



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA  
SALUD ANIMAL**

**CARACTERIZACIÓN DE *E. coli* COMENSAL**

**DEL CIERVO ROJO (*Cervus elaphus*)**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**MARIANA DAFNE CARRILLO DEL VALLE**

**TUTOR PRINCIPAL**

**RIGOBERTO HERNÁNDEZ CASTRO**

**COMITÉ TUTORAL**

**CECILIA ROSARIO CORTÉS**

**EFRÉN DÍAZ APARICIO**

**México D.F**

**2011**



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.

## Dedicatoria

Dedico este trabajo a una persona que en un principio no creía mucho en sí misma, pero el tiempo le hizo ver que todo es cuestión de confiar en uno mismo.

## Agradecimientos

A usted Dr. Rigoberto, por haber confiado en mí cuando más lo necesitaba, por darme la oportunidad de reinventarme, por su enseñanza pero sobre todo por su infinita paciencia que me permitieron concluir con este capítulo, a usted gracias.

A usted Dra. Cecilia, cuyas enseñanzas me permitieron ser una estudiante más crítica, capaz y comprometida con mi trabajo.

A usted Dr. Efrén, cuyos consejos me permitieron escribir con éxito esta tesis y cuyo buen humor ante todas las situaciones, me permitió ser más positiva.

A todos mis compañeros de laboratorio cuyas aportaciones por pequeñas que fuesen me ayudaron a ser mejor en mi trabajo, gracias a todos ustedes.

A CONACYT que me brindó apoyo económico sin el cual habría sido imposible continuar con mis estudios.

## Resumen

*Escherichia coli* es un importante comensal de la microbiota intestinal del hombre y los animales; no obstante, algunas cepas son de gran relevancia en diversas patologías intestinales y extraintestinales. El objetivo de este trabajo fue determinar las características serológicas, grupos filogenéticos, resistencia microbiana y factores de virulencia en 22 aislamientos de *E. coli* comensal del tracto gastrointestinal del ciervo rojo (*Cervus elaphus*). La determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) demostró que la mayoría de los aislamientos fueron sensibles a todos los quimioterapéuticos probados y tan solo 3 aislamientos mostraron resistencia. En relación a los grupos filogenéticos se encontraron los cuatro filo-grupos, 6 muestras pertenecieron al grupo A, 4 al grupo B1, 3 al grupo B2 y 9 al grupo D. Con respecto a los factores de virulencia se identificaron los genes *stx1* (17/22), *stx2* (12/22), *bfp* (6/22), *st* (12/22) y *eae* (4/22). Los serotipos encontrados fueron 5 aislamientos positivos a O6, 3 a O70, 3 a O23, 6 no fueron identificados y los serotipos O5, O75, O91, O38 y solo se obtuvo un aislamiento rugoso, para los antígenos flagelares, se identificaron 7 aislamientos no móviles, 5 que pertenecieron a H21, 4 al H34, 1 al H9, 2 para H16 y H25 y un aislamiento no fue tipificable (NT). El presente estudio representa el primer trabajo de caracterización de cepas de *E. coli* comensal en ciervo rojo (*Cervus elaphus*), realizado en México.

## Abstract

*Escherichia coli* is an important commensal in human and animal intestinal microbiota. However, some strains are of great relevance to a variety of intestinal pathologies. The objective of this work was to determine serologic characteristics, phylogenetic groups, resistance, and virulence factors of 22 isolates of commensal *E. coli* from the gastrointestinal tract of the red deer (*Cervus elaphus*). The determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) showed that the majority of isolates were sensible to all the chemotherapeutics proved and only 3 isolates showed resistance. In relation to the phylogenetic groups, we found the 4 phylogenetic groups, 6 samples belonged to group A, 4 to group B1, 3 to group B2 and 9 to group D. In respect to the virulence factors the genes *stx1* (17/22), *stx2* (12/22), *bfp* (6/22), *st* (12/22) y *eae* (4/22) were identified. The serotypes were 5 positive O6 strains, 3 positive O70, 3 positive O23, and 6 were non typificable and from serotypes O5, O75, O91, O38 and rough only one isolate was positive, for the flagellar antigen, 7 isolates were identified as non mobile, 5 belonged to H21, 4 to H34, 1 to H9, 2 to H16 and H25 and 1 isolate was non typificable (NT).

The present study represents the first work in characterization of commensal *E. coli* strains in red deer (*Cervus elaphus*) from Mexico.

## Contenido

<b>1</b>	<b>Introducción</b>	10
1.1	<i>Escherichia coli</i>	11
1.2	Filogenia de <i>Escherichia coli</i>	12
1.3	Tipos de <i>E. coli</i>	14
1.4	<i>Escherichia coli</i> comensal	14
1.5	Patovares y patogenésis de <i>Escherichia coli</i> intestinal	16
1.5.1	<i>Escherichia coli</i> Enteropatógena (EPEC)	16
1.5.2	<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica (EHEC)	17
1.5.3	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigenica (ETEC)	18
1.5.4	<i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa (EAEC)	19
1.5.5	<i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva (EIEC)	19
1.6	Genes de Virulencia	19
1.6.1	Toxinas Shiga ( <i>stx1</i> , <i>stx2</i> )	19
1.6.2	Toxina termo lábil (Lt)	20
1.6.3	Toxina termo-estable (St)	21
1.6.4	Intimina ( <i>eae</i> )	22
1.6.5	<i>rfb</i> <sub>E<sub>O157</sub></sub>	22
1.6.6	<i>fli</i> <sub>C<sub>H7</sub></sub>	22
1.6.7	<i>bfp</i>	22
1.6.8	<i>ipaH</i>	23
<b>2</b>	<b>Justificación</b>	23
<b>3</b>	<b>Hipótesis</b>	23

<b>4. Objetivo General</b> .....	23
4.1 Objetivos específicos.....	24
<b>5. Material y Métodos</b> .....	24
5.1 Colección de muestras.....	24
5.1.2 Aislamientos y Ensayo de concentración mínima inhibitoria (MIC).....	24
5.1.3 Extracción de DNA.....	25
5.1.4 Serotipos.....	25
5.1.5 Determinación de grupos filogenéticos.....	26
5.1.6 Identificación de factores de virulencia.....	26
<b>6. Resultados</b> .....	28
6.1 Identificación de aislamientos y resistencia a quimioterapéuticos.....	28
6.2 Grupos Filogenéticos.....	30
6.3 Genes de virulencia.....	31
6.4 Serotipificación.....	34
<b>7. Discusión</b> .....	34
<b>8. Conclusión</b> .....	44
<b>9. Referencias</b> .....	45

## **Lista de cuadros**

**Cuadro 1.** Características de *Escherichia coli* comensal en la microbiota

**Cuadro 2.** Iniciadores para la identificación de factores de virulencia

**Cuadro 3.** Perfil de resistencia en los 22 aislamientos de ciervo rojo

**Cuadro 4.** Resultados globales del análisis sobre grupos filogenéticos, factores de virulencia y serotipificación

**Cuadro 5.** Asociación de los resultados de grupos filogenéticos, genes de virulencia, sensibilidad antimicrobiana y serotipificación

## **Lista de Figuras**

**Figura 1.** Árbol dicotómico interpretativo de los diferentes grupos filogenéticos de *E. coli*

**Figura 2.** Amplificación de los genes *lt* y *st*

**Figura 3.** Amplificación del gen *bfp*

**Figura 4.** Amplificación del gen *stx2*

**Figura 5.** Amplificación del gen *stx1-eae*

## 1. INTRODUCCIÓN

En México, la crianza y aprovechamiento del ciervo rojo (*Cervus elaphus*) puede hacerse de manera legal solo en las Unidades de Manejo y Aprovechamiento Sustentable (UMAS), las cuales promueven esquemas alternativos de producción compatibles con el cuidado del ambiente<sup>1</sup>. El ciervo rojo (*Cervus elaphus*) pertenece a la familia *Cervidae*, es el venado más grande introducido en México y se considera una especie exótica. Su hábitat principal son los bosques de encino y mixtos (encino y pino) con pastizales naturales. Actualmente la especie se encuentra introducida en las UMAS, principalmente en el Norte de México<sup>1</sup>.

La carne de venado es consumida por cazadores, sus familias y conocidos. Sólo cantidades mínimas se venden en el comercio regular. Por lo tanto, sólo una pequeña parte de esta carne está sujeta a inspección sanitaria. Los animales son cazados y despiezados por lo general al aire libre o en graneros, garajes, sótanos o cocinas. Este tipo de prácticas en gran medida aumenta el riesgo de contaminación fecal de la carne, reduciendo la calidad del producto. Las heces de cérvidos silvestres pueden contaminar las aguas superficiales, que a su vez puede llegar a ser utilizada como agua potable para seres humanos o animales domésticos<sup>2</sup>. Cuando se manejan especies silvestres, se debe tener en cuenta el posible efecto negativo sobre las poblaciones nativas y su hábitat, tales como posibles enfermedades que puedan ser transmitidas por los ciervos a la fauna silvestre, animales domésticos e incluso para el hombre, de este efecto no se tienen estudios en México<sup>1</sup>.

Bacterias enteropatógenas como *E. coli*, se han identificado en muestras de heces de animales domésticos y silvestres<sup>3-4</sup>, por lo que, el posible papel de ciervos silvestres en la epidemiología de *E. coli* ha empezado a recibir mayor atención, más aún cuando algunas infecciones humanas se han asociado con carne de venado mal cocinada o procesada<sup>5-6</sup>.

## 1.1 *Escherichia coli*

Bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*<sup>7</sup>, predominante de la microbiota normal del colón de los vertebrados, normalmente coloniza el tracto gastrointestinal dentro de las primeras horas de vida<sup>8-9</sup>, la bacteria obtiene nutrimentos y beneficios sin causar ningún tipo de enfermedad y a cambio produce nutrientes como vitamina K, riboflavina y vitamina B<sub>12</sub><sup>10-11</sup>.

## 1.2 Filogrupos de *Escherichia coli*

Herzer y colaboradores<sup>12</sup> desarrollaron un sistema de clasificación basado en el análisis de los patrones de movilidad electroforética de 38 enzimas metabólicas de la estructura poblacional de una colección de 72 cepas de referencia de *E. coli* de diversos orígenes. Los análisis filogenéticos de esta colección revelaron 4 grupos filogenéticos principales, designados como A, B1, B2 y D además de dos grupos accesorios denominados C y E<sup>12-13</sup>.

Estudios de bibliotecas genómicas realizados en cepas pertenecientes a los diferentes grupos filogenéticos pusieron en evidencia genes o fragmentos de DNA específicos de cada grupo, sugiriendo así, su uso como marcadores moleculares de cada uno de los grupos filogenéticos existentes. Con base en estos estudios, Clermont y colaboradores<sup>14</sup> en el año 2000 desarrollaron una técnica de detección de los grupos filogenéticos de *E. coli*, basada en la presencia o ausencia de los genes, *chuA* (necesario para el transporte del grupo hemo en *E. coli* O157:H7 enterohemorrágica) y *yjaA* (identificado en el genoma de *E. coli* K-12, con función desconocida) y un fragmento de DNA llamado TSPE.C2 que codifica como parte de una esterasa lipasa<sup>14</sup>.

Los genes utilizados para determinar los grupos filogenéticos tienen una relación dicotómica que se utiliza para distinguir los cuatro grupos filogenéticos a partir de la identificación de las regiones génicas mencionadas, mediante la amplificación de DNA por la reacción en cadena de la polimerasa (Fig. 1).

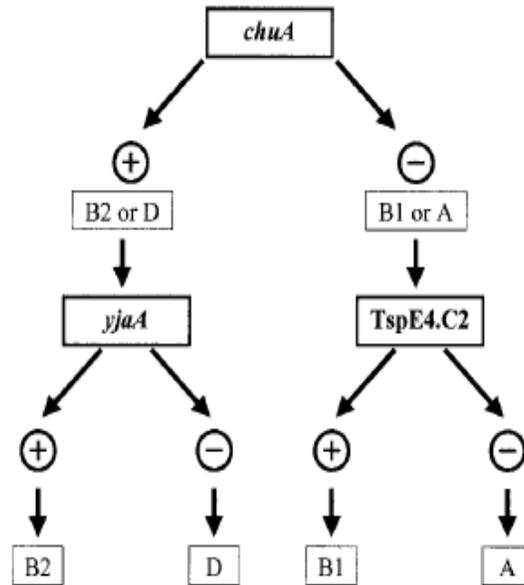


Fig. 1. Árbol dicotómico interpretativo de los diferentes grupos filogenéticos de *E. coli* en función de la presencia o ausencia de los genes *chuA*, *yjaA* y del fragmento TSPE4.C2. Tomado de Clermont et al., 2000.

Posteriormente Tenaillon y colaboradores en el 2010<sup>9</sup>, basándose en los estudios de Clermont y colaboradores<sup>14</sup> mencionan que la técnica de PCR triple permite asignar a las cepas uno de los cuatro grupos filogenéticos principales (A, B1, B2 y D), ya que desde su introducción en el año 2000, ha sido ampliamente utilizado debido a su simplicidad y rapidez. El método, basado en un PCR triple, utiliza la combinación de los genes: *chuA*, *yjaA* y TspE4.C2, la precisión con la que el método asigna correctamente las cepas a su grupo filogenético es del 99%<sup>15</sup>.

Los grupos A y B1 se consideran grupos “hermanos” y el grupo B2 es considerado por algunos como el representante del linaje ancestral de *E. coli*<sup>16</sup>. Las cepas de los cuatro grupos difieren en sus características fenotípicas, incluyendo su capacidad para utilizar diferentes carbohidratos, resistencia a los antibióticos y tasa de crecimiento<sup>12</sup>. El tamaño del genoma varía entre los cuatro filo-grupos, las cepas que pertenecen a los grupos A y B1 tienen genomas más pequeños comparados con las cepas que pertenecen a los grupos B2 o D<sup>17</sup>. La distribución (presencia/ausencia) de una variedad de genes que se cree caracterizan a una cepa para causar enfermedad extraintestinal también varía entre las cepas de los cuatro filo-grupos<sup>18</sup>.

### 1.3 Tipos de *E. coli*

Dentro de la biota existen cepas de *E. coli* que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos. Las cepas de *E. coli* de importancia biológica se clasifican en tres grupos: cepas comensales, patógenas intestinales (entéricas o diarreogénicas) y cepas patógenas extraintestinales. La patogenicidad de estos tipos de *E. coli* se debe a que cuentan con factores de virulencia específicos que le confieren mayor habilidad para adaptarse a un nuevo nicho ocasionando un amplio espectro de enfermedades. *E. coli* patógena intestinal se divide en seis patotipos: *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC). Las cepas patógenas intestinales se incluyen en los grupos filogenéticos B2, D o en linajes no clasificados<sup>19</sup>. Las cepas patógenas de *E. coli* extraintestinales, se denominan ExPEC y pueden presentarse en individuos de cualquier edad e involucra casi cualquier órgano o sitio anatómico ocasionando infecciones de tracto urinario (ITU), meningitis, infecciones intrabdominales, neumonía, infección intravascular, osteomielitis e infección de tejido blando y colibacilosis en aves. Actualmente las cepas extraintestinales han sido clasificadas como *E. coli* asociada a meningitis (MNEC), *E. coli* patógena aviar (APEC) y *E. coli* uropatógena (UPEC)<sup>20-21</sup>. Existen escasos estudios que caracterizan cepas comensales de *E. coli*, por lo cual la importancia de estudiar cepas comensales reside en explicar cómo bacterias comensales se convierten en patógenas y pueden representar problemas de salud en humanos, animales domésticos y silvestres<sup>22</sup>.

### 1.4 *Escherichia coli* comensal

*Escherichia coli* tiene la interesante característica de ser tanto un comensal intestinal como un patógeno versátil, causando enfermedades intrainestinales como extraintestinales. Por lo que se le considera el candidato perfecto para estudiar la transición entre comensalismo y patogenicidad y como la estrecha relación entre una bacteria y su huésped puede oscilar entre el mutualismo, comensalismo y oportunismo o incluso de patogénesis especializada. Aunque las cepas patógenas han sido extensivamente investigadas, pocos estudios se han centrado en las cepas comensales, ahondar en su conocimiento podría permitir entender los mecanismos de virulencia y resistencia a los antimicrobianos de las cepas patógenas. La presión de selección

en los hábitats de las cepas comensales pueden promover la presencia de factores de virulencia y resistencia a los antibióticos, lo que hace de las cepas de *Escherichia coli* comensal posibles reservorios de cepas virulentas y resistentes<sup>9</sup>.

La definición de *E. coli* comensal reside en la relación entre esta bacteria y el huésped, en el cual uno de los dos organismos se beneficia de la interacción entre ellos, mientras que el otro no es ni perjudicado ni beneficiado. El huésped proporciona nutrientes, ambiente estable y protección contra el estrés ambiental, transporte y diseminación a la bacteria, ella por su parte provee de algunos beneficios al huésped como son el prevenir la colonización por patógenos a través de la producción de bacteriocinas y otros mecanismos<sup>9</sup>.

Las cepas de *E. coli* comensal constituyen gran parte de la microbiota del intestino de humanos sanos, mamíferos y aves. Son cepas perfectamente adaptadas a la coexistencia con su hospedador y no desarrollan sintomatología en dicho huésped, excepto en casos de inmunosupresión. Generalmente pertenecen a los grupos filogenéticos A y B1 y se caracterizan por carecer de los factores de virulencia que están presentes en cepas patógenas<sup>19</sup>. En el tracto digestivo, las cepas comensales de *E. coli* se encuentran en el intestino grueso, especialmente ciego y colón<sup>9</sup>.

Los huéspedes de *E. coli* son variables desde muchos aspectos como tamaño corporal, morfología intestinal, dieta, tiempo de retención de la ingesta y microbiota. Estas características pueden tener influencia sobre la prevalencia y densidad de *E. coli*, que puede variar de 0% a 100% aunque en humanos es mayor al 90%, mientras que en animales domésticos no hay datos al respecto; en animales silvestres la prevalencia se encuentra en un rango de 10 a 55%, la concentración por gramo de heces varía en humanos de  $10^7$ - $10^9$  unidades formadoras de colonias (UFC), mientras que en animales domésticos va de  $10^4$ - $10^6$  UFC, no hay datos relacionados con UFC en animales silvestres. Los principales grupos filogenéticos que se han encontrado en humanos son A y B2, en animales domésticos y silvestres son el B1. Es común encontrar genes de virulencia extraintestinales en aislados de humanos, sin embargo, en animales domésticos y silvestres son raros. La resistencia a antibióticos tanto en humanos como en animales domésticos es común, pero en animales

silvestres es mínima o nula, por otra parte, la prevalencia de integrones en humanos es mayor en relación con las especies domésticas e inexistentes en animales silvestres (Cuadro 1)<sup>9</sup>.

**Cuadro 1.** Características de *Escherichia coli* comensal en la microbiota

Características	Humanos	Animales domésticos	Animales silvestres
Prevalencia (%)	>90	Sin datos	10-55
Cantidad (UFC por heces)	10 <sup>7</sup> -10 <sup>9</sup>	10 <sup>4</sup> -10 <sup>6</sup>	Sin datos
Principales grupos filogenéticos	A y B2	B1	B1
Genes de Virulencia Extraintestinales	Común	Raros	Raros
Puntuación de resistencia a antibióticos*	18	11	0-7
Prevalencia de integrones	16	7	0

\*El nivel de resistencia es definido como  $(R/na) \times 100$ , donde  $n$  es el número de cepas probadas,  $A$  es el número de antibióticos probados y  $R$  es la suma del número de cepas resistentes a cada uno de los antibióticos. Tomado de Tenailon y colaboradores, 2010.

## 1.5 Patotipos y patogenésis de *Escherichia coli* intestinal

### 1.5.1 *Escherichia coli* Enteropatógena (EPEC)

Está implicada como una de las causas de diarrea en varias especies animales, principalmente, en conejos, cerdos y perros. Estas cepas inducen lesiones A/E (adherencia íntima y esfacelamiento) en la mucosa intestinal y son agrupadas en una categoría llamada *E. coli* de adherencia íntima y esfacelamiento (AEEC), las cuales incluyen cepas EHEC positivas a la isla de patogenicidad LEE. El ganado, ovejas y cerdos sanos parecen ser importantes reservorios de AEEC<sup>23</sup>. EPEC es reconocida por dos fenotipos que se observan *in vitro* e *in vivo*, adherencia íntima y esfacelamiento (AE) y adherencia localizada (LA). El fenotipo AE, es caracterizado por la destrucción de la microvellosidad y la formación del pedestal debajo del cual las bacterias se encuentran adheridas y es mediado por los genes presentes en una isla de patogenicidad (LEE)<sup>24</sup>. LA es un patrón distintivo de adherencia a las células epiteliales en EPEC, en el cual la bacteria forma grupos de células estrechamente unidas<sup>25-26</sup>.

### 1.5.2 *Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC)

Dentro de las cepas enteropatógenas más estudiadas se encuentra una cepa que pertenece al grupo de las enterohemorrágicas y corresponde al serotipo O157:H7, al cual se le relaciona con brotes de diarrea, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico alrededor del mundo<sup>27</sup>.

Los rumiantes (predominantemente borregos y cabras) pueden servir como reservorio de cepas EHEC que son potencialmente patogénicas para humanos<sup>28-30</sup>. Se han reportado brotes de EHEC asociados con ferias agrícolas y zoológicos en Estados Unidos<sup>31-32</sup> y Europa<sup>32</sup>. EHEC ha sido aislada en ciervos silvestres<sup>33</sup>, por lo que se les ha implicado en la transmisión de *E. coli* O157:H7 en humanos en Japón<sup>34</sup> y Estados Unidos<sup>35</sup> la enfermedad se puede transmitir a los humanos por ingestión de alimentos o agua contaminados con heces, o por contacto directo con animales infectados<sup>27,36-37</sup>.

La cepa O157:H7 se ha encontrado en heces de venados (*Odocoileus virginianus*), lo que representa directa o indirectamente riesgo zoonótico para cazadores, consumidores y otros en contacto con las heces de venado incluyendo fauna silvestre y animales de granja<sup>38</sup>. Debido a que existe potencial interacción entre el ganado y ciervos en libertad en situación de pastoreo, el ganado podría no ser la única fuente de *E. coli* O157:H7, ya que puede ocurrir transmisión entre especies<sup>39</sup>.

Las cepas de este tipo, tienen como principal factor de virulencia a la citotoxina *stx*, la cual está codificada en un bacteriófago insertado dentro del cromosoma, la familia *stx* contiene dos grandes grupos llamados *stx1* y *stx2*, una cepa de EHEC puede expresar únicamente *stx1*, *stx2* o ambas. Estas cepas son portadoras de un plásmido que codifica una hemolisina, también llamada enterohemolisina (*ehx*). Se ha reconocido un factor de adherencia intestinal que ha demostrado jugar un rol importante en la colonización intestinal *in vivo* en un modelo animal la proteína de membrana externa llamada intimina, proteína codificada por el gen *eae*<sup>8</sup>.

### **1.5.3 *Escherichia coli* Enterotoxigénica (ETEC)**

Se considera que esta cepa es la causa más común de diarrea por *E. coli* en animales de granja<sup>36</sup> es definida como la cepa de *E. coli* que elabora al menos una de las enterotoxinas: ST (termoestable, resistente al tratamiento de 100° C por 15 min) a menudo, ha sido caracterizada como STa (o ST1) y STb (o STII) basado en su tamaño, estructura molecular y actividad biológica<sup>7</sup> y LT<sup>40</sup> (termolábil, se inactiva a 60° C por 15 min) ambas toxinas son codificadas por plásmidos<sup>41</sup>.

Las cepas de ETEC son consideradas generalmente como representantes de un prototipo patogénico: el organismo se adhiere mediante fimbrias al epitelio lo que permite la colonización a la superficie de la mucosa del intestino delgado donde elabora sus enterotoxinas, dando lugar a un estado secretorio<sup>42-43</sup> causando diarrea a través de la acción de las enterotoxinas (LT y ST)<sup>44</sup> lo que puede conducir a deshidratación, languidez y muerte<sup>7</sup>.

### **1.5.4 *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC)**

Es considerada como la segunda causa de diarrea en humanos después de ETEC, se caracteriza por adherirse a las células HEp-2 en un patrón conocido como autoagregativo, en el cual las bacterias se adhieren entre sí como “ladrillos apilados”<sup>8</sup>, mediante la fimbria de adherencia agregativa AAFs (aggregative adherence fimbriae) codificada por genes que se encuentran en una familia de plásmidos de virulencia llamados pAA<sup>45</sup>.

### **1.5.5 *Escherichia coli* Enteroinvasiva (EIEC)**

Está relacionada genéticamente con *Shigella* spp.<sup>46-47</sup> por lo que sus características patogénicas son semejantes a ésta. El modelo actual de patogénesis de EIEC inicia en la mucosa colónica con el ingreso de la bacteria a la célula epitelial, lisis de la vacuola endocítica, multiplicación intracelular, movimiento direccional a través del citosol y extensión dentro de las células epiteliales adyacentes. Los genes necesarios para la invasividad de EIEC se encuentran en un plásmido (pInv)<sup>8</sup>.

## 1.6 Genes de Virulencia

En los diferentes patotipos de *E. coli* existen genes específicos que caracterizan a cada grupo.

### 1.6.1 Toxinas Shiga (*stx1*, *stx2*)

Las toxinas Shiga pertenecen a una familia de proteínas citotóxicas<sup>7-8</sup>. La toxina mayoritaria es la Stx (*Stx1*) que es idéntica a la toxina Shiga de *Shigella dysenteriae* y *Stx2*, que a su vez es homóloga en un 56% a *Stx1*<sup>7,48,8</sup>. Se han descrito variantes de *Stx2* (*Stx2c*, *Stx2v*, *Stx2vhb*, *Stx2e*, etc.) las cuales difieren únicamente en algunos aminoácidos sin tener consecuencias en la toxicidad<sup>8, 48</sup> aunque recientemente se ha reportado que podrían diferir en su actividad biológica<sup>49</sup>.

La estructura de Stx tiene una subunidad A-B. La subunidad A es la porción biológicamente activa de la toxina la cual permite a la toxina llegar al ribosoma eucariota donde impide la síntesis de proteína provocando muerte celular<sup>8, 48-49</sup> y la subunidad B une la toxina al receptor glicolípido de la membrana, llamado globotriaosilceramida o mejor conocida como Gb<sub>3</sub> para *Stx1* y *Stx2* o Gb<sub>4</sub> para *Stx2e* y *Stx2ev*<sup>7,8,48-49</sup>. Los receptores se encuentran principalmente en las células de Peneth, en la mucosa intestinal en humanos<sup>50</sup> y en la superficie del epitelio celular del riñón<sup>8</sup>. El ganado carece de estos receptores en el tracto intestinal, lo cual puede explicar porque en el caso de EHEC la colonización en ganado es asintomática<sup>51</sup>.

### 1.6.2 Toxina termo lábil (Lt)

La toxina Lt está estrechamente relacionada con la enterotoxina expresada por *Vibrio cholera*<sup>52</sup> comparte características de estructura, secuencia de proteínas, receptor primario, actividad enzimática y actividad en ensayos de cultivo celular. Los dos principales grupos de LT, son LT-I y LT-II. LT-I es expresada por cepas *E. coli* que son patógenas tanto para humanos como para animales. LT-II se encuentra principalmente en aislados de *E. coli* de animales y raramente en aislados de humanos, pero ni en animales ni humanos se ha visto asociada con enfermedad<sup>53</sup>.

Los genes que codifican LT (*elt* o *etx*) residen en plásmidos que también pueden contener genes que codifican ST y/o antígenos del factor de colonización (CFAs). La toxina termolábil provoca un cuadro característico de diarrea osmótica<sup>8</sup>.

### 1.6.3 Toxina termo-estable (St)

En contraste con las grandes toxinas Lt oligoméricas, las St son toxinas monoméricas que contienen múltiples residuos de cisteína, los enlaces disulfuro le permiten ser estable a elevadas temperaturas. Los genes para ambas toxinas (Lt y St) se encuentran predominantemente en plásmidos, y algunos genes que codifican para St han sido asociados a transposones. La toxina STa (llamada ST-I) es producida por ETEC y otras bacterias Gram negativas incluyendo *Yersinia enterocolitica* y *V. cholerae*<sup>54-55</sup>.

**STa:** es un péptido de 18 a 19 aminoácidos. Tiene dos variantes, STp (ST porcina o STIa) y STh (STh humana o STIb), después de su descubrimiento en cepas aisladas de cerdos y seres humanos<sup>56</sup>. La toxina se une a los receptores de guanilato ciclasa en el borde en cepillo del epitelio intestinal donde estimula su actividad lo cual conduce a un aumento de los niveles intracelulares de GMP cíclico lo que resulta en la alteración de la absorción de Na<sup>+</sup> y H<sub>2</sub>O dentro del lumen intestinal, provocando así un cuadro diarreico<sup>57</sup>.

**STb:** induce daño histológico en el epitelio intestinal que consiste en la pérdida y atrofia de vellosidades en las células epiteliales<sup>8</sup>.

### 1.6.4 Intimina (*eae*)

La proteína intimina, es responsable de la adherencia y es codificada por el gen *eae*, el cual es parte de una isla de patogenicidad llamada locus de esfacelamiento en enterocito (LEE)<sup>8,56,57</sup>. La LEE es un fragmento de ADN que consiste de 41 genes, organizados dentro de 5 operones (LEE 1-5)<sup>58</sup>. LEE codifica los componentes estructurales de un sistema de secreción tipo III, reguladores, translocadores, chaperones, moléculas efectoras que alteran los diversos procesos de señalización celular<sup>59</sup>. Actualmente se han hecho 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,  $\gamma 1$ ,  $\theta/\gamma 2$ ,  $\epsilon 1$ ,  $\nu R/\epsilon 2$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ,  $\iota 1$ ,  $\mu R/\iota 2$ ,  $\lambda$ ,  $\mu B$ ,  $\nu B$ ,  $\xi B$ )<sup>60-62,56,58</sup>.

**1.6.5 *rfbE*<sub>O157</sub>:** codifica para la biosíntesis del lipopolisacárido O157. La región *rfb* es un lugar complejo; varía en tamaño entre 8 y 14 kb y contiene de 8 a 14 genes que codifican las enzimas necesarias para la síntesis de las cadenas laterales O que confieren la especificidad al serogrupo<sup>63-65</sup>.

**1.6.6 *fliC*<sub>H7</sub>:** Los genes *fliC* codifican para antígenos flagelares H7 y H6 revelando secuencias muy similares entre cepas que pertenecen al mismo tipo H pero de diferentes serotipos<sup>66-67</sup>. Además, la tipificación molecular de los genes *fliC* permite identificar los aislamientos de *E. coli* flagelares de los no flagelares<sup>66,68-69</sup>.

**1.6.7 *bfp*:** (bundle-forming pilus), es responsable de la adhesión localizada de la bacteria a las células HeLa *in vitro*<sup>70</sup>, además se le atribuye la formación de microcolonias, promoviendo la interacción bacteria-bacteria y bacteria enterocito<sup>70-71</sup>.

**1.6.8 *ipaH*:** *ipa* (invasión plásmid antigens) es una proteína, producida por *Shigella*<sup>72</sup>, al igual que otros efectores de *Shigella*, *ipaH* se localiza en plásmidos<sup>8</sup>.

## **2. Justificación**

*Escherichia coli* es uno de los principales habitantes del tracto intestinal de una amplia variedad de especies incluyendo animales domésticos y silvestres, se le puede encontrar como comensal o patógeno lo que le permite ser un modelo idóneo para estudiar la transición de organismo comensal a patógeno a través de diversos mecanismos que involucran la transferencia de material genético. Actualmente existen escasos reportes sobre aislamientos comensales de *E. coli* particularmente en animales silvestres, en México el ciervo rojo es una especie cuyo fin es principalmente cinegético por lo que está en contacto con otras especies incluidas el humano, esta relación permite tomar como base aislamientos de bacterias comensales para determinar la presencia de patógenos que puedan representar un riesgo de salud tanto para humanos como animales, así como su posible asociación con el medio ambiente, por lo cual es importante la identificación de grupos filogenéticos, resistencia a quimioterapéuticos, serotipificación y factores de virulencia en aislamientos comensales.

## **3. Hipótesis**

Los aislamientos comensales de *E. coli* procedentes de ciervo rojo no presentan características de cepas patógenas, ya que dichas cepas pertenecen a determinados grupos filogenéticos y serotipos además de poseer factores de virulencia particulares y patrones de resistencia antimicrobiana que no presenta *E. coli* comensal.

## **4. Objetivo General**

Determinar las características serológicas, filogenéticas, factores de virulencia y resistencia microbiana en aislamientos de *E. coli* comensal del tracto gastrointestinal del ciervo rojo (*Cervus elaphus*).

### **4.1 Objetivos específicos**

- Determinar la resistencia y susceptibilidad mediante la concentración mínima inhibitoria (MIC) de las cepas aisladas
- Identificar los serotipos (O-H)

- Determinar los grupos filogenéticos (A, B1, B2, y D) mediante la identificación de los genes *chuA*, *yjaA*, TSPF.C2
- Identificar los genes de virulencia *eae*, *stx1*, *stx2*, *rfbE*<sub>O157</sub>, *fliC*<sub>H7</sub>, *bfp*, *lt*, *st*, e *ipaH*

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 Colección de muestras

Se utilizaron 22 hisopos rectales en 22 animales (ciervo rojo; *Cervus elaphus*). Cada hisopo fue introducido al recto del animal y girado repetidas veces e introducido al medio de transporte AMIES con carbón activado y enviado al laboratorio de bacteriología del INIFAP para su posterior análisis. Las muestras fueron obtenidas de animales clínicamente sanos, provenientes del Área Natural Protegida Sierra Fría, Aguascalientes (ANPSF). Los hisopos fueron sembrados en agar MacConkey y agar cromogénico diferenciador. Las colonias positivas a la fermentación de la lactosa fueron seleccionadas para su identificación final por medio del sistema automatizado MicroScan (DADE BEHRING).

#### 5.1.2 Aislamientos y ensayo de concentración mínima inhibitoria (MIC)

Los aislamientos de *E. coli* fueron sembrados en agar MacConkey y agar Soya Trypticaseína (TSA) se incubaron a 37°C durante 24 h. Cada aislamiento fue resembrado en dos placas, el primer cultivo se utilizó para hacer extracción de DNA (TSA) y el segundo para almacenarlo a -80°C en un medio líquido de caldo infusión cerebro corazón-glicerol al 50%. Los aislamientos fueron identificados en el laboratorio clínico del hospital “Dr. Manuel Gea González” utilizando el sistema automatizado MicroScan (DADE BEHRING), así mismo se determinó la presencia de beta-lactamasas y la concentración mínima inhibitoria (MIC) mediante el mismo sistema que utiliza los siguientes quimioterapéuticos: amicacina, amoxicilina/acido clavulánico, ampicilina/sulbactam, ampicilina, aztreonam, cefazolina, cefepima, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, ciprofloxacina, gatifloxacina, gentamicina, imipenem, levofloxacina, piperacilina/tazobactam, piperacilina, tobramicina, trimetoprim/sulfametoxazol.

### 5.1.3 Extracción de DNA

La extracción de DNA cromosómico se realizó con la técnica de tiocinato de guanidina, descrita por Pitcher y colaboradores<sup>73</sup>. El crecimiento bacteriano de 5 ml en caldo infusión cerebro corazón fue centrifugado a 8000 rpm durante 10 min, la pastilla bacteriana fue lisada con una solución de tiocianato de guanidina 5 M, posteriormente se adicionó acetato de amonio 7.5 M, se mezcló y se adicionó cloroformo-alcohol isoámilico. Se centrifugó y se tomó el sobrenadante, finalmente se obtuvo el DNA con pipeta, fue lavado tres veces con etanol al 70%, y el pellet de DNA se dejó secar para posteriormente resuspenderlo en agua destilada estéril y ser utilizado. El producto de DNA se visualizó en gel de agarosa al 1.5% y 2% teñido con bromuro de etidio.

### 5.1.4 Serotipos

La serotipificación de los aislamientos de *E. coli* se realizó en la Facultad de Medicina de la UNAM. La metodología se realizó de acuerdo a lo descrito por Ørskov F y Ørskov<sup>74</sup>. Se serotipificaron 22 aislamientos de *E. coli* comensal obtenidos de muestras de ciervo rojo (*Cervus elaphus*) empleando suero de conejo contra los antígenos somático (O) y flagelar (H) del esquema de tipificación. De los aislamientos se obtuvieron los antígenos somáticos y flagelares a los cuales se les hicieron diluciones para la reacción de microaglutinación en microplaca con antisueros preparados en conejo contra los 186 antígenos somáticos conocidos. Los antígenos flagelares se determinaron usando 56 antisueros monovalentes.

El esquema antigénico fue actualizado por el Dr. Flemming Scheutz del The International *Escherichia* and *Klebsiella* Centre (WHO) en Copenhague. Además se utilizaron 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).

### 5.1.5 Determinación de grupos filogenéticos

Se realizaron reacciones de PCR múltiples para identificar el grupo filogenético de los aislamientos, los iniciadores utilizados fueron descritos por Clermont y cols<sup>14</sup>, para detectar los genes *chuA* (279 pb), *yjaA* (211 pb) y *TspE4C2.1*. (152 pb). Las condiciones de PCR consistieron en 5 min a 94°C de desnaturalización inicial seguido de 30 ciclos por 30s a 94°C, 30s a 55°C y 30s a 72°C y una extensión final de 7 min a 72°C. Con base en la presencia o ausencia de dichos genes se determinó el grupo filogenético al que pertenecieron los aislamientos. El grupo filogenético de cada aislamiento fue determinado por la presencia (positivo +) o ausencia (negativo -) de la combinación de *chuA*, *yjaA* y *TSPE4.C2*, en este orden para el fenotipo A la combinación es - - - y -+-, para B1 - - +, en el caso de B2 el fenotipo es +-+ y +++, la combinación para el fenotipo D es + - -<sup>14</sup>.

### 5.1.6 Identificación de factores de virulencia

La identificación de los factores de virulencia se realizó de acuerdo a lo descrito por DebRoy y Roberts<sup>75</sup>, y Tornieporth y colaboradores<sup>76</sup>. El total de genes a identificar fueron; *eae*, *stx1*, *stx2*, *rfbE*<sub>O157</sub>, *fliC*<sub>H7</sub>, *bfp*, *lt*, *st*, *ipaH*, se realizaron reacciones de PCR múltiples donde se incluyeron los genes *eae*, *stx1*, y *rfbE*<sub>O157</sub>, *fliC*<sub>H7</sub>, así como *lt* y *st* posteriormente se incluyeron individualmente los genes *stx2*, *bfp* e *ipaH* (Cuadro 2)<sup>75-76</sup>. El programa empleado fue el siguiente: para los genes *bfp*, *lt*, *st* e *ipaH*, se utilizaron 30 ciclos, desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, desnaturalización 94° C por 1 min, la alineación de 56°C por 2 min y la extensión de 72°C por 1 min, la extensión final fue de 72°C durante 7 min<sup>76</sup>. Para los genes *stx1* y *eae*, así como *stx2* el programa utilizado fue de 30 ciclos, la desnaturalización inicial consistió de 94°C por 5 min, la desnaturalización fue de 94°C 30 s, la alineación de 56°C por 30 s, la extensión de 72°C 45 s y la extensión final de 72° por 7 min. El programa para los genes *rfbE*<sub>O157</sub>, *fliC*<sub>H7</sub> consistió de 30 ciclos, desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, desnaturalización a 94°C por 30 s, alineación a 56°C por 30 s, extensión a 75°C por 45 s y extensión final a 72°C por 7 min. Los productos amplificados se observaron en un gel de agarosa al 1.5 y 2%.

**Cuadro 2.** Iniciadores para la identificación de factores de virulencia

Gen	Secuencia de iniciadores (5´- 3´)	Posición (amplicón)
<i>eae</i>	GTG GCG AAT ACT GGC GAG ACT CCC CAT TCT TTT TCA CCG TCG	2518-3408 (890 pb)
<i>stx1</i>	ACA CTG GAT GAT CTC AGT GG CTG AAT CCC CCT CCA TTA TG	938-1520 (582 pb)
<i>stx2</i>	GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G	603-857 (255 pb)
<i>rfbE<sub>O157</sub></i>	AAC GGT TGC TCT TCA TTT AG GAG ACC ATC CAA TAA GTG TG	287-964 (678 pb)
<i>fliC<sub>H7</sub></i>	TAC CAC CAA ATC TAC TGC TG TAC CAC CTT TAT CAT CCA CA	735-1294 (560 pb)
<i>bjp</i> (EPEC)	CAA TGG TGC TTG CGC TTG CT GCC GCT TTA TCC AAC CTG GT	119-443 (324 pb)
<i>LT</i> (ETEC)	GCG ACA AAT TAT ACC GTG CT CCG AAT TCT GTT ATA TAT GT	59-765 (708 pb)
<i>STa</i> (ETEC)	CTG TAT TGT CTT TTT CAC CT GCA CCC GGT ACA AGC AGG AT	79-260 (182 pb)
<i>ipaH</i> ( <i>Shigella</i> spp. y EIEC)	GCT GGA AAA ACT CAG TGC CT CCA GTC CGT AAA TTC ATT CT	1061-1484 (424 pb)

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Identificación de aislamientos y resistencia a quimioterapéuticos

Los 22 aislamientos fueron identificados utilizando el método automatizado MicroScan (DADE BEHRING) en el cual se demostró que pertenecen al género y especie *E. coli* con un porcentaje de identidad del 100%. A cada aislamiento se le determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC), utilizando los siguientes quimioterapéuticos: amicacina, amoxicilina/ácido clavulánico, ampicilina/sulbactam, ampicilina, aztreonam, cefazolina, cefepima, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, ciprofloxacina, gatifloxacina, gentamicina, imipenem, levofloxacina, piperacilina/tazobactam, piperacilina, tobramicina, trimetoprim/sulfametoxazol. De los 22 aislamientos únicamente 3 muestras mostraron resistencia, un aislamiento mostró resistencia a 7 antimicrobianos: ampicilina, aztreonam, cefazolina, cefepima, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona y piperacilina, así como positivo a la presencia de beta-lactamasas de espectro extendido (ESBL), otro aislamiento fue resistente a la ampicilina/sulbactam, ampicilina, piperacilina y a trimetoprim/sulfametoxazol, finalmente un tercer aislamiento mostró resistencia a la ampicilina, ampicilina/sulbactam y a trimetoprim/sulfametoxazol, en las tres muestras se presentó sensibilidad al resto de los quimioterapéuticos utilizados, las muestras restantes fueron sensibles a todos los antimicrobianos (Cuadro 3).

**Cuadro 3. Perfil de resistencia en los 22 aislamientos de ciervo rojo**

Sensibles	19
Amp/Sulbactam	2
Ampicilina	3
Aztreonam	1
Cefazolina	1
Cefepima	1
Cefotaxima	1
Ceftazidima	1
Ceftriaxona	1
Piperacilina	2
Trimet/sulfametoxazol	2

## 6.2 Grupos Filogenéticos

Para la determinación de los grupos filogenéticos se utilizaron los genes *chuA*, *yjaA*, y TspE4C2.1, con base en la presencia o ausencia de estos se determinan los grupos filogenéticos en A, B1, B2 y D. Se detectó la presencia del gen *chuA* en 12 aislamientos, para el caso de *yjaA*, 4 aislamientos fueron positivos, TSPE4.C2 estuvo presente en 8 aislamientos (Figura 1). Del total de las muestras 6 pertenecieron al grupo A, 4 al grupo B1, 3 al grupo B2 y 9 al grupo D (Cuadro 4).

## 6.3 Genes de virulencia

Se utilizó el método de PCR para identificar la presencia de 9 genes de virulencia (*eae*, *stx1*, *stx2*, *rfbE*<sub>O157</sub>, *fliC*<sub>H7</sub>, *bfp*, *lt*, *st*, *ipaH*). Se identificó el gen *eae* en 4 aislamientos, para el gen *stx1* se obtuvieron 17 aislamientos positivos, para el gen *stx2*, se obtuvieron 12 aislamientos positivos, para los genes *rfbE*, *fliC*, *ipaH* y *lt*, no se obtuvieron muestras positivas. El gen *bfp* estuvo presente en 6 aislamientos. Finalmente, del gen *st*, 12 aislamientos resultaron positivos (Fig. 2). Del total de los aislamientos solo uno no fue positivo a ningún gen, 4 fueron positivos a 1 gen, 6 a 2 genes, 9 a 3 genes y 2 a 4 genes (Cuadro 4).

**Cuadro 4. Resultados globales del análisis sobre grupos filogenéticos, factores de virulencia y serotipificación**

Aislamiento	Genes Grupos Filogenéticos (GF)			G F	Genes de Virulencia									Serogrupos	
	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	<i>TsPF4C2</i>		<i>eae</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>rfbE</i>	<i>fliC</i>	<i>bfp</i>	<i>ipaH</i>	<i>lt</i>	<i>st</i>	Somático	Flagelar
1	+	-	-	D	-	+	-	-	-	-	-	-	-	Rg	NM
2	-	-	-	A	-	+	+	-	-	+	-	-	-	O?	H21
3	+	-	-	D	+	+	+	-	-	-	-	-	-	O?	H21
4	-	-	-	A	-	+	+	-	-	+	-	-	-	O?	H21
5	-	-	-	A	+	+	-	-	-	+	-	-	-	O?	H21
6	+	-	-	D	-	+	-	-	-	+	-	-	-	O?	H21
7	-	-	-	A	-	+	-	-	-	-	-	-	-	O70	NM
8	+	-	-	D	-	-	-	-	-	+	-	-	+	O5	NM
9	+	-	-	D	-	-	+	-	-	-	-	-	+	O70	NM
10	-	+	+	B 1	-	+	+	-	-	-	-	-	+	O91	NM
11	-	+	+	B 1	-	-	+	-	-	-	-	-	+	O?	NM
12	-	+	+	B 1	-	+	+	-	-	-	-	-	+	O70	NM
13	+	+	+	B 2	-	+	+	-	-	+	-	-	+	O23	H16
14	+	-	-	D	-	+	+	-	-	-	-	-	+	O23	H16
15	+	-	-	D	-	+	-	-	-	-	-	-	-	O23	H25
16	+	-	-	D	-	+	+	-	-	-	-	-	+	O38	H25
17	+	+	+	B 2	+	+	+	-	-	-	-	-	+	O6	H34
18	+	+	+	B 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	O6	H34
19	+	-	+	D	+	+	-	-	-	-	-	-	-	O6	NT
20	-	-	+	B 1	-	+	+	-	-	-	-	-	+	O6	H34
21	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	+	O6	H34
22	-	-	-	A	-	+	-	-	-	-	-	-	+	O75	H9

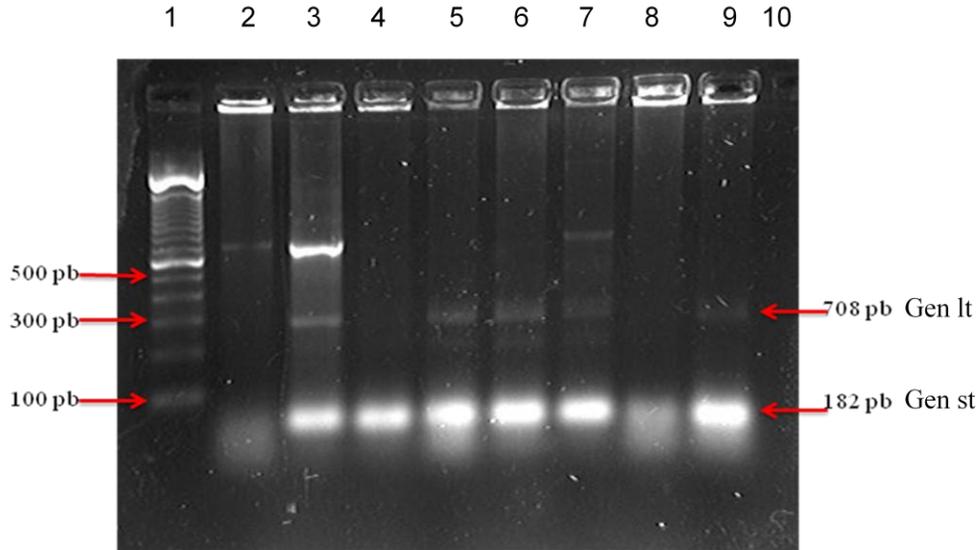


Fig. 2. Amplificación de los genes *lt* y *st*. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carril 1 marcador de peso molecular 100pb; carril 2 control positivo gen *lt*:ETEC; control positivo *lt-st*:ETEC; carril 3-9 aislamientos: 15,16,14,20,21,22; carril 10 control negativo.

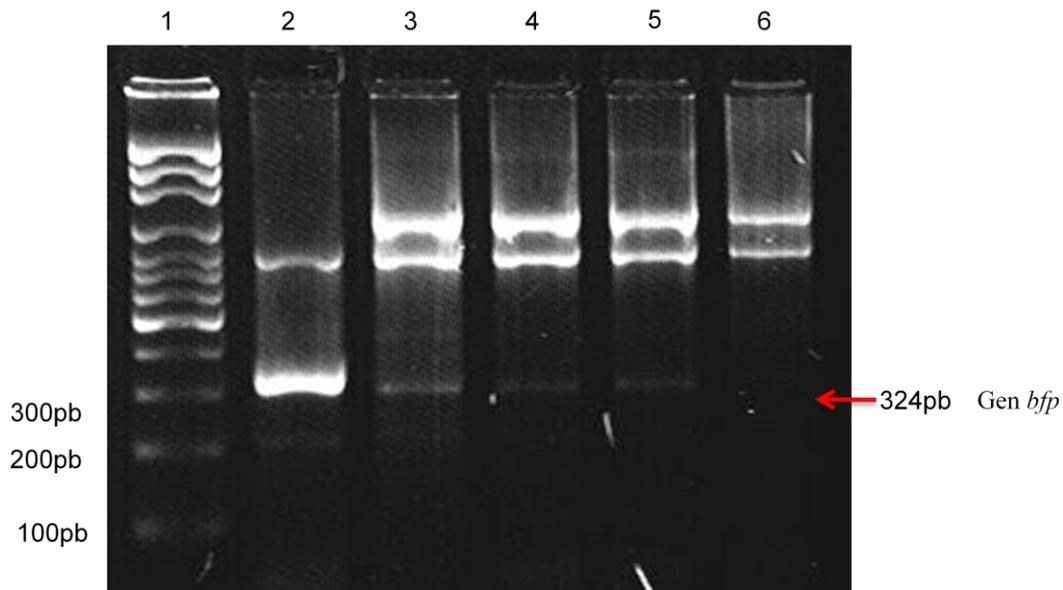


Fig. 3. Amplificación del gen *bfp*. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carril 1 marcador de peso molecular 100pb; carril 2 control positivo gen *bfp*:EPEC; carril 3-6 aislamientos: 2,4,5,6.

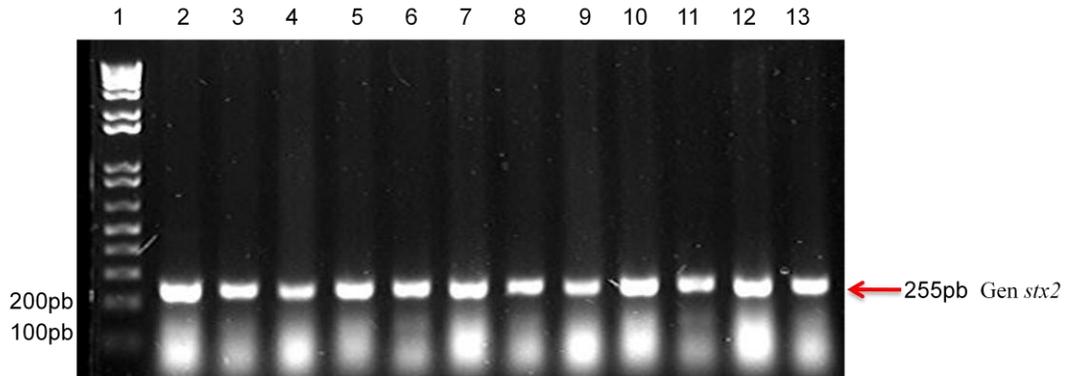


Fig. 4. Amplificación del gen *stx2*. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Carril 1 marcador de peso molecular 100pb; carril 2 control positivo gen *stx2*: EHEC; carril 3-13 aislamientos: 2,3,4,9,10,11,12,13,14,16,17,20.

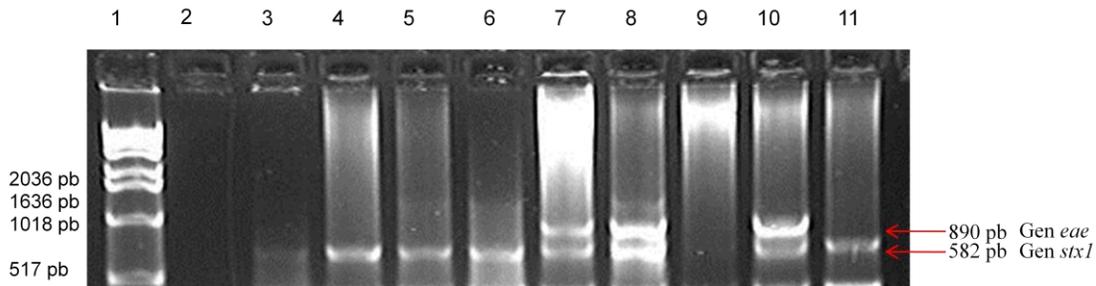


Fig. 5. Amplificación de los genes *stx1* y *eae*. Gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio. Carril 1 marcador de peso molecular 1kb; carril 2 control negativo; carril 3-6 aislamientos negativos para el gen *eae* y positivos para el gen *stx1*. Carril 7-8 aislamientos positivos a ambos genes, carril 9 aislamiento negativo para ambos genes; carril 10 aislamiento positivo ambos genes, carril 11 aislamiento positivo al gen *stx1*.

## 6.4 Serotipificación

Los resultados mostraron que de los 22 aislamientos, solo un aislamiento presentó un fenotipo rugoso (Rg), 6 muestras fueron no tipificables, 3 muestras correspondieron al serotipo O70, 3 aislamientos con el serotipo O23, 5 aislamientos pertenecieron al serogrupo O6 y se encontraron aislamientos positivos a los serotipos O5, O91, O38 y O75.

Con respecto a los aislamientos que presentaron flagelo de las 22 muestras, 6 fueron identificados con H21, 4 con H34, 2 con H16 y 2 más con H25, un aislamiento fue identificado con H9 y finalmente 7 muestras no fueron móviles al no mostrar crecimiento flagelar (Cuadro 4).

## 7. DISCUSIÓN

Se evaluaron las relaciones entre los grupos filogenéticos, la presencia de genes de virulencia, así como la susceptibilidad a quimioterapéuticos y serotipificación (Cuadro 5). La asociación entre las variantes analizadas mostró sorprendentemente la presencia de 12 aislamientos de un total de 22 identificados dentro de los grupos B2 y D lo cual representa más de la mitad de muestras ubicadas en filo grupos que no son característicos de cepas de *E. coli* comensal, aunado a esto amplificaron genes de virulencia incluso en muestras que se identificaron dentro del filo grupo A y B1 lo que indica que aunque estas cepas podrían ser no patógenas cuentan con genes que les provee del potencial para serlo o bien que el portar dichos genes no necesariamente indica que vayan a expresarlos. Otro punto importante a destacar en nuestros resultados es la baja resistencia encontrada en los aislamientos, tan solo tres muestras de 22 aislamientos se observaron resistentes a más de un quimioterapéutico, lo más sobresaliente es que dos de esas muestras se encontraban dentro del filo grupo A y uno en el grupo D, por otra parte 8 serotipos estuvieron presentes en el filo grupo A, 4 en B1, 6 en B2 y 11 en D, el comportamiento tanto de genes de virulencia como de serotipos en los aislamientos analizados nos dan una idea al respecto de cómo es que efectivamente el genoma de *E. coli* muestra gran plasticidad al permitir el intercambio de información genética entre cepas comensales y patógenas mediante mecanismos de transferencia genética ya conocidos.

Cuadro 5. Asociación de los resultados de grupos filogenéticos, genes de virulencia, sensibilidad antimicrobiana y serotipificación

	GF	GV	MIC	O70	O6	O75	O91	O23	O5	O38	O?	H21	H9	H34	H16	H25	NM	NT
■ A	6	13	2	1	1	1	0	0	0	0	3	3	1	1	0	0	1	0
■ B1	4	11	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	3	0
■ B2	3	8	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0

NM: no móvil, NT: no tipificable, O?: no tipificable

Al determinar los grupos filogenéticos se observaron resultados interesantes e inesperados debido a que más de la mitad de los aislamientos estudiados se encontraron dentro de los grupos B2 y D, esto es notable ya que las cepas comensales comúnmente no pertenecen a dichos grupos que son característicos de cepas patógenas, existen diversos factores que pueden intervenir en la distribución de las cepas a los diferentes filo grupos, algunos estudios han empezado a buscar los factores que determinan las asociaciones entre el tipo de cepa y huésped, no resulta fácil si se tiene en cuenta que incluso entre especies existe gran variación, tan solo los animales representan un grupo muy complejo debido a la gran diversidad de sus poblaciones que incluyen mamíferos silvestres y domésticos, aves y reptiles. Los factores que determinan la estructura genética de la población de *E. coli* puede dividirse en características propias del huésped (dieta, morfología intestinal y masa corporal) y ambiente, ambos factores parecen ser predictores importantes de la distribución filogenética de los grupos<sup>70,77</sup>. Por otro lado, se ha observado que la complejidad física del intestino grueso en los herbívoros y omnívoros parece favorecer a las cepas B2, asimismo, se ha reportado que podrían existir diferentes nichos en el intestino, como las cepas del grupo A que es más probable aislar en el tracto gastrointestinal superior, y las cepas B1 en las heces<sup>78</sup>.

Un estudio realizado en Australia por Gordon y Crowling<sup>77</sup> con aislamientos pertenecientes a vertebrados silvestres observan que cepas identificadas en el grupo B1 provienen principalmente de mamíferos carnívoros y cepas del grupo B2 corresponden a herbívoros, omnívoros y especies rumiantes, y las cepas del grupo A y B1 pueden ser recuperadas de cualquier grupo de vertebrados, mientras que las cepas del grupo B2 y D parecen ser “especialistas”, dado que se limitan en gran medida a vertebrados endotérmicos, sin embargo las cepas del grupo B2 parecen ser las más especializadas debido a que predominan en los mamíferos rumiantes, por lo que la complejidad física del intestino en herbívoros determina la presencia del filo-grupo B2. Por otra parte Escobar-Páramo y cols<sup>79</sup> determinan que las fuerzas que intervienen en la estructura genética de *E. coli* comensal pueden ser el ambiente, seguido del efecto de domesticación, clima, dieta y masa corporal, y que el efecto de la relación de asentamientos humanos con animales puede influenciar el grupo filogenético al que pertenecen las cepas de animales silvestres que de acuerdo a este estudio mayoritariamente pertenecen al grupo B2 y D y pocas cepas pertenecen al grupo A y B1 en comparación con animales domésticos.

En este estudio los resultados entre grupos filogenéticos y genes de virulencia mostraron la combinación de genes de virulencia identificados en el filo-grupo B2 (*eae, stx1, stx2, bfp, st*) y B1 (*stx1, stx2, st*), mientras que los aislamientos restantes fueron identificados dentro de los filo-grupos A y D mostraron menor número de genes de virulencia pero mayor número de aislamientos positivos a dichos genes, el factor de virulencia con mayor frecuencia encontrado fue el gen *stx1* con 17 aislamientos positivos, en menor número estuvieron los genes *stx2* y *st* los cuales se encontraron en 12 aislamientos, mientras que para los genes *bfp* y *eae* se encontraron tan solo en 6 y 4 aislamientos positivos respectivamente, estos resultados coinciden con el estudio de Baldy-Chudzik y cols<sup>80</sup> donde utilizaron 300 cepas de *E. coli* comensal recuperadas de animales sanos (mamíferos herbívoros, carnívoros y omnívoros) de un zoológico en Polonia, en los animales herbívoros encontraron aislamientos positivos a genes de virulencia (*eae, stx1, stx2*) que pertenecieron a muestras que fueron identificadas dentro del filo-grupo B1, lo cual también coincide con Girardeau y cols<sup>81</sup> quienes mencionan que *E. coli* productora de toxina Shiga del ganado se clasifica con más frecuencia en el grupo B1 que en el grupo D, en el presente estudio se encontraron 4

aislados que corresponden al grupo de las EHEC cuyos genes de virulencia fueron *eae* y *stx1*, *stx2* o ambos.

Los resultados referentes a la sensibilidad a quimioterapéuticos demostraron que de los 22 aislamientos al menos tres de ellos presentaron resistencia a más de un quimioterapéutico y el resto fue sensible a todos los antibióticos (Cuadro 3), se ha demostrado que la microbiota comensal y especialmente la microbiota intestinal, tiene un papel importante en la resistencia a los antibióticos<sup>82</sup>, ya que una alta densidad bacteriana junto con una gran reserva genética combinada con elevada exposición a antibióticos utilizados tanto en medicina humana como en medicina veterinaria, es una explosiva combinación para la selección de resistencia a los antibióticos en la microbiota comensal<sup>9</sup>. Además de la exposición a los antibióticos, los antecedentes genéticos de la cepa también parecen afectar los patrones de resistencia a los antibióticos. En el presente estudio de los tres aislamientos que presentaron resistencia, dos se identificaron dentro del filo-grupo A y uno en el filo-grupo D, estos resultados son similares a otros en donde se revela que cepas del filo-grupo A<sup>83</sup> y algunas cepas del filo-grupo D<sup>84</sup> son particularmente permisivas al desarrollo de resistencia a cefalosporinas de tercera generación, como en el estudio actual donde se observó resistencia a cefalosporinas de 1<sup>a</sup> (Cefazolina), 3<sup>a</sup> (Cefepima) y 4<sup>a</sup> (Ceftazidima) generación. Por el contrario las cepas del filo-grupo B2 son menos resistentes que otras cepas, independientemente de los mecanismos moleculares involucrados en la adquisición de la resistencia (por ejemplo mutación o adquisición de genes), y tener menor prevalencia de integrones en cepas de *E. coli* comensal de huéspedes humanos<sup>85</sup> y animales<sup>86</sup>. Se ha descrito que la resistencia en cepas de *E. coli* intestinal es promovida por exposición reciente a los antibióticos<sup>87</sup>, dieta<sup>88</sup> e higiene deficiente<sup>89</sup>. Las poblaciones de *Escherichia coli* están estructuradas en cuatro principales grupos filogenéticos A, B1, B2, y D<sup>12</sup> y los aislados del grupo filogenético B2 parecen ser los menos resistentes a los antibióticos<sup>75-76</sup>.

Gran cantidad de especies bacterianas están presentes en alta densidad en un entorno que permite intercambio genético entre bacterias, que a su vez pueden difundir entre los ecosistemas a través del contacto entre humanos y animales, la cadena alimentaria y el reciclado de los residuos animales como fertilizante. Algunos estudios han documentado la prevalencia de bacterias multiresistentes asociadas a integrones, herramientas moleculares

altamente eficientes utilizadas por las bacterias para la adquisición y expresión de resistencia microbiana en microbiota comensal humana<sup>85</sup> además se ha reportado que los genes de resistencia antimicrobiana se pueden encontrar en elementos móviles como son plásmidos, transposones e integrones<sup>90</sup>.

Un hecho realmente importante a considerar es que actualmente uno de los mayores problemas es la creciente resistencia a los antibióticos que se observa en muchas especies bacterianas de origen animal, humano y procedente de alimentos, por lo que encontrar resultados como los de este estudio nos indica que el manejo de los animales en la reserva donde se obtuvieron las muestras es el adecuado y que pese a que en ese lugar cohabitan otras especies la resistencia microbiana es baja.

La serotipificación es un método bien establecido que fue desarrollado con base en las diferencias en los antígenos O, K y H determinados por la porción del lipopolisacárido (LPS), polisacárido capsular y proteínas flagelares, respectivamente<sup>91</sup>. Existen 186 serotipos O y 56 antígenos flagelares (H), sin embargo estas cifras siguen en constante cambio, al identificar nuevos serotipos<sup>92</sup>. En la literatura no se han reportado estudios sobre la utilización de la técnica de serotipificación en aislamientos de *E. coli* comensal y menos aun en muestras pertenecientes a ciervo rojo (*Cervus elaphus*) en México. El aislamiento que presentó el tipo rugoso pudo originarse por mutaciones que afectan cualquiera de los diferentes pasos en la biosíntesis de la cadena O, del lipopolisacárido<sup>93-95</sup>.

En este estudio se observaron los serogrupos O5, O6, O23, O38, O70, O75 y O91 algunos aislamientos no fue posible identificarlos debido a que el serogrupo no estaba dentro de los utilizados o porque corresponden a un serogrupo no identificado, sugiriendo que dichos serogrupos podrían ser específicos para esta especie animal. En un estudio realizado en España por Sánchez y cols en el 2009<sup>96</sup> se reportan los serogrupos encontrados en muestras de varias especies de *cérvidos* que son O2, O8, O128, O146, O166 y O174, el serogrupo más frecuentemente encontrado fue el O146. Los serogrupos O20, O25, O166, O171, O174 y O176 no se habían encontrado previamente en rumiantes salvajes. Estos datos no concuerdan con lo reportado en este estudio pero dan idea de los serogrupos que se pueden encontrar en las especies de *cérvidos* silvestres.

En la identificación de serogrupos el O6 fue el más frecuente con 5 aislamientos positivos, seguido de los serogrupos O70 y O23 con tres aislamientos positivos cada uno, en menor número estuvieron los serotipos O5, O38, O75 y O91 con tan solo un aislamiento positivo, sin embargo seis aislamientos no fueron identificados y uno presentó características de cepa rugosa (Cuadro 4). De estos serogrupos el O6 se ha visto involucrado como causa de enfermedad extraintestinal tanto en perros como en ganado bovino<sup>97</sup>, así como en gatos y humanos<sup>96</sup>. Mientras que el serotipo O5 ha sido relacionado con enfermedad también en ganado vacuno, además de ganado ovino<sup>97</sup>. El resto de los serogrupos no han sido reportados en animales, sin embargo a dichos serogrupos (O23, O38, O70, O75 y O91) se les relaciona con enfermedad en humanos<sup>98</sup>. Por otra parte, los antígenos flagelares, nos proporcionan información interesante de cómo se comportan los aislamientos de este estudio, ya que se encontró diversos serotipos como el H9, H16, H21, H25 y H34.

El presente estudio representa el primer trabajo de caracterización de cepas de *E. coli* comensal en ciervo rojo (*Cervus elaphus*), realizado en México, sin embargo es necesario realizar más estudios para ampliar los hallazgos obtenidos en el presente trabajo.

## 8. CONCLUSIÓN

- Este es el primer trabajo de cepas comensales de *E. coli* en ciervo rojo (*Cervus elaphus*) realizado en México donde se determinan grupos filogenéticos, sensibilidad a quimioterapéuticos, genes de virulencia y serotipificación.

## 9. REFERENCIAS

1. GALLINA S, ESCOBEDO-MORALES LA. Análisis sobre las Unidades de Manejo (UMAs) de ciervo rojo (*Cervus elaphus* Linnaeus, 1758) y wapití (*Cervus canadensis* (Erxleben, 1777) en México: problemática para la conservación de los ungulados nativos. *Journal-Tropical Conservation Science* 2009; 2(2):251-265.
2. LILLEHAUG A, BERGSJØ B, SCHAU J, BRUHEIM T, VIKØREN T, HANDELAND K. *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., Verocytotoxic *Escherichia coli*, and Antibiotic Resistance in Indicator Organisms in Wild Cervids. *Acta Veterinaria Scandinavica* 2005; 46:23-32.
3. GRIFFIN PM, TAUXE RV. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol. Rev* 1991; 13:60-98.
4. MORABITO S, DELL'OMO G, AGRIMI U, SCHMIDT H, KARCH H, CHEASTY T, CAPRIOLI A. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in feral pigeons. *Vet Microbiol* 2001; 82:275-283.
5. KEENE WE, SAZIE E, KOK J, RICE DH, HANCOCK DD, BALAN *et al.* An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections traced to jerky made from deer meat. *Journal of the American Medical Association* 1997; 277: 1229-1231.
6. CODY SH, GLYNN MK, FARRAR JA, CAIRNS KL, GRIFFIN PM, KOBAYASHI J *et al.* An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection from unpasteurized commercial apple juice. *Annals of Internal Medicine* 1999; 130: 202-209.
7. GYLES CL, FAIRBROTHER JM. Pathogenesis of bacterial infections in animals, 3era ed., Iowa State University Press, Ames, 2004.
8. NATARO JP, KAPER JB. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11:142-201.
9. TENAILLON O, SKURNIK D, PICARD BERTRAND, DANAMUR E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *NATURE REVIEWS* 2010; 8: 207-217.
10. JOHNSON JR. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4(1): 80-128.

11. CARTER GR, DARLA JW. Veterinary Bacteriology and mycology. Sources and transmission of infectious agents. 6a ed. Iowa State Press. 2004.
12. HERZER PJ, INOUE SM, WHITTAM TS. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. J. Bacteriol 1990; 172: 6175-6181.
13. SELANDER RK, CAUGANT DA, WHITTAM TS. Genetic structure and variation in natural populations of *Escherichia coli*, p. 1625-1648. In F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D.C, 1987.
14. CLERMONT O, BONACORSI S, BINGEN E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. Appl Environ Microbiol 2000; 66:4555-4558.
15. GORDON DM, CLERMONT O, TOLLEY H, DENAMUR E. Assigning *Eschechia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. Environ. Microbiol 2008; 10:2484-2496.
16. LECOINTRE G, RACHDI L, DARLU P, DENAMUR E. *Escherichia coli* molecular phylogeny using the incongruence length difference test. Mol Biol Evol 1998; 15:1685–1695.
17. BERGTHORSSON U, OCHMAN H. Distribution of Chromosome length variation in natural isolates of *Escherichia coli*. Mol Biol Evol 1998; 15: 6–16.
18. JOHNSON JR, DELAVARI P, KUSKOWSKI M, STELL AL. Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. J Infect Dis 2001; 183:78–88.
19. RUSSO TA, JOHNSON JR. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. J. Infect. Dis 2000; 181: 1753-1754.
20. FRANZ M, HÖRL WH. Common errors in diagnosis and management of urinary tract infection. I:Pathophysiology and diagnostic techniques. Nephrol Dial Transplant 1999; 14: 2746-2753.

21. JOHNSON JR, KUSKOWSKI MA, MENARD M, GAJEWSKI A, XERCAVINS M, GARAU J. Similarity between human and chicken *Escherichia coli* isolates in relation to ciprofloxacin resistance status. *J Infect Dis* 2006; 194(1): 71-78.
22. DASZAL P, CUNNINGHAM AA, HYATT AD. Emerging infectious diseases of wildlife threats to biodiversity and human health. *Science* 2000; 287:443-449.
23. KRAUSE G, ZIMMERMANN S, BEUTIN L. Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin-(eae) gene positive *Escherichia coli* types. *Vet Microbiol* 2005; 106: 87-95.
24. DONNENBERG MS, KAPER JB. Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1992; 60:3953-3961.
25. 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.
26. SCALETSKY IC, SILVA ML, Trabulsi LR. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect. Immun* 1984; 45:534-536.
27. LEJEUNE JT, HANCOCK D, WASTESON Y, SKJERVE E, URDAHL AM. Comparison of *E. coli* O157 and Shiga toxin-encoding genes (*stx*) prevalence between Ohio, USA and Norwegian dairy cattle. *International Journal of Food Microbiology* 2006; 109:19-24.
28. BEUTIN L, GEIER G, STEINRÜCK H, ZIMMERMANN S, SCHEUTZ F. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J Clin Microbiol* 1993; 31:2483-2488.
29. MAINIL JG, DAUBE G. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? *J. Appl. Microbiol* 2005; 98:1332-1344.
30. PATON JC, PATON AW. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Infect. Clin Microbiol Rev* 1998; 11:450-479.
31. ISHII S, MEYER M, SADOWSKY J. Relationship between phylogenetic groups, genotypic clusters, and virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains from diverse human and animal sources. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73:5703-10.

32. HEUVELINK AE, VAN HEERWAARDEN C, ZWARTKRUIS-NAHUIS JTM, VAN OOSTEROM R, EDINK K, VAN DUYNHOVEN THP. *et al. Escherichia coli* O157 infection associated with a petting zoo. *Epidemiol Infect* 2002; 129:295–302.
33. RENTER DG, SARGEANT JM, HYGSTORM SE, HOFFMAN JD, GILLESPIE JR. *Escherichia coli* O157:H7 in free-ranging deer in Nebraska. *Journal of Wildlife Diseases* 2001; 37:755-760.
34. NAGANO H, HIROCHI T, FUJITA K, WAKAMORI Y, TAKESHI K, YANO S. Phenotypic and genotypic characterization of beta-D glucuronidase-positive Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolates from deer. *Journal of Medical Microbiology* 2004; 53: 1037-1043.
35. RABATSKY-EHR T, DINGMAN D, MARCUS R, HOWARD R, KINNEY A, MSHAR P. Deer meat as the source for a sporadic case of *Escherichia coli* O157:H7 infection, Connecticut. *Emerging Infectious Diseases* 2002 8: 525–527.
36. FAIRBROTHER JM, NADEAU J. *Escherichia coli*: on farm contamination of animals. *Rev Sci Tech Int Epiz* 2006; 25 (2), 555-569.
37. HANCOCK DD, BESSER TE, KINSEL M, TARR I, RICE DH, PAROS MG. The prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy and beef cattle in Washington State. *Epidemiology and Infection* 1994; 113:199–207.
38. SARGEANT JM, HAFER DJ, GILLESPIE JR, OBERST RD, FLOOD SJA. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in white-tailed deer sharing rangeland with cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1999; 215: 792–794.
39. RICE DH, HANCOCK DD, BESSER TE. Letter to the editor: Verotoxigenic *E. coli* O157 colonization of wild deer and range cattle. *The Veterinary Record* 1995: 137: 524.
40. LEVINE MM. *E. coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis* 1987; 155:377-389.

41. DUPONT HL, FORMAL SB, HORNICK RB, SNYDER MJ, LIBONATI JP, SHEAHAN DG *et al.* Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. *N Engl J Med* 1971; 285:1–9.
42. ELSINGHORST EA, KOPECKO DJ. Molecular cloning of epithelial cell invasion determinants from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun* 1992; 60:2409–2417.
43. ELSINGHORST EA, WEITZ JA. Epithelial cell invasion and adherence directed by the enterotoxigenic *Escherichia coli* *tib* locus is associated with a 104-kilodalton outer membrane protein. *Infect Immun* 1994; 62:3463–3471.
44. SEARS CL, KAPER JB. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol Rev* 1996; 60:167–215.
45. CROXEN MA, FINLAY BB. Molecular mechanism of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology* 2010; 8: 26-38.
46. WEI J, GOLDENBERG MB, BURLAND V, VENKATESAN MM, DENG W, FOURNIER G *et al.* Complete genome sequence and comparative genomics of *Shigella flexneri* serotype 2a strain 2457T. *Infect. Immun* 2003; 71:2775–2786.
47. PUPO GM, LAN R, REEVES PR. Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of their many characteristics. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000a; 97:10567–10572.
48. JACQUES M. Shiga/Verocytotoxins and Shiga/verotoxigenic *Escherichia coli* in animals. *Vet Res* 1999; 30: 235-257.
49. GYLES CL. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *J Anim Sci* 2007; 85:(E. Suppl.) E45-E62.
50. SCHÜLLER S, HEUSCHKEL R, TORRENTE F, KAPER JB, PHILLIPS AD. Shiga toxin binding in normal and inflamed human intestinal mucosa. *Microbes Infect* 2007; 9: 35–39.
51. PRUIMBOOM-BREES IM, MORGAN TW, ACKERMANN MR, NYSTROM ED, SAMUEL JE, CORNICK NA *et al.* Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2000; 97: 10325–10329.
52. SIXMA TK, KALK KH, VAN ZANTEN BA, DAUTER Z, KINGMA J, WITHOLT B, HOL WG. Refined structure of *Escherichia coli* heatlabile

- enterotoxin, a close relative of cholera toxin. *J Mol Biol* 1993; 230:890–918.
53. DICKINSON BL, CLEMENTS JD. Dissociation of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin adjuvant activity from ADP-ribosyltransferase activity. *Infect Immun* 1995; 63:1617–1623.
  54. SAVARINO SJ, FOX P, YIKANG D, NATARO JP. Identification and characterization of a gene cluster mediating enteroaggregative *Escherichia coli* aggregative adherence fimbria I biogenesis. *J Bacteriol* 1994; 176:4949–4957.
  55. YAMAMOTO T, KANEKO M, CHANGCHAWALIT S, SERICHANTALERGS O, IJUN S, ECHEVERRIA P. Actin accumulation associated with clustered and localized adherence in *Escherichia coli* isolated from patients with diarrhea. *Infect Immun* 1994; 62:2917–2929.
  56. RASHEED JK, GUZMAN-VERSEZCO LM, KUPERSZTOCH YM. Two precursors of the heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: evidence of extracellular processing. *Mol Microbiol* 1990; 4:265–273.
  57. TURNER SM, SCOTT-TUCKER A, COOPER LM, HENDERSON IR. Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett* 2006; 263, 10–20.
  58. BLANCO M, PADOLA NL, KRUGER A, SANZ ME, BLANCO JE, GONZÁLEZ EA *et al.* Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. *International Microbiology* 2004; 7:269-276.
  59. GARMENDIA J, FRANKEL G, CREPIN VF. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infect Immun* 2005a 73:2573–2585.
  60. ADU-BOBIE J, FRANKEL G, BAIN C, GONCALVES AG, TRABULSI LR *et al.* Detection of intimins  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , and  $\delta$ , four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. *J Clin Microbiol* 1998; 36:662-668.
  61. OSWALD E, SCHMIDT H, MORABITO S, KARCH H, MARCHÈS O, CAPRIOLI A. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infect Immun* 2000 68:64-71.

62. SON WG, GRAHAM TA, GANNON VPJ. Immunological characterization of *Escherichia coli* O157:H7 intimin  $\gamma$ 1. Clin Diagn Lab Immunol 2002; 9:46-53.
63. REEVES P. Role of O-antigen variation in the immune response. Trends Microbiol 1995 3:381–386.
64. REEVES PR, HOBBS M, VALVANO MA, SKURNIK M, WHITFIELD C, COPLIN D *et al.* Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. Trends Microbiol 1996; 4:495–503.
65. WHITFIELD C. Biosynthesis of lipopolysaccharide O antigens. Trends Microbiol 1995; 3(5):178-85.
66. REID SD, SELANDER RK, WHITTAM TS: Sequence diversity of flagellin (*fliC*) alleles in pathogenic *Escherichia coli*. J Bacteriol 1999; 181:153-160.
67. WANG L, ROTHEMUND D, CURD H, REEVES PR. Sequence diversity of the *Escherichia coli* H7 *fliC* genes: implication for a DNAbased typing scheme for *E. coli* O157:H7. J Clin Microbiol 2000; 38:1786-1790.
68. ZHANG WL, BIELASZEWSKA M, BOCKEMUHL J, SCHMIDT H, SCHEUTZ F, KARCH H. Molecular analysis of H antigens reveals that human diarrheagenic *Escherichia coli* O26 strains that carry the *eae* gene belong to the H11 clonal complex. J Clin Microbiol 2000; 38:2989-2993.
69. URDAHL AM, BEUTIN L, SKJERVE E, ZIMMERMANN S, WASTESON Y. Animal host associated differences in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from sheep and cattle on the same farm. J Appl Microbiol 2003; 95:92-101.
70. GIRON JA, HO AS, SCHOOLNIK GK. Characterization of fimbriae produced by enteropathogenic *Escherichia coli*. J Bacteriol 1993;175:7391–7403.
71. TOBE T, SASAKAWA C. Role of bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli* in host cell adherence and in microcolony development. Cell Microbiol 200;13:579–585.
72. BUYSSE JM, STOVER CK, OAKS EV, VENKATESAN M, KOPECKO DJ. Molecular cloning of invasion plasmid antigen (*ipa*) genes from *Shigella flexneri*: analysis of *ipa* gene products and genetic mapping. J Bacteriol 1987;169:2561-2569.

73. PITCHER DG, SAUNDERS NA, OWEN RJ. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Journal* 1989; 8: 151-156.
74. ØRSKOV F. ØRKOV I. Serotyping of *Escherichia coli*. In *Methods in Microbiology*, vol 14, pp. 43-112. Edited by T. Bergan. London: Academy Press, 1984.
75. DEBROY C, ROBERTS E. Screening petting zoo animals for the presence of potentially pathogenic *Escherichia coli*. *J Vet Diagn Invest* 2006; 18:597-600.
76. TORNIEPOTH NG, JOYLENE J, SALGADO K, DE PAULO J, LATHAM E, CLOTILDES MN *et al.* Differentiation of Pathogenic *Escherichia coli* Strains in Brazilian Children by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 1995; 1371-1374.
77. GORDON DM, CROWLING A. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology* 2003; 149:3575–3586.
78. CLERMONT O, OLIER M, HOEDE C, DIANCOURT L, BRISSE S, KEROUDEAN *et al.* Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. *Infection. Genetics and Evolution* 2011; 11:654-662.
79. ESCOBAR-PÁRAMO P, LE MENACH A, LE GALL T, AMORIN C, GOURIOU S, PICARD B *et al.* Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. *Environmental Microbiology* 2006; 8: (11) 1975-1984.
80. BALDY-CHUDZIK K, MACKIEWICZ P, STOSIK M. Phylogenetic background, virulence gene profiles, and genomic diversity in commensal *Escherichia coli* isolated from ten mammal species living in one zoo. *Veterinary Microbiology* 2008; 131:173-184.
81. GIRARDEAU JP, DALMASSO A, BERTIN Y, DUCROT C, BORD S, LIVRELLI V *et al.* Association of virulence genotype with phylogenetic background in comparison to different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 6098-6107.
82. ANDREMONT A. Commensal flora may play key role in spreading antibiotic resistance. *ASM News* 2003; 63, 601–607.

83. MAMMERI H, GALLEN M, NORDMANN P. Role of the Ser-287-Asn replacement in the hydrolysis spectrum extension of AmpC  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53, 323–326.
84. DESCHAMPS C, CLERMONT O, HIPEAUX MC, ARLET G, DANAMUR E, BRANGER C. Multiple acquisitions of CTX-M plasmids in the rare D2 genotype of *Escherichia coli* provide evidence for convergent evolution. *Microbiology* 2009; 155: 1656–1668.
85. SKURNIK D, LE MENACH A, ZURAKOWSKI D, DIDIER M, COURVALLIN P, DENAMUR E *et al.* Integron-associated antibiotic resistance and phylogenetic grouping of *Escherichia coli* isolates from healthy subjects free of recent antibiotic exposure. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 3062–3065.
86. SKURNIK D, RUIMY R, ANDREMONT A, AMORIN C, ROUQUET P, PICARD B *et al.* Effect of human vicinity on antimicrobial resistance and integrons in animal faecal *Escherichia coli*. *J. Antimicrob Chemother* 2006; 57: 1215–1219.
87. MURRAY BE, RENSIMER ER, DUPONT HL. Emergence of high-level trimethoprim resistance in fecal *Escherichia coli* during oral administration of trimethoprim or trimethoprim-sulfamethoxazole. *N Engl J Med* 1982; 306:130–135.
88. CORPET DE. Antibiotic resistance from food. *N Engl J Med* 1988; 318:1206–1207.
89. WALSON JL, MARSHALL B, POKHREL BM, KAFLE KK, LEVY SB. Carriage of antibiotic-resistant fecal bacteria in Nepal reflects proximity to Kathmandu. *J Infect. Dis* 2001; 184:1163–1169.
90. CARATTOLI A. Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Vet Res* 2001; 32: 243–259
91. ØRSKOV F Y ØRSKOV I. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Can. J Microbiol* 1992; 38:699-704.
92. NAVARRO A, ESLAVA C, PEREA LM, INZUNZA A, DELGADO G, MORALES-ESPINOSA G *et al.* New enterovirulent *Escherichia coli* serogroup 64474 showing antigenic and genotypic relationships to *Shigella boydii* 16. *Journal of Medical Microbiology* 2010; 59: 453-461.

93. PREHM P, SCHMIDT G, STIRM S. On the Mutations Responsible for the Rough Phenotype of *Escherichia coli* B. *Journal of General Microbiology* 1976; 97:121-124.
94. RICK PD. Lipopolysaccharide biosynthesis. En *Escherichia coli and Salmonella typhimurium, cellular and molecular biology*, F. C. Neidhardt (Ed.). Washington, DC: ASM Publications 1987; p. 648-662.
95. SCHNAITMAN CA, KLENA JD. Genetics of Lipopolysaccharide Biosynthesis in Enteric Bacteria. *Microbiological Reviews* 1993;57:655-682
96. SANCHEZ S, GARCIA SANCHEZ A, MARTÍNEZ R, BLANCO J, BLANCO JE, BLANCO M *et al.* Detection and characterisation of Shiga toxin –producing *Escherichia coli* other than *Escherichia coli* O157:H7 in wild ruminants.
97. GYLES CL, PRESCOTT JF, SONGER JG, THOEN CO. *Escherichia coli*, en *Pathogenesis of bacterial Infections in animals*, 4a Ed. Blackwell Publishing 2004.
98. JOHNSON JR, JOHNSON B, CLABOTS CR., KUSKOWSKI MA, ROBERTS E, DEBROY C. Virulence Genotypes and Phylogenetic Background of *Escherichia coli* Serogroup O6 Isolates from Humans, Dogs, and Cats. *J. Clin. Microbiol* 2008; 46:417-422.