica en la secuencia del genoma de *E. coli* K-12 codifica para una proteína de la membrana externa no caracterizada cuya función es desconocida y un fragmento de ADN TspE4.C2 que codifica para una lipasa esterasa (**Fig. 3**). El enfoque de este método es sobre la presencia o ausencia de dichos marcadores (120, 121, 122).

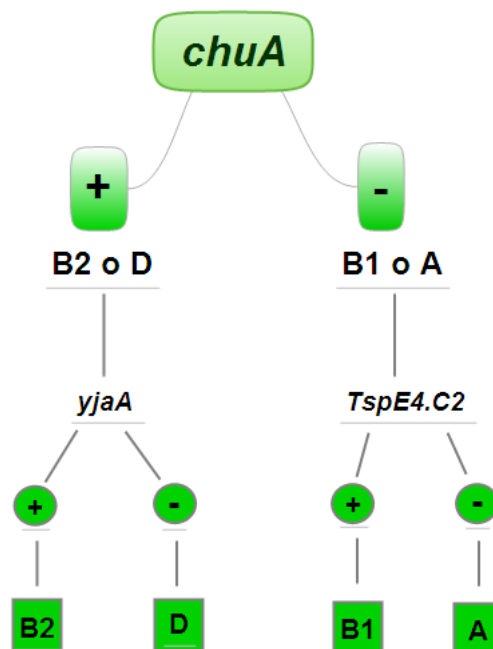


Fig. 3. Árbol dicotómico interpretativo de los diferentes grupos filogenéticos de *E. coli* en función de la presencia o ausencia de los genes *chuA*, *yjaA* y el fragmento TspE4.C2. Tomado de Clermont *et al.*, 2000. Diseño modificado por Adriana Yañez Villa (ConcepDraw office).

I.III Determinación de microorganismos bacterianos en el Delfín

En el delfín nariz de botella se han realizado estudios para determinar los microorganismos que se encuentran en muestras tomadas del recto y espiráculo, donde se han aislado 1,871 especies de las cuales se encuentran; *Vibrio* sp., *Pseudomonas* sp., *E. coli* y *Staphylococcus* sp. Las bacterias entéricas son aisladas con mayor frecuencia en animales que se encuentran cerca de las zonas costeras, esto puede estar relacionado con la calidad del agua afectada por el escurrimiento de la tierra (14, 123). A pesar de las numerosas infecciones bacterianas en los delfines nariz de botella, amplias evaluaciones de los patógenos bacterianos en las poblaciones de este mamífero son difíciles debido a la proliferación bacteriana y la contaminación asociada a la descomposición post-mortem, toma de muestra, agua del océano, entre otros. Para evaluar el riesgo relativo de los diversos microorganismos bacterianos del delfín, se propuso un sistema de clasificación de riesgo para los patógenos bacterianos que son considerados de alto riesgo para la salud humana; el cual cuenta con cinco categorías: (i) tejido anormal o signo clínico relevante, (ii) histopatología anormal o recuento de glóbulos blancos indicativa de una infección bacteriana, (iii) confirmado o se sospecha firmemente la etiología de la morbilidad según lo evaluado por un veterinario, (iv) confirmada o se sospecha firmemente la etiología de la mortalidad según lo evaluado por un patólogo, y (v) sin evidencia de co-infección de virus y hongos que se encuentre por histopatología u otras herramientas de diagnóstico. La importancia de crear este tipo de sistema, puede ser de gran ayuda para las futuras evaluaciones de riesgo de bacterias que involucran mamíferos marinos que viven en una variedad de entornos, incluyendo los delfines que viven en

instalaciones de aguas cerradas o en los que viven en el océano abierto (13, 124, 125, 126). En el caso de los delfines criados en cautiverio es muy importante conocer las causas de mortalidad neonatal ya que estos problemas a menudo se desconoce; se ha reportado (Elk MW, 2007), el caso de un delfín nariz de botella macho de 3 días de edad muerto por una *E. coli* septicémica la cual fue aislada en cultivo puro de varios órganos (cerebro, hígado, riñón, pulmón, músculo, médula espinal, bazo, páncreas, estómago e intestino), oronasales, epidermis y heces de delfines (127).

II. Justificación

La información que existe sobre la microbiota normal y bacterias en el delfín nariz de botella es escasa. Por lo que es importante identificar de manera global y en forma específica la presencia de *E. coli* en la microbiota de estos organismos. De tal manera que el conocimiento y la información generada servirá para poseer una base de datos que funcione para mejorar medidas preventivas y de control, ya que estos animales se encuentran en contacto directo con los humanos; lo cual contribuirá a disminuir los problemas que se presenten en los delfines en cautiverio, causados o que estén asociados a *E. coli*. Asimismo, la identificación de *E. coli* que se encuentra en los delfines ayudará a determinar si son portadores de cepas patógenas de importancia para la salud humana.

III. Hipótesis

Las cepas comensales de *E. coli* del delfín nariz de botella clínicamente sano son genética y serológicamente similares entre ellas.

IV. Objetivo General

Caracterización genética y serológica de cepas comensales de *E. coli*, del delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*).

V. Objetivos Específicos

- 1.- Identificar bioquímicamente cepas de *E. coli* en delfín nariz de botella clínicamente sano y serotipificación mediante antígenos O y H.
- 2.- Establecer la susceptibilidad a quimioterapéuticos por medio de la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC).
- 3.- Determinar grupos taxonómicos mediante la detección de los genes *chuA*, *yjaA* y un fragmento de ADN TspE4.C2.
- 4.- Determinar factores de virulencia mediante la detección de los genes *eae*, *stx1* y *stx2* y marcadores de tipificación molecular *rfbE*_{O157} y *fliC*_{H7}.

VI. Material y Métodos

Muestras

Se trabajó con 19 cepas de *E. coli* obtenidos previamente de la región anal de delfines clínicamente sanos en cautiverio y en vida libre. 5 aislamientos provenientes de animales del parque Atlantis, 4 aislamientos de Ixtapa-Zihuatanejo, 6 aislamientos de Cancún y 4 aislamientos provenientes de animales de vida libre (recién capturados). La siembra de los aislamientos se realizó en medios de cultivo de agar MacConkey, agar Soya Trypticaseína (TSA) y ChromoAgar orientador. Las colonias que fueron positivas a la fermentación de la lactosa fueron seleccionadas para su identificación y extracción de ADN.

Identificación

Las cepas fueron sembradas en agar MacConkey e incubadas a 37°C durante 24 h. La identificación y susceptibilidad se realizó en el laboratorio clínico del hospital “Dr. Manuel Gea González” utilizando el sistema automatizado MicroScan (DADE BEHRING) (**Fig. 4**), asimismo, se determinó la presencia de beta-lactamasas y la concentración mínima inhibitoria (MIC) mediante el mismo sistema; los quimioterapéuticos que se utilizaron fueron los siguientes: amikacina, amoxicilina/acido clavulánico, ampicilina/sulbactam, ampicilina, aztreonam, cefazolina, cefepima, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, ciprofloxacina, gatifloxacina, gentamicina, imipenem, levofloxacina, piperacilina/tazobactam, piperacilina, tobramicina, trimetoprim/sulfametoxazol.

Posteriormente las cepas se sembraron en agar TSA e incubaron a 37°C durante 24 horas y se almacenaron a -80°C en una suspensión de caldo infusión cerebro corazón-glicerol 50% hasta ser utilizadas.

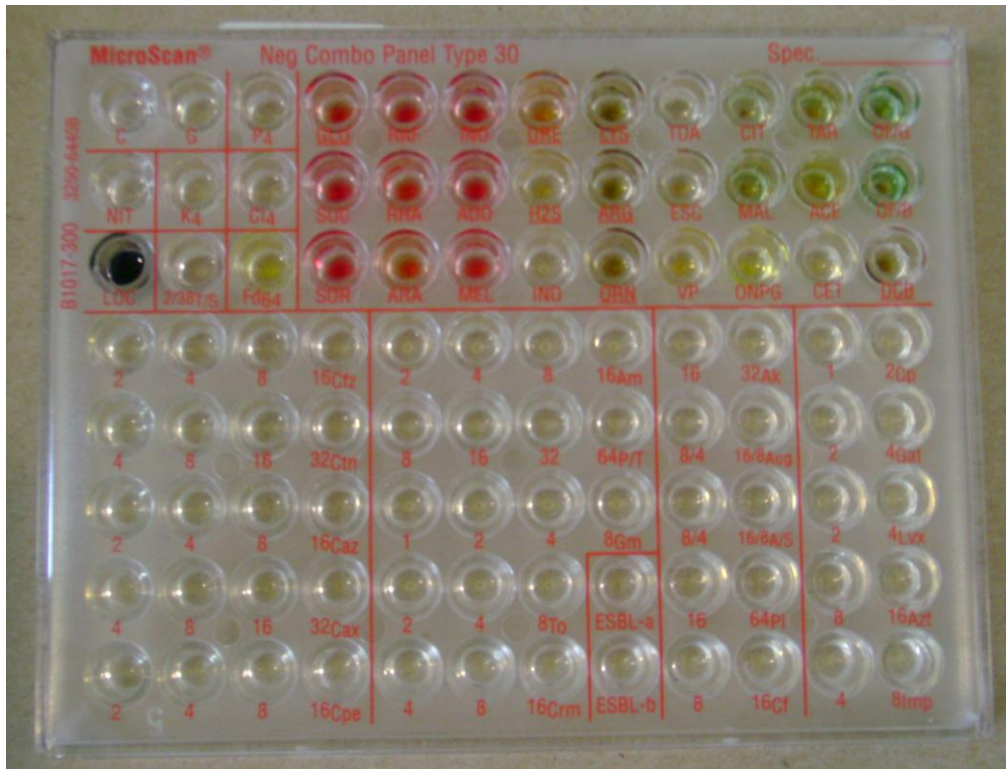


Fig. 4. Placa de panel tipo 30 para identificación de bacterias Gram negativas para MicroScan.

Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó utilizando la técnica descrita por Pitchner *et al* (1989) empleando tiocinato de guanidina (128). Las cepas se cultivaron en 5 ml de caldo LB e incubadas a 37°C por 18 h, posteriormente se centrifugaron a 8000 x g y la pastilla bacteriana se lisó con 550 µl de buffer de lisis (Tiocinato de Guanidina 5M, EDTA 0.1M, Sarkosyl 0.5% (p/v)), posteriormente se agregó 250 µl de acetato de amonio 7.4 M y se mezcló por 5

min, asimismo, se colocó 550 µl de cloroformo y se centrifugó a 8000 x g por 10 min, se obtuvo el sobrenadante y el ADN se precipitó con etanol al 100% y se realizaron 2 lavados con etanol al 70%. El pellet de ADN se dejó secar y posteriormente fue resuspendido en agua estéril grado biología molecular y se almacenó a 4°C hasta su uso. El ADN se visualizó en gel de agarosa al 1.5% y 2% teñido con bromuro de etidio.

Determinación de grupos filogenéticos

Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple para identificar los grupos filogenéticos, los iniciadores utilizados fueron descritos por Clermont O (120), para detectar los genes *chuA*, *yjaA* y el fragmento de ADN TspE4.C2. Los iniciadores utilizados para *chuA* fueron: *chuA.1* (5'-GACGAACCAACGGTCAGGAT-3') y *chuA.2* (5'-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3') con un producto de amplificación de 279 pb, para *yjaA*: *yjaA.1* (5'-TGAAGTGTCAGGAGACGCT-3') y *yjaA.2* (5'-ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC-3'), con un producto esperado de 211 pb y para TspE4.C2: TspE4C2.1 (5'-GAGTAATGTCTCGGGGCATTCA-3') y TspE4C2.2 (5'-CGCGCCAACAAAGTATTACG-3'), con un producto de amplificación de 152 pb (89). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: Desnaturalización inicial por 5 min a 95°C; 30 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 59°C, y 30 s a 72°C; y una extensión final de 5 min a 72°C. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1.5 y 2% teñido con bromuro de etidio. Los grupos filogenéticos fueron determinados en base a la presencia o ausencia de los genes (**Cuadro 1**).

Cuadro 1. Combinación de genes para determinar los Grupos Filogenéticos

Gen			Grupo Filogenético
<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TspE4.C2	
-	-	-	A
-	-	+	B1
+	+	-	B2
+	-	-	D

(120).

Determinación de factores de virulencia de EHEC

La determinación de los factores de virulencia se realizó de acuerdo a lo descrito por DebRoy y Roberts (129). Los genes que se identificaron fueron; *eae*, *stx1*, *stx2*, *rfbE*_{O157} y *fliC*_{H7}. Se realizaron reacciones de PCR múltiple donde se incluyeron los genes *eae*, *stx1*, así como *rfbE*_{O157} y *fliC*_{H7}; para el gen *stx2* se realizó una reacción individual de PCR. Los iniciadores que se emplearon para la detección genética fueron los siguientes; *eae.1* (5'-GTGGCGAATACTGGCGAGACT-3') y *eae.2* (5'-CCCCATTCTTTTTACCGTCG-3') con un producto de amplificación de 890 pb; *stx1.1* (5'-ACACTGGATGATCTCAGTGG-3') y *stx1.2* (5'-CTGAATCCCCCTCCATTATG-3') con un amplicón de 582 pb; *stx2.1* (5'-GGCACTGTCTGAAACTGCTCC-3') y *stx2.2* (TCGCCAGTTATCTGACATTCTG) producto de amplificación 255 pb; *rfbE*_{O157}. 1 (5'-AACGGTTGCTCTTCATTTAG-3') y *rfbE*_{O157}. 2 (5'-GAGACCATCCAATAAGTGTG-3') con un producto de amplificación de 678 pb; *fliC*_{H7}. 1 (5'-TACCACCAAATCTACTGCTG-3') y *fliC*_{H7}. 2 (5'-

TACCACCTTTATCATCCACA-3') amplicón de 560 pb (129). Las condiciones que se usaron para el programa de la PCR para los genes *stx1* y *eae*, así como *stx2* fueron: la desnaturalización inicial consistió de 5 min 94°C, 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 56°C y 45 s a 72°C; la extensión final de 72°C por 7 min. El programa para los genes *rfbE*_{O157}, *fliC*_{H7} consistió en: desnaturalización inicial 5 min a 94°C, 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 56°C, y 45 s a 75°C; extensión final 7 min a 72°C. Los productos amplificados se observaron en un gel de agarosa al 1.5 y 2% teñidos con bromuro de etidio.

Tipificación serológica

Las cepas fueron serotipificadas utilizando el sistema de microaglutinación en placa (96 pozos). La serotipificación se realizó en el Laboratorio de Bacteriología que se encuentra ubicado en la Torre de Investigación de la Facultad de Medicina de la UNAM; la metodología que se empleó fue de acuerdo a lo descrito por Orskov F y Orskov I (130) y a lo establecido por el Biólogo y M en C Navarro Ocaña Armando responsable del Laboratorio de Bacteriología. Para la obtención del antígeno somático (O) las cepas se sembraron por estría cerrada en tubos con agar inclinado de Soya Tripticaseína (TSA), se incubaron a 37°C por 24 h; posteriormente se agregó 10ml de solución salina (S.S) se agito para obtener el sobrenadante y se depositó en otro tubo para baño María a 110°C por 1 h; se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se agregó 15ml de formalina a cada tubo y se almacenaron hasta su uso. En el caso del antígeno flagelar (H) se sembraron por picadura en tubos de Craigie con agar semisólido, se incubó a 30°C






durante 21 días, seguidamente se sembró el antígeno flagelar en biotriptasa incubados a 28°C por 24 h; después se les agrego de 5 a 10ml de formalina.

Se utilizó antisuero de conejo contra los 186 antígenos somáticos (O) y antisueros monovalentes contra los 56 antígenos flagelares (H) del esquema de tipificación (el esquema antigénico fue actualizado por el Dr. Flemming Scheutz del The International *Escherichia* and *Klebsiella* Centre (WHO) en Copenhagen).

Para la reacción de microaglutinación en placa se realizaron diluciones de los antígenos; se llevaron a cabo tres titulaciones para cada antígeno, donde las dos primeras se utilizo antisueros diluidos y en la ultima se utilizo antisuero puro de *E. coli*. En la tipificación del antígeno O se incubo a 50°C por 24 h en estufa de cultivo, la lectura se realizó después de las 24 h. El antígeno flagelar se incubo a 50°C por 2 h en estufa de cultivo, posteriormente se realizo la lectura.

Se incluyeron sueros específicos para definir el serogrupo de *E. coli*. En la tipificación serológica se incluyeron 45 sueros anti-O de *Shigella* spp., (*S. dysenteriae* O1-O15; *S. boydii* O1-O20; *S. flexneri* O1-O6, con sus subtipos a y b de O1, O2, O3, O4 y O5 además las variedades X e Y; *S. sonnei* I y II) para evitar una reacción cruzada (**Cuadro 2**).

Cuadro 2. Lectura de microaglutinación en placa

Microaglutinación					
Interpretación	Negativa	1+ Positiva	2+ Positiva	3+ Positiva	4+ Positiva

VII. Resultados

VII.I Identificación y susceptibilidad

La identificación de los 19 aislamientos se realizó mediante el método automatizado MicroScan (DADE BEHRING), fueron referidos con el 99.99% de pertenencia al género y especie de *Escherichi coli*; al mismo tiempo se determinó la presencia de beta-lactamasas de espectro extendido (ESBL) y la concentración mínima inhibitoria (MIC), utilizando los siguientes quimioterapéuticos: amikacina (Ak), amoxicilina/ácido clavulánico (Aug), ampicilina (Am), ampicilina/sulbactam (A/S), aztreonam (Azt), cefazolina (Cfz), cefepima (Cpe), cefotetan (Ctn), ceftazidima (Caz), ceftriaxona (Cax), cefuroxima (Crm), cefalotina (Cf), ciprofloxacino (Cp), gatifloxacino (Gat), gentamicina (Gm), imipenem (Imp), levofloxacino (Lvx), piperacilina (Pi), piperacilina/tazobactam (P/T), tobramicina (To) y trimetoprim/sulfametoxazol (T/S). De los 19 aislamientos se demostró la susceptibilidad de 11 a A/S, 19 a Ak, 11 a Am, 12 a Aug, 18 Azt, 17 Cax, 17 Caz, 9 Cf, 16 Cfz, 14 Cp, 19 Cpe, 17 Crm, 18 Ctn, 14 Gat, 14 Gm, 19 Imp, 14 Lvx, 19 P/T, 11 Pi, 16 T/S, 13 To. Se determinó como intermedio de los 19 aislamientos a los siguientes quimioterapéuticos: 4 a A/S, 5 a Aug, 6 Cf, 1 Cfz, 1 a Ctn, 3 Pi, y 4 a To. De los 19 aislamientos presentaron resistencia 4 a la A/S, 8 a Am, 2 a Aug, 1 a Azt, 2 a Cax, 2 a Caz, 4 a Cf, 2 a Cfz, 5 a Cp, 2 a Crm, 5 a Gat, 5 a Gm, 5 a Lvx, 5 a Pi, 3 a T/S, y 2 a To. De los cuales 2 aislamientos presentaron ESBL (**Tabla 1**).

Tabla 1. MIC de 19 aislamientos de Delfín nariz de botella

Quimioterapéutico	Susceptibilidad	Intermedio	Resistencia
A/S	11	4	4
Ak	19		
Am	11		8
Aug	12	5	2
Azt	18		1 *
Cax	17		2 *
Caz	17		2 *
Cf	9	6	4
Cfz	16	1	2
Cp	14		5
Cpe	19		
Crm	17		2
Ctn	18	1	
Gat	14		5
Gm	14		5
Imp	19		
Lvx	14		5
P/T	19		
Pi	11	3	5
T/S	16		3
To	13	4	2

* Aislamientos que presentaron resistencia al quimioterapéutico y fueron positivos a la presencia de ESBL.

VII.II Grupos filogenéticos

En la determinación de los grupos filogenéticos se utilizaron dos marcadores genéticos (*chuA* y *yjaA*) y un fragmento de ADN TspE4.C2. Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se obtuvieron los

siguientes grupos filogenéticos; 8 aislamientos pertenecen al grupo B2, 6 aislamientos al grupo A, 3 al grupo B1 y 2 al grupo filogenético D (**Tabla 2**) (**Fig. 5**).

Tabla 2. Grupos filogenéticos

Aislamiento	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TspE4.C2	Grupo filogenético
1	+	+	-	B2
2	+	+	-	B2
3	+	+	-	B2
4	-	-	-	A
5	-	-	-	A
6	-	-	+	B1
7	+	+	-	B2
8	-	-	-	A
9	+	-	-	D
10	-	-	-	A
11	-	-	-	A
12	+	+	-	B2
13	+	-	-	D
14	+	+	-	B2
15	+	+	-	B2
16	+	+	-	B2
17	-	-	-	A
18	-	-	+	B1
19	-	-	+	B1

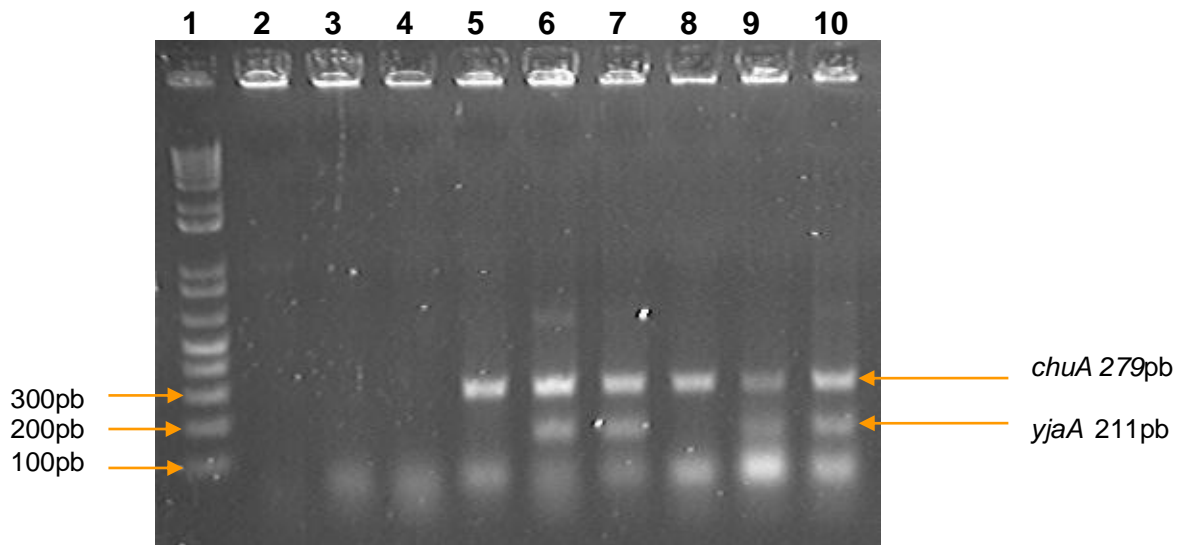


Fig. 5. Amplificación de los genes *chuA*, *yjaA* y fragmento TspE4.C2. Carril 1 marcador de peso molecular 100pb; carril 2 control negativo *E.coli* K-12; carril 3 control negativo DH5; carril 4 control negativo HB101; carril 5 control positivo O157:H7 (EHEC); carril 6 aislamiento 12; carril 7 aislamiento 14; carril 8 aislamiento 13; carril 9 aislamiento 3; y carril 10 aislamiento 7. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

VII.III Factores de virulencia de EHEC

Para determinar la presencia de los genes de virulencia del patotipo EHEC (*eae*, *stx1*, *stx2*, *rfbE_{O157}*, *fliC_{H7}*) se utilizó la PCR con lo que se determinó: 1 aislamiento que presentó el gen *eae*, 5 que presentaron el gen *stx1* (**Fig. 6**), 18 *stx2* (**Fig. 7**), 1 *rfbE_{O157}* y 3 *fliC_{H7}* (**Fig. 8**). Dentro de estos aislamientos sólo uno presentó los genes característicos de la EHEC, siendo positivo para todos ellos (**Tabla 3**).

Tabla 3. Genes de virulencia (EHEC)

Aislamiento	<i>eae</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>rfbE</i>_{O157}	<i>fliC</i>_{H7}
1			+		+
2			+		
3			+		
4			+		
5			+		
6		+	+		
7			+		
8			+		
9		+	+		
10			+		
11			+		
12*	+	+	+	+	+
13		+	+		
14			+		+
15			+		
16			+		
17		+	+		
18					
19			+		

*Aislamiento con los genes del patotipo EHEC (O157:H7)

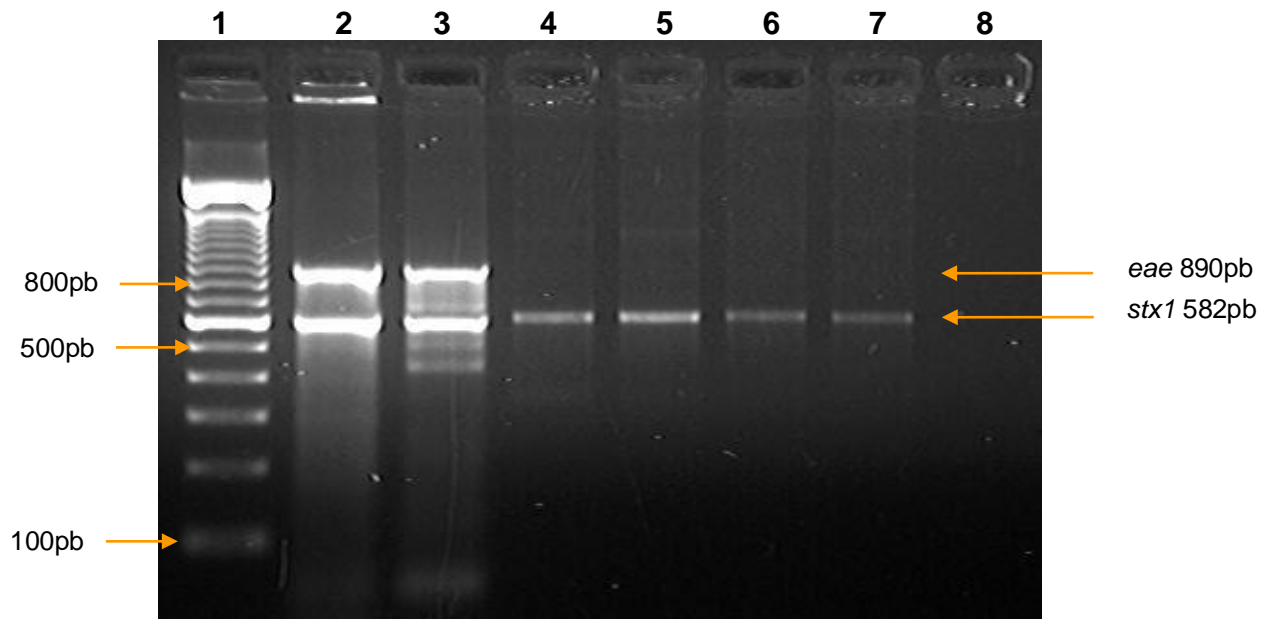


Fig. 6. Amplificación de los genes *eae* y *stx1*. Carril 1 marcador de peso molecular 100pb; carril 2 control positivo O157:H7 (EHEC); carril 3 aislamiento 12; carril 4-7 aislamientos 6, 9, 13 y 17; carril 8 control negativo. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

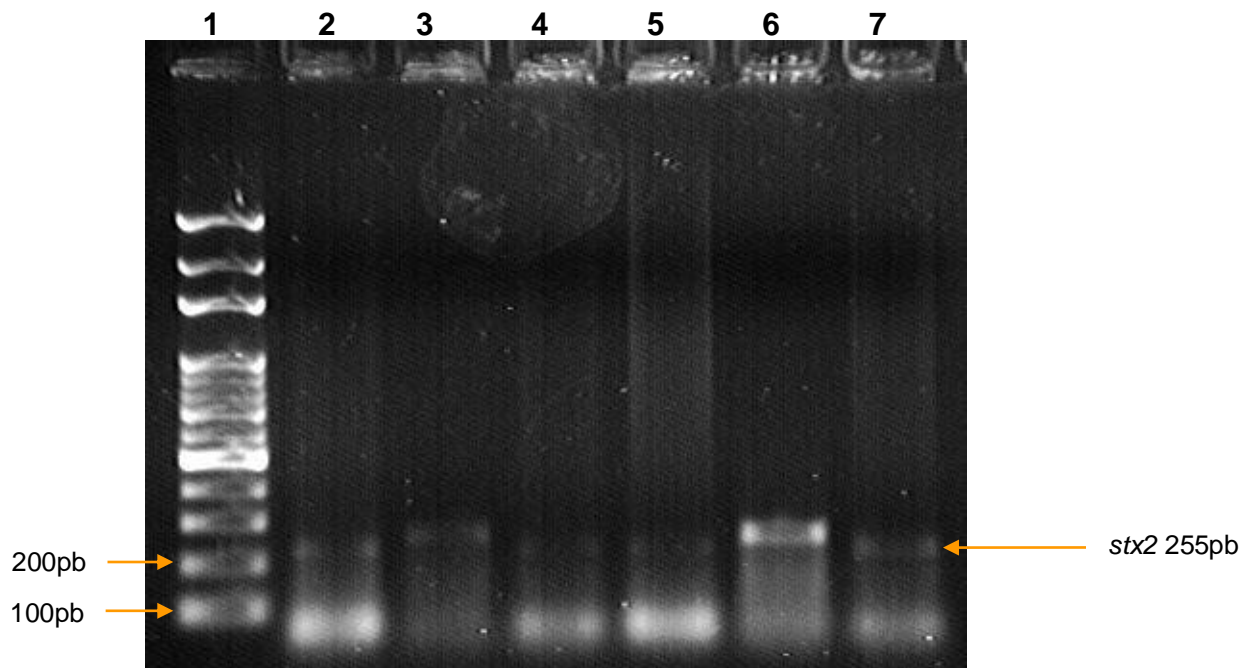


Fig. 7. Amplificación del gen *stx2*. Carril 1 marcador de peso molecular 100pb; carril 2 control positivo O157:H7 (EHEC); carril 3 aislamiento 1; carril 4 aislamiento 2; carril 5 aislamiento 3; carril 6 aislamiento 4; y carril 7 aislamiento 5. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

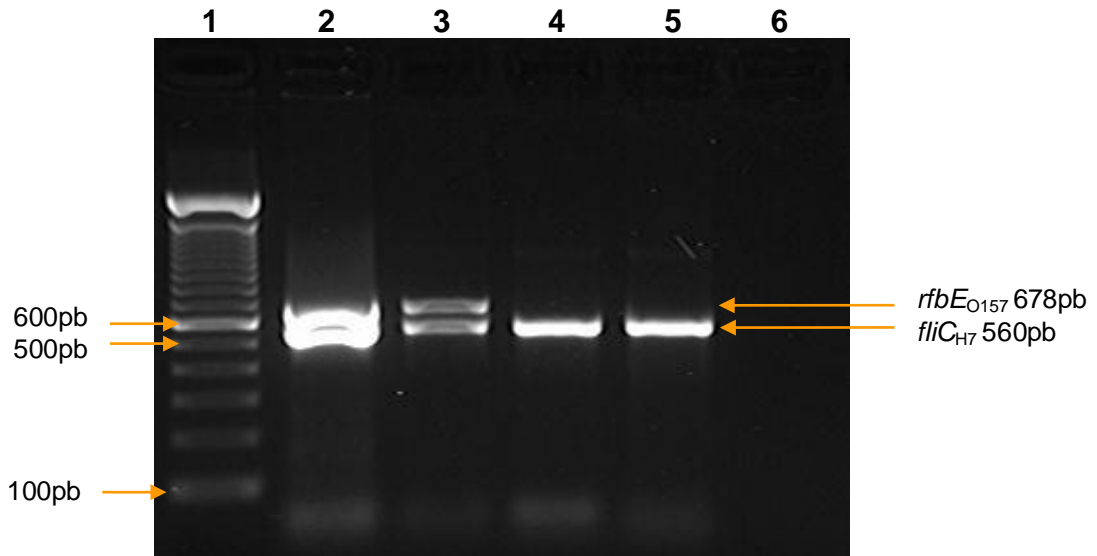


Fig. 8. Amplificación de los genes *rfbE*_{O157} y *fliC*_{H7}. Carril 1 marcador de peso molecular 100pb; carril 2 control positivo O157:H7 (EHEC); carril 3 aislamiento 12; carril 4 aislamiento 1; carril 5 aislamiento 14; y carril 6 control negativo. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

VII.IV Serotipificación

Se determinaron los antígenos somático (O) y flagelar (H) para determinar el serotipo, por medio de la microaglutinación en microplaca.

Los serotipos fueron los siguientes: O15:H7, O32:H42, O25:H4, O170:H16, O163:H19, O71:H14, O153:H2, O75:H5, O140:H32; serogrupo O101. De los 19 aislamientos solo presentaron los siguientes antígenos flagelares: H31, H42, H2. Y un aislamiento OR:H14 (cepa rugosa), a la que se le realizó una segunda serotipificación (**Tabla 4**) (**Fig. 9**).

Tabla 4. Serotipificación

Serotipo	Aislamiento	Serogrupo	Aislamiento	H	Aislamiento	Rugosa	Aislamiento
O15:H7	1, 14	O101	5	H:31	7	OR:H14	12
O32:H42	2, 10			H:42	11		
O25:H4	3, 15			H:2	13		
O170:H16	4, 8						
O71:H14	6						
O153:H2	9						
O75:H5	16						
O140:H32	17						
O163:H19	18, 19						

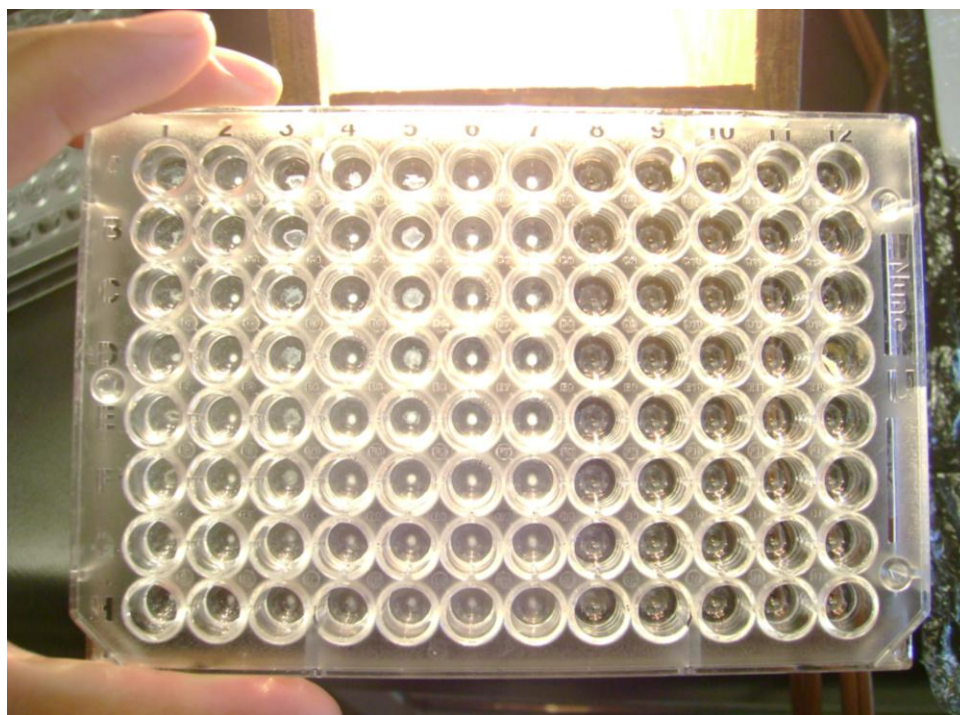


Fig. 9. Lectura de la microaglutinación en placa. En la columna 2 se observa una microaglutinación negativa; en la columna 3 se observa una microaglutinación positiva de dos puntos (2+); y de la columna 8 a la 12 es una respuesta positiva de 4 puntos (4+).

VII.V Resultados generales de grupos filogenéticos, factores de virulencia, serotipificación y antibiograma.

Integrando la información obtenida de las técnicas realizadas de los 19 aislamientos, se observó la correlación entre los diferentes resultados de cada aislamiento, donde los aislamientos con grupo filogenético de cepas comensales (A, B1) presentaron genes de virulencia (*stx1*, *stx2*); los aislamientos con filo-grupos de cepas patógenas (B2, D) mostraron además de los genes que codifican para la toxinas, los genes *eae*, *rfbE*_{O157} y *fliC*_{H7} (**Tabla 5**).

Estableciendo una relación de la resistencia y susceptibilidad a los antibióticos, se observó que los aislamientos con grupo filogenético comensal (A), mostraron resistencia y presencia de ESBL a más de un antibiótico, así como antibióticos clasificados como intermedio; los aislamientos con filo-grupo B1 fueron susceptibles a los 21 antibióticos a diferencia del grupo A. En cuanto a los filogrupos de cepas patógenas (B2, D); B2 fue heterogéneo ya que fue susceptible, resistente, intermedio y ESBL a diversos antibióticos, al igual que el grupo D este grupo no presentó ESBL (**Tabla 6**).

Tabla 5. Resultados generales

Aislamiento	Grupos Filogenéticos (GF)			GF	Genes de virulencia					Serotipo
	<i>ChuA</i>	<i>yjaA</i>	<i>TsPF4C2</i>		<i>eae</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>rfbE_{O157}</i>	<i>fliC_{H7}</i>	
1	+	+	-	B2	-	-	+	-	+	O15:H7
2	+	+	-	B2	-	-	+	-	-	O32:H42
3	+	+	-	B2	-	-	+	-	-	O25:H4
4	-	-	-	A	-	-	+	-	-	O170:H16
5	-	-	-	A	-	-	+	-	-	O101:HNT
6	-	-	+	B1	-	+	+	-	-	O71:H14
7	+	+	-	B2	-	-	+	-	-	ONT:H31
8	-	-	-	A	-	-	+	-	-	O170:H16
9	+	-	-	D	-	+	+	-	-	O153:H2
10	-	-	-	A	-	-	+	-	-	O32:H42
11	-	-	-	A	-	-	+	-	-	ONT:H42
12	+	+	-	B2	+	+	+	+	+	OR:H14
13	+	-	-	D	-	+	+	-	-	ONT:H2
14	+	+	-	B2	-	-	+	-	+	O15:H7
15	+	+	-	B2	-	-	+	-	-	O25:H4
16	+	+	-	B2	-	-	+	-	-	O75:H5
17	-	-	-	A	-	+	+	-	-	O140:H32
18	-	-	+	B1	-	-	-	-	-	O163:H19
19	-	-	+	B1	-	-	+	-	-	O163:H19

No tipificable (NT).

Tabla 6. Relación resistencia y susceptibilidad, GF y GV

Aislamiento	GF	Genes de virulencia	Serotipo	Susceptible	Resistente y ESBL	Intermedio
1	B2	<i>stx2, fliC_{H7}</i>	O15:H7	21*	-	-
2	B2	<i>stx2</i>	O32:H42	9	ESBL (Cax, Caz). Am, Aug, Cf, Cfz, Crm, Gm	A/S, Ctn, Pi, To
3	B2	<i>stx2</i>	O25:H4	12	A/S, Am, Cp, Gat, Gm, LvX, Pi	Cf, To
4	A	<i>stx2</i>	O170:H16	20	-	Cf
5	A	<i>stx2</i>	O101:HNT	12	A/S, Am, Cp, Gat, LvX, Pi, T/S	Aug, Cf
6	B1	<i>stx1, stx2</i>	O71:H14	21*	-	-
7	B2	<i>stx2</i>	ONT:H31	21*	-	-
8	A	<i>stx2</i>	O170:H16	20	Cf	-
9	D	<i>stx1, stx2</i>	O153:H2	11	Am, Cp, Gat, LvX, T/S, To	A/S, Aug, Cf, Pi
10	A	<i>stx2</i>	O32:H42	9	ESBL (Azt, Cax, Caz). Am, Aug, Cf, Cfz, Crm, Gm	A/S, Pi, To
11	A	<i>stx2</i>	ONT:H42	21*	-	-
12	B2	<i>eaE, stx1, stx2, rfbE_{O157}, fliC_{H7}</i>	OR:H14	11	A/S, Am, Cp, Gat, Gm, LvX, Pi	Aug, Cf, To
13	D	<i>stx1, stx2</i>	ONT:H2	14	Am, Gm, Pi, T/S, To	A/S, Aug
14	B2	<i>stx2, fliC_{H7}</i>	O15:H7	20	-	Cf
15	B2	<i>stx2</i>	O25:H4	12	A/S, Am, Cf, Cp, Gat, LvX, Pi	Aug, Cfz
16	B2	<i>stx2</i>	O75:H5	21*	-	-
17	A	<i>stx1, stx2</i>	O140:H32	21*	-	-
18	B1	-	O163:H19	21*	-	-
19	B1	<i>stx2</i>	O163:H19	21*	-	-

*Se utilizo 21 quimioterapéuticos para determinar la susceptibilidad.

Grupos filogenéticos (GF)

Genes de virulencia (GV)

Amoxicilina/ácido clavulánico (Aug), ampicilina (Am), ampicilina/sulbactam (A/S), aztreonam (Azt), cefazolina (Cfz), cefotetan (Ctn), ceftazidima (Caz), ceftriaxona (Cax), cefuroxima (Crm), cefalotina (Cf), ciprofloxacino (Cp), gatifloxacino (Gat), gentamicina (Gm), levofloxacino (LvX), piperacilina (Pi), tobramicina (To) y trimetoprim/sulfametoxazol (T/S).

VIII. Discusión

Escherichia coli es un organismo comensal o un patógeno potencial, dependiendo de la cepa. El conocimiento de los mecanismos de transferencia de ADN proporciona características de resistencia a antibióticos en *E. coli*; situación más estudiada en comparación con las otras especies bacterianas. La resistencia a los antibióticos de bacterias coliformes de la microbiota puede tener un impacto en la patogenicidad de *E. coli*. Por lo que, es considerado como un buen candidato para los estudios sobre el nivel de resistencia a antibióticos de la microbiota del tracto intestinal (25). Las investigaciones de la prevalencia de la resistencia de esta bacteria en diferentes poblaciones de animales y de humanos, hace que sea posible comparar y detectar la posible transferencia de resistencia a las bacterias de los animales para los seres humanos y de los seres humanos a los animales (131).

En este estudio se analizaron 19 aislamientos de delfín nariz de botella, donde se observó que los aislamientos provenientes de los delfines que se encuentran en cautiverio (sistema cerrado y abierto) y en contacto directo con los humanos, presentaron un nivel de resistencia a diversos antibióticos (amoxicilina/ác. clavulámico, cefalotina, cefazolina, cefuroxima, gentamicina, ampicilina/sulbactam, ampicilina, ciprofloxacino, gatifloxacino, levofloxacino, piperacilina, trimetoprim/sulfametoxazol y tobramicina) y producción de ESBL asociada a ceftriaxona, ceftazidima y aztreonam. En cambio los aislamientos procedentes de los delfines que se encuentran en vida libre mostraron sensibilidad a los 21 antibióticos utilizados.

Se ha reportado que el incremento de población en zonas costeras, influye en el estrés ambiental sobre los ecosistemas marinos (132). Los cambios en el medio ambiente como resultado de actividades antropogénicas puede influir en la proliferación y la distribución de bacterias coliformes fecales y patógenos potenciales, incluyendo a *E. coli* (133). De acuerdo con el estudio realizado por Österblad *et al.*, (2000) donde se analizaron 3 grupos de muestras de heces de humanos; encontraron que el nivel de resistencia de *E. coli* era proporcional al nivel de exposición de la flora intestinal a los antibióticos y en comparación con las otras enterobacterias fue la responsable de la mayor parte de las resistencias encontradas (ampicilina, estreptomina, cloranfenicol, tetraciclina, sulfametoxazol, trimetropim, cotrimoxazol, ácido nalidíxico, cefalotina, cefuroxima, gentamicina, amoxicilina/ácido clavulámico), también encontraron que es el principal portador de las combinaciones de resistencia que suelen ser transferibles en la microbiota intestinal.

De acuerdo a Bogaard *et al.*, (2000) sugiere que la transferencia de las cepas resistentes de los animales a los humanos tiene una correlación positiva con las cantidades de antibióticos a los que están expuestos la población animal. Además, se ha demostrado que dicha resistencia en la microbiota intestinal se da por una alta densidad bacteriana en un entorno determinado, junto con una gran reserva genética permiten el intercambio genético entre las bacterias; este intercambio genético se puede transferir de manera horizontal (44, 135, 136). Algunos estudios han documentado que aislamientos de *E. coli* resistentes a antibióticos, son también productoras de betalactamasas (ESBL) como: *bla*_{TEM-1}, *qnrB*, *bla*_{CMY-26}, *bla*_{SHV-36}, *bla*_{OXY-2} y *bla*_{CTX-M-2}; por lo que ciertos autores

sugieren que un incremento de ESBL en *E. coli* podría ser atribuido a la expresión clonal de *bla*_{CTX-M} (137, 138, 139). Estos genes de resistencia se pueden encontrar en elementos móviles como son plásmidos, transposones e integrones (140). Las bacterias multiresistentes asociadas a integrones y productoras de ESBL son un problema grave, ya que limitan severamente las opciones terapéuticas contra las infecciones humanas y animales (140, 141). Estos integrones son herramientas moleculares altamente eficientes utilizadas por las bacterias para la adquisición y expresión de resistencia microbiana (135).

Se han realizado estudios en otras especies donde se aisló a *E. coli* y se determinó que estas cepas son resistentes a quimioterapéuticos, por ejemplo, Edge *et al.*, (2005) que identificaron que las heces de los gansos salvajes, patos y gaviotas pueden ser un factor destacado de la resistencia en *E. coli*. También, Literak *et al.*, (2010) demostraron la ocurrencia de aislados de *E. coli* productoras de ESBL; así como aislamientos con plásmidos que codifican la resistencia a fluoroquinolonas, en heces de gaviotas a aves acuáticas en la costa del Mar Báltico. Mencionan que estas aves pueden ser reservorios y vectores de cepas de *E. coli*; por el tipo de búsqueda de alimento, ya que pueden ir a zonas agrícolas, rurales, urbanas, basureros y plantas de tratamiento de aguas residuales. Por lo tanto, pueden adquirir fácilmente bacterias resistentes de los animales domésticos y fuentes humanas. Estas aves acuáticas excretan grandes cantidades de coliformes fecales y son teóricamente capaces de afectar la calidad del agua. En otro estudio analizan

los sedimentos de la costa marina y mencionan que dichos sedimentos representan un reservorio potencial de *E. coli* patógenas (144).

En el delfín nariz de botella se ha identificado la colonización de *E. coli* en múltiples áreas geográficas, incluyendo las poblaciones de estuarios (145, 146); han reportado que la colonización es mayor al 69% con un 25% de cepas resistentes a antibióticos (147). Un estudio similar al nuestro, elaborado por Schaefer *et al.*, (2009) analizan muestras de espiráculo, heces y fluidos gástricos de delfines nariz de botella que habitan en estuarios de la Laguna India River (Florida) y de Charleston (Carolina del Sur), en donde aíslan a *E. coli* con mayor frecuencia. Estos aislamientos mostraron una alta incidencia de resistencia a la ampicilina, amoxicilina/ác. clavulánico, cefalosporina y eritromicina. Los autores proponen que la escorrentía agrícola y la descarga de los desechos humanos que contienen antibióticos u organismos resistentes podrían ser los responsables. Mencionan que los organismos resistentes de humanos y animales posiblemente son trasferidos al medio ambiente marino y colonizar a los delfines que habitan en aguas costeras. Alternativamente, la descarga de los productos farmacéuticos en el medio marino tal vez es responsable del desarrollo de resistencia seguida por la exposición de las bacterias nativas y el intercambio genético selectivo. Sin embargo, los estudios realizados no han tratado de determinar si los patrones de colonización de *E. coli* entre los delfines nariz de botella están asociados con factores de riesgo ambientales (148). En comparación al presente estudio, se observó que la mayoría de los aislamientos presentaron una alta susceptibilidad a ampicilina y a amoxicilina/ác. clavulánico. En el caso de resistencia a estos

quimioterapéuticos, 8 aislamientos fueron resistentes a ampicilina y 2 a amoxicilina/ác. clavulánico.

Los resultados obtenidos de los 19 aislamientos donde se determinaron los grupos filogenéticos y la presencia de genes de virulencia de EHEC (*eae*, *stx1*, *stx2*), junto con dos marcadores para tipificación molecular del lipopolisacárido O157 y el antígeno flagelar H7 (*rfbE*_{O157} y *fliC*_{H7}); se observó la predominancia de los filo-grupos B2 y A; y el resto de los aislamientos en menor número al grupo filogenético B1 y D. Los 4 grupos filogenéticos mostraron la presencia de los tres genes de virulencia que se investigaron en este estudio, con mayor ocurrencia el gen *stx2* el cual se determinó en 18 aislamientos; el gen *stx1* sólo en 5 aislamientos; un aislamiento fue positivo a la presencia de *eae*, *stx1*, *stx2*, además de presentar los dos marcadores para la tipificación molecular (*rfbE*_{O157} y *fliC*_{H7}); por lo tanto se obtuvo un hallazgo de una cepa O157:H7 en el delfín nariz de botella (**Tabla 5**). La mayoría de los aislamientos corresponden al filo-grupo B2 que es característico de las cepas patógenas extraintestinales, seguido por el grupo A al que pertenecen las cepas comensales. Las cepas patógenas intestinales y comensales se encuentran en los grupos A y B1, mientras que las extraintestinales a los filo-grupos B2 y en menor número al grupo D (117, 118, 119, 115). En comparación con lo que demostró Walk *et al.*, (2007) donde determinan que la mayoría de las cepas de *E. coli* que pueden persistir en el ambiente pertenecen al filo-grupo A y B1 (149). Y las cepas que son aisladas con menor frecuencia del medio ambiente, peces, ranas y reptiles pertenecen al filo-grupo B2 y D (116). La distribución de las cepas a los diferentes grupos filogenéticos es

influenciada por diferentes factores; se han realizado estudios para identificar los factores que determinan la asociación entre el tipo de cepa y huésped (150, 151). Diversos autores indican que estos factores están relacionados con las condiciones y fronteras geográficas, factores dietéticos, uso de antibióticos y su resistencia, la capacidad de aprovechar azúcares, nichos ecológicos y el clima (114, 115, 116).

Johnson *et al.*, (2001) al igual que Boyd *et al.*, informaron que las cepas de *E. coli* del grupo filogenético B2 presentan más factores de virulencia seguidos por el grupo D, en relación a los filo-grupos A y B1. Algunos autores analizaron la distribución de los grupos filogenéticos principales entre las cepas de *E. coli* aisladas de las heces humanas y animales. Uno de estos autores es Escobar-Páramo *et al.*, (2006) que al analizar aislados de *E. coli* de heces de aves, mamíferos no humanos y humanos; observa la prevalencia de los grupos D y B1 en aves, A y B1 en mamíferos no humanos y A y B2 en humanos. Determina que el efecto de la relación de asentamientos humanos con animales puede influenciar el grupo filogenético al que pertenecen las cepas de animales silvestres. Por lo tanto, concluye que el principal factor que da forma a la estructura genética de las poblaciones de *E. coli* es la domesticación.

En otro estudio elaborado por Camila *et al.*, (2010) analizan la distribución de grupos filogenéticos de *E. coli* en heces de humanos, cerdos, pollos, ovejas, cabras y vacas; y determinar un posible indicador sobre la contaminación al medio ambiente. Determinaron que los mamíferos omnívoros presentaron una prevalencia del filo-grupo A, mientras que los mamíferos herbívoros la prevalencia es del grupo B1; ellos establecen que el grupo filogenético B2 podría ser un buen indicador de contaminación fecal humana. También, Baldy-

Chudzik *et al.*, (2008) realizan un estudio donde analizan antecedentes filogenéticos, perfiles de genes de virulencia y diversidad genómica de *Escherichia coli* comensal, aisladas de diez especies de mamíferos que se encuentran en el zoológico de Polonia. Observan que la prevalencia de los aislamientos de herbívoros pertenecen al grupo filogenético B1, los carnívoros a A y los omnívoros a B1. Los filo-grupos D y B2 fueron determinados en todas las especies pero en menor número. En cuanto a los genes de virulencia (*eae*, *stx1*, *stx2*) se agruparon en el filo-grupo B1 de las especies de herbívoros.

Por otra parte, DebRoy *et al.*, (2006) desarrollan un ensayo de PCR para la detección de STEC/EHEC en muestras fecales de animales de zoológicos. El protocolo que desarrollaron se ha aplicado con éxito en estos animales, ya que se aislaron *E. coli* de heces y detectaron los genes *stx1*, *stx2*, *eae* y los genes que determinan el antígeno somático O157 y el flagelo H7 (*rfbE_{O157}* y *fliC_{H7}*). Concluyen que la finalidad de crear protocolos es para prevenir la transmisión de enfermedades zoonóticas en lugares de exposición animal. Estos estudios no se han reportado en el delfín nariz de botella; pero si hay reportes en análisis de agua de lluvia en el sureste de Queensland, Australia, donde Ahmed *et al.*, (2011) determinaron grupos filogenéticos y factores de virulencia; observaron una alta prevalencia de los grupos A y D, en menor número los grupos B2 y B1. Detectaron que el gen *eae* se encontró con un porcentaje mayor en los aislamientos que pertenecen al filo-grupo B2 y D, con un porcentaje menor en A y B1. Los genes *stx1* y *stx2* no se detectaron en ninguna de las 200 cepas analizadas. Otro estudio que se ha realizado y se puede relacionar con el hábitat del *Tursiops truncatus*; es el elaborado por Luna *et al.*, (2010) ellos analizan sedimentos marinos costeros y determinaron

si estos son portadores de genes de virulencia. Encontraron que el porcentaje de principales filo-grupos en sedimentos marinos fueron 60%, 25%, 21% y 19%, A, B1, D y B2 respectivamente. En el cual, el grupo B2 es el que presentó más genes de virulencia que en el D; el gen *eae* tuvo un porcentaje de 9.5 en B2 y 8.7 en D; los genes que no se encontraron fueron *stx1* y *stx2*, en este estudio realizado por Luna *et al.*

La serotipificación es un método bien establecido, el cual fue desarrollado con base a las diferencias de los antígenos O, K, F y H. En la actualidad ya no se determinan los antígenos K, ni F. Existen 186 serogrupos O y 56 antígenos flagelares, sin embargo la cantidad de estos antígenos cambian constantemente al descubrir nuevos serotipos (85, 86, 39, 87). Aunque es un método ya establecido, no ha habido reportes sobre serotipificación de *E. coli* en muestras procedentes de delfín nariz de botella (*T. truncatus*); en el presente estudio se realizó la serotipificación de *E. coli* de heces procedentes del delfín nariz de botella. Se analizaron 19 aislamientos donde se encontró los siguientes serotipos: O15:H7, O32:H42, O25:H4, O170:H16, O71:H14, O153:H2, O75:H5, O140:H32, O163:H19; se determinó un serogrupo O101, un aislamiento rugoso OR:H14, el cual fue positivo a los dos marcadores de tipificación molecular *rfbE*_{O157} y *fliC*_{H7} determinando una cepa O157:H7 y los siguientes antígenos flagelares: H31, H42 y H2 (**Tabla 4**). De los serotipos y serogrupo que se reporta en la literatura son O25:H4, O163:H19 y O101; de los demás no se han reportado. El serotipo O25:H4 ha sido reportado en varios trabajos, en donde se ha observado que este serotipo pertenece a las ExPEC, que es un serotipo muy conocido por estar asociado con infecciones urinarias, además de ser un serotipo clásico en humanos. Este serotipo se relaciona con

las *E. coli* productoras del clon CTX-M-15, que se caracteriza por pertenecer al grupo filogenético B2, serotipo O25:H4 y tipo de secuencia de 131 (ST131), las cuales produce β -lactamasas de espectro extendido; O25:H4 parece ser el responsable de una gran parte de la epidemia internacional de *E. coli* productora de CTX-M (157, 158, 159, 160, 161, 162). En nuestro estudio, el serotipo O25:H4 pertenece al filo-grupo B2 y presenta resistencia a varios antibióticos (**Tabla 6**). Sin embargo, no se puede hablar de un serotipo O25:H4-ST131 ya que no se determinó la secuencia de 131 (ST131). En cuanto al serotipo O163:H19 se detectó en algunos estudios; donde se ha aislado *E. coli* de plantas procesadoras de borregos, de heces provenientes de ganado clínicamente sano (vacas, cerdos y cabras) y de pacientes con síndrome urémico hemolítico (SUH). En estos estudios determinan la presencia de genes de virulencia donde el serotipo O163:H19 de animales presentan el gen *stx2*; los aislados de pacientes no presentan genes de la toxina shiga (*stx*) (163, 164, 165).

En relación con los resultados obtenidos en el presente estudio; los dos aislamientos originarios de delfín nariz de botella con serotipo O163:H19; uno de ellos presentó el gen *stx2*, en el otro aislamiento no se detectó ningún gen de virulencia analizado en este estudio. Por otra parte, un estudio elaborado por Fratamico *et al.*, (2004) que determinan la prevalencia de *E. coli* productoras de toxina shiga en heces de cerdos en Estados Unidos. Aislaron STEC/EHEC que pertenecen a diferentes serogrupos entre estos O101, el cual presentó el gen *stx2*; estos autores indican que la cepa de *E. coli* serogrupo O101 se encuentra relacionado con el humano. Comparando este artículo con el presente estudio, el aislamiento de *E. coli* con serogrupo O101 proveniente

del delfín nariz de botella también presenta el gen *stx2*, al igual que en el estudio elaborado por Fratamico.

Se elaboró un estudio diferente al nuestro en cuanto a la especie animal donde Krause *et al.*, (2004) aislaron una *E. coli* con antígeno somático no determinado y H2 (ONT:H2) de gatos, esta cepa presentó el gen de la intimina (*eae*). Relacionando este estudio con el resultado de los delfines, el aislamiento ONT:H2 en delfín presentó los genes de virulencia *stx1* y *stx2*; pero no se detectó el gen de intimina. La serología al igual que grupos filogenéticos y factores de virulencia no se reportan en el delfín nariz de botella, por lo que los resultados no se pueden comparar al 100% ya que se habla de otras especies y de muestras en donde se han aislado.

IX. Conclusión

- Este fue el primer trabajo en el mundo donde se realiza una identificación completa de *Escherichia coli* en el delfín nariz de botella. Que comprende identificación bioquímica, determinación de grupos filogenéticos, factores de virulencia de EHEC, serotipificación y concentración mínima inhibitoria (MIC).
- Se encontró que los delfines analizados presentan aislamientos que pertenecen al filo-grupo B2 y A. Estos son positivos a los genes *stx1* y *stx2*.
- La serotipificación demostró una gran variedad de serotipos y la mayoría pertenece al patotipo STEC.
- La mayoría de animales en cautiverio presentaron aislamientos con resistencia a diversos antibióticos.
- Es el primer reporte de un aislamiento O157:H7 que pertenece al patotipo EHEC el cual presenta los genes *eae*, *stx1*, *stx2* y los genes de tipificación molecular *rfbE*_{O157} y *fliC*_{H7}.

X. Referencias

- 1.- Würsig B, Jefferson TA, Schmidly JD. The Marine Mammals of the Gulf of Mexico. Primer edición, ed. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data. 2000. 6-151pag
- 2.- Randall RR, Brent SS, *et al.* Guide to Marine mammals of the world. National Audubon society., ed. Ediciones Omega. 2005. 180-183, 326-331, 358-360, 494-498p
- 3.- William FP, *et al.* Encyclopedia of Marine mammals., ed. Academic press. 2009. 122-128.
- 4.- Jefferson TA, Webber MA, Pitman RL. Marine mammals of the world: a comprehensive guide to their identification. Edt. Academic press y Elsevier. 2008. 7-9, 17-19, 216-220.
- 5.- Annalisa B, James LS, *et al.* Marine Mammals: Evolutionary Biology. Segunda edición, ed. Academic press. 2006. 20-21, 49, 64-67, 76-77, 160-165.
- 6.- Fernández AY. Delfín nariz de botella, (*Tursiops truncatus*) (tesis de licenciatura). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México, 1991
- 7.- www.cites.org
- 8.- www.iucnredlist.org
- 9.- www.ifaw.net
- 10.- www.semarnat.gob.mx
- 11.- Shirihai H. Whales, Dolphins, and Other Marine Mammals of the World. Edt. Princeton University Press. 2008. 155-158, 362-368.
- 12.- Purves PE. The Anatomy of Delphinids. Head Department Cetacea, Pinipedia, Sirenia, of the British Museum of Natural History, Cromwel Road, S. Kensington, London SW7, Englan. Disponible en: <http://www.aquaticmammalsjournal.org/share/AquaticMammalsIssueArchives/1972/Aquatic Mammals 1 1/Dudok1.pdf>
- 13.- Dunn JL., Buck JD., Robeck TR. Bacterial diseases of cetaceans and pinnipeds. In Handbook of Marine Mammal Medicine: Health, Disease, and Rehabilitation. Edited by Dierauf, L. A., Gulland, F. M. D. USA: CRC Press. 2001
- 14.- 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). México (DF) México:

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México, 2007

15.- Higgins R. Bacterial and fungi of marine mammals: A review. *Can Vet J* 2000; 41:105-116.

16.- Medway W. Schryver HF. Respiratory problems in captive small cetaceans. *J Am Vet Med Assoc* 1973; 163: 571-573.

17.- Medway W. Some bacterial and mycotic diseases of marine mammals. *J Am Vet Med Assoc* 1980; 177: 831-834.

18.- Bourg G, *et al.* The genomic structure of *Brucella* strains isolated from marine mammals gives clues to evolution history within the genus. *Veterinary Microbiology*. 2007

19.- Foster G, *et al.* A review of *Brucella* sp. Infection of sea mammals with particular emphasis on isolates from Scotlan. *Vet. Microb* 2002; 90: 563-580

20.- Schroeder JP, *et al.* An infection by *Vibrio alginolyticus* in an Atlantic bottlenose dolphin housed in an open ocean pen. *J Wildl Dis* 1985; 21 (4): 437-438

21.- Beck BM, Rice CD. Serum antibody levels against select bacterial pathogens in Atlantic bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*, from Beaufort NC USA and Charleston harbor, Charleston, SC, USA. *Mar Environ Res* 2003; 55: 161-179

22.- Fowler ME. Cetacea (Whales, dolphin and porpoise) *Zoo and Wild Animal Medicine*. 5th ed. Philadelphia: Saunders, 1993.

23.- Kennedy S. Viral diseases. Health, Disease, and Rehabilitation. In: Dierauf AL, Gulland FMD, editors. *Handbook of Marine Mammal Medicine: Health, Disease, and Rehabilitation*. USA: CRC Press, 2001

24.- Ingraham JL, Ingraham CA. *Introduction to microbiology*. 2nd ed. McGraw-Hill, 2000

25.- Sorum H, Sunde M. Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. *Vet Res* 2001; 32: 227-241

26.- Tlaskalova HH, Stepankova R, *et al.* Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol Lett* 2004; 93: 97-108

27.- Wentworth CC, *et al.* Enteric commensal bacterial induce ERK pathway signaling via formyl peptide receptor (FPR)-dependant redox modulation of dual specific phosphatase 3 (DUSP 3)

- 28.- Kaser A, *et al.* Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol* 2010; 28:573-621
- 29.- Maloy KJ, Powrie F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature* 2011; 474: 298-306
- 30.- Rajilic SM, *et al.* Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. *Environ. Microbiol* 2007; 9: 2125-2136
- 31.- www.bergeys.org
- 32.- Gaboriau RV, *et al.* The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity* 2009; 31: 677-689
- 33.- Franke A, *et al.* Genome-wide meta-analysis increases to 17, the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Gen* 2010; 42: 1118-1125
- 34.- Macpherson AJ, Harris NL. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 478-485
- 35.- Glunder G, Influence of diet on the occurrence of some bacterial in the intestinal flora of wild and pet birds. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 2002; 109: 266-270.
- 36.- Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. 1998; *Clin Microbiol Rev* 11: 142-201.
37. - Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. 2004; *Nat Rev Microbiol* 2: 123-140.
- 38.- Ron EZ, Host specificity of septicemic *Escherichia coli*: human and avian pathogens. 2006; *Curr Opin Microbiol* 9: 28-32.
- 39.- Orskov F, Orskov I. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. 1992; *Can. J. Microbiol.* 38: 699-704
- 40.- Tenailon O, Skurnik D, *et al.* The population genetics of commensal *Escherichia coli*. 2010; *Nat. Rev. Microbiol.* 8: 207-217
- 41.- Selander PHA, *et al.* Genetic structure and variation in natural populations of *Escherichia coli*. In: Neidhardt FC, Ingraham JL, *et al.* (Eds.). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. American Society for Microbiology, Washington, DC. 1987; 1625-1648
- 42.- Savageau MA. *Escherichia coli* habitats, cell types, and molecular mechanisms of gene control. 1983; *Am. Nat.* (122): 732-744

- 43.- Weintraub A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. 2007; Medical Microbiology 56: 4-8.
- 44.- Johnson JR. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4(1): 80-128
- 45.- Cravioto A, Gross RJ, Scotland SM, Rowe B. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr Microbiol* 1979; 3:95–99.
- 46.- Carrillo DVMD. Caracterización de *E. coli* comensal del ciervo rojo (*Cervus elaphus*), (tesis de maestría). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México, 2011
- 47.- Escobar PP, Clermont O, *et al.* A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. 2004: *Mol. Biol. Evol.* 21: 1085-1094
- 48.- Scaletsky ICA, Silva MLM, and Trabulsi LR. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. 1984: *Infect. Immun.* 45:534–536.
- 49.- Lejeune JT, Hancock D, Wasteson Y, *et al.* Comparison of *E. coli* O157 and Shiga toxin-encoding genes (*stx*) prevalence between Ohio, USA and Norwegian dairy cattle. 2006: *International Journal of Food Microbiology.* 109:19-24.
- 50.- Mokady D., Gophna U., Ron EZ. Virulence factors of septicemic *Escherichia coli* strains. 2005: *Int. J. Med. Microbiol.* 295: 455-62.
- 51.- Ewing WH. Identification of *Enterobacteriaceae*. 1986: Elsevier Science Publishing. 4.
- 52.- Bern C, Martines J, *et al.* The magnitude of the global problem of diarrhoeal diseases: a ten-year update. *Bull.* 1992: World Health Organ. 70: 705-14.
- 53.- Francis DH. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in pigs and its diagnosis. 2002: *J. Swine Health Prod.* 10(4):171–175.
- 54.- Moon HW. Colonization factor antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli* in animals. 1990: *Curr. Top. Microb. Immun.* 151:147–165.
- 55.- Wilson MR, Francis DH. Fimbriae and enterotoxins associated with *Escherichia coli* serogroups isolated from pigs with colibacillosis. 1986: *Am. J. Vet. Res.* 47:213–217.
- 56.- Graaf FK, Mooi FR. The fimbrial adhesins of *Escherichia coli*. 1986: *Adv. Microbiol. Physiol.* 28:65–143.

- 57.- Erickson AK, Willgohs JA, *et al.* Identification of two porcine brush border glycoproteins that bind the K88ac adhesin of *Escherichia coli* and correlation of these glycoproteins with the adhesive phenotype. 1992: Infect. Immun. 60:983–988.
- 58.- Smeds A, Hemmann K, *et al.* Characterization of the adhesin of *Escherichia coli* F18 fimbriae. 2001: Infect. Immun. 69:7941–7945.
- 59.- Nagy B, Fekete PZ. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. 1999: Vet Res 30, 259–284.
- 60.- Hirayama T. Heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*, p. 281–296. In Moss J, Iglewski B, *et al.* (ed.). Bacterial toxins and virulence factors in disease. 1995: Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.
- 61.- Sears CL, and Kaper JB. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. 1996: Microbiol. Rev. 60:167–215.
- 62.- Dreyfus LA, Frantz JC, and Robertson DC. Chemical properties of heat-stable enterotoxins produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* of different host origins. 1983: Infect. Immun. 42:539–548.
- 63.- Vieira N, Bates SJ, Owen D, *et al.* High prevalence of Enteroinvasive *Escherichia coli* isolated in a remote region of Northern coastal Ecuador. 2007: J. Trop. Med. Hyg. 76(3): 528-533.
- 64.- Sousa CP, Dubreuil JD. Distribution and expression of the *astA* gene (EAST1 toxin) in *Escherichia coli* and *Salmonella*. 2001: Int. J. Med. Microbiol. 291: 15-20.
- 65.- Nataro JP, Kaper JB, *et al.* Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to Hep-2 cells. 1987: J. Pediatr. Infect. Dis. 6: 829-831.
- 66.- Nataro JP, Deng Y, *et al.* Aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli* requires two unlinked plasmid regions. 1993: Infect. Immun. 61: 1126-1131.
- 67.- Nataro JP, Deng Y, *et al.* Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. 1992: Infect. Immun. 60: 2297-2304.
- 68.- Nataro JP. Enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. In Blaser MJ, Smith PD, Ravdin JI, Greenberg HB, Guerrant RL, (Eds.), Infections of the Gastrointestinal Tract. 1995: New York: Raven Press Ltd. 727-737.
- 69.- Tobe T, Hayashi T, Han CG *et al.* Complete DNA sequence and structural analysis of the enteropathogenic *Escherichia coli* adherence factor plasmid. 1999: Infect Immun. 67(10):5455-62.

- 70.- Trabulsi LR, Keller R, Gomes TAT. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. 2002: Emerg Infect Dis 8: 508-513.
- 71.- Servin AL. Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. 2005: Clin. Microbiol. Rev. 18: 264–292.
- 72.- Le Bouguéne C, Lalioui L, Du Merle L, et al. Characterization of AfaE adhesins produced by extraintestinal and intestinal human *Escherichia coli* isolates: PCR assays for detection of *afa* adhesins that do or do not recognize Dr blood group antigens. 2001: J Clin Microbiol. 39:1738-45.
- 73.- Alam MJ, Zurek L. Seasonal prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in beef cattle feces. 2006: J Food Prot. 69(12): 3018-3020
- 74.- Avery LM, Williams AP, et al. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in waters from lakes, rivers, puddles and animal-drinking troughs. 2008: Sci Total Environ. 389(2-3):378-385
- 75.- Buchanan RL, Doyle MP. Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *E.coli*. 1997: Food Technol. 51(10): 69-76
- 76.- Kobayashi H, et al. Prevalence and characteristics of intimin- and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from gulls, pigeons and broilers in Finland. 2002: J Vet. Med. Sci. 64: 1071-1073.
- 77.- Schmidt H, Scheef J, et al. A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolate from pigeons. 2000: Appl. Environ. Microbiol. 66: 1205-1208.
- 78.- Wallace JS, Cheasty T, Jones K. Isolation of verocytotoxin producing *Escherichia coli* O157 from wild birds. 1997: J. Appl. Microbiol. 82: 399-404.
- 79.- Kobayashi H, et al. Prevalence and Characteristics of *eae*- and *stx*-Positive Strains of *Escherichia coli* from Wild Birds in the Immediate Environment of Tokyo Bay. 2009: Appl. Environ. Microbiol. 75(1): 292-295.
- 80.- Jenkins C, Evans J, et al. *Escherichia coli* serogroup O26—a new look at an old adversary. 2008: J. Appl. Microbiol. 104(1): 14-25.
- 81.- Karama M, Johnson RP, et al. Phenotypic and genotypic characterization of verotoxin-producing *Escherichia coli* O103:H2 isolates from cattle and humans. 2008: J Clin Microbiol. 46(11): 3569-3575.
- 82.- Lee JH, Hur J, et al. Occurrence and characteristics of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 and O111 in calves associated with diarrhea. 2008: Vet J. 176(2): 205-209.

- 83.- Leomil L, *et al.* Characterization of two major groups of diarrheagenic *Escherichia coli* O26 strains which are globally spread in human patients and domestic animals of different species. 2005; FEMS Microbiol Lett. 249(2): 335-342.
- 84.- Levine MM. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. 1987; J. Infect. Dis. 155: 377-389.
- 85.- Milon A, Oswald E, De Rycke J. Rabbit EPEC: a model for the study of enteropathogenic *Escherichia coli*. 1999; Vet. Res. 30: 203-219.
- 86.- Gyles CL, Fairbrother JM. Pathogenesis of bacterial Infections in Animals. 2004; Blackwell Publishing. 3: 193-195.
- 87.- Herzer PJ, Inouye M, *et al.* Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. 1990; J. Bacteriol. 172: 6175-6181.
- 88.- Lingwood CA. Role of verotoxin receptors in pathogenesis. 1996; Trends Microbiol. 4:147-153.
- 89.- O'Brien AD, Tesh VL, *et al.* Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis. 1992; Microbiol. Immunol. 180:65–94.
- 90.- Kaper JB, Elliott S, *et al.* Attaching and effacing intestinal histopathology and the locus of enterocyte effacement. In: Kaper JB, O'Brien AD (Eds) *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. ASM Press, Washington, DC, 1998. pp 163-182.
- 91.- Brown JE, Ussery MA, *et al.* Inhibition of protein synthesis by Shiga toxin. Activation of the toxin and inhibition of peptide elongation. 1980; FEBS Lett. 117:84–88.
- 92.- Yamamoto T, Kaneko M, *et al.* Actin accumulation associated with clustered and localized adherence in *Escherichia coli* isolated from patients with diarrhea. 1994; Infect. Immun. 62:2917–2929.
- 93.- Tenailon O, Skurnik D, *et al.* The population genetics of commensal *Escherichia coli*. 2010; Nature Reviews. 8: 207-217.
- 94.- Sandvig K, Van Deurs B. Endocytosis and intracellular sorting of ricin and Shiga toxin. 1994; FEBS Lett. 346:99-102.
- 95.- Turner SM, Scott-tucker A, Cooper LM, Henderson IR. Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer enterotoxigenic *Escherichia coli*. 2006; FEMS Microbiol. Lett. 263: 10–20.

- 96.- Armstrong GD, Rowe PC, Goodyer P, *et al.* A phase I study of chemically synthesized verotoxin (Shiga-like toxin) Pk-trisaccharide receptors attached to chromosorb for preventing hemolytic-uremic syndrome. 1995; J Infect Dis. 171:1042-1045.
- 97.- Jerse AE, Yu J, Tall BD, Kaper JB. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. 1990; Proc Natl Acad Sci USA. 87:7839-7843.
- 98.- Donnenberg MS, Tzipori S, *et al.* The role of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment *in vitro* and in a porcine model. 1993; J. Clin. Investig. 92:1418–1424.
- 99.- Frankel G, Phillips AD, *et al.* Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. 1998; Mol. Microbiol. 30:911–921.
- 100.- Roe AJ, Hoey DE, Gally DL. Regulation, secretion and activity of type III-secreted proteins of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157. 2003; Biochem. Soc. Trans. 31:98–103.
- 101.- Zhang WL, Bielaszewska M, Bockemuhl J, *et al.* Molecular analysis of H antigens reveals that human diarrheagenic *Escherichia coli* O26 strains that carry the *eae* gene belong to the H11 clonal complex. 2000; J Clin Microbiol. 38:2989-2993.
- 102.- Urdahl AM, Beutin L, Skjerve E, *et al.* Animal host associated differences in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from sheep and cattle on the same farm. 2003; J Appl Microbiol. 95:92-101.
- 103.- Giron JA, Ho AS, Schoolnik GK. Characterization of fimbriae produced by enteropathogenic *Escherichia coli*. 1993; J Bacteriol. 175:7391–7403.
- 104.- Son WG, Graham TA, Gannon VPJ. Immunological characterization of *Escherichia coli* O157:H7 intimin γ 1. 2002; Clin Diagn Lab Immunol. 9:46-53
- 105.- Tramuta C, Robino P, Oswald E, Nebbia P. Identification of intimin alleles in pathogenic *Escherichia coli* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. 2008; Vet. Res. Commun. 32: 1-5.
- 106.- Zhang WL, Kohler B, Oswald E, *et al.* Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. 2002; J. Clin. Microbiol. 40: 4486-4492.
- 107.- Gordillo R, Córdoba JJ, Andrade MJ, Luque MI, Rodríguez M. Development of PCR assays for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in meat products. 2011; J. Elsevier. Meat Science. 88: 767-773.

- 108.- Liu Y, Gong Z, Morin N, Pui O, *et al.* Electronic deoxyribonucleic acid (DNA) microarray detection of viable pathogenic *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, and *Salmonella* Typhi. 2006; *Anal. Chim. Acta* 578:75–81.
- 109.- Shimizu T, Yamasaki S, Tsukamoto T, Takeda Y. Analysis of the genes responsible for the O-antigen synthesis in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157. 1999; *Microb. Pathog.* 26:235–247.
- 110.- Wang L, Reeves PR. Organization of *Escherichia coli* O157 O antigen gene cluster and identification of its specific genes. 1998; *Infect. Immun.* 66:3545–3551.
- 111.- Bourdet-sicard R, Rüdiger M, Jockush BM, *et al.* Binding of the *Shigella* protein IpaA to vinculin induces F-actin depolymerization. 1999; *J. EMBO.* 18: 5853–5862.
- 112.- Ogawa M, Handa Y, Ashida H, Suzuki M, Sasakawa C. The versatility of *Shigella* effectors. 2008; *Nature Reviews Microbiology.* 6: 11-16.
- 113.- Selander RK, Caugant DA, Ochman H, *et al.* Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. 1986; *Appl Environ Microbiol.* 51:873-884.
- 114.- Duriez P, Clermont O, Bonacorsi S, *et al.* Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. 2001; *Microbiology.* 147:1671–1676.
- 115.- Gordon DM. The influence of ecological factors on the distribution and genetic structure of *Escherichia coli*. In *Escherichia Coli and Salmonella Typhimurium: Cellular and Molecular Biology*. Neidhardt, F., *et al.* (eds). Washington, DC, USA: American Society for Microbiology. 2004. [<http://www.ecosal.org/ecosal/index.jsp>]
- 116.- Gordon DM, Cowling A. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. 2003; *Microbiology.* 149:3575-3586.
- 117.- Johnson JR and Stell AL. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. 2000; *J Infect Dis.* 181:261-272.
- 118.- Picard B, Garcia JS, *et al.* The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. 1999; *Infect Immun.* 67:546-553.
- 119.- Bingen E, Picard B, *et al.* Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strain. 1998; *J Infect Dis.* 177:642-650.

- 120.- Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. 2000; Appl Environ Microbiol. 66:4555-4558.
- 121.- Escobar PP, Le MA, Le GT. Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. 2006; Environ Microbiol. 8:1975-1984.
- 122.- Arredondo GJL, Figueria DR, *et al.* Comparison of short-term treatment regimen of ciprofloxacin versus long-term treatment regimens of uncomplicated lower urinary tract infections: a randomized, multicentre, open-label, prospective study. 2004; J. Antimicrob Chemother. 54 (4): 840-843.
- 123.- Buck JD, Wells RS, *et al.* Aerobic microorganisms associated with free-ranging bottlenose dolphins in coastal gulf of Mexico and Atlantic ocean waters. 2006. Wildlife Diseases. 42(3): 538-541.
- 124.- Howard EB, Britt JO, *et al.* Bacterial diseases. Pathobiology of marine mammal diseases. 1983; CRC Press, Boca Raton. Vol.2; 69-118.
- 125.- Wommack KE, Colwell R. R. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. 2000; Microbiol Mol Biol Rev. 64; 69-114.
- 126.- Watson SV, Smith CR, Jensen ED. Primary bacterial pathogens in bottlenose dolphins *Tursiops truncatus*: needles in haystacks of commensal and environmental microbes. 2008; Diseases of aquatic organisms. Vol. 79; 87-91.
- 127.- Elk MW, Bildt BE, *et al.* *Escherichia coli* Septicemia Associated with Lack of Maternally Acquired Immunity in a Bottlenose Dolphin Calf. 2007; Vet Pathol. 44; 88-90.
- 128.- Pitchner O, Saunders N, Owen R. Rapid Extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. 1989; Lett App Microbiol. 8: 151-156.
- 129.- DebRoy C, Roberts. Screening petting zoo animals for the presence of potentially pathogenic *Escherichia coli*. 2006; J. Vet Diagn Invest. 18: 597-600.
- 130.- Orskov F, Orskov I. Serotyping of *Escherichia coli*. 1984; In Methods in Microbiology. 14: 43–112. Edited by T. Bergan. London: Academic Press.
- 131.- Bogaard AE, Stobberingh. Epidemiology of resistance to antibiotics Links between animals and humans. 2000; International Journal of Antimicrobial Agents. 14: 327-335.
- 132.- U.S. Census Bureau, United States Census, 2000, <http://www.census.gov/>.

- 133.- Miller MA, Byrne BA, Jang SS, *et al.* Enteric bacterial pathogen detection in southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*) is associated with coastal urbanization and freshwater runoff. 2010; Veterinary Research. 41: (1).
- 134.- Österblad M, Hakanen A, *et al.* A between-Species Comparison of Antimicrobial Resistance in Enterobacteria in Fecal Flora. 2000; American Society for Microbiology. 44; (6): 1479-1484.
- 135.- Carattoli A. Importance of integrons in the diffusion of resistance. 2001; Vet Res. 32: 243–259.
- 136.- Dobrindt, U. (Patho-)Genomics of *Escherichiacoli*. 2005; Int.J.Med.Microbiol. 295: 357–371.
- 137.- Sato M, Ahmed AM, *et al.* Isolation and molecular characterization of multidrug-resistant Gram-negative bacteria from imported flamingos in Japan. 2009; Acta. Vet. Scan. 51; (46): 1-5.
- 138.- Ahmed AM, Motoi Y, *et al.* Zoo Animals as Reservoirs of Gram-Negative Bacterial Harboring Integrons and Antimicrobial Resistance Genes. 2007; Applied and Environmental Microbiology. 73; (20): 6686-6690.
- 139.- Bourjilat F, Bouchrif B, *et al.* Emergence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in community-acquired urinary infections in Casablanca, Morocco. 2011; J Infect Dev Ctries. 5; (12): 850-855.
- 140.- Rodriguez AG. Principales características y diagnóstico de los grupo patógenos de *Escherichia coli*. 2002; Salud Pública de México. 44(5): 464-475.
- 141.- Rice LB. The clinical consequences of antimicrobial resistance. 2009; Curr. Opin. Microbiol. 12:476–481.
- 142.- Edge TA, Hill S. Occurrence of antibiotic resistance in *Escherichia coli* from surface waters and fecal pollution sources near Hamilton, Ontario. 2005; Can. J. Microbiol. 51:501–505.
- 143.- Literak I, Dolejska M, *et al.* Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Bacteria, Including Strains with Genes Encoding the Extended-Spectrum Beta-Lactamase and QnrS, in Waterbirds on the Baltic Sea Coast of Poland. 2010; Applied and Environmental Microbiology. 76; (24): 8126-8134.
- 144.- Luna GM, Vignaroli C, *et al.* Extraintestinal *Escherichia coli* Carrying Virulence Genes in Coastal Marine Sediments. 2010; Applied and Environmental Microbiology. 76; (17): 5659-5668.
- 145.- Buck JD, Overstrom NA, Patton GW, Anderson HF, Gorzelany JF. Bacteria associated with stranded cetaceans from the northeast USA and southwest Florida Gulf coasts. 1991; Diseases of Aquatic Organisms. 10; (2): 147–152.

- 146.- Schaefer AM, Goldstein JD, Reif JS, Fair PA, Bossart GD. Antibiotic-resistant organisms cultured from atlantic bottlenose dolphins (*tursiops truncatus*) inhabiting estuarine waters of charleston, sc and Indian River Lagoon, FL. 2009; EcoHealth. 6; (1): 33–41.
- 147.- Greig TW, Bemiss JA, Lyon BR, Bossart GD, Fair PA. Prevalence and diversity of antibiotic resistant *Escherichia coli* in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the Indian River Lagoon, Florida, and CharlestonHarbor area, South Carolina. 2007; AquaticMammals. 33: 185–194.
- 148.- Schaefer AM, Bossart GD, Mazzoil M, Fair PA, Reif JS. Risk Factors for Colonization of *E. coli* in Atlantic Bettlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*) in the Indian River Lagoon, Florida. 2011; J. Environmental and Public Health. 10: 1-8.
- 149.- Walk ST, Alm EW, Calhoun LM, *et al.* Genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* isolated from freshwater beaches. 2007; Environ Microbiol. 9:2274-2288.
- 150.- Dean P, Kenny B. The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell. 2009; Curr Opin Microbiol. 12:101–109.
- 151.- Buysse JM, Stover CK, *et al.* Molecular cloning of invasion plasmid antigen (ipa) genes from *Shigella flexneri*: analysis of ipa gene products and genetic mapping. 1987; J Bacteriol. 169: 2561-2569.
- 152.- Johnson JR, Delavari P, Kuskowski M, Stell AL. Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. 2001; J Infect Dis. 183:78-88.
- 153.- Boyd EF and Hartl DL. Chromosomal regions specific to pathogenic isolates of *Escherichia coli* have a phylogenetically clustered distribution. 1998; J. Bacteriol. 180:1159–1165.
- 154.- Camila C, Pires MM, *et al.* *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. 2010; BMC Microbiology. 161: 1-10.
- 155.- Baldy CK, Mackiewics P, Stosik M. Phylogenetic background, virulence gene profiles, and genomic diversity in commensal *Escherichia coli* isolated from ten mammal species living in one zoo. 2008; Vet Microbiol. 131:173-184.
- 156.- Ahmed W, Hodgers L, *et al.* Occurrence of Intestinal and Extraintestinal Virulence Genes in *Escherichia coli* Isolates from Rainwater Tanks in Southeast Queensland, Australia. 2011; Applied and Environmental Microbiology. 77; (20): 7394-7400.

- 157.- Molina LJ, Aparicio OG, *et al.* Drug resistance, serotypes, and phylogenetic groups among uropathogenic *Escherichia coli* including O25-ST131 in Mexico City. 2011; J Infect Dev Ctries. 5; (12): 840-849.
- 158.- Cortés P, Blanc V, *et al.* Isolation and Characterization of Potentially Pathogenic Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* Strains from Chicken and Pig Farms in Spain. 2010; Applied and Environmental Microbiology. 76; (9): 2799-2805.
- 159.- Martínez MM, Mora A, *et al.* Similarity and Divergence among Adherent-Invasive *Escherichia coli* and Extraintestinal Pathogenic *E. coli* Strains. 2009; J Clinical Microbiology. 47; (12): 3968-3979.
- 160.- Coque TM, Novais A, *et al.* Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15. 2008; Emerg. Infect. Dis. 14:195–200.
- 161.- Nicolas-Chanoine MH, Blanco J, *et al.* Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. 2008; J. Antimicrob. Chemother. 61:273–281.
- 162.- Norasak K, Terrance MA, *et al.* Microbiological Characterization of Lamb Carcasses at Commercial Processing Plants in the United States. 2007; J of Food Protection. 70; (8): 1811-1819.
- 163.- Fukuyama M, Imagawa Y, *et al.* Contamination of healthy livestock with verocytotoxin producing *Escherichia coli* (VTEC), the first isolation from goats in Japan. 1994; Kansenshogaku Zasshi. 68; (4): 508-512.
- 164.- Chart H, Smith HR, *et al.* Serological identification of *Escherichia coli* O157:H7 infection in haemolytic uraemic syndrome. 1991; Lancet. 337; (8734): 138-140.
- 165.- Fratamico MP, Bagi KL, *et al.* Prevalence and Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Swine Feces Recovered in the National Animal Health Monitoring System's Swine 2000 Study. 2004; Applied and Environmental Microbiology. 70; (12): 7173-7178.
- 166.- Krause G, Zimmermann S, *et al.* Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin-(*eae*) gene positive *Escherichia coli* types. 2004; J Elsevier Vet. Microbiology. 106: 87-95.