



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**IDENTIFICACIÓN DE GRUPOS FILOGENÉTICOS Y GENES DE VIRULENCIA  
EN AISLAMIENTOS DE *Escherichia coli* COMENSAL, EN LOBOS MARINOS  
*Zalophus californianus* DE VIDA LIBRE EN BAJA CALIFORNIA SUR, MÉXICO**

**TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:  
KARLA ALEJANDRA LÓPEZ MURILLO**

**TUTOR  
DR. GERARDO SUZÁN AZPIRI  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**COMITÉ TUTOR  
DRA. BEATRIZ ARELLANO REYNOSO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
DR RIGOBERTO HERNÁNDEZ CASTRO  
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**MÉXICO D. F.**

**MAYO 2014**



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.

*“The sea, once it casts its spell, holds one in  
its net of wonder forever”*

JACQUES-YVES COUSTEAU

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al comité tutor por todo el tiempo y recursos invertidos en este trabajo.

Al jurado por sus valiosas aportaciones.

A los académicos, técnicos y estudiantes del laboratorio de investigación de tuberculosis y brucelosis de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente a la maestra Rosalía Ávalos, por su apoyo con las técnicas de colección de muestras y de laboratorio.

A los académicos, técnicos y estudiantes del laboratorio de ecología de agentes patógenos del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, especialmente al doctor Rigoberto Hernández, por las largas horas de trabajo en el laboratorio.

Al candidato a doctor Rafael Ojeda, por su apoyo en la sección de resultados.

Este estudio fue apoyado por el proyecto PAPIIT #IN229111 UNAM.

A todos los que de alguna manera participaron en este proceso, muchas gracias.

## Resumen

*Escherichia coli* es parte de la microbiota normal y puede actuar como un centinela natural de cambios medioambientales. Diversos estudios han clasificado a *E. coli* en cuatro grupos filogenéticos: A, B1, B2 y D, asociados también a la presencia de genes de virulencia. Los patotipos de *E. coli* identificados en humanos y animales, han sido reportados en especies silvestres, sin embargo todavía queda mucho por entender acerca de la adquisición de genes de virulencia y de resistencia a antibióticos, los efectos en las poblaciones silvestres y la identificación de posibles actividades antropogénicas involucradas en los procesos de infección y colonización. El propósito de este trabajo fue identificar resistencia a quimioterapéuticos, grupos filogenéticos y presencia de los genes de virulencia: *eae*, *stx1*, *stx2*, *bfp*, *lt*, *st* e *ipaH* en cepas de *E. coli* comensal aislada de muestras rectales de dos poblaciones de *Zalophus californianus*. Las muestras rectales fueron colectadas en 2011 y 2012 y cultivadas en agar MacConkey. La identificación y la resistencia a quimioterapéuticos se determinaron con el sistema automatizado MicroScan 96. Los grupos filogenéticos se identificaron con una PCR utilizando el método de Clermont, y los genes de virulencia por PCR simple y múltiple. Se aislaron 63 cepas de *E. coli*; los resultados mostraron un aislamiento resistente a amoxicilina/ácido clavulánico (>16/8 mg/l), 2 a trimetoprim/sulfametoxazol (>2/38 mg/l), 7 a ampicilina/sulbactam (>16/8 mg/l) y uno a cefoxitina (16 mg/l). 22 pertenecieron al grupo A, 5 al B1, 2 al B2 y 34 al D. El 61.9% de los aislamientos fue positivo al menos a un gen de virulencia, 13 a *eae*, 9 a *stx1*, 18 a *stx2*, 14 a *bfp*, 8 a *lt* y 2 a *st*. En este estudio reportamos por primera vez la distribución de aislamientos de *E. coli* en los grupos filogenéticos, resistencia a quimioterapéuticos y la presencia de genes de virulencia en lobos marinos de California. Estos hallazgos serán modelos de rastreo útiles, para determinar el grado de daño al medio ambiente en esta región geográfica.

**Palabras clave:** *Escherichia coli*, resistencia antimicrobiana, grupos filogenéticos, genes de virulencia, *Zalophus californianus*, Baja California Sur.

## Abstract

*E. coli* is considered part of the normal microflora and acts as a potential natural sentinel for environmental changes. Several studies have placed *E. coli* strains in four main phylogenetic groups: A, B1, B2 and D, also related to the presence of virulence and resistance genes. *E. coli* pathotypes associated with animal and humans have been reported in wildlife species, but there is still much to understand about the acquisition of antibiotic resistance and virulence genes, the effects on wildlife populations and the identification of possible anthropogenic activities involved in the infection or colonization. The aim of this work was to identify antibiotic resistance, phylogenetic groups and presence of *eae*, *stx1*, *stx2*, *bfp*, *lt*, *st* and *ipaH* virulence genes, in commensal *E. coli* isolates, from rectal samples in two populations of *Zalophus californianus*. Rectal samples were collected between 2011 and 2012 and cultured individually in MacConkey agar plates. Identification and antimicrobial susceptibilities for each sample were determined by the MicroScan 96 automated lecture system using standardized minimum concentration breakpoints. Phylogenetic groups were determined by triplex PCR using the Clermont method and virulence genes were identified by simple and multiplex PCR. 63 strains of *E. coli* were isolated; results showed one isolation resistant to amoxicillin/clavulanic acid (>16/8 mg/l), 2 resistant to trimethoprim/sulfamethoxazole (>2/38 mg/l), 7 resistant to ampicillin/sulbactam (>16/8 mg/l) and one to cefoxitin (16 mg/l). 22 belonged to group A, 5 to B1, 2 to B2 and 34 to group D. 61.9% of the isolates were positive to at least one virulence gene, 13 were positive to *eae*, 9 to *stx1*, 18 to *stx2*, 14 to *bfp*, 8 to *lt* and 2 to *st*. In this study we report for the first time the distribution of *E. coli* isolates within the four main phylogenetic groups, antibiotic resistance and the presence of virulence genes in California sea lions. These findings will be useful trace models, to determine the degree of disturbance of the environment in this geographic region.

**Key words:** *Escherichia coli*, antibiotic resistance, phylogenetic groups, virulence genes, *Zalophus californianus*, Baja California.

## Contenido

Agradecimientos .....	ii
Resumen .....	iii
Abstract.....	iv
Lista de cuadros .....	vii
Lista de figuras .....	vii
Introducción .....	1
Ecosistemas marinos .....	1
Escherichia coli .....	2
Resistencia a quimioterapéuticos .....	3
Grupos filogenéticos de <i>E. coli</i> .....	5
Patotipos y genes de virulencia de <i>E. coli</i> .....	6
<i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC).....	6
<i>E. coli</i> productora de toxina shiga (STEC)/ <i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC) ..	7
<i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC).....	8
<i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC) .....	9
<i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC) .....	11
<i>E. coli</i> de adherencia difusa (DAEC).....	11
<i>E. coli</i> adherente-invasiva (AIEC) .....	12
Península de Baja California .....	14
Isla San Esteban.....	15
Isla Magdalena .....	15
Lobos marinos de California ( <i>Zalophus californianus</i> ).....	15
Justificación .....	16
Hipótesis.....	17
Objetivo General .....	17
Objetivos Específicos .....	17
Material y Métodos.....	18
Colección de muestras .....	18
Aislamiento, Identificación Bacteriana y Concentración Mínima Inhibitoria .....	18
Cepas control de <i>E. coli</i> .....	19
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	19
Identificación molecular de <i>E. coli</i> .....	19

Determinación de grupos filogenéticos .....	20
Detección de genes de virulencia.....	20
Resultados.....	24
Aislamiento, identificación bacteriana y MIC .....	24
Identificación molecular de <i>E. coli</i> .....	24
Determinación de grupos filogenéticos .....	24
Detección de genes de virulencia.....	33
Discusión y conclusiones.....	37
Conclusiones.....	45
Lista de abreviaturas.....	46
Referencias.....	47



### **Lista de cuadros**

<b>Cuadro 1</b> Marcadores de virulencia típicos de los patotipos de <i>E. coli</i> , función y localización genómica.....	13
<b>Cuadro 2.</b> Iniciadores para la detección de genes de virulencia en muestras de <i>E. coli</i> . .....	23
<b>Cuadro 3</b> Resistencia antimicrobiana, grupos filogenéticos, presencia de genes de virulencia y los patotipos asociados, de los 63 aislamientos de <i>E. coli</i> de <i>Zalophus californianus</i> . .....	25
<b>Cuadro 4.</b> Distribución de los 63 aislamientos de <i>E. coli</i> comensal de <i>Zalophus californianus</i> de las Islas Magdalena y San Esteban en los diferentes grupos filogenéticos. ....	31
<b>Cuadro 5.</b> Detección de solo un gen de virulencia en 24 aislados, los patotipos asociados, y su distribución entre los grupos filogenéticos. ....	31
<b>Cuadro 6.</b> Detección de dos o más genes de virulencia en 15 aislados de <i>E. coli</i> , los patotipos asociados, y su distribución entre los grupos filogenéticos.....	34
<b>Cuadro 7.</b> Distribución de genes de virulencia de <i>E. coli</i> y su distribución entre los cuatro grupos filogenéticos. ....	35

### **Lista de figuras**

<b>Figura 1.</b> Árbol de decisión dicotómica para la determinación del grupo filogenético de las cepas de <i>E. coli</i> , utilizando los resultados de la amplificación de la PCR de los genes <i>chuA</i> , <i>yjaA</i> y el fragmento TSPE4.C2 (Clermont <i>et al.</i> , 2000). .....	22
<b>Figura 2.</b> Amplificación del gen <i>gadA</i> . Control positivo <i>E. coli</i> K12; control negativo <i>Salmonella</i> Typhimurium; aislamientos 13-a-29b; marcadores de peso molecular 100 pb DNA ladder y 1 Kb DNA ladder.....	30
<b>Figura 3.</b> Amplificación de los genes <i>chuA</i> (279 pb) <i>yjaA</i> (211 pb) y el fragmento de DNA TspE4C2.1. (152 pb) en los patotipos de <i>E. coli</i> ; control positivo <i>E. coli</i> K12; control negativo de reacción de PCR agua (-); aislamientos 16a y 30a; marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder.....	32
<b>Figura 4.</b> Amplificación de los genes de virulencia de diversos patotipos de <i>E. coli</i> . Muestras J6-27b-9a-34a-10b-30a con los diferentes genes de virulencia: <i>bfp</i> (324 pb), <i>stx1</i> (582 pb), <i>stx2</i> (255pb), <i>eae</i> (890 pb), <i>lt</i> (132 pb) y <i>st</i> (190 pb). Marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder. ....	35

## Introducción

### ***Ecosistemas marinos***

Los ecosistemas marinos se encuentran dentro de las fuentes más valiosas y mayormente explotadas de servicios ecosistémicos (Staudinger, 2012).

Desafortunadamente, estos sistemas se han deteriorado rápidamente, principalmente por la degradación, sobre explotación, introducción de especies exóticas, contaminación, acidificación y disrupción climática (Ceballos & Ehrlich, 2002), reduciendo así las funciones ecosistémicas (Aguirre & Tabor, 2008). Este deterioro se debe primordialmente a que aproximadamente 60 por ciento de los asentamientos humanos a nivel mundial se encuentran a 100 kilómetros de alguna costa, y 20 por ciento de los ecosistemas adyacentes a los océanos han sido modificados (Burke, 2000, Pompa *et al.*, 2011).

Lo anterior promueve la diseminación tanto de patógenos de origen humano como de patógenos marinos a los sistemas oceánicos, asociados con animales marinos, fitoplancton, zooplancton, y sedimentos, así como el intercambio de estos entre humanos y animales (Stewart *et al.*, 2008). Las interacciones entre hospederos, patógenos y el medio ambiente influyen los brotes de enfermedades, por lo que cambios en alguno de estos componentes, puede conllevar hacia estados de alta intensidad de enfermedad, o incluso alejarse de estos (Burge *et al.*, 2013).

En un análisis realizado por Stewart y colaboradores (2008), subrayan que la importancia del mantenimiento de la salud de los ecosistemas marinos, ha promovido un aumento en la investigación que se realiza alrededor de temas como: los microorganismos importantes para la salud pública, la virulencia, enfermedades zoonóticas y emergentes, así como el estudio de animales y medio ambientes como centinelas de la calidad del agua, fuentes de contaminación y detección de agentes patógenos.

Para poder continuar con un manejo efectivo de los ecosistemas marinos y preservar la salud de estos, una de las estrategias es determinar los efectos de agentes infecciosos sobre las poblaciones marinas (Burge *et al.*, 2013). La detección directa de enterobacterias a través de técnicas moleculares, de muestras medio ambientales como agua, sedimentos, aerosoles y muestras biológicas, es un método de monitoreo de fuentes de contaminación fecal que se ha utilizado desde hace varias décadas (Sidhu *et al.*, 2013, Cabelli *et al.*, 1983, Edberg *et al.*, 2000).

### ***Escherichia coli***

*Escherichia coli* es uno de los modelos bacterianos mejor caracterizados (Tenaillon *et al.*, 2010); es un microorganismo Gram negativo y anaerobio facultativo que se encuentra como parte de la microbiota de la mucosa del intestino grueso, colon y ciego de los mamíferos (Kaper *et al.*, 2004). *E. coli* coloniza el intestino de los mamíferos recién nacidos en pocas horas, y se establece como el anaerobio facultativo más abundante durante toda la vida, además de ser capaz de reproducirse y enfrentarse al medio ambiente intestinal del hospedero que se encuentra en constante cambio (Dobrindt *et al.*, 2013).

Los diferentes serotipos de *E. coli* pueden ser aislados de heces de una amplia variedad de hospederos tanto sanos como enfermos, además de agua y de sedimentos, por lo que ha servido como herramienta en diversos estudios moleculares, biológicos y genéticos (Tenaillon *et al.*, 2010), como por ejemplo: para rastrear fuentes de contaminación fecal, para entender las bases genéticas y los mecanismos moleculares asociados a la adquisición de virulencia de las enterobacterias (DebRoy & Maddox, 2001), así como para la detección de perfiles de susceptibilidad bacteriana a quimioterapéuticos (Rose *et al.*, 2009, Davies, 1996). Por lo anterior, *E. coli* es considerada como un estándar global para la detección de contaminación fecal (Pesapane *et al.*, 2013).

Touchon y colaboradores (2009) han reportado que únicamente 2,000 de los 18,000 genes ortólogos de *E. coli* abarcan el genoma *core* o genoma núcleo,

compuesto por genes con alta homología y conservados, que están presentes en todas las cepas de *E. coli*. Lo anterior, apoya que esta bacteria ha evolucionado gracias a su plasticidad genética, dando lugar a la emergencia de variantes patógenas, así como asociaciones específicas con sus hospederos (Dobrindt, 2005).

### ***Resistencia a quimioterapéuticos***

Los mecanismos por los cuales las bacterias han adquirido resistencia a quimioterapéuticos son: la expresión de porinas transmembranales por medio de las cuales algunas moléculas son transportadas a través de la bicapa lipídica celular (Vila *et al.*, 2007), la expresión de las bombas de flujo que expulsan principalmente macrólidos, tetraciclinas y quinolonas disminuyendo su acumulación intracelular (Poole, 2002, Barker, 1999), por inactivación enzimática de los fármacos como es el caso de las  $\beta$ -lactamasas y enzimas modificadoras del cloranfenicol y de los aminoglicósidos (Robicsek *et al.*, 2006) y por mutaciones en genes que codifican enzimas o proteínas específicas, que confieren mayor resistencia a los compuestos químicos (Nikaido, 2009, Khachatryan *et al.*, 2004).

La resistencia a quimioterapéuticos puede ser el resultado de grandes cambios genómicos, como la adquisición de plásmidos, de elementos móviles como transposones, integrones e islas genómicas (Thomas & Nielsen, 2005, Liu & Pop, 2009, Vila *et al.*, 2007). Tal es el caso de los genes contenidos en plásmidos que codifican para  $\beta$ -lactamasas de tipo CMY y CTX-M, para carbapenemasas de tipo KPC (Jacoby & Munoz-Price, 2005), y transposones con el gen *tet (A)* que codifican una proteína reguladora y un determinante de resistencia a la tetraciclina (Ribera *et al.*, 2003).

Una característica importante de los plásmidos radica en que la mayoría de ellos se transfieren de manera horizontal, permitiendo el intercambio de material genético a organismos del mismo género o de géneros muy distantes (Norman *et al.*, 2009).

La adquisición de genes de resistencia a través de la transferencia horizontal, es considerada de gran importancia en el desarrollo y diseminación de la resistencia a antibióticos entre las bacterias (Davies, 1997). La localización de estos genes en animales silvestres, es una herramienta importante para estimar el grado de contaminación de los ecosistemas, ya que los animales silvestres proveen un mecanismo biológico para su diseminación (Allen *et al.*, 2010).

Existen estudios que evidencian que dichos genes han sido identificados en bacterias colectadas antes de la “era de los antibióticos”, con lo que comprueban que, la resistencia a quimioterapéuticos existe naturalmente en el medio ambiente, y que probablemente estas bacterias adquirieron genes, incluso desde antes de la introducción de los antibióticos y de la presión de selección que estos han ejercido (Allen *et al.*, 2010, Singer *et al.*, 2006). Por lo anterior, las bacterias comensales funcionan como reservorios potenciales de elementos móviles (Shoemaker *et al.*, 2001), que también pueden ser transferidos a bacterias patógenas y viceversa (van den Bogaard & Stobberingh, 2000).

Se ha observado que dentro de los agentes etiológicos de algunas enfermedades se encuentran bacterias resistentes a múltiples quimioterapéuticos. Algunos estudios indican que nunca se había observado un grado tan dramático de resistencia a fármacos en algunos géneros bacterianos. El aumento de dicha resistencia se debe fundamentalmente al abuso en la utilización de quimioterapéuticos para el tratamiento de enfermedades, así como al incremento en la movilidad humana y la industrialización (Hawkey & Jones, 2009).

Los desechos de los asentamientos humanos y de producciones pecuarias, los cuales incluyen residuos de fármacos utilizados en tratamientos médicos, son vertidos en el medio ambiente tanto terrestre como en las costas (Samadpour *et al.*, 2005). La resistencia a fármacos reduce la posibilidad de tratar con eficacia las enfermedades además de aumentar el riesgo de complicaciones (Andersson & Hughes, 2010) y por ende aumentar la morbilidad y mortalidad (Hawkey & Jones, 2009).

Existen pocos reportes de resistencia a antibióticos en animales marinos. Tal es el caso del trabajo de Rose y colaboradores (2009), en donde a partir de diversos tejidos tomados de focas comunes (*Phoca vitulina*), focas grises (*Halichoerus gryphus*) y diferentes especies de pájaros, tanto de vida libre como varados, aislaron diferentes grupos bacterianos e identificaron una alta prevalencia en los perfiles de resistencia a 16 quimioterapéuticos probados.

Por último los estudios en pinípedos varados incluyen: uno realizado por Wallace y colaboradores (2013), en donde además de aislar diversos géneros bacterianos, observaron una importante disminución en la sensibilidad a quimioterapéuticos, en un periodo de seis años, y el estudio realizado por Stoddard y colaboradores (2009), en donde identificaron un aumento de casi 40 por ciento en la resistencia de *E. coli* aislada de elefantes marinos del norte (*Mirounga angustirostris*) después de haber sido tratados con antibióticos en un centro de rehabilitación.

### **Grupos filogenéticos de *E. coli***

Diversos estudios han catalogado a las cepas de *E. coli* en cuatro grupos filogenéticos principales: A, B1, B2 y D (Herzer *et al.*, 1990, Clermont *et al.*, 2000) y más recientemente en el grupo E (Touchon *et al.*, 2009). La asignación de las diferentes cepas de *E. coli* en estos grupos, depende de su nicho ecológico, de la historia natural, de la propensión a causar enfermedad (Gordon *et al.*, 2008), así como de la presencia de diferentes genes de virulencia (Boyd & Hartl, 1998, Picard *et al.*, 1999).

En estos trabajos se ha observado que las cepas comensales de origen intestinal de *E. coli*, se encuentran asociadas a los grupos A y B1, las cepas patógenas extraintestinales pertenecen principalmente al grupo B2 y en segundo término al grupo D (Herzer *et al.*, 1990), y las cepas patógenas intestinales pertenecen a los grupos A, B1 y D (Pupo *et al.*, 1997). Finalmente, las cepas uropatógenas (UPEC) y algunas cepas de *E. coli* medio ambiental también se distribuyen dentro del grupo D (Dobrindt *et al.*, 2013).

Otros estudios han demostrado que la abundancia de los grupos filogenéticos entre los mamíferos, es dependiente a la dieta del hospedero, a la masa corporal y al clima (Gordon & Cowling, 2003).

En el año 2000 Clermont y colaboradores (2000), desarrollaron un método rápido para la determinación de los grupos filogenéticos, mediante la presencia y/o ausencia de tres marcadores genéticos específicos. El gen *chuA*, identificado en *E. coli* O157:H7, el cual codifica una proteína de 69kDa, sintetizada para el transporte del grupo hemo como una fuente de hierro (sideróforo) (Torres & Payne, 1997). El gen *yjaA*, identificado en el genoma de *E. coli* K12, y el fragmento de DNA TSPE4.C2, que codifica para una lipasa estearasa (Gordon *et al.*, 2008).

### ***Patotipos y genes de virulencia de E. coli***

Entre las variantes patógenas intestinales de *E. coli* que han sido bien descritas en la literatura, se encuentran las productoras de toxinas shiga (STEC) (Girardeau *et al.*, 2005), la enterohemorrágica (EHEC), la enterotoxigénica (ETEC), la enteropatógena (EPEC), la enteroinvasiva (EIEC) (Croxen & Finlay, 2010, Kaper *et al.*, 2004), la enteroagregativa (EAEC), la adherente difusa (DAEC) y el nuevo patotipo, *E. coli* adherente-invasiva (AIEC) (Croxen *et al.*, 2013). Estos patovares varían en las manifestaciones clínicas de la enfermedad, los antecedentes filogenéticos (Dobrindt *et al.*, 2013), así como en los factores de virulencia.

#### ***E. coli* enteropatógena (EPEC)**

El patotipo EPEC fue el primero en ser descrito (Kaper *et al.*, 2004), generalmente es un organismo no invasivo, que pertenece al grupo de bacterias que pueden causar lesiones A/E (adhesión y esfacelación) en la superficie del epitelio intestinal del hospedero, provocando diarrea (Croxen *et al.*, 2013). EPEC es una importante causa de muerte por diarreas en niños en países en desarrollo (Nataro & Kaper, 1998). Las EPEC se clasifican en típicas y atípicas, por la presencia o ausencia del plásmido EAF (Moura *et al.*, 2009). La variante patógena atípica, ha sido

aislada en perros, conejos, monos, gatos y rumiantes (Sekse *et al.*, 2011, Moura *et al.*, 2009).

Típicamente EPEC presenta una serie de factores de virulencia; se adhiere al epitelio intestinal a través del pilus formador de mechones (BFP), codificado en el operon *bfp* (Cuadro 1), el cual es considerado un factor predominante en el mecanismo de patogenicidad, ya que forma microcolonias generando un patrón de adherencia localizada (Croxen *et al.*, 2013). El factor inhibidor de linfocitos (LifA), es una adhesina secretada por el sistema de secreción tipo III (T3SS), asociada también a la adherencia y codificada en el gen *lifA* (Badea *et al.*, 2003).

Otros factores de adherencia son: el pilus común de *E. coli* (ECP), un factor de adherencia accesorio relacionado con la colonización de cepas tanto comensales como patógenas, y la proteína EspA, involucrada en la adhesión inicial y en la eliminación de microvellosidades junto con BFP (Cleary *et al.*, 2004).

La transducción de señales y la formación de las lesiones A/E, están mediadas por la interacción de la intimina codificada en el gen *eae*, y la traslocación de una proteína bacteriana, el receptor de intimina translocado (Tir). Tir es insertado en la membrana plasmática de la célula del hospedero, esta proteína cuenta con un dominio extracelular y otro citoplásmico. La intimina se une a la porción extracelular de Tir, proceso en el cual ocurre una adhesión muy estrecha de las bacterias a las células del hospedero, además de estar implicada en la cascada de señalización que provoca el ensamblaje de actina para la formación de pedestales (Campellone, 2010) y estimular la hiperplasia de las criptas intestinales (Higgins *et al.*, 1999).

Una vez adosada la bacteria al epitelio, las proteínas efectoras: Map, EspF, EspG, EspZ, EspH y EspB, son inyectadas a través de T3SS para causar la patogénesis característica de EPEC (Croxen *et al.*, 2013).

#### *E. coli productora de toxina shiga (STEC)/ E. coli enterohemorrágica (EHEC)*

Las STEC son un patotipo causante de diarreas moderadas a sanguinolentas y del síndrome urémico hemolítico (HUS), caracterizado por falla renal aguda, anemia



hemolítica y trombocitopenia (Nataro & Kaper, 1998). Los animales y sus derivados, en especial los rumiantes, el agua y la tierra, son importantes reservorios de esta variante patógena, por lo que su presencia en estos lugares está estrechamente relacionada con contaminación en el medio ambiente, debido a la transmisión fecal-oral (Gyles, 2007, Croxen *et al.*, 2013).

Este patotipo se caracteriza por presentar los genes *stx1*, *stx2* solos o en combinación (Cuadro 1), los cuales codifican para las citotoxinas Stx1 y Stx2 (Gyles, 2007). Las Stx se unen a las globotriaosilceramidas (Gb3s) tanto en las células de Paneth en la mucosa intestinal, como en la superficie de las células epiteliales renales. La interacción de la subunidad B de la Stx con las Gb3, induce invaginaciones que facilitan la internación de las toxinas. Después de una endocitosis, la Stx es transportada de forma retrógrada por el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico, una vez en el citosol, la subunidad A de la toxina produce necrosis y muerte celular (Gyles, 2007, Croxen & Finlay, 2010).

El patotipo EHEC es considerado un subtipo de la STEC, el cual además de presentar alguna o ambas Stx, también posee la isla de patogenicidad LEE donde se localiza el gen *eae* (Cuadro 1), provocando igual que EPEC, lesiones A/E, pero a diferencia de los 30 efectores de EPEC, se han reportado hasta 62 efectores inyectados a las células. Adicionalmente, las EHEC presentan el gen *ehly* o *ehxA*, que codifican para una hemolisina formadora de poros (Croxen *et al.*, 2013). La importancia del aislamiento de este patotipo en animales, radica en su condición de reservorio de la infección que puede causar enfermedad en humanos (Kaper *et al.*, 2004).

#### *E. coli enterotoxigénica (ETEC)*

*E. coli* ETEC por su parte, es causante de la “diarrea del viajero” en humanos y es endémica en la mayoría de los países considerados en desarrollo (Qadri *et al.*, 2005). Este patotipo también es de gran importancia para la industria porcícola, causando alta morbilidad y mortalidad en lechones, así como en becerros (Nagy & Fekete, 2005). La transmisión es por la vía fecal-oral (Croxen *et al.*, 2013).

Esta variante patógena se caracteriza por la producción, simultánea o individual, de las enterotoxinas termolábil Lt y termo estable St, codificadas en los genes *lt* y *st* respectivamente (Cuadro 1); el anclaje a los enterocitos a través de factores de colonización (CFs), que se unen a diferentes receptores en las células del hospedero; de una adhesina localizada en la punta de las fimbrias o pili (EtpA) encargada de mediar la adhesión a las células epiteliales; y por las proteínas de adherencia e invasión Tia y TibA, codificadas en los genes *tia* y *tib*.

Algunos estudios reportan la presencia de la toxina St en un 80 por ciento de aislamientos de ETEC analizados, (45% sola y 33% en combinación con Lt) (Isidean *et al.*, 2011). El mecanismo general de este péptido consiste en su comportamiento idéntico a la hormona guanilina, para poder unirse a los receptores de la guanilil ciclasa C en el epitelio intestinal. Esta unión produce un aumento en los niveles intracelulares de GMP cíclico, que a su vez activarán el regulador de conductancia transmembranal de la fibrosis quística (CFTR), produciendo finalmente, la secreción de Cl<sup>-</sup> hacia el lumen intestinal y disminuyendo la absorción de Na<sup>+</sup> (Turner *et al.*, 2006).

La toxina Lt es similar en un 80 por ciento a la secuencia de los aminoácidos de la toxina de *V. cholerae*. Las subunidades B se unen al monosialogangliósido (GM1) de las células del hospedero, y se internan a través de balsas lipídicas llevando la subunidad A al citoplasma. Esta subunidad se mueve a través del movimiento retrógrado del retículo endoplásmico hasta el citoplasma, activando la adenil ciclasa y aumentando los niveles de AMP cíclico, que a su vez activarán a la proteína quinasa A (PKA) y esta última a CFTR (Croxen & Finlay, 2010).

#### *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)

La EIEC se caracteriza por ser un patógeno intracelular facultativo, y comparte las mismas propiedades patógenas, bioquímicas y genéticas con *Shigella* spp. (Crowe *et al.*, 2013). Este patotipo es una importante causa de diarrea en niños (Tornieporth *et al.*, 1995) y es reconocido como un enteropatógeno emergente en países en desarrollo (Guion *et al.*, 2008). Ha sido aislado de humanos y de

grandes simios (Croxen *et al.*, 2013) y recientemente identificado en ganado vacuno (Chandra *et al.*, 2013).

Este patotipo posee un mecanismo general que involucra: la penetración de la barrera epitelial, la inducción de la muerte de macrófagos, invasión, supresión de la respuesta inmune, movimiento intracelular y daño epitelial.

Está provisto de un T3SS mediante el cual inyecta alrededor de 25 factores de virulencia que intervienen con diversos procesos en las células hospederas (Croxen *et al.*, 2013). Las proteínas Mxi-Spa son componentes necesarios para el ensamblaje y función del T3SS; chaperonas como IpgA, IpgE, IpgC y Spa15, que estabilizan los sustratos del T3SS en el citoplasma bacteriano, y las dos últimas adicionalmente, participan en la regulación transcripcional de los genes efectores del T3SS. Reguladores transcripcionales como VirF, VirB y MxiE, que regulan los genes que se encuentran asociados al T3SS; e IpaB, IpaC, e IpaD, que permiten la traslocación directa de las proteínas efectoras desde el citoplasma bacteriano hasta la célula hospedera, controlando adicionalmente, la secreción y traslocación de otras proteínas efectoras hacia las células eucariotas (Schroeder & Hilbi, 2008).

La bacteria penetra la barrera epitelial por medio de las células M, dañando las uniones estrechas y provocando inflamación. Una vez en la submucosa, los macrófagos residentes fagocitan la *E. coli* y ésta, evadiendo el fagosoma y lisosoma, activando la muerte celular a través de la inducción de caspasa-I, es liberada para invadir basolateralmente a los enterocitos, con la ayuda de las proteínas inyectadas.

El movimiento intracelular está regulado por VirG, que induce la adquisición de N-WASP, que precede a la formación de una cola de actina en la superficie bacteriana mediada por el complejo ARP 2/3. Posteriormente hay una adhesión mediada por IpaB y el complejo IpaBCD, e IpaC, IpgB1, IpgD, IpaA y VirA, que están involucrados en el reclutamiento del complejo ARP2/3 para la polimerización de actina, y la formación de un re-arreglo celular característico llamado *ruffling*. Los efectores IpgD, IpaA y VirA se encuentran involucrados en la desestabilización de la actina y los microtúbulos, promoviendo la invasión. Finalmente, el escape del

fagosoma sucede por la utilización de los efectores IpaB, IpaC, IpaD e IpaH (Croxen *et al.*, 2013, Croxen & Finlay, 2010). El gen *ipaH* (Cuadro 1) es un gen con múltiples copias que puede encontrarse tanto en un plásmido como en el cromosoma, y únicamente se encuentra en EIEC (Beld & Reubsaet).

#### *E. coli enteroagregativa (EAEC)*

El patotipo EAEC, está caracterizado por la formación de biopelículas mediada por genes que se encuentran en plásmidos de virulencia (pAA), y que codifican los genes necesarios para la biogénesis de fimbrias (AAF's) (Croxen & Finlay, 2010). Ha sido identificado en diarreas persistentes, tanto endémicas como epidémicas en todo el mundo. Es la bacteria mayormente identificada en muestras diarreicas (Croxen *et al.*, 2013). La colonización ocurre tanto en intestino delgado como grueso, produciendo inflamación en el colon (Nataro & Kaper, 1998). Se considera que los aislamientos de EAEC son muy heterogéneos, y aunque no han sido aislados de muestras de animales, no se deben de excluir como posibles reservorios (Croxen *et al.*, 2013).

#### *E. coli de adherencia difusa (DAEC)*

La DAEC es un patotipo diferente a los que producen lesiones A/E, pero de igual forma, las bacterias se adhieren a los enterocitos causando diarrea (Nataro & Kaper, 1998). DAEC se ha aislado en niños y no se conoce su transmisión ni reservorios (Croxen *et al.*, 2013).

En general, el mecanismo de infección está mediado por adhesinas fimbriales y afimbriales (Afa/Dr) que se unen al factor acelerador de la degradación (DAF), induciendo un re-arreglo del citoesqueleto, elongando o destruyendo las microvellosidades (Servin, 2005). Otras cepas se unen al antígeno carcinoembriónico (CAECAM), para la internación hacia células epiteliales indiferenciadas, mecanismo dependiente de rearrreglos y balsas lipídicas (Croxen *et al.*, 2013).

### *E. coli* adherente-invasiva (AIEC)

Finalmente, AIEC ha sido implicado como un agente causal de la enfermedad de Crohn, causando inflamación en el intestino delgado. Este patotipo invade las y se replica en las células epiteliales, así como en macrófagos. AIEC se adhiere a las células del hospedero por medio de un flagelo, y utiliza un pilus de superficie tipo I para adherirse al CAECAM6. Posteriormente AIEC utiliza diversos factores de virulencia para la invasión, como la producción de vesículas de la membrana externa (OMVs), que liberan efectores al unirse con las células epiteliales a través de la expresión de la proteína (OmpA). Este puede infectar y replicarse en los fagolisosomas, sin inducir la muerte celular de los macrófagos (Croxen *et al.*, 2013).

Algunos genes de virulencia asociados a los patotipos de *E. coli*, han sido descritos recientemente en fauna silvestre terrestre como en los lobos Ibéricos (*Canis lupus signatus*) (Simoes *et al.*, 2012), en cérvidos salvajes (*Cervus elaphus*; *Capreolus capreolus*) (Bardiau *et al.*, 2010) y en gansos de Canadá (*Branta canadensis*) (Kullas *et al.*, 2002). En colecciones zoológicas (Baldy-Chudzik *et al.*, 2008, DebRoy & Roberts, 2006, Wang *et al.*, 2013) y en mamíferos marinos como las nutrias marinas del sur (*Enhydra lutris nereis*) (Miller *et al.*, 2010) y lobos marinos de Sudamérica (*Otaria flavescens*) (Salinas C *et al.*, 2010).

**Cuadro 1** Marcadores de virulencia típicos de los patotipos de *E. coli*, función y localización genómica.

<b>Gen de virulencia</b>	<b>Función</b>	<b>Localización genómica</b>	<b>Patotipo de <i>E. coli</i></b>
<i>bfp</i>	Pilus formador de mechones	Plásmido	EPEC
<i>eae</i>	Intimina A/E	IP LEE	EHEC/EPEC
<i>stx1</i>	Toxina shiga I	Bacteriófago	EHEC/STEC
<i>stx2</i>	Toxina shiga II	Bacteriófago	EHEC/STEC
<i>ipaH</i>	Plásmido invasivo antigénico	Plásmido	EIEC
<i>st</i>	Enterotoxina termo estable	Plásmido	ETEC
<i>lt</i>	Entero toxina termo lábil	Plásmido	ETEC

### ***Península de Baja California***

La costa oeste de México, especialmente la Península de Baja California, tanto del lado del Océano Pacífico como el del Mar de Cortés, es una región con una alta riqueza de especies (Pompa *et al.*, 2011) y muchas de ellas con probabilidades de encontrarse en riesgo de extinción (Davidson *et al.*, 2012) por lo que es de nuestro interés realizar trabajos de investigación en esta zona, para ampliar el conocimiento sobre la relación especie-hábitat y la posible influencia antropogénica.

El Océano Pacífico mexicano es una zona de transición oceanográfica que varía estacionalmente entre 18° y 23° N. Se encuentra entre las aguas frías provenientes de la Corriente de California y las aguas templadas de la Corriente Norecuatorial (Rosales-Nanduca *et al.*, 2011) además de estar definido en los intervalos 12° a 34° N y 122° O.

Por otra parte, el Golfo de California es considerado un ecosistema marino grande, toda vez que diversas especies ocupan distintos hábitats y tienen un movimiento importante a lo largo de toda el área. Se encuentra orientado de norte a sur y cuenta con una extensión de aproximadamente 150 km de ancho y 1000 km de largo. La variabilidad en su topografía, la surgencia estacional a lo largo de Sonora y Baja California y las mareas producidas en el golfo central, son los principales factores que ejercen influencia sobre el amplio rango de hábitats, por lo que es considerado uno de los océanos más productivos en el mundo (Szteren & Auriolles-Gamboa, 2011, Díaz-Uribe *et al.*, 2012). Es un área de alta riqueza en especies y en riesgo crítico por ser un importante sector económico por el desarrollo de la pesca y el turismo (Olson & Dinerstein, 2002, Davidson *et al.*, 2012). Es necesario tener un mejor conocimiento de las dinámicas estructurales y funcionales del ecosistema para poder contribuir al planteamiento de estrategias enfocadas al mejoramiento del manejo de esta zona.

### *Isla San Esteban*

La Isla San Esteban se localiza a 400 km al sur de la cabeza del Golfo de California, entre la Península de Baja California y Sonora (Desonie, 1992), a una latitud de 28° 43'N y una longitud de 112° 35'O (Zavala-González, 1997). Con base en la regionalización propuesta por Szteren y Auriolés (2011) donde se incluyen las 13 colonias reproductivas de *Zalophus californianus*, se considera dentro de las islas del Golfo Central que tienen tendencias poblacionales fluctuantes o en aumento, concentraciones de clorofila de medias a altas, temperatura superficial del mar de media a baja y diversidad de dieta alta (Szteren & Auriolés-Gamboa, 2011).

### *Isla Magdalena*

La Bahía Magdalena por su parte, tiene una extensión de 170, 000 hectáreas y es la bahía natural de agua profunda más grande en Baja California, considerado el mayor ecosistema de humedales en las costa oeste de la península de Baja California (Morgan *et al.*, 2005). Se divide en cuatro zonas principales: la norte, la central, la sur y la periférica. Al oeste de la zona periférica se encuentra la Isla Magdalena (Hastings & Fischer, 2001), con una latitud de 24° 55.45'N y una longitud de 112° 13.50' O (Riofrío-Lazo *et al.*, 2012). En esta región habita una de las colonias más grandes de *Zalophus californianus* (Hastings & Fischer, 2001), la cual pertenece al grupo de manejo de la zona occidental de Baja California.

### ***Lobos marinos de California (Zalophus californianus)***

El lobo marino de California *Zalophus californianus* pertenece a la familia de los otáridos y representa un modelo útil de estudio en ambientes marinos por ser un omnívoro que consume diversas especies dentro de las redes tróficas (García-Rodríguez, 2004), por su amplia distribución geográfica que va a lo largo de la costa del Pacífico desde la Columbia Británica en Canadá, hasta la punta sur de la Península de Baja California en México, incluyendo el Golfo de California (Le Boeuf, 1983). *Zalophus californianus* es la especie de pinípedo más abundante en



el Golfo de California (García-Rodríguez, 2004). Esta especie se encuentra protegida por la Norma Mexicana NOM-059-ECOL-1994, listada como “Protección Especial” y por el Acta de Protección de Mamíferos Marinos de los Estados Unidos de América (EUA). Está subdividida en tres grupos de manejo: el de EUA, el de la zona occidental de Baja California y el del Golfo de California; a su vez, en México, las colonias se encuentran divididas en alto Golfo de California, sur de la Península de Baja California y costa Pacífico superior de Baja California. Lo anterior con base en las variaciones genéticas encontradas en estudios de DNA mitocondrial (Maldonado *et al.*, 1995, Gonzalez-Suarez *et al.*, 2009).

La población total de lobos marinos en costas mexicanas se estima entre 75 mil a 87 mil para la costa oeste de la península y de alrededor de 30 mil individuos (Aurioles & Trillmich, 2008) concentrados en su mayoría en la parte superior del Golfo. Estos se encuentran divididos en 13 colonias reproductivas y aisladas por distancia de las poblaciones del Océano Pacífico (Aurioles-Gamboa & Zavala-Gonzalez, 1994). Pese a lo anterior, estas poblaciones se encuentran genéticamente bien estructuradas (Szteren *et al.*, 2006). Las poblaciones de lobos marinos son abundantes y probablemente se encuentren en la máxima capacidad de carga en las áreas de distribución del norte del continente, sin embargo, el aislamiento de las poblaciones del Golfo de California, su tamaño y su disminución en los últimos 20 años sugieren que la especie debe encontrarse en la categoría de amenazada (Aurioles & Trillmich, 2008).

### **Justificación**

*E. coli* es uno de los modelos bacterianos mejor caracterizados, y juega un papel preponderante al formar parte de la microbiota normal de la mucosa intestinal de los mamíferos. No existe suficiente información respecto a *E. coli* en lobos marinos (*Zalophus californianus*); los estudios que se han realizado, reportan el aislamiento de este género bacteriano de diversos tejidos obtenidos de animales enfermos, varados o muertos, sin embargo, aún se desconoce el impacto que puede tener en la especie. *E. coli* ha servido como modelo para rastrear fuentes de contaminación

fecal, para entender las bases genéticas y los mecanismos moleculares asociados a la adquisición de virulencia de las enterobacterias, así como para detectar la disminución de la susceptibilidad bacteriana a quimioterapéuticos. Por lo anterior, esta investigación permitirá establecer las bases de las características fenotípicas y moleculares de *E. coli* en *Zalophus californianus*, aportará información para realizar estudios de impacto ambiental, derivadas de las actividades antropogénicas en la región, y contribuirá a la generación de nuevo conocimiento, sobre la ecología de las enfermedades infecciosas, en mamíferos marinos que habitan aguas mexicanas.

### **Hipótesis**

Los aislamientos de *E. coli* comensal, procedentes de lobos marinos (*Zalophus californianus*) de Baja California Sur, México, no presentan resistencia a quimioterapéuticos, pertenecen al grupo filogenético A, y no presentan genes de virulencia.

### **Objetivo General**

Identificar los grupos filogenéticos y detectar la presencia de genes de virulencia de aislamientos de *E. coli*, de muestras rectales de lobos marinos (*Zalophus californianus*) de vida libre en Baja California Sur, México.

### **Objetivos Específicos**

1. Identificar bioquímicamente y determinar la resistencia a quimioterapéuticos de *E. coli* de muestras rectales de lobos marinos (*Zalophus californianus*).
2. Determinar los grupos filogenéticos mediante la presencia o ausencia de los genes *chuA*, *yjaA* y TSPE4.C2.
3. Detectar los genes de virulencia: *bfp*, *eae*, *stx1*, *stx2*, *lt*, *st* e *ipaH*.

## **Material y Métodos**

### ***Colección de muestras***

Se colectaron un total de 69 muestras rectales de lobos marinos de California (*Zalophus californianus*) sin signos aparentes de enfermedad, provenientes de las Islas Magdalena y San Esteban, Baja California Sur, México. Se utilizó un hisopo estéril para coleccionar cada una de las muestras, se almacenaron a 4°C y transportaron en medio *AMIES* con carbón activado. Las muestras se enviaron al laboratorio de ecología de agentes patógenos del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” para el análisis bacteriológico. Para las muestras de la Isla San Esteban, los lobos marinos fueron capturados con red, inmovilizados, inducidos con Isoflurano al 5% y mantenidos con anestesia inhalada a 3% para obtener la muestra rectal. Una vez que los animales se recuperaron completamente, fueron liberados.

### ***Aislamiento, Identificación Bacteriana y Concentración Mínima Inhibitoria***

Cada hisopo se inoculó en agar MacConkey y en medio agar soya tripticaseína (TSA) y se cultivó bajo condiciones de aerobiosis a 37°C de 24 a 48 h. Los aislados se utilizaron para ser almacenados a -80°C en medio caldo infusión cerebro corazón (BHI) con glicerol al 40%. Las colonias fermentadoras de lactosa fueron seleccionadas e inoculadas nuevamente en agar MacConkey y cultivadas bajo las mismas condiciones.

La identificación de *E. coli* se realizó utilizando el sistema automatizado MicroScan Walk-Away 96 (Dade Behring, West Sacramento, CA, USA) en el cual también se determinó la presencia de  $\beta$ -lactamasas y la concentración mínima inhibitoria (MIC) utilizando los quimioterapéuticos; amikacina, amoxicilina/ácido clavulánico, ampicilina/sulbactam, ampicilina, aztreonam, cefazolina, cefepime, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, ciprofloxacina, gatifloxacina, gentamicina, imipenem, levofloxacina, piperacilina/tazobactam, piperacilina, trimetoprim/sulfametoxazol y tobramicina.

### ***Cepas control de E. coli***

Para la identificación y la MIC se utilizó la cepa de *E. coli* ATCC 25922 como control de reacciones y puntos de corte de MIC; para la realización de la PCR de identificación de *E. coli* (*gadA*), se utilizó a *E. coli* K12, como control positivo y a *Salmonella* Typhimurium como control negativo. Con respecto a las cepas utilizadas en la detección de genes de virulencia, se incluyeron: a *E. coli* O78:H11:K80 (cepa H10407/ETEC); *E. coli* O127:H6 (cepa E2348/69/EPEC); *E. coli* O157:H7 (cepa EDL933/EHEC) ATCC 70092; *E. coli* O157:H7 (Laboratorio de Salud Pública, Facultad de Medicina, UNAM) y *E. coli* EIEC (*Department of Enteric Pathogens. Central Public Health Laboratory, London, England*). Las cepas control utilizadas fueron sembradas en agar MacConkey y agar TSA de acuerdo a cada protocolo.

### ***Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)***

Todas las reacciones de PCR, se realizaron utilizando una colonia aislada como template de DNA. Los componentes generales de las reacciones fueron: 10.5 µL de agua destilada estéril, 0.5 µL (50 pmol) de cada uno de los iniciadores, 12.5 µL de TopTaq Master Mix (Qiagen, Ventura, CA. USA), que contiene TAQ DNA Polimerasa (1.25 u), dNTP's (200µM c/u), solución amortiguadora (1X) y 15mM de MgCl<sub>2</sub>.

### ***Identificación molecular de E. coli***

Adicionalmente a la identificación bioquímica de *E. coli*, se realizó la identificación molecular por medio de la detección del gen *gadA* (670pb) que codifica para la enzima glutamato descarboxilasa (GAD), mediante PCR. Se utilizaron los iniciadores descritos por McDaniels y colaboradores (1996) *gadA*F 5'-ACCTGCGTTGCGTAAATA-3' y *gadA*R 5'-GGGCGGGAGAAGTTGATG-3'. Las condiciones de la PCR fueron: 4 min a 95°C de desnaturalización inicial, seguido por 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 58°C y 1 min 72°C y una extensión final de 4 min a 72°C.

### ***Determinación de grupos filogenéticos***

Se utilizó una PCR múltiple, para identificar el grupo filogenético de los aislamientos de *E. coli*. Se utilizaron los iniciadores previamente descritos por Clermont y colaboradores (2000) con pequeñas modificaciones, para detectar los genes *chuA* (279 pb) *yjaA* (211 pb) y el fragmento de DNA TspE4C2.1. (152 pb). Las condiciones de la PCR consistieron en 5 min a 95 °C de desnaturalización inicial seguido de 30 ciclos de 30 seg a 95 °C, 33 seg a 58 °C y 30 seg a 72 °C y una extensión final de 7 min a 72 °C.

El grupo filogenético de cada aislamiento, se determinó con base en la presencia (+) o ausencia (-) de la combinación de *chuA*, *yjaA* y TSPE4.C2 respectivamente (Figura 1).

### ***Detección de genes de virulencia***

Para la identificación de los genes de virulencia de los diferentes patotipos (*eae*, *stx1*, *stx2*, *bfp*, *lt*, *st* e *ipaH*) se realizaron reacciones de PCR múltiple, utilizando los iniciadores previamente descritos (Bisi-Johnson *et al.*, 2011, Tornieporth *et al.*, 1995, DebRoy & Roberts, 2006). Para la amplificación de los genes *eae* y *stx1* se utilizaron los siguientes parámetros: desnaturalización de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 56°C y 45 seg a 75°C, con una extensión final de 7 min a 72°C. Para los genes *bfp* e *ipaH* las condiciones fueron las siguientes: desnaturalización de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 56°C y 1 min a 72°C, con una extensión final de 7 min a 72°C. Para la detección de los genes *lt* y *st*, se realizaron bajo el siguiente esquema de amplificación: desnaturalización de 5 min a 95°C; 30 ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a 60°C y 30 seg a 72°C, con una extensión final de 5 min a 72°C. Por último, para el gen *stx2* se realizó una PCR simple bajo las siguientes condiciones: desnaturalización de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 45 seg a 94°C, 45 seg a 58°C y 45 seg a 72°C con una extensión final de 7 min a 72°C. Los iniciadores utilizados se enlistan en el (Cuadro 2).

Los productos de amplificación de cada una de las reacciones, fueron visualizados en geles de agarosa al 1.5 y 2%, teñidos previamente con bromuro de etidio (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), y las imágenes fueron digitalizadas en un fotodocumentador. El tamaño de los amplicones se determinó utilizando un marcador de peso molecular DNA ladder de 100-pb.

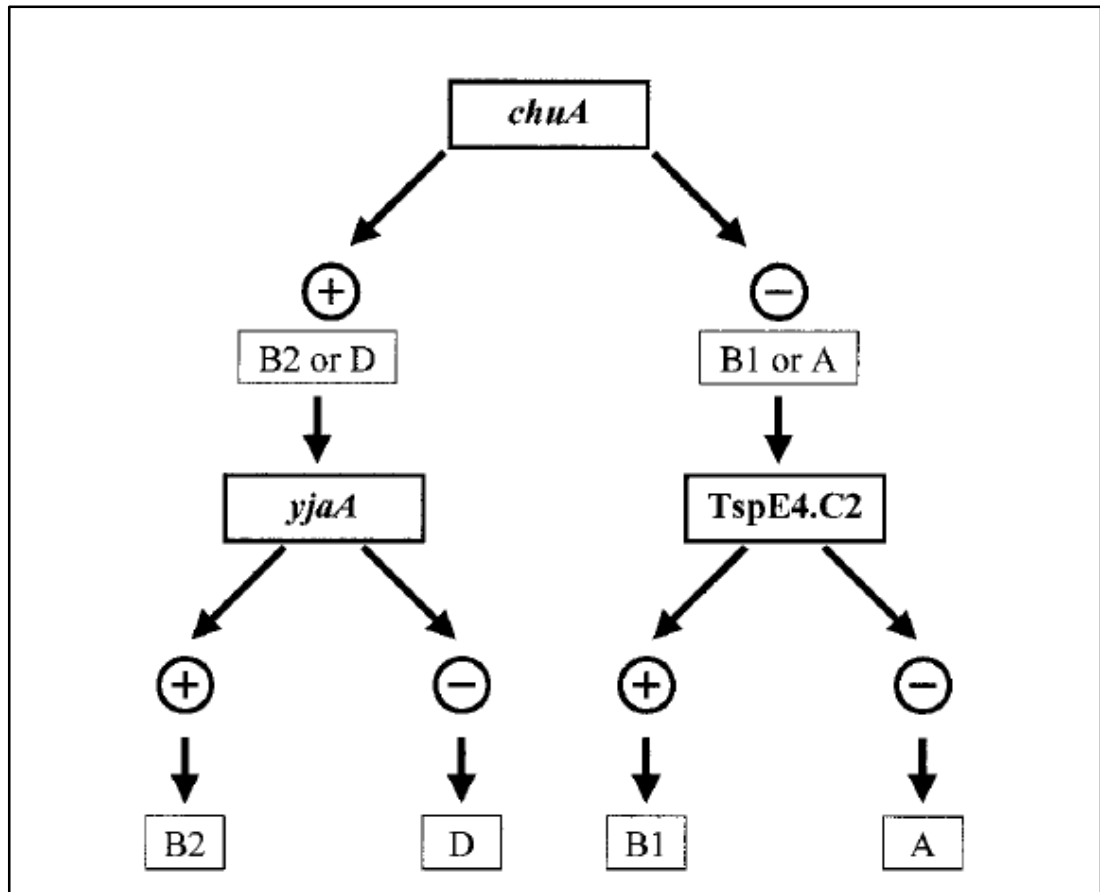


Figura 1 Árbol de decisión dicotómica para la determinación del grupo filogenético de las cepas de *E. coli*, utilizando los resultados de la amplificación de la PCR de los genes *chuA*, *yjaA* y el fragmento TSPE4.C2 (Clermont *et al.*, 2000).

**Cuadro 2. Iniciadores para la detección de genes de virulencia en muestras de *E. coli*.**

<b>Gen</b>	<b>Secuencia de iniciadores (5' - 3')</b>	<b>Posición (amplicón)</b>	<b>Referencia</b>
<i>eae</i>	GTG GCG AAT ACT GGC GAG ACT CCC CAT TCT TTT TCA CCG TCG	2518-3408 (890 pb)	(DebRoy & Roberts, 2006)
<i>stx1</i>	ACA CTG GAT GAT CTC AGT GG CTG AAT CCC CCT CCA TTA TG	938-1520 (582 pb)	(DebRoy & Roberts, 2006)
<i>stx2</i>	GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G	603-857 (255 pb)	(DebRoy & Roberts, 2006)
<i>bfp</i> (EPEC)	CAA TGG TGC TTG CGC TTG CT GCC GCT TTA TCC AAC CTG GT	119-443 (324 pb)	(Tomieporth <i>et al.</i> , 1995)
<i>lt</i> (ETEC)	AGC AGG TTT CCC ACC GGA TCA CCA GTG CTC AGA TTC TGG GTC TC	(132 pb)	(Bisi-Johnson <i>et al.</i> , 2011)
<i>STa</i> (ETEC)	GCT AAT GTT GGC AAT TTT TTA TTT CTG TA AGG ATT ACA ACA AAG TTC ACA GCA GTA A	9-171 (190 pb)	(Bisi-Johnson <i>et al.</i> , 2011)
<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)	(Tomieporth <i>et al.</i> , 1995)



## Resultados

### ***Aislamiento, identificación bacteriana y MIC***

Se colectaron 15 muestras rectales de lobos marinos adultos y crías de la Isla San Esteban, de las cuales se obtuvieron 13 aislamientos de *E. coli*. Por otro lado, se colectaron 54 muestras rectales de lobos marinos adultos y juveniles de la Isla Magdalena, en las cuales se identificaron 50 aislamientos de *E. coli*. En total, se colectaron 69 muestras rectales, de los cuales se obtuvieron 63 aislamientos de *E. coli*.

De los 13 aislamientos de *E. coli* provenientes de la Isla San Esteban, únicamente una cepa presentó resistencia a cefoxitina (16 mg/L). Para el caso de la Isla Magdalena, un aislamiento de *E. coli* presentó resistencia a la combinación amoxicilina/ácido clavulánico (>16/8 mg/L), dos mostraron resistencia a la combinación trimetoprim/sulfametoxazol (>2/38 mg/L), y siete presentaron resistencia a la combinación ampicilina/sulbactam (>16/8 mg/L) (Cuadro 3).

### ***Identificación molecular de E. coli***

Al total de aislamientos de *E. coli* se les realizó la amplificación de un fragmento de 670 pb del gen *gadA*, mediante PCR de colonia. El 100% de los aislamientos fueron positivos a la amplificación de *gadA*, confirmando que pertenecen al género y especie *E. coli* (Figura 2).

### ***Determinación de grupos filogenéticos***

La combinación de los genes *chuA*, *yjaA* y TspE4C2.1, permitieron clasificar los 63 aislamientos de *E. coli* dentro de los grupos filogenéticos A, B1, B2 y D (Cuadro 4 y Figura 3). La mayoría de los aislamientos de ambas islas se encontraron dentro del grupo D con 34 cepas, seguido del grupo A con 22, B1 con cinco y B2 con dos (Cuadro 4).

**Cuadro 3 Resistencia antimicrobiana, grupos filogenéticos, presencia de genes de virulencia y los patotipos asociados, de los 63 aislamientos de *E. coli* de *Zalophus californianus*.**

ID Aislado	Antimicrobiano	MIC mg/L	Grupo filogenético	Genes de virulencia							Patotipo <i>E. coli</i>
				<i>bfp</i>	<i>eae</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>st</i>	<i>lt</i>	<i>ipaH</i>	
2b			A	+			+				EPEC/EHEC/STEC
5a			A								-
7a			A			+					EHEC/STEC
7b			A			+					EHEC/STEC
8b			D	+		+					EPEC/EHEC/STEC
10b			D	+		+			+		EPEC/EHEC/STEC/ETEC
11a			D		+						EPEC/EHEC
11c			D								-
13b			D								-
15a			A								-
2a			A	+							EPEC
3b			D	+		+			+		EPEC/EHEC/STEC/ETEC
4a			D								-
4b			D				+				EHEC/STEC

**Cuadro 3 (continuación)**

ID Aislado	Antimicrobiano	MIC mg/L	Grupo filogenético	Genes de virulencia							Patotipo <i>E. coli</i>	
				<i>bfp</i>	<i>eae</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>st</i>	<i>lt</i>	<i>ipaH</i>		
5a	Amox/AC	>16/8	D									-
6b			D									-
7a			A							+		ETEC
7b			D									-
9a			A				+					EHEC/STEC
10d			D				+					EHEC/STEC
12a			D				+					EHEC/STEC
12c			A		+		+					EPEC/EHEC/STEC
9Ba			D									-
9Bb			D									-
14b			D									-
15a			D			+						EHEC/STEC
16a			D	+		+	+					EPEC/EHEC/STEC
18a			D	+			+			+		EPEC/EHEC/STEC/ETEC
19a			D				+					EHEC/STEC

**Cuadro 3 (continuación)**

ID Aislado	Antimicrobiano	MIC mg/L	Grupo filogenético	Genes de virulencia						Patotipo <i>E. coli</i>	
				<i>bfp</i>	<i>eae</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>st</i>	<i>lt</i>		<i>ipaH</i>
20a			A		+		+				EPEC/EHEC/STEC
21a			D		+						EPEC/EHEC
22b			D		+		+			+	EHEC/STEC/EPEC/ETEC
26a			A								-
26b			B1		+						EPEC/EHEC
29b			A				+				EHEC/STEC
32c			D								-
35a			A	+			+				EPEC/EHEC/STEC
36a			A	+							EPEC
36b			A		+						EPEC/EHEC
37a			A								-
39a			A								-
21b	Trim/Sulfa	>2/38	D	+	+						EPEC/EHEC
25a	Amp/Sulb	>16/8	A		+						EPEC/EHEC
27b	Amp/Sulb	>16/8	B1							+	EHEC/STEC

**Cuadro 3 (continuación)**

ID Aislado	Antimicrobiano	MIC mg/L	Grupo filogenético	Genes de virulencia							Patotipo <i>E. coli</i>
				<i>bfp</i>	<i>eae</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>st</i>	<i>lt</i>	<i>ipaH</i>	
28b	Amp/Sulb	>16/8	B1	+			+				EPEC/EHEC/STEC
30a	Amp/Sulb	>16/8	B2	+			+	+	+		EHEC/STEC/EPEC/ETEC
30c	Amp/Sulb	>16/8	B2	+		+	+	+	+		EHEC/STEC/EPEC/ETEC
31a	Amp/Sulb	>16/8	A				+				EHEC/STEC
33a	Trim/Sulfa	>2/38	B1				+				EHEC/STEC
34a	Amp/Sulb	>16/8	A		+					+	EPEC/ETEC
C1			D								-
C3			D								-
C4			D								-
C5			B1		+						EPEC/EHEC
J1			D								-
J2			A		+						EPEC/EHEC
J3			D								-
J4			D		+						EPEC/EHEC
J6			A	+							EPEC

**Cuadro 3 (continuación)**

ID Aislado	Antimicrobiano	MIC mg/L	Grupo filogenético	Genes de virulencia							Patotipo <i>E. coli</i>
				<i>bfp</i>	<i>eae</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>st</i>	<i>lt</i>	<i>ipaH</i>	
J8			D								-
H1			D								-
H10			D								-
H5	Cefoxitina	16	D								-

Ampicilina/Sulbactam - Amp/Sulb      Trimetprim/Sulfametoxazol - Trim/Sulfa  
 Amoxicilina/Ácido Clavulánico - Amox/AC      MIC - Concentración Mínima Inhibitoria

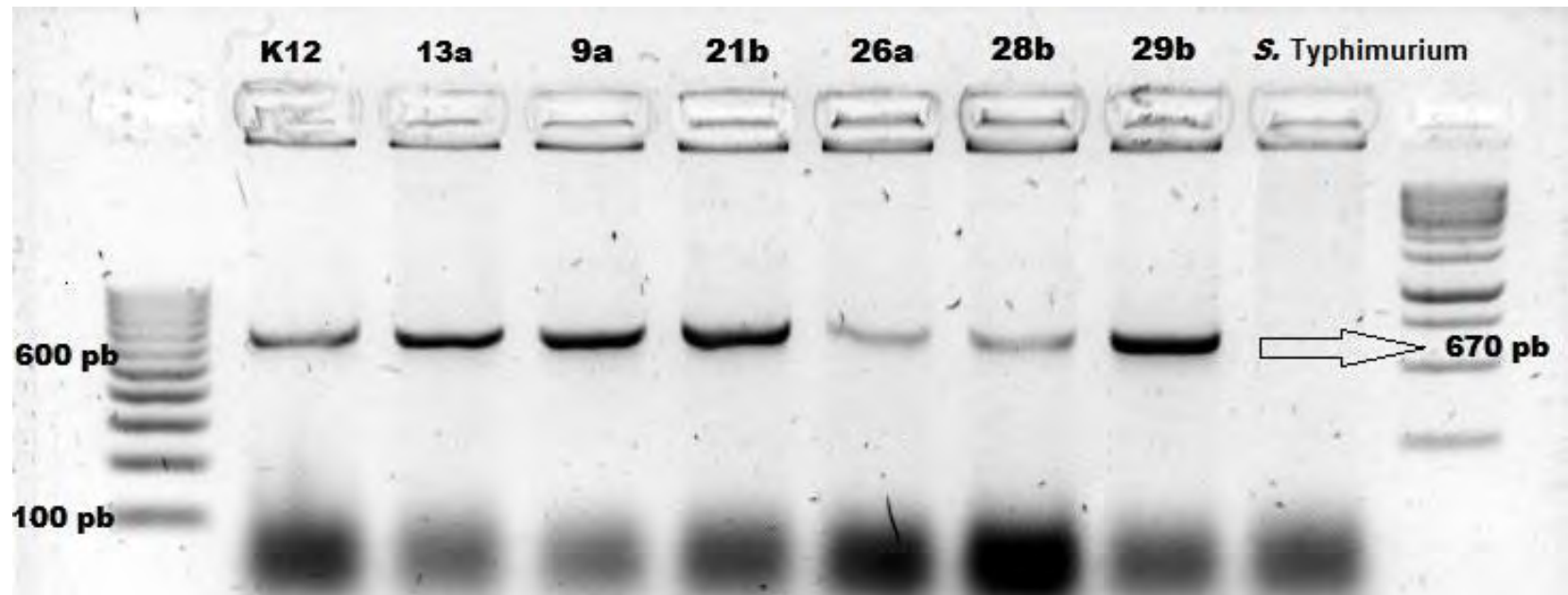


Figura 2. Amplificación del gen *gadA*. Control positivo *E. coli* K12; control negativo *Salmonella* Typhimurium; aislamientos 13-a-29b; marcadores de peso molecular 100 pb DNA ladder y 1 Kb DNA ladder.

**Cuadro 4. Distribución de los 63 aislamientos de *E. coli* comensal de *Zalophus californianus* de las Islas Magdalena y San Esteban en los diferentes grupos filogenéticos.**

Grupo filogenético	A	B1	B2	D	
Isla Magdalena	20	4	2	24	50
Isla San Esteban	2	1		10	13
Total	22 (34.92%)	5 (7.93%)	2 (3.17%)	34 (53.97%)	63

**Cuadro 5. Detección de solo un gen de virulencia en 24 aislados, los patotipos asociados, y su distribución entre los grupos filogenéticos.**

Genes de virulencia	Patotipo asociado	Aislamiento de un solo gen	Grupo filogenético		
			A	B1	D
<i>bfp</i>	EPEC	3	3		
<i>eae</i>	EHEC/EPEC	8	3	2	3
<i>stx1</i>	EHEC/STEC	4	2	1	1
<i>stx2</i>	EHEC/STEC	8	3	1	4
<i>lt</i>	EPEC	1	1		
		<b>24</b>			



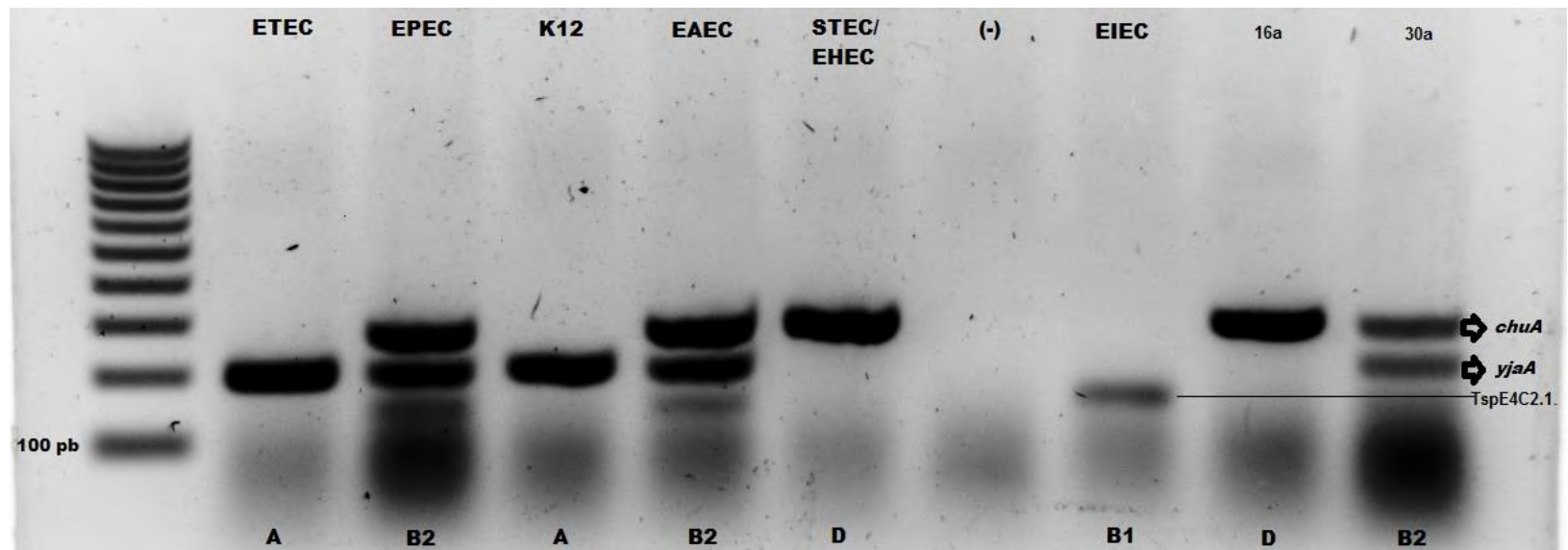


Figura 3. Amplificación de los genes *chuA* (279 pb) *yjaA* (211 pb) y el fragmento de DNA TspE4C2.1. (152 pb) en los patotipos de *E. coli*; control positivo *E. coli* K12; control negativo de reacción de PCR agua (-); aislamientos 16a y 30a; marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder.

### ***Detección de genes de virulencia***

De los 63 aislamientos de *E. coli* identificados, 24 (38.09%) presentaron un solo gen de virulencia, 20 corresponden a las muestras de la Isla Magdalena y cuatro a las de la Isla San Esteban (Cuadro 5).

En 15 (23.8%) aislamientos de *E. coli*, se identificaron dos o más genes de virulencia al mismo tiempo (Cuadro 6). Todos ellos pertenecen a las muestras colectadas en la Isla Magdalena.

Los genes *stx2*, *bfp* y *eae* fueron identificados en más del 20% de los 63 aislamientos de *E. coli*; *stx2* se identificó en el 28.12%, ocho veces solo y diez veces con uno o más genes. Con respecto al gen *bfp*, se identificó en el 21.87% de los aislamientos, tres veces solo y once veces en combinación con otros genes. El gen *eae* fue identificado en 20.31% de los aislamientos, ocho veces solo y cinco con uno o más genes. El gen *ipaH* no fue identificado en ninguno de los aislamientos.

De un total de 64 genes de virulencia detectados en este estudio (Figura 4), 22 (34.37%) pertenecen al grupo A, seis (9.37%) al grupo B1, nueve (14.06%) al grupo B2 y 27 (42.18%) al grupo D (Cuadro 7).

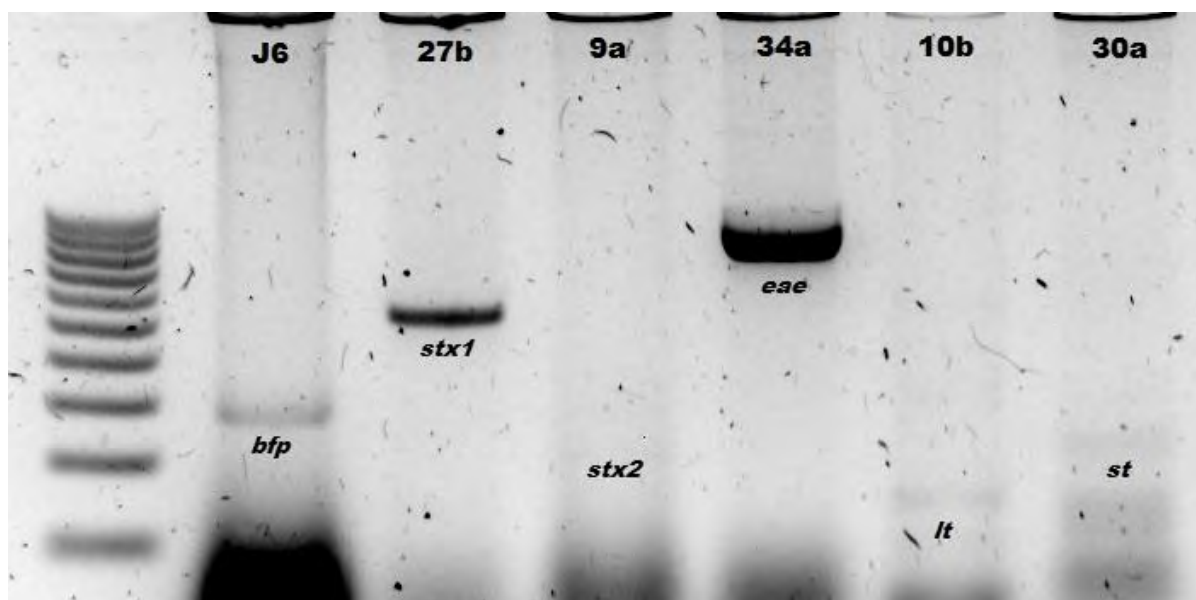
De los 63 aislamientos de *E. coli*, 24 (38.09%) no presentaron ningún gen de virulencia, de estos 15 corresponden a las muestras obtenidas de la Isla Magdalena y nueve a las de la Isla San Esteban; cinco aislamientos pertenecen al grupo A y 19 al grupo D.

**Cuadro 6. Detección de dos o más genes de virulencia en 15 aislados de *E. coli*, los patotipos asociados, y su distribución entre los grupos filogenéticos.**

ID Aislado	Antimicrobiano	MIC mg/L	Grupo filogenético	Genes de virulencia						Patotipo <i>E. coli</i>
				<i>bfp</i>	<i>eae</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>st</i>	<i>lt</i>	
2b			A	+			+			EPEC/EHEC/STEC
8b			D	+		+				EPEC/EHEC/STEC
10b			D	+		+			+	EPEC/EHEC/STEC/ETEC
3b			D	+		+			+	EPEC/EHEC/STEC/ETEC
12c			A		+		+			EPEC/EHEC/STEC
16a			D	+		+	+			EPEC/EHEC/STEC
18a			D	+			+		+	EPEC/EHEC/STEC/ETEC
20a			A		+		+			EPEC/EHEC/STEC
22b			D		+		+		+	EHEC/STEC/EPEC/ETEC
35a			A	+			+			EPEC/EHEC/STEC
21b	Trim/Sulfa	>2/38	D	+	+					EPEC/EHEC
28b	Amp/Sulb	>16/8	B1	+			+			EPEC/EHEC/STEC
30a	Amp/Sulb	>16/8	B2	+			+	+	+	EHEC/STEC/EPEC/ETEC
30c	Amp/Sulb	>16/8	B2	+		+	+	+	+	EHEC/STEC/EPEC/ETEC
34a	Amp/Sulb	>16/8	A		+				+	EPEC/ETEC

**Cuadro 7. Distribución de genes de virulencia de *E. coli* y su distribución entre los cuatro grupos filogenéticos.**

Grupo filogenético	Genes de virulencia (GV)							
	<i>bfp</i>	<i>eae</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>ipaH</i>	<i>st</i>	<i>lt</i>	
A (22)	5	6	2	7	0	0	2	22
B1 (5)	1	2	1	2	0	0	0	6
B2 (2)	2	0	1	2	0	2	2	9
D (34)	6	5	5	7	0	0	4	27
GV Total	14	13	9	18	0	2	8	
n=63	(22.22%)	(20.63%)	(14.28%)	(28.57%)	(0%)	(3.17%)	(12.69%)	



**Figura 4 Amplificación de los genes de virulencia de diversos patotipos de *E. coli*. Muestras J6-27b-9a-34a-10b-30a con los diferentes genes de virulencia: *bfp* (324 pb), *stx1* (582 pb), *stx2* (255pb), *eae* (890 pb), *lt* (132 pb) y *st* (190 pb). Marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder.**

En general la mayoría de los aislamientos no presentaron resistencia a los quimioterapéuticos, sin embargo, el aislamiento (H5) de la Isla San Esteban presentó resistencia a cefoxitina (16 mg/L), y el aislamiento (5a) de la Isla Magdalena fue resistente a amoxicilina/ácido clavulánico (>16/8 mg/L). En ninguno de ellos se identificaron genes de virulencia (Cuadro 3).

En los aislamientos resistentes a la combinación trimetoprim/sulfametoxazol (>2/38 mg/L), se identificaron los genes *bfp* y *eae* en la muestra (21b), y en la (33a) el gen *stx2*. En los aislamientos resistentes a ampicilina/sulbactam (>16/8 mg/L), se identificó el gen *eae* en la muestra (25a) y el gen *stx1* en la muestra (27b), en la muestra (28b) se identificaron simultáneamente los genes *bfp* y *stx2* y en la muestra (34a) los genes *eae* y *lt*. Finalmente, el aislamiento (30a) presentó los genes *bfp*, *stx2*, *st* y *lt* simultáneamente, y en el (30c) se identificaron cinco genes de virulencia al mismo tiempo, *bfp*, *stx1*, *stx2*, *st* y *lt* (Cuadro 3 y Cuadro 7).

## Discusión y conclusiones

*E. coli* se ha identificado en diversas especies marinas alrededor del mundo: en especies de vida libre como el lobo marino de Steller (*Eumetopias jubatus*) en Alaska (Carrasco *et al.*, 2011), en pinípedos varados como lobos marinos (*Zalophus californianus*), focas comunes (*Phoca vitulina*) y elefantes marinos del norte (*Mirounga angustirostris*) en las costas de California en EUA (Thornton *et al.*, 1998, Johnson *et al.*, 1998), en animales enfermos como elefantes marinos del norte (*Mirounga angustirostris*) (Stoddard *et al.*, 2009), y en animales muertos como en lobos marinos de Nueva Zelanda (*Phocarctos hookeri*) (Castinel *et al.*, 2007).

En lobos marinos (*Zalophus californianus*), *E. coli* se ha asociado a casos de endocarditis (Kim *et al.*, 2002), edema (Diamond *et al.*, 1980), carcinoma urogenital (Johnson *et al.*, 2006), varamientos y muerte (Stroud & Roffe, 1979, Sweeney & Gilmartin, 1974) pero también se ha aislado de la mucosa nasal de crías clínicamente sanas (Hernández-Castro *et al.*, 2005).

Diversos trabajos han reportado la presencia de *E. coli* en muestras rectales y de diferentes tejidos, en especies de mamíferos marinos (Carrasco *et al.*, 2011, Thornton *et al.*, 1998). Sin embargo, se desconoce el papel de estas cepas en cada uno de los casos, debido principalmente a que en estas investigaciones, sólo se realizó la identificación fenotípica y bioquímica sin hacer énfasis en los patotipos o serotipos asociados.

En este trabajo encontramos que casi el 18 por ciento de los aislamientos, presentaron algún grado de resistencia a quimioterapéuticos; estos resultados son similares a los hallazgos de Rose y colaboradores (2009), en donde reportaron que 14 por ciento de los aislamientos de *E. coli* provenientes de diferentes pinípedos, eran resistentes a cuando menos un quimioterapéutico.

De los 13 aislamientos de *E. coli* provenientes de la Isla San Esteban, únicamente uno presentó resistencia a cefoxitina (16 mg/L). Dentro de los mecanismos de resistencia a los beta-lactámicos, se encuentran las  $\beta$ -lactamasas, las cuales pueden conferir resistencia dentro del género *Enterobacteriaceae*, a

una gran variedad de antibióticos  $\beta$ -lactámicos como la cefoxitina, así como a combinaciones de inhibidores de estos (Jacoby, 2009).

Para el caso de la Isla Magdalena, siete aislamientos presentaron resistencia a la combinación ampicilina/sulbactam ( $>16/8$  mg/L). Ésta es una combinación de penicilina y un inhibidor  $\beta$ -lactámico, que fue desarrollado debido al incremento de la resistencia bacteriana a los beta-lactámicos, la cual es mediada por las beta-lactamasas. La ampicilina/sulbactam es utilizada en medicina humana para el tratamiento de una amplia gama de enfermedades, como infecciones cutáneas, intra-abdominales, y ginecológicas (Adnan *et al.*, 2013). Esta combinación no se utiliza en medicina veterinaria.

Únicamente un aislamiento de *E. coli* presentó resistencia a la combinación amoxicilina/ácido clavulánico ( $>16/8$  mg/L), que tiene el mismo mecanismo de acción que la ampicilina/sulbactam. Finalmente, dos aislamientos de *E. coli* mostraron resistencia a la combinación trimetoprim/sulfametoxazol ( $>2/38$  mg/L). Esta combinación farmacológica de un inhibidor de la tetrahidrofolato reductasa con una sulfonamida, inhibe en cascada, la síntesis bacteriana del ácido tetrahidrofólico, la forma activa del ácido fólico, un cofactor necesario en la síntesis de las purinas y de DNA bacteriano (Masters *et al.*, 2003).

El mecanismo principal de resistencia de las bacterias Gram negativas a los  $\beta$ -lactámicos, es la síntesis de  $\beta$ -lactamasas que pueden ser de origen cromosomal (AmpC), o de origen plasmídico. Las más importantes y donde existe una gran variedad para los diferentes beta-lactámicos, son conocidas como las beta-lactamasas de espectro extendido (ESBL) y las metalo-beta lactamasas. Con el incremento en la utilización de la combinación con el inhibidor  $\beta$ -lactámico, aparecieron las  $\beta$ -lactamasas clase C también codificadas en plásmidos, confiriendo resistencia incluso ante la presencia de sulbactam (Philippon *et al.*, 2002). Se ha comprobado en años recientes que *E. coli* ha disminuido su susceptibilidad a la ampicilina/sulbactam (Hawser *et al.*, 2011).

Este quimioterapéutico se utiliza en medicina humana principalmente para tratar infecciones urinarias y respiratorias, y es el tratamiento de elección contra

oportunistas no fermentadores, excepto *Acinetobacter* spp., y *Pseudomonas aeruginosa*, que presenta una resistencia inherente. En ocasiones se ha utilizado para tratar infecciones causadas por enterobacterias, pero este uso se ha limitado por la generación de resistencia mediada por plásmidos, que codifican para los genes *sul* y *dfp* promoviendo la producción de las enzimas, dihidropteroato sintetasa y dihidrofolato reductasa (Livermore *et al.*, 2014).

En general los quimioterapéuticos son absorbidos por el organismo en donde intervienen en reacciones metabólicas, sin embargo, cantidades significativas de los fármacos sin metabolizar, son excretados a través de la orina y las heces para incorporarse a la tierra, por medio de la utilización de fertilizantes orgánicos, o a los sistemas de disposición de desechos, cuyo destino final son los océanos (Hirsch *et al.*, 1999). En medicina veterinaria en la producción de animales de consumo, el uso de tetraciclinas y  $\beta$ -lactámicos para tratar infecciones y como promotores de crecimiento juegan un papel importante (Sarmah *et al.*, 2006).

Para el caso de los mamíferos marinos, existen diversos reportes de centros de rehabilitación, en donde se administran tratamientos de antibioterapia a animales enfermos, que posteriormente son liberados a su hábitat original (Stoddard *et al.*, 2009, Wallace *et al.*, 2013), por lo que al regresar al océano donde interactúan con otros animales tanto de su misma especie, como de otras especies, es muy posible que estos mamíferos estén actuando como reservorios de bacterias resistentes.

Por otro lado, la utilización de antibióticos en la industria piscícola, especialmente en la producción de salmón y trucha, ha sido extensiva, especialmente como tratamientos profilácticos administrados en el alimento o en el agua. Las excretas de los peces y el alimento no consumido son difundidos en los sedimentos, mezclados y esparcidos al medio ambiente. En el mar, peces, bivalvos y otros organismos, así como aves silvestres pueden ingerir estos antibióticos residuales, provocando presión de selección de bacterias resistentes (Cabello, 2006, Allen *et al.*, 2010). En el caso específico de la región en donde se llevó a cabo este estudio, la explotación de granjas camaroneras, y de especies



como abulón, ostras y ostión, podrían estar impactando la zona de manera importante, debido a la utilización de antibióticos en las primeras etapas de larvación.

Lo anterior explicaría que la presencia de resistencia a estos quimioterapéuticos en *E. coli* aisladas de lobos marinos, debe de estar sucediendo por la transferencia horizontal de plásmidos de enterobacterias como *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella* y *E. coli* de origen humano y de otras especies animales, por medio del consumo de alimento, del contacto con el medio ambiente terrestre y marino y por el estrecho contacto con animales de su misma especie u otras especies como aves.

Otra posible explicación de la presencia de resistencia a quimioterapéuticos, en *E. coli* recuperada de estas islas que no presentan un impacto antropogénico evidente, es el contacto con microorganismos del ambiente que producen antibióticos de manera natural (Singer *et al.*, 2006). Un ejemplo de esto es el aislamiento de bacterias resistentes a beta-lactámicos, aminoglicósidos, macrólidos, daptomicina, entre otros antibióticos de nueva generación, provenientes de la Cueva de Lechuguilla en Nuevo México, la cual ha permanecido totalmente aislada por más de cuatro millones de años (Bhullar *et al.*, 2012). Lo anterior sustenta la capacidad intrínseca de las bacterias de adquirir genes que les confieren atributos de resistencia, así como la existencia de dichos atributos previo a la utilización de los antibióticos como tratamientos (Finley *et al.*, 2013).

Adicionalmente, existen presiones selectivas como la presencia de metales pesados y solventes orgánicos, que han contribuido a la selección ambiental de genes de resistencia (Alonso *et al.*, 2001), confiriendo ventajas ecológicas a las bacterias, ya que algunas de ellas parecen tener mayor adaptación, que las bacterias susceptibles (Khachatryan *et al.*, 2004).

En cuanto a los grupos filogenéticos de *E. coli*, los resultados obtenidos en este trabajo, muestran que del total de los aislamientos, un poco más de la mitad, pertenecieron al grupo D (53.97%), y casi 35 por ciento al grupo A.

De acuerdo con Carlos y colaboradores (2010), los mamíferos omnívoros en general presentan mayor incidencia del filogrupo A. En contraste, otro estudio presentó una mayor incidencia del grupo B2 (35%) en 497 aislamientos de *E. coli* en mamíferos herbívoros y omnívoros (Gordon & Cowling, 2003). Johnson y colaboradores (2001) por su parte, encontraron que las cepas pertenecientes a los filogrupos B2 y D, presentaban mayor cantidad de factores de virulencia que los grupos A y B1.

La clasificación realizada en este trabajo, es consistente con los hallazgos realizados en colecciones zoológicas, en donde encontraron que el número de aislamientos de *E. coli* pertenecientes al grupo D, era significativamente mayor en omnívoros que en carnívoros (Baldy-Chudzik *et al.*, 2008).

El hecho de que los resultados obtenidos en el presente trabajo también concuerden con la distribución de las cepas de *E. coli* medio ambiental dentro del grupo D, descrita por Dobrindt *et al.* (2013), resulta lógico, ya que nuestros aislamientos de *E. coli* comensal pueden ser de origen medioambiental. Lo anterior además de la colonización normal del intestino por *E. coli*, derivado de los hábitos de los lobos marinos en donde después de nacer, pasan varios meses en la tierra teniendo estrecho contacto con otros lobos marinos, tanto crías como adultos, así como con aves y alimento, construyendo de esta forma, la microbiota normal.

A pesar de que los lobos marinos son omnívoros, la dieta, masa corporal y el clima son diferentes a los omnívoros de algunos de los artículos revisados, por lo que esto también puede soportar el postulado de Gordon (2003) con respecto a la dependencia del grupo filogenético atribuido a estos factores.

Únicamente dos muestras de las 63 pertenecieron al grupo filogenético B2, estos resultados son consistentes con los hallazgos de Girardieu y colaboradores (2005) en donde afirman que este grupo es raro entre los aislamientos de *E. coli* en ganado vacuno. Adicionalmente, estas dos muestras presentaron resistencia a la combinación de ampicilina/sulbactam, e identificamos cinco y seis diferentes genes de virulencia respectivamente, que pueden ser encontrados en los cuatro patotipos EPEC, ETEC, STEC y EHEC. De acuerdo con diversos autores el grupo

B2 es un filogrupo altamente virulento (Simoes *et al.*, 2012, Johnson *et al.*, 2001). Por otro lado, en 2006 se demostró que los aislamientos pertenecientes a B2 persistían por periodos más prolongados en niños, que otras cepas de *E. coli* (Nowrouzian *et al.*, 2006).

En este trabajo se identificaron diferentes marcadores genéticos, de los patotipos de *E. coli* más frecuentemente aislados en humanos y animales. La presencia de estos genes en *E. coli* comensal de mamíferos marinos, puede deberse a la plasticidad del genoma de esta enterobacteria, en donde el intercambio de material genético, confiere combinaciones poco convencionales de genes de virulencia (Simoes *et al.*, 2012).

También es importante mencionar, que aunque la Isla Magdalena está situada en una locación remota, y es considerada un área prístina y aislada, en donde el acceso humano a la colonia de lobos marinos es poco común, existen alrededor de 16 cooperativas pesqueras trabajando a lo largo de todo el sistema de la Bahía Magdalena (Hastings & Fischer, 2001).

Por lo anterior, y toda vez que el agua de mar contiene bacterias patógenas provenientes tanto de fuentes antropogénicas (Baquero *et al.*, 2008) como animales, y el viento así como las corrientes marinas son fuentes importantes para la diseminación de estos microorganismos (Allen *et al.*, 2010), podemos especular que existe un riesgo de transmisión y diseminación de estos patógenos dentro de la colonia y hacia las poblaciones humanas.

A pesar de las notables diferencias en los hábitats de los lobos (*Canis lupus signatus*) estudiados por Simões (2012) y los animales estudiados en este trabajo, es interesante destacar que los genes más comunes encontrados en ambos casos, fueron *eae* y *bfp*. De la misma forma, nuestros resultados son también similares con el estudio realizado por Salinas y colaboradores. (2010) en donde identificaron el gen *eae* en aislamientos de *E. coli* obtenidos de lobos marinos de Sudamérica (*Otaria flavescens*); y con el estudio de Bardiau y colaboradores (2010) en el que reportaron la presencia de los genes *eae*, *stx1* y *stx2* en cérvidos salvajes (*Cervus elaphus* y *Capreolus capreolus*).

Dos factores de virulencia se encuentran codificados por los genes *eae* y *bfp*, los cuales tienen como función principal la adhesión al epitelio intestinal del hospedero, por lo tanto, la adquisición de estos genes puede entenderse como co-evolución con el propio hospedero así como una adaptación selectiva al medio ambiente. Al mismo tiempo el gen *stx2* también se identificó en más del 20 por ciento de las muestras analizadas. La presencia de los genes *eae* y *stx2* también es similar a los resultados obtenidos en estudios análogos realizados en mamíferos silvestres en condiciones de cautiverio (Baldy-Chudzik *et al.*, 2008), en donde se ha identificado el gen *stx1* de *E. coli* comensal aislada de muestras fecales de *aurochs* y búfalos clínicamente sanos.

Los genes de la toxina shiga *stx* son considerados los genes más importantes que codifican para factores de virulencia de STEC (Leotta *et al.*, 2006) y de EHEC. En estos patotipos, los factores de virulencia se asocian con toxicidad y con el SUH, así como con apoptosis en las células epiteliales intestinales, con daño en el colon y diarrea sanguinolenta (Kaper *et al.*, 2004). *E. coli* productora de *stx* se ha aislado de animales domésticos clínicamente sanos (Nataro & Kaper, 1998), por lo que los lobos marinos de California que no presentan signos aparentes de enfermedad y son hospederos de *E. coli* con estos genes, pueden ser considerados reservorios potenciales, sin embargo, es necesario realizar más estudios para poder determinarlo con seguridad.

En este trabajo se identificaron dos genes *st* y ocho genes *lt* en los aislamientos de *E. coli*. En diversas ocasiones se han intentado detectar los genes *lt* y *st* en fauna silvestre, tal es el caso de los antílopes lechwes (*Kobus leche kafuensis*) (Kuroda *et al.*, 2013), pero solo han sido identificados en ganado vacuno, en cerdos y en hurones de patas negras (*Mustela nigripes*) (Casey *et al.*, 2012, Nagy & Fekete, 2005, Bradley *et al.*, 2001).

El patotipo ETEC tanto de animales como de humanos es específico con respecto a sus hospederos; tal es el caso de las toxinas *lt*: en humanos se identifica la LTh-I y en cerdos la LTp-I. Por otro lado, las toxinas STaP y STb, son específicas de cerdos y becerros, mientras que la ETEC en humanos puede

producir STaP o STaH (Nagy & Fekete, 2005). Lo anterior indica que los genes identificados en *E. coli* de lobos marinos, deben de pertenecer a ETEC de otras especies de mamíferos terrestres, sugiriendo la presencia de contaminación fecal en estas islas.

Esta es la primera ocasión en la que se aíslan los genes *lt* y *st* en mamíferos marinos, sin embargo existen reportes de la identificación de estos genes de *E. coli*, en muestras de agua (Sidhu *et al.*, 2013, Patel *et al.*, 2011) granjas camaroneras (Roy *et al.*, 2013) y diversos alimentos de distintos orígenes (Canizalez-Roman *et al.*), por lo que otra explicación para la adquisición de estos genes, que se encuentran codificados en plásmidos, es a partir de bacterias del océano, tanto del agua como del alimento consumido, en donde puede estar presente ETEC.

En este trabajo se aisló *E. coli* comensal de lobos marinos de California (*Zalophus californianus*) con perfiles de resistencia y con genes de virulencia que pertenecen a los patotipos EPEC, EHEC, STEC y ETEC, así como otras combinaciones de los genes buscados. *E. coli* productora de *stx* identificada en los lobos marinos, podría estar comportándose como comensal, de la misma forma que sucede en los animales domésticos en los que ha sido aislada. Por su parte, los lobos marinos pueden estar actuando como reservorios y como fuente de contaminación y transmisión de esta cepa enterohemorrágica hacia los humanos.

Nuestros resultados descartan de manera parcial la hipótesis planteada, debido a que los aislamientos se ubicaron en su mayoría en los filogrupos D y A, y en menor medida en los filogrupos B1 y B2. Asimismo, se observó que el 60 por ciento de los aislados no presentaron genes de virulencia, sin embargo se confirmó que la mayoría de éstos no presentaron resistencia a los diversos antibióticos utilizados.

Finalmente, es importante continuar evaluando *E. coli* en fauna marina, para poder contar con información más precisa con relación a la adquisición de atributos de resistencia y virulencia en poblaciones silvestres, y realizar análisis más profundos respecto a la potencial patogenicidad de estas cepas de *E. coli*.

Todavía queda mucho por entender acerca de la dinámica, adquisición y mantenimiento de los genes de virulencia; el origen y el papel de la resistencia antimicrobiana en comunidades bacterianas intestinales de los animales silvestres; los posibles efectos en poblaciones de animales marinos y la identificación de algunas actividades antropogénicas que estén involucradas en la infección o la colonización.

Los patrones de resistencia antimicrobiana, perfiles de virulencia y la determinación de grupos filogenéticos en aislamientos de *E. coli* comensal proveniente de lobos marinos de California en condiciones de vida libre, serán modelos de rastreo útiles para determinar el grado de daño al medio ambiente en esta región geográfica y, pueden tener implicaciones importantes para la ecología de las enfermedades infecciosas y la biología de la conservación.

Este trabajo provee nueva información para apoyar las estrategias globales actuales, en donde es importante expandir la colaboración interdisciplinaria, ya que se considera que el hombre y los animales se encuentran estrechamente relacionados a través del medio ambiente.

### **Conclusiones**

- Se realizó por primera vez la identificación bioquímica y molecular de *E. coli* comensal, aislada de muestras rectales de lobos marinos *Zalophus californianus*, de dos islas de la península de Baja California Sur, México.
- Se identificó la resistencia a beta-lactámicos y sulfas-trimetoprim, en once aislamientos de *E. coli* comensal.
- Los cuatro grupos filogenéticos (A, B1, B2 y D), fueron determinados en cepas de *E. coli* de *Zalophus californianus*, sin embargo, el grupo D se observó en más del cincuenta por ciento de las cepas.
- Se detectaron un total de 64 genes de virulencia, siendo los más frecuentes *stx2*, *bfp* y *eae*, característicos de los patotipos EHEC, STEC y EPEC.
- No se identificó el gen *ipaH* en ninguno de los aislamientos de *E. coli* comensal.

## Lista de abreviaturas

A/E	Adhesión y esfacelación
AIEC	<i>E. coli</i> adherente-invasiva
BFP	Pilus formador de mechones
BHI	Caldo infusión cerebro corazón
CAECAM	Antígeno carcinoembriogénico
CFs	Factores de colonización
CFTR	Regulador de conductancia transmembranal de la fibrosis quística
DAE	<i>E. coli</i> adherente difusa
DAF	Factor acelerador de la degradación
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
ECP	Pilus común de <i>E. coli</i>
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatógena
ESBL	Beta-lactamasas de espectro extendido
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigénica
EUA	Estados Unidos de América
GAD	Enzima glutamato descarboxilasa
Gb3s	Globotriaosilceramidas
GM1	Monosialogangliósido
HUS	Síndrome urémico hemolítico
LifA	Factor inhibidor de linfocitos
MIC	Concentración mínima inhibitoria
OMVs	Vesículas de la membrana externa
pAA	Plásmidos de virulencia
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PKA	Proteína quinasa A
STEC	<i>E. coli</i> productora de toxinas shiga
T3SS	Sistema de secreción tipo III
Tir	Receptor de intimina translocado
TSA	Agar soya tripticaseína

## Referencias

- ADNAN, S., PATERSON, D. L., LIPMAN, J. & ROBERTS, J. A. (2013) Ampicillin/sulbactam: Its potential use in treating infections in critically ill patients. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 42, 384-389.
- AGUIRRE, A. A. & TABOR, G. M. (2008) Global Factors Driving Emerging Infectious Diseases Impact on Wildlife Populations. *Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Prediction and Prevention*.
- ALONSO, A., SÁNCHEZ, P. & MARTÍNEZ, J. L. (2001) Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environmental Microbiology*, 3, 1-9.
- ALLEN, H. K., DONATO, J., WANG, H. H., CLOUD-HANSEN, K. A., DAVIES, J. & HANDELSMAN, J. (2010) Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 251-259.
- ANDERSSON, D. I. & HUGHES, D. (2010) Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nature Reviews Microbiology*, 8, 260-271.
- AURIOLES-GAMBOA, D. & ZAVALA-GONZALEZ, A. (1994) Ecological factors that determine distribution and abundance of the California sea lion *Zalophus californianus* in the Gulf of California. *Ciencias Marinas*, 20, 535-553.
- AURIOLES, D. & TRILLMICH, F. (2008) *Zalophus californianus*. IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2.
- BADEA, L., DOUGHTY, S., NICHOLLS, L., SLOAN, J., ROBINS-BROWNE, R. M. & HARTLAND, E. L. (2003) Contribution of Efa1/LifA to the adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Microbial Pathogenesis*, 34, 205-215.
- BALDY-CHUDZIK, K., MACKIEWICS, P. & STOSIK, M. (2008) Phylogenetic background, virulence gene profiles, and genomic diversity in commensal *Escherichia coli* isolated from ten mammal species living in one zoo. *Veterinary Microbiology*, 131, 173 - 184.
- BAQUERO, F., MARTÍNEZ, J.-L. & CANTÓN, R. (2008) Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*, 19, 260-265.
- BARDIAU, M., GRÉGOIRE, F., MUYLEAERT, A., NAHAYO, A., DUPREZ, J. N., MAINIL, J. & LINDEN, A. (2010) Enteropathogenic (EPEC), enterohaemorrhagic (EHEC) and verotoxigenic (VTEC) *Escherichia coli* in wild cervids. *Journal of Applied Microbiology*, 109, 2214-2222.
- BARKER, K. F. (1999) Antibiotic resistance: a current perspective. *British Journal Clinical Pharmacology*, 48, 109-24.



- BELD, M. J. C. & REUBSAET, F. A. G. Differentiation between *Shigella*, enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and noninvasive *Escherichia coli*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 31, 899-904.
- BHULLAR, K., WAGLECHNER, N., PAWLOWSKI, A., KOTEVA, K., BANKS, E. D., JOHNSTON, M. D., BARTON, H. A. & WRIGHT, G. D. (2012) Antibiotic Resistance Is Prevalent in an Isolated Cave Microbiome. *PLoS ONE*, 7, e34953.
- BISI-JOHNSON, M., OBI, C., VASAIKAR, S., BABA, K. & HATTORI, T. (2011) Molecular basis of virulence in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Salmonella* species from a tertiary hospital in the Eastern Cape, South Africa. *Gut Pathogens*, 3, 9.
- BOYD, E. F. & HARTL, D. L. (1998) Chromosomal Regions Specific to Pathogenic Isolates of *Escherichia coli* Have a Phylogenetically Clustered Distribution. *Journal of Bacteriology*, 180, 1159-1165.
- BRADLEY, G. A., ORR, K., REGGIARDO, C. & GLOCK, R. D. (2001) Enterotoxigenic *Escherichia coli* Infection in Captive Black-footed Ferrets. *Journal of Wildlife Diseases*, 37, 617-620.
- BURGE, C. A., MARK EAKIN, C., FRIEDMAN, C. S., FROELICH, B., HERSHBERGER, P. K., HOFMANN, E. E., PETES, L. E., PRAGER, K. C., WEIL, E., WILLIS, B. L., FORD, S. E. & HARVELL, C. D. (2013) Climate Change Influences on Marine Infectious Diseases: Implications for Management and Society. *Annual Review of Marine Science*, 6, 249-277.
- BURKE, L. (2000) *Pilot Assessment of Global Ecosystems: Coastal Ecosystems*, Washington DC, World Resources Institute.
- CABELLI, V. J., DUFOUR, A. P., MCCABE, L. J. & LEVIN, M. A. (1983) A Marine Recreational Water Quality Criterion Consistent with Indicator Concepts and Risk Analysis. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, 55, 1306-1314.
- CABELLO, F. C. (2006) Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental microbiology*, 8, 1137-1144.
- CAMPELLONE, K. G. (2010) Cytoskeleton-modulating effectors of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: Tir, EspFU and actin pedestal assembly. *FEBS Journal*, 277, 2390-2402.
- CANIZALEZ-ROMAN, A., GONZALEZ-NUÑEZ, E., VIDAL, J. E., FLORES-VILLASEÑOR, H. & LEÓN-SICAIROS, N. Prevalence and antibiotic resistance profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from food items in northwestern Mexico. *International Journal of Food Microbiology*, 164, 36-45.
- CARLOS, C., PIRES, M., STOPPE, N., HACHICH, E., SATO, M., GOMES, T., AMARAL, L. & OTTOBONI, L. (2010) *Escherichia coli* phylogenetic group determination and

its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. *BMC Microbiology*, 10, 161.

CARRASCO, S. E., BUREK, K. A., BECKMEN, K. B., OAKS, J. L., DAVIS, M. A., BAKER, K. N. & MAZET, J. A. (2011) Aerobic oral and rectal bacteria of free-ranging Steller sea lion pups and juveniles (*Eumetopias jubatus*) in Alaska. *Journal Wildlife Diseases*, 47, 807-820.

CASEY, T. A., CONNELL, T. D., HOLMES, R. K. & WHIPP, S. C. (2012) Evaluation of heat-labile enterotoxins type IIa and type IIb in the pathogenicity of enterotoxigenic *Escherichia coli* for neonatal pigs. *Veterinary Microbiology*, 159, 83-89.

CASTINEL, A., DUIGNAN, P. J., POMROY, W. E., LÓPEZ-VILLALOBOS, N., GIBBS, N. J., CHILVERS, B. L. & WILKINSON, I. S. (2007) Neonatal mortality in New Zealand sea lions (*Phocarcos hookeri*) at Sandy Bay, Enderby Island, Auckland Islands from 1998 to 2005. *Journal of Wildlife Diseases*, 43, 461-474.

CEBALLOS, G. & EHRlich, P. R. (2002) Mammal population losses and the extinction crisis. *Science*, 296, 904-907.

CLEARY, J., LAI, L.-C., SHAW, R. K., STRAATMAN-IWANOWSKA, A., DONNENBERG, M. S., FRANKEL, G. & KNUTTON, S. (2004) Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. *Microbiology*, 150, 527-538.

CLERMONT, O., BONACORSI, S. & BINGEN, E. (2000) Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol*, 66, 4555 - 4558.

CROWE, A., JAMES, M. J., LEE, V. M., SMITH, A. B., 3RD, TROJANOWSKI, J. Q., BALLATORE, C. & BRUNDEN, K. R. (2013) Aminothienopyridazines and Methylene Blue affect Tau Fibrillization via Cysteine Oxidation. *Journal Biological Chemistry*, 288, 11024-11037.

CROXEN, M. A. & FINLAY, B. B. (2010) Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 26-38.

CROXEN, M. A., LAW, R. J., SCHOLZ, R., KEENEY, K. M., WLODARSKA, M. & FINLAY, B. B. (2013) Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 26, 822-880.

CHANDRA, M., CHENG, P., RONDEAU, G., PORWOLLIK, S. & MCCLELLAND, M. (2013) A single step multiplex PCR for identification of six diarrheagenic *E. coli* pathotypes and *Salmonella*. *International Journal of Medical Microbiology*, 303, 210-216.

DAVIDSON, A. D., BOYER, A. G., KIM, H., POMPA-MANSILLA, S., HAMILTON, M. J., COSTA, D. P., CEBALLOS, G. & BROWN, J. H. (2012) Drivers and hotspots of extinction risk in marine mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 3395-3400.

- DAVIES, J. (1996) Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiologia (Madrid, Spain)*, 12, 9-16.
- DAVIES, J. E. (1997) Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. *Ciba Foundation Symposium*, 207, 15-27.
- DEBROY, C. & MADDOX, C. (2001) Identification of virulence attributes of gastrointestinal *Escherichia coli* isolates of veterinary significance. *Animal Health Research Reviews*, 2, 129.
- DEBROY, C. & ROBERTS, E. (2006) Screening Petting Zoo Animals for the Presence of Potentially Pathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18, 597-600.
- DESONIE, D. L. (1992) Geologic and geochemical reconnaissance of Isla San Esteban: post-subduction orogenic volcanism in the Gulf of California. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 52, 123-140.
- DIAMOND, S. S., RAFLO, C. P., BELEAU, M. H. & CADWELL, G. A. (1980) Edema disease in a California sea lion. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 177, 808-810.
- DÍAZ-URIBE, J. G., ARREGUÍN-SÁNCHEZ, F., LERCARI-BERNIER, D., CRUZ-ESCALONA, V. H., ZETINA-REJÓN, M. J., DEL-MONTE-LUNA, P. & MARTÁINEZ-AGUILAR, S. (2012) An integrated ecosystem trophic model for the North and Central Gulf of California: An alternative view for endemic species conservation. *Ecological Modelling*, 230, 73-91.
- DOBRINDT, U. (2005) (Patho-) Genomics of *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology*, 295, 357-371.
- DOBRINDT, U., HACKER, J. H., SVANBORG, C., LEIMBACH, A., HACKER, J. & DOBRINDT, U. (2013) *E. coli* as an All-Rounder: The Thin Line Between Commensalism and Pathogenicity. *Between Pathogenicity and Commensalism*. Springer Berlin Heidelberg.
- EDBERG, S. C., RICE, E. W., KARLIN, R. J. & ALLEN, M. J. (2000) *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. *Symposium series (Society for Applied Microbiology)*, 29, 106-116.
- FINLEY, R. L., COLLIGNON, P., LARSSON, D. G. J., MCEWEN, S. A., LI, X.-Z., GAZE, W. H., REID-SMITH, R., TIMINOUNI, M., GRAHAM, D. W. & TOPP, E. (2013) The Scourge of Antibiotic Resistance: The Important Role of the Environment. *Clinical Infectious Diseases*, 57, 704-710.
- GARCÍA-RODRÍGUEZ, F. A. A.-G., DAVID (2004) Spatial and temporal variation in the diet of *Zalophus californianus* in the Gulf of California, Mexico. *Fishery Bulletin*, 102, 47-62.

- GIRARDEAU, J. P., DALMASSO, A., BERTIN, Y., DUCROT, C., BORD, S. V., LIVRELLI, V. R., VENOZY-ROZAND, C. & MARTIN, C. (2005) Association of Virulence Genotype with Phylogenetic Background in Comparison to Different Seropathotypes of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 6098-6107.
- GONZALEZ-SUAREZ, M., FLATZ, R., AURIOLES-GAMBOA, D., HEDRICK, P. W. & GERBER, L. R. (2009) Isolation by distance among California sea lion populations in Mexico: redefining management stocks. *Molecular Ecology*, 18, 1088-1099.
- GORDON, D. M., CLERMONT, O., TOLLEY, H. & DENAMUR, E. (2008) Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environmental Microbiology*, 10, 2484-2496.
- GORDON, D. M. & COWLING, A. (2003) The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology*, 149, 3575-3586.
- GUION, C. E., OCHOA, T. J., WALKER, C. M., BARLETTA, F. & CLEARY, T. G. (2008) Detection of Diarrheagenic *Escherichia coli* by Use of Melting-Curve Analysis and Real-Time Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 46, 1752-1757.
- GYLES, C. L. (2007) Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *Journal of Animal Science*, 85, 45-62.
- HASTINGS, R. & FISCHER, D. (2001) Management priorities for Magdalena Bay, Baja California, Mexico. *Journal of Coastal Conservation*, 7, 193-202.
- HAWKEY, P. M. & JONES, A. M. (2009) The changing epidemiology of resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64, 3-10.
- HAWSER, S. P., BOUCHILLON, S. K., LASCOLS, C., HACKEL, M., HOBAN, D. J., BADAL, R. E. & CANTÓN, R. (2011) Susceptibility of European *Escherichia coli* clinical isolates from intra-abdominal infections, extended-spectrum  $\beta$ -lactamase occurrence, resistance distribution, and molecular characterization of ertapenem-resistant isolates (SMART 2008–2009). *Clinical Microbiology and Infection*, 18, 253-259.
- HERNÁNDEZ-CASTRO, R., MARÍNEZ-CHAVARRÍA, L., DÍAZ-AVELAR, A., ROMERO-OSORIO, A., GODÍNEZ-REYES, C., ZAVALA-GONZÁLEZ, A. & VERDUGO-RODRÍGUEZ, A. (2005) Aerobic bacterial flora of the nasal cavity in Gulf of California sea lion (*Zalophus californianus*) pups. *The Veterinary Journal*, 170, 359-363.
- HERZER, P. J., INOUYE, S., INOUYE, M. & WHITTAM, T. S. (1990) Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 172, 6175-6181.

- HIGGINS, L. M., FRANKEL, G., CONNERTON, I., GONÇALVES, N. S., DOUGAN, G. & MACDONALD, T. T. (1999) Role of Bacterial Intimin in Colonic Hyperplasia and Inflammation. *Science*, 285, 588-591.
- HIRSCH, R., TERNES, T., HABERER, K. & KRATZ, K.-L. (1999) Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Science of The Total Environment*, 225, 109-118.
- ISIDEAN, S. D., RIDDLE, M. S., SAVARINO, S. J. & PORTER, C. K. (2011) A systematic review of ETEC epidemiology focusing on colonization factor and toxin expression. *Vaccine*, 29, 6167-6178.
- JACOBY, G. A. (2009) AmpC  $\beta$ -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 22, 161-182.
- JACOBY, G. A. & MUNOZ-PRICE, L. S. (2005) The new beta-lactamases. *New England Journal Medicine*, 352, 380-391.
- JOHNSON, J. R., DELAVARI, P., KUSKOWSKI, M. & STELL, A. L. (2001) Phylogenetic Distribution of Extraintestinal Virulence-Associated Traits in *Escherichia coli*. *Journal of Infectious Diseases*, 183, 78-88.
- JOHNSON, S., LOWENSTINE, L., GULLAND, F., JANG, S., IMAI, D., ALMY, F., DELONG, R. & GARDNER, I. (2006) Aerobic bacterial flora of the vagina and prepuce of California sea lions (*Zalophus californianus*) and investigation of associations with urogenital carcinoma. *Veterinary Microbiology*, 114, 94-103.
- JOHNSON, S. P., NOLAN, S. & GULLAND, F. M. D. (1998) Antimicrobial Susceptibility of Bacteria Isolated from Pinnipeds Stranded in Central and Northern California. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 29, 288-294.
- KAPER, J. B., NATARO, J. P. & MOBLEY, H. L. T. (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 123-140.
- KHACHATRYAN, A. R., HANCOCK, D. D., BESSER, T. E. & CALL, D. R. (2004) Role of Calf-Adapted *Escherichia coli* in Maintenance of Antimicrobial Drug Resistance in Dairy Calves. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 752-757.
- KIM, J. H., LEE, J. K., YOO, H. S., SHIN, N. R., SHIN, N. S., LEE, K. H. & KIM, D. Y. (2002) Endocarditis Associated with *Escherichia coli* in a Sea Lion (*Zalophus californianus*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 14, 260-262.
- KULLAS, H., COLES, M., RHYAN, J. & CLARK, L. (2002) Prevalence of *Escherichia coli* serogroups and human virulence factors in faeces of urban Canada geese (*Branta canadensis*). *International Journal of Environmental Health Research*, 12, 153-162.
- KURODA, K., SUZUKI, R., IHARA, K., MIYAGI, H., WATANABE, H., SATO, K., HANG'OMBE, B. M., MUBITA, C., ISOGAI, N. & MULENGA, E. (2013) Detection of virulence genes of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. from fecal samples of Kafue lechwe (*Kobus leche kafuensis*) and pastoral cattle in the interface areas of Zambia. *African Journal of Microbiology Research*, 7, 504-508.

- LE BOEUF, B. J. (1983) *Size and distribution of the California sea lion population in Mexico*, San Francisco, California Academy of Sciences.
- LEOTTA, G. A., DEZA, N., ORIGLIA, J., TOMA, C., CHINEN, I., MILIWEBSKY, E., IYODA, S., SOSA-ESTANI, S. & RIVAS, M. (2006) Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in captive non-domestic mammals. *Veterinary Microbiology*, 118, 151-157.
- LIU, B. & POP, M. (2009) ARDB-Antibiotic Resistance Genes Database. *Nucleic Acids Research*, 37, D443-D447.
- LIVERMORE, D. M., MUSHTAQ, S., WARNER, M. & WOODFORD, N. (2014) Comparative in vitro activity of sulfametrole/trimethoprim and sulfamethoxazole/trimethoprim and other agents against multiresistant Gram-negative bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69, 1050-1056.
- MALDONADO, J. E., DAVILA, F. O., STEWART, B. S., GEFFEN, E. & WAYNE, R. K. (1995) Intraespecific genetic differentiation in California sea lions (*Zalophus californianus*) from southern California and the Gulf of California. *Marine Mammal Science*, 11, 46-58.
- MASTERS, P. A., O'BRYAN, T. A., ZURLO, J., MILLER, D. Q. & JOSHI, N. (2003) Trimethoprim-sulfamethoxazole revisited. *Archives of Internal Medicine*, 163, 402-410.
- MCDANIELS, A. E., RICE, E. W., REYES, A. L., JOHNSON, C. H., HAUGLAND, R. A. & STELMA, G. N. (1996) Confirmational identification of *Escherichia coli*, a comparison of genotypic and phenotypic assays for glutamate decarboxylase and beta-D-glucuronidase. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 3350-4.
- MILLER, M. A., BYRNE, B. A., JANG, S. S., DODD, E. M., DORFMEIER, E., HARRIS, M. D., AMES, J., PARADIES, D., WORCESTER, K., JESSUP, D. A. & MILLER, W. A. (2010) Enteric bacterial pathogen detection in southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*) is associated with coastal urbanization and freshwater runoff. *Veterinary Research*, 41.
- MORGAN, L., MAXWELL, S., TSAO, F., WILKINSON, T. A. C. & ETNOYER, P. (2005) Áreas prioritarias para la conservación: Baja California al mar de Bering. *Comisión para la Cooperación Ambiental y Marine Conservation Biology Institute*. Montreal.
- MOURA, R. A., SIRCILI, M. P., LEOMIL, L., MATTÉ, M. H., TRABULSI, L. R., ELIAS, W. P., IRINO, K. & PESTANA DE CASTRO, A. F. (2009) Clonal Relationship among Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Different Animal Species and Humans. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 7399-7408.
- NAGY, B. L. & FEKETE, P. T. Z. (2005) Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *International Journal of Medical Microbiology*, 295, 443-454.

- NATARO, J. P. & KAPER, J. B. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11, 142 - 201.
- NIKAIDO, H. (2009) Multidrug resistance in bacteria. *Annual Review Biochemistry*, 78, 119-46.
- NORMAN, A., HANSEN, L. H. & SORENSEN, S. J. (2009) Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364, 2275-2289.
- NOWROUZIAN, F. L., ADLERBERTH, I. & WOLD, A. E. (2006) Enhanced persistence in the colonic microbiota of *Escherichia coli* strains belonging to phylogenetic group B2: role of virulence factors and adherence to colonic cells. *Microbes and Infection*, 8, 834-840.
- OLSON, D. M. & DINERSTEIN, E. (2002) The Global 200: Priority ecoregions for global conservation. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 89, 199-224.
- PATEL, C. B., VAJPAYEE, P., SINGH, G., UPADHYAY, R. S. & SHANKER, R. (2011) Contamination of potable water by enterotoxigenic *Escherichia coli*: qPCR based culture-free detection and quantification. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74, 2292-2298.
- PESAPANE, R., PONDER, M. & ALEXANDER, K. A. (2013) Tracking Pathogen Transmission at the Human-Wildlife Interface: Banded Mongoose and *Escherichia coli*. *EcoHealth*, 10, 115-128.
- PHILIPPON, A., ARLET, G. & JACOBY, G. A. (2002) Plasmid-Determined AmpC-Type  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, 1-11.
- PICARD, B., GARCIA, J. S., GOURIOU, S., DURIEZ, P., BRAHIMI, N., BINGEN, E., ELION, J. & DENAMUR, E. (1999) The Link between Phylogeny and Virulence in *Escherichia coli* Extraintestinal Infection. *Infection and Immunity*, 67, 546-553.
- POMPA, S., EHRLICH, P. R. & CEBALLOS, G. (2011) Global distribution and conservation of marine mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 13600-13605.
- POOLE, K. (2002) Outer membranes and efflux: the path to multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Current Pharmacology Biotechnology*, 3, 77-98.
- PUPO, G. M., KARAOLIS, D. K., LAN, R. & REEVES, P. R. (1997) Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and mdh sequence studies. *Infection and Immunity*, 65, 2685-92.
- QADRI, F., SVENNERHOLM, A.-M., FARUQUE, A. S. G. & SACK, R. B. (2005) Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Developing Countries: Epidemiology,

Microbiology, Clinical Features, Treatment, and Prevention. *Clinical Microbiology Reviews*, 18, 465-483.

RIBERA, A., ROCA, I., RUIZ, J., GIBERT, I. & VILA, J. (2003) Partial characterization of a transposon containing the tet(A) determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52, 477-480.

RIOFRÍO-LAZO, M., AURIOLES-GAMBOA, D. & LE BOEUF, B. J. (2012) Ontogenetic changes in feeding habits of northern elephant seals revealed by  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  analysis of growth layers in teeth. *Marine Ecology Progress Series*, 450, 229-241.

ROBICSEK, A., STRAHILEVITZ, J., JACOBY, G. A., MACIELAG, M., ABBANAT, D., PARK, C. H., BUSH, K. & HOOPER, D. C. (2006) Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nature Medicine*, 12, 83-88.

ROSALES-NANDUCA, H., GERRODETTE, T., URBÁN, J., RDENAS-HINOJOSA, G. & MEDRANO-GONZÁLEZ, L. (2011) Macroecology of marine mammal species in the Mexican Pacific Ocean: diversity and distribution. *Marine Ecology Progress Series*, 431, 281-291.

ROSE, J. M., GAST, R. J. & BOGOMOLNI, A. (2009) Occurrence and patterns of antibiotic resistance in vertebrates of the Northeastern United States coast. *FEMS Microbiology Ecology*, 67, 421-431.

ROY, D., BISWAS, B., ISLAM, H. M., AHMED, M. S., RASHEDUZZAMAN, M. & SAROWER, M. G. (2013) Rapid identification of enterovirulent *Escherichia coli* strains using polymerase chain reaction from shrimp farms. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 16, 1260-1269.

SALINAS C, P., MORAGA M, R., SANTANDER P, E. & SIELFELD K, W. (2010) Presencia de cepas diarreogénicas de *Escherichia coli* y estudio de genes de virulencia en aislados desde fecas de dos poblaciones de lobo marino común, *Otaria flavescens* en el norte de Chile. *Revista de biología marina y oceanografía*, 45, 153-158.

SAMADPOUR, M., ROBERTS, M. C., KITTS, C., MULUGETA, W. & ALFI, D. (2005) The use of ribotyping and antibiotic resistance patterns for identification of host sources of *Escherichia coli* strains. *Letters in Applied Microbiology*, 40, 63-68.

SARMAH, A. K., MEYER, M. T. & BOXALL, A. B. A. (2006) A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, 65, 725-759.

SCHROEDER, G. N. & HILBI, H. (2008) Molecular Pathogenesis of *Shigella* spp.: Controlling Host Cell Signaling, Invasion, and Death by Type III Secretion. *Clinical Microbiology Reviews*, 21, 134-156.



- SEKSE, C., SUNDE, M., LINDSTEDT, B. A., HOPP, P., BRUHEIM, T., CUDJOE, K. S., KVITLÉ, B. & URDAHL, A. M. (2011) Potentially Human-Pathogenic *Escherichia coli* O26 in Norwegian Sheep Flocks. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 4949-4958.
- SERVIN, A. L. (2005) Pathogenesis of Afa/Dr Diffusely Adhering *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 18, 264-292.
- SHOEMAKER, N. B., VLAMAKIS, H., HAYES, K. & SALYERS, A. A. (2001) Evidence for Extensive Resistance Gene Transfer among *Bacteroides* spp. and among *Bacteroides* and Other Genera in the Human Colon. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 561-568.
- SIDHU, J. P. S., AHMED, W., HODGERS, L. & TOZE, S. (2013) Occurrence of Virulence Genes Associated with Diarrheagenic Pathotypes in *Escherichia coli* Isolates from Surface Water. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 328-335.
- SIMÕES, R., FERREIRA, C., GONCALVES, J., ÁLVARES, F., RIO-MAIOR, H., ROQUE, S., BRANDAO, R. & MARTINS DA COSTA, P. (2012) Occurrence of virulence genes in multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates from Iberian wolves (*Canis lupus signatus*) in Portugal. *European Journal of Wildlife Research*, 58, 677-684.
- SINGER, R. S., WARD, M. P. & MALDONADO, G. (2006) Can landscape ecology untangle the complexity of antibiotic resistance? *Nature Reviews Microbiology*, 4, 943-952.
- STAUDINGER, M. D., GRIMM, NANCY B., STAUDT, AMANDA, CARTER, SHAWN L., CHAPIN, F. STUART, KAREIVA, PETER, RUCKELSHAUS, MARY, STEIN, BRUCE A. (2012) Impacts of Climate Change on Biodiversity, Ecosystems, and Ecosystem Services: Technical Input to the 2013 National Climate Assessment. *Cooperative Report to the 2013 National Climate Assessment*.
- STEWART, J., GAST, R., FUJIOKA, R., SOLO-GABRIELE, H., MESCHKE, J. S., AMARAL-ZETTLER, L., DEL CASTILLO, E., POLZ, M., COLLIER, T., STROM, M., SINIGALLIANO, C., MOELLER, P. & HOLLAND, A. F. (2008) The coastal environment and human health: microbial indicators, pathogens, sentinels and reservoirs. *Environmental Health*, 7, S3.
- STODDARD, R. A., ATWILL, E. R., CONRAD, P. A., BYRNE, B. A., JANG, S., LAWRENCE, J., MCCOWAN, B. & GULLAND, F. M. D. (2009) The effect of rehabilitation of northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*) on antimicrobial resistance of commensal *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology*, 133, 264-271.
- STROUD, R. K. & ROFFE, T. J. (1979) Causes of death in marine mammals stranded along the Oregon coast *Journal of Wildlife Diseases*, 15, 91-97.
- SWEENEY, J. C. & GILMARTIN, W. G. (1974) Survey of diseases in free-living California Sea Lions *Journal of Wildlife Diseases*, 10, 370-376.

- SZTEREN, D. & AURIOLES-GAMBOA, D. (2011) Ecological regionalization of *Zalophus californianus* rookeries, as a tool for conservation in the Gulf of California. *Ciencias Marinas*, 37, 349-368.
- SZTEREN, D., AURIOLES, D. & GERBER, L. R. (2006) Population status and trends of the California sea lion (*Zalophus californianus californianus*) in the Gulf of California, Mexico. *Sea Lions of the World*. Fairbanks, Alaska Sea Grant Coll Program.
- TENAILLON, O., SKURNIK, D., PICARD, B. & DENAMUR, E. (2010) The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 207-217.
- THOMAS, C. M. & NIELSEN, K. M. (2005) Mechanisms of, and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 711-721.
- THORNTON, S. M., NOLAN, S. & GULLAND, F. M. (1998) Bacterial isolates from California sea lions (*Zalophus californianus*), harbor seals (*Phoca vitulina*), and northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*) admitted to a rehabilitation center along the central California coast, 1994-1995. *Journal Zoo Wildlife Medicine*, 29, 171-176.
- TORNIEPORTH, N. G., JOHN, J., SALGADO, K., DE JESUS, P., LATHAM, E., MELO, M. C., GUNZBURG, S. T. & RILEY, L. W. (1995) Differentiation of pathogenic *Escherichia coli* strains in Brazilian children by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 1371-4.
- TORRES, A. G. & PAYNE, S. M. (1997) Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Molecular Microbiology*, 23, 825-833.
- TOUCHON, M., HOEDE, C., TENAILLON, O., BARBE, V., BAERISWYL, S., BIDET, P., BINGEN, E., BONACORSI, S., BOUCHIER, C., BOUVET, O., CALTEAU, A., CHIAPELLO, H., CLERMONT, O., CRUVEILLER, S., DANCHIN, A., DIARD, M., DOSSAT, C., KAROUI, M. E., FRAPY, E., GARRY, L., GHIGO, J. M., GILLES, A. M., JOHNSON, J., LE BOUGUENEC, C., LESCAT, M., MANGENOT, S., MARTINEZ-JEHANNE, V., MATIC, I., NASSIF, X., OZTAS, S., PETIT, M. A., PICHON, C., ROUY, Z., RUF, C. S., SCHNEIDER, D., TOURRET, J., VACHERIE, B., VALLENET, D., MEDIGUE, C., ROCHA, E. P. & DENAMUR, E. (2009) Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genetics* 5.
- TURNER, S. M., SCOTT-TUCKER, A., COOPER, L. M. & HENDERSON, I. R. (2006) Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 263, 10-20.
- VAN DEN BOGAARD, A. E. & STOBBERINGH, E. E. (2000) Epidemiology of resistance to antibiotics: Links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 14, 327-335.

- VILA, J., MARTÍ, S. & SÁNCHEZ-CÉSPEDES, J. (2007) Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59, 1210-1215.
- WALLACE, C., YUND, P., FORD, T., MATASSA, K. & BASS, A. (2013) Increase in Antimicrobial Resistance in Bacteria Isolated from Stranded Marine Mammals of the Northwest Atlantic. *EcoHealth*, 10, 201-210.
- WANG, X., YAN, Q., XIA, X., ZHANG, Y., LI, D., WANG, C., CHEN, S. & HOU, R. (2013) Serotypes, Virulence Factors, and Antimicrobial Susceptibilities of Vaginal and Fecal Isolates of *Escherichia coli* from Giant Pandas. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 5146-5150.
- ZAVALA-GONZÁLEZ, A., MELLINK, ERIC (1997) Entanglement of California sea lions *Zalophus californianus californianus*, in fishing gear in the central-northern part of the Gulf of California, Mexico *Fishery Bulletin*, 95, 180-184.