

Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Xochimilco
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Producción Agrícola y Animal
Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia

Informe final de Servicio Social

**Características filogenéticas, factores de virulencia y resistencia microbiana
en aislamientos de *Escherichia coli* obtenidas de mamíferos silvestres no
nativos en Aguascalientes, México.**

Prestador de Servicio social
Quetzalli Ventura Pimentel
Matrícula: 2132030036

Asesor interno
M. en C. Javier Lorenzo Olivares Orozco
Núm. Económico: 6288

Asesor externo
Dra. Erika Gabriela Palomares Reséndiz
Cédula Profesional: 669557

Lugar de realización:

Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología, INIFAP

Fecha de inicio y término

Del 03 de septiembre del 2018 al 01 de marzo de 2019

Índice

1. Introducción	3
2. Justificación	3
3. <i>E. coli</i>	4
3.1.1 Clasificación	4
3.1.1 Clasificación serológica	4
3.1.3 Clasificación por patotipos	4
3.1.4 Clasificación por filogrupos	5
3.2 <i>E. coli</i> comensal	5
3.3 Principales patotipos patógenos en animales	6
3.3.1 STEC (EHEC)	6
3.3.2 EPEC	6
3.3.3 ETEC	7
3.3.5 EIEC	7
4. Objetivos	8
4.1 Objetivo general	8
4.2 Objetivos específicos	8
5. Metodología	8
5.2 Concentración mínima inhibitoria	9
5.3 Serotipificación	9
5.4 Determinación de grupos filogenéticos	10
5.5 Identificación de factores de virulencia	11
6. Actividades realizadas	12
7. Objetivos y metas alcanzados	12
8. Resultados	13
9. Discusión	16
10. Conclusión	17
11. Recomendaciones	17
12. Bibliografía	18

1. Introducción

En México, la crianza y aprovechamiento de los animales silvestres se realizan de manera legal en las Unidades de Manejo y Aprovechamiento Sustentable (UMAS), las cuales promueven esquemas alternativos de producción que son compatibles con el cuidado del medio ambiente. Sin embargo, en los últimos años se han incrementado las interacciones con el medio silvestre, existe un mayor riesgo de transmisión de agentes infecciosos entre las distintas poblaciones, se ha estimado que, de todos los organismos capaces de provocar infección en el ser humano el 61% son de carácter zoonótico (Carroll *et al.*, 2015). Por todo ello, el estudio de la fauna silvestre como portadora y reservorio de agentes zoonóticos se ha convertido en un tema de creciente importancia, se ha encontrado que en las heces de animales domésticos y silvestres están presentes bacterias enteropatógenas, dentro de las cuales destacaremos a *Escherichia coli*, que pasa aproximadamente la mitad de su ciclo de vida en el ambiente externo (suelo, agua superficial o subterránea) contaminándolo aumentando la probabilidad de que los animales silvestres sirvan como reservorio (Guenther *et al.*, 2010). A pesar de que *E. coli* es la bacteria mejor conocida del mundo, apenas se ha empezado a entender su ecología y su biología, esto debido a que su genoma es muy dinámico. Las diversas herramientas genéticas moleculares y de serotipificación abren la posibilidad de realizar estudios ecológicos y evolutivos de esta bacteria (Souza *et al.*, 2001).

2. Justificación

A pesar de que *E. coli* es responsable de enfermedades gastrointestinales en humanos y animales, ocasiona alta mortalidad en todo el mundo, especialmente en niños, ancianos y animales (Oliveira *et al.*, 2012). *E. coli* es un miembro común de la flora microbiana de animales salvajes y aves (Oludairo *et al.*, 2016), en poblaciones de animales silvestres está poco estudiada, por lo que en esta investigación se analizaron muestras de animales silvestres para detectar *E. coli* y saber qué características filogenéticas, serológicas, factores de virulencia y resistencia microbiana presentan.

3. *E. coli*

Es un bacilo Gram negativo, oxidasa negativa, no esporulada, catalasa positiva, anaerobio facultativo que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* Crece a temperaturas de entre 15 a 45°C, con un pH óptimo de 7.0, en agar Mac Conkey produce colonias brillantes, cuyo tamaño es de 0.5 a 3.0 micras, circulares y rosadas debido a que es lactosa positiva, (Gyles y Fairbrother, 2009; Tenailon *et al.*, 2010). Además, forma parte de la microbiota normal intestinal de diferentes especies (incluidos todos los mamíferos y otros) y está presente en una concentración estimada de $\sim 10^6$ bacterias/g (Gyles *et al.*, 2007).

3.1.1 Clasificación

Su clasificación puede hacerse por varios métodos, como: serotipificación, división por patotipos (cepas patógenas, según el daño que provoquen), fagotipificación, genotipificación, marcadores de virulencia y perfiles filogenéticos (Garza, 2015).

3.1.1 Clasificación serológica

Esta clasificación involucra la detección y caracterización de los antígenos: O (somático), K (capsular), H (flagelar) y F (fimbrial). Para el antígeno O se ha encontrado que existen 174 grupos reconocidos (del 01 a 0181, exceptuando O31, O47, O67, 072, 093, 094 y O122), para el K (antígeno de superficie) se han reportado 80 tipos distintos y para el H se mencionan 53 tipos diferentes. No obstante, pocos laboratorios cuentan con la capacidad de determinar el antígeno capsular, por lo que se emplean sólo los antígenos O y H, a esta combinación O:H se le llama serotipo (Scheutz *et al.*, 2004).

3.1.3 Clasificación por patotipos

Esta es específica para cepas patógenas y se toman en cuenta los factores de virulencia de las cepas y el tipo de daño que estas provocan. En animales, los principales patotipos son: *E. coli* Enteropatogénica (EPEC), *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) que incluye al subgrupo *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC) y *E. coli* Extraintestinal patogénica (EXPEC) (Croxen *et al.*, 2013; Gyles *et al.*, 2010). En cuanto al ser humano, los principales patotipos

asociados son 7: STEC (con el subgrupo EHEC), EPEC, ETEC, *E. coli* Enteroagregativa (EAEC), *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* Difusamente Adherente (DAEC) y *E. coli* Adherente Invasiva (AEIEC). Las cepas extraintestinales (ExPEC) también se asocian a enfermedad humana, principalmente las cepas uropatógenicas (UPEC). Los patotipos asociados al humano pueden provocar tres cuadros clínicos: enfermedad diarreica/intestinal, infección del tracto urinario y sepsis/meningitis (Wang *et al.* 2003).

3.1.4 Clasificación por filogrupos

Actualmente, el sistema más empleado para la genotipificación es Clasificación de Clermont, quien revolucionó la filogenética de *E. coli* al ser una opción económica y técnicamente viable (Gordon *et al.*, 2008). Clermont propone una reacción de PCR cuádruplex inicial con una reacción doble complementaria en donde permite dividir a los aislamientos de *E. coli* en 8 grupos filogenéticos: A1, B1, B2, C, D, E y F que son estrictamente *E. coli* y el octavo grupo correspondiente al Clado Críptico I (Clermont *et al.*, 2013). Esta clasificación permite diferenciar las cepas comensales de las cepas patógenas, por ejemplo, se ha relacionado que las cepas patógenas intestinales se incluyen en los grupos filogenéticos B2, D o en linajes no clasificados (Russo y Johnson, 2000).

3.2 *E. coli* comensal

Las cepas de *E. coli* comensal constituyen una gran parte de la microbiota intestinal de seres humanos, mamíferos y aves. Son cepas adaptadas a la coexistencia con su hospedador y no desarrollan sintomatología, excepto en casos donde exista inmunosupresión. Generalmente pertenecen a los grupos filogenéticos A y B1, los cuales se caracterizan por carecer de los factores de virulencia que están presentes en cepas patógenas (Russo y Johnson, 2000). Se ha encontrado que coloniza el tracto gastrointestinal de los recién nacidos dentro de sus primeras horas y permanece en el intestino grueso, especialmente ciego y colon durante toda la vida en simbiosis con su hospedero (Gyles y Fairbrother, 2009; Tenaillon *et al.*, 2010).

3.3 Principales patotipos patógenos en animales

3.3.1 STEC (EHEC)

Esta cepa se ha encontrado que provoca diarrea o colitis hemorrágica en humanos que pueden ser complicadas por secuelas sistémicas potencialmente mortales como el daño serológico (Nishikawa, 2011), donde los serogrupos involucrados en la inducción de estos padecimientos son principalmente: O157:H7 y O157: (Denamur, 2011; Mohawk y O'Brien, 2011). El serotipo de *E. coli* O157:H7 es uno de los más estudiados y se ha encontrado que se transporta geográficamente por medio de la fauna migratoria, ya que se ha aislado tanto en animales domésticos bovinos, ovinos, caprinos, cerdos, caballos, perros, venados, aves, conejos y ratas salvajes, así como en animales silvestres; los cuales funcionan como reservorios de infección, indicando que sirven como una fuente común de exposición o transmisión entre especies (Rice y Besser, 2003; Betancor *et al.*, 2007). La patogenicidad de estas cepas ha favorecido que exprese los genes de las toxinas Shiga (*stx1* y *stx2*) que se encuentran codificadas en el genoma de bacteriófagos; además poseen otros factores de virulencia adicionales, siendo el más importante una proteína denominada intimina que es responsable de la adhesión de las bacterias al epitelio intestinal y de la lesión de adhesión y borrado (attaching and effacing) (Denamur, 2011; Martínez, 2013).

3.3.2 EPEC

Estas cepas tienen la capacidad de destruir las microvellosidades del intestino y por presentar la adherencia íntima entre la bacteria y la célula hospedera, dicha característica la comparte con las cepas de STEC, esto debido a que las cepas EPEC son las precursoras de estas. Estas cepas se han clasificado en típicas y atípicas según la presencia o ausencia del plásmido de factor de adherencia (pEAF) el cual se encarga de codificar para el pili formador de agregados (bfp, bundle forming pillus), aquellas que contienen a pEAF se denominan típicas (tEPEC) y aquellas que carezcan de este son consideradas atípicas (aEPEC) (Croxen *et al.*, 2013). Además, presentan el factor de virulencia denominado islas de patogenicidad LEE (locus of enterocyte effacement) con los genes: *eae* y *tir* (translocated intimin receptor). El gen *eae* codifica para una proteína de la membrana externa

denominada intimina que es responsable de la adhesión de la bacteria con el enterocito (Fujioka *et al.*, 2009). Las aEPEC son encontradas con gran frecuencia en animales como perros, bovinos, conejos, primates, ovejas y seres humanos y las infecciones por esta variedad superan a las provocadas por las típicas que es causante de enfermedades infantiles diarreas leves y moderadas.

3.3.3 ETEC

Esta cepa es la causante de la “diarrea del viajero” donde el principal mecanismo de transmisión es por agua y alimentos contaminados. En animales esta cepa se ha visto que es la causante de diarrea en lechones y rumiantes, siendo letal en recién nacidos (Mazariego *et al.*, 2010). Los mecanismos de virulencia implicados en la patogenicidad de ETEC son: factores de colonización fimbriales que permiten que se adhiera al intestino delgado proximal y resista la acción del peristaltismo y producción de una o dos toxinas denominadas enterotoxinas LT (termolábil) y ST (termoestable); resultando en una disminución de la absorción de fluidos y electrolitos desde el lumen intestinal y causando una diarrea acuosa similar al cólera (Sherlock *et al.*, 2005; Hur *et al.*, 2011).

3.2.4 EAEC

Es considerada como la segunda causa de diarrea en humanos después de ETEC, se caracteriza por adherirse a las células Hep-2 en un patrón conocido como autoagregativo, en el cual las bacterias se adhieren entre sí, mediante la fimbria de adherencia agregativa AAFs (aggregative adherence fimbriae) codificada por genes que se encuentran en una familia de plásmidos de virulencias llamados pAA (Croxen y Finlay, 2010).

3.3.5 EIEC

Se encuentra relacionada genéticamente con *Shigella spp.* Por lo que sus características patogénicas son semejantes a ésta. Su patogénesis inicia en la mucosa colónica con el ingreso de la bacteria a la célula epitelial, lisis de la vacuola endocítica, multiplicación intracelular, movimiento direccional a través del citosol y extensión dentro de las células epiteliales adyacente y estos genes que son

necesarios para la invasividad de EIEC se encuentran en un plásmido (pInV) (Mainil y Daube, 2005).

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

- Determinar las características serológicas, filogenéticas, factores de virulencia y resistencia microbiana en aislamientos de *E. coli* de muestras rectales de mamíferos silvestres no nativos procedentes de una Unidad para la conservación, manejo y aprovechamiento sustentable de la vida silvestre en Aguascalientes, México.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar la resistencia y susceptibilidad mediante la concentración mínima inhibitoria (MIC) de las cepas aisladas.
- Identificar los serotipos (O y H) de las cepas aisladas.
- Determinar los grupos filogenéticos (A, B1, B2, D y F) mediante la identificación de los genes
- Identificar mediante PCR los genes de virulencia *eae*, *stx1*, *stx2*, *rfbE*_{O157}, *FliC*_{H7}, *bfp*, *lt* y *st*.

5. Metodología

El estudio se realizó en las UMAs Serengueti, Jocoque y San José de Gracia (Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre), destinados a la caza legal y sostenida dentro de la Zona Natural Protegida Sierra Fría, (se encuentra a 21° 52' 50" y 22 ° 19' 46" Norte y 102° 22' 50 " y 102° 51' 26" Oeste), y se extiende por más de 1.120 km², con una altitud que oscila entre los 1.800 y 3.050 m sobre el nivel del mar. Se obtuvieron 17 muestras rectales de mamíferos silvestres los cuales no presentaron signología sugerente a colibacilosis, las muestras fueron enviadas en medio AMIES con carbón activado a 4 °C, al laboratorio de Enfermedades de los pequeños rumiantes, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Para realizar el aislamiento de la bacteria, se sembró con la punta del hisopo en la parte superior de Mac Conkey, con un asa redonda se sembró por dilución mediante estrías, se incubaron a 37 °C, 18 a 24 h. Se

seleccionaron colonias sospechosas de *E. coli* lactosa positivas, para su identificación mediante tinción de Gram, las que salieron negativas se les realizó PCR de gad A la cual es una identificación confirmatoria de *E. coli*; las colonias positivas se sembraron en dos placas de agar Trypticase soya (TSA), el primer cultivo se utilizó para hacer las reacciones de PCR (factores de virulencia y grupos filogenéticos) y el segundo para almacenarlo a -80 °C en una suspensión de caldo infusión cerebro corazón-glicerol 50%. Los aislamientos fueron identificados por variedad de especies muestreadas se clasificaron según el tipo de alimentación que tenían, agrupándolas como mamífero rumiante y mamífero omnívoro.

5.2 Concentración mínima inhibitoria

Las cepas fueron sembradas en agar MacConkey e incubadas a 37°C durante 24 h y después se transportaron al laboratorio clínico del hospital “Dr. Manuel Gea González” donde se realizó la identificación y susceptibilidad a antibióticos utilizando el sistema automatizado MicroScan WalkAway 96 plus con los siguientes quimioterapéuticos: Amicacina, Ampicilina/Sulbactam, Piperacina/Tazobactam, Cefazolina, Ceftriaxona, Cefepima, Aztreonam, Ertapenem, Meropenem, Amicacina, Gentamicina, Tobramicina, Ciprofloxacino, Tigeciclina, Itofurantoir y Trimetoprim/Sulfametoxazol.

5.3 Serotipificación

Las colonias aisladas fueron sembradas en placas de medio Mac Conkey y fueron transportadas al Laboratorio de Serología de la Torre de Investigación de la Facultad de Medicina en Ciudad Universitaria (UNAM). Posteriormente, a partir de este medio, se seleccionó una colonia aislada y se sembró en tubos (13x 1000 mm) con agar tripticase soya en pico de flauta (tubo de trabajo) y se incubaron por 37 °C por 24 h. La obtención del antígeno somático (Ag O) se realizó sembrando la cepa a partir del tubo de trabajo en tubos (16 x 150 mm) con agar tripticase soya en pico de flauta y se incubaron 24 h a 37 °C. Posteriormente, se les agregó 10 ml de solución salina, dejando humedecer las colonias. Por agitación y con ayuda de un asa microbiológica estéril, se removió el crecimiento del tubo, diluyéndolo en solución salina, lo recolectado se puso en un tubo y se hirvieron a 110 °C por una hora con vapor fluyente. Una vez hervido y atemperado, a los tubos se les agregó

formalina para fijar el antígeno. Inicialmente se probaron los antígenos somáticos contra sueros de conejo específicos para los 174 antígenos de *E. coli*: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8a, 8b, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, Flexneri 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4a, 4b, 5a, 5b, 6, 1037, x, y; Boydii 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20; Sonnei 1, 2; 29733, 44037, 49766, 56836, 64474, 108308, 108414, 110538, 112198 y 117308.

Las cepas positivas a uno o varios antígenos fueron desafiadas con diluciones del mismo antígeno (dobles seriadas: 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400). Posteriormente, el título obtenido se comparó a los títulos obtenidos con antígenos de cepas de referencia y, de alcanzar un título semejante, se consideraban positivos. Tras este paso, se confirmaba cada antígeno positivo empleando sueros puros específicos (obtenidos por procesos de absorción con otros antígenos), empleando de igual forma diluciones (1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200). Del mismo modo, se comparaban los títulos de la cepa evaluada con los obtenidos con cepas de referencia para determinar o descartar su positividad.

Para los antígenos flagelares (Ag H) de *E. coli* fueron preparados inoculando, a partir del tubo de trabajo de TSA, medios semisólidos Colindale en tubos de 16 x 150 mm con una varilla de vidrio en su interior. Estos se sembraron por picadura con asa recta en el interior del tubo y se incubaron a 31°C por hasta 21 días, con revisiones periódicas. Aquellos cultivos que desarrollaron el flagelo fueron sacados de la incubación, resembrados en caldo biotriptasa e incubados a 31° C por 24 horas. Este caldo fue fijado con formalina y esta solución se empleó para evaluar los antígenos flagelares. Se empleó el mismo método que con los antígenos somáticos para comprobar la positividad a los antígenos flagelares (se usaron diluciones dobles seriadas con sueros iniciales y después se realizaron diluciones con sueros puros).

5.4 Determinación de grupos filogenéticos

La determinación del grupo filogenético se realizó mediante una PCR punto final descrita por Clermont *et al.* 2013. Se utilizaron tres genes (*chuA*, *yjaA*, y el fragmento

de ADN TspE.4C2 y ArpA 1) los aislados de *E. coli* se clasificaron en uno de los cuatro grupos filogenéticos: A, B1, B2, D y F. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: Desnaturalización inicial por 5 min a 95°C; 30 ciclos de 30 s a 95°C, 33 s a 58°C, y 30 s a 72°C; y una extensión final de 7 min a 72°C. A las reacciones de PCR se les realizó electroforesis en geles de agarosa al 2% y por último se tiñeron con bromuro de etidio. Los grupos filogenéticos fueron determinados en base a la presencia o ausencia de los genes.

5.5 Identificación de factores de virulencia

Los genes a identificados fueron; *eae*, *stx1*, *stx2*, *bfp*, *lt*, *st*, *rfbE*_{O157} y *fliC*_{H7}. Se realizaron reacciones de PCR múltiples donde se incluyeron los genes *eae*, *stx1*, *rfbE*_{O157}, *fliC*_{H7}, *lt* y *st*, *bfp* y para el gen *stx2* se realizó una reacción individual de PCR. Las condiciones para la PCR punto final para los genes *bfp* fue una desnaturalización inicial de 94°C durante 5 min, 30 ciclos a 94°C durante 1 min, 56°C a 2 min y 72°C a 1 min y una extensión final 72°C durante 7 min.

Las condiciones para la PCR punto final para los genes *lt* y *st* fue una desnaturalización inicial de 94°C durante 5 min, 35 ciclos a 94°C durante 1 min, 55°C a 1.30 min y 72°C a 1.30 min y una extensión final 72°C durante 7 min. Para el gen *stx2* fue una desnaturalización inicial de 94°C durante 5 min, 40 ciclos a 94°C durante 45 s, 58°C a 45 s y 72°C a 45 s y una extensión final 72°C durante 7 min.

Las condiciones para la PCR punto final para los genes *stx1* y *eae* fueron una desnaturalización inicial de 94°C durante 5 min, 30 ciclos a 94°C durante 30 s, 56°C a 30 s y 72°C a 45 s y una extensión final 72°C durante 7 min. Por último, para los genes *rfbE*_{O157} y *fliC*_{H7} las condiciones serán: desnaturalización inicial de 94°C durante 5 min, 30 ciclos a 94°C durante 30 s, 56°C a 30 s y 72°C a 45 s y una extensión final 72°C durante 7 min. A las reacciones de PCR se les realizaron electroforesis en geles de agarosa al 2% y se tiñeron con bromuro de etidio. Los cebadores utilizados en este estudio para las reacciones de PCR para la identificación de genes de virulencia y grupos filogenéticos se detallan en la tabla 1.

Tabla 1. Cebadores usados para identificar genes de virulencia y grupos filogenéticos.

Gen	Secuencia de oligonucleótidos (5'-3')	Producto	Referencia
Bfp	5'-CAA TGG TGC TTG CGC TTG CT-3' 5'-GCC GCT TTA TCC AAC CTG GT-3'	324 pb	(Tornieporth, <i>et al.</i> , 1995)
Eae	5'-GTG GCG AAT ACT GGC GAG ACT-3' 5'-CCC CAT TCT TTT TCA CCG TCG-3'	890 pb	(Debroy y Roberts, 2006)
Stx1	5'-ACA CTG GAT GAT CTC AGT GG-3' 5'-CTG AAT CCC CCT CCA TTA TG-3'	582 pb	(Debroy y Roberts, 2006)
Stx2	5'-GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC-3' 5'-TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G-3'	255 pb	(Debroy y Roberts, 2006)
rfbEO157	5'-AAC GGT TGC TCT TCA TTT AG-3' 5'-GAG ACC ATC CAA TAA GTG TG-3'	678 pb	(Debroy y Roberts, 2006)
fliCH7	5'-TAC CAC CAA ATC TAC TGC TG-3' 5'-TAC CAC CTT TAT CAT CCA CA-3'	560 pb	(Debroy y Roberts, 2006)
Lt	5'-GCG ACA AAT TAT ACC GTG CT-3' 5'-CCG AAT TCT GTT ATA TAT GT-3'	132 pb	(Tornieporth, <i>et al.</i> , 1995)
St	5'-CTG TAT TGT CTT TTT CAC CT-3' 5'-GCA CCC GGT ACA AGC AGG AT-3'	182 pb	(Tornieporth, <i>et al.</i> , 1995)
chuA	5'-ATG GTA CCG GAC GAA CCA AC-3' 5'-TGC CGC CAG TAC CAA AGA CA-3'	288 pb	Clermont <i>et al.</i> , 2013
yjaA	5'-CAA ACG TGA AGT GTC AGG AG-3' 5'-AAT GCG TTC CTC AAC CTG TG-3'	211 pb	Clermont <i>et al.</i> , 2013
TspE4C2	5'-CAC TAT TCG TAA GGT CAT CC-3' 5'-AGT TTA TCG CTG CGG GTC GC-3'	152 pb	Clermont <i>et al.</i> , 2013
arpA	5'-AAC GCT ATT CGC CAG CTT GC-3' 5'-TCT CCC CAT ACC GTA CGC TA-3'	400 pb	Clermont <i>et al.</i> , 2013

6. Actividades realizadas

Se realizó el muestreo a 17 animales mamíferos silvestres obteniendo muestras fecales las cuales fueron sembradas y aisladas en medio MacConkey en el laboratorio de Enfermedades de los pequeños rumiantes en el INIFAP, posteriormente se transportaron al laboratorio clínico del hospital "Dr. Manuel Gea González" donde se determinó su sensibilidad a antibacterianos. Posteriormente, se realizaron PCR punto final para la determinación de grupos filogenéticos y factores de virulencia.

7. Objetivos y metas alcanzados

Esta investigación pudo ampliar el conocimiento y la información acerca de la naturaleza de *E. coli* en 17 especies de animales mamíferos silvestres logrando determinar sus características serológicas, filogenéticas, factores de virulencia y resistencia microbiana.

8. Resultados

En la tabla 2 se detallan los resultados obtenidos de los mamíferos carnívoros y omnívoros. De las 17 muestras obtenidas, se encontró que de acuerdo a la serología, filogrupos y a los factores de virulencia en el grupo de mamíferos carnívoros el 73.3 % (11 muestras) corresponden al patotipo ETEC siendo las especies positivas: Caracal, Hiena marrón, Hiena moteada, Búfalo cafre, Jirafa, Addax, Gran kudú, Venado cola blanca, Berberisco, Cebra de grévy, Ciervo rojo; sólo una muestra corresponde al patotipo EIEC (Chita), y tres muestras no correspondieron a ningún patotipo, por lo que son consideradas *E. coli* comensales según su filogrupos, estas especies fueron Lycaon, Serval y Orix del cabo. En el grupo de mamíferos omnívoros las dos muestras correspondieron al patotipo ETEC, las especies fueron Orix cimitarra y Lemúr.

Tabla 2. Presencia de *E. coli*, serogrupo y patotipos (EIEC y ETEC) en muestras de hisopo colectados de animales silvestres

Nombre	Clasificación	Cepas	Serogrupo	Filogrupos	Factores de virulencia	Patotipo
Lycaon <i>Lycaon pictus</i>	Mamífero carnívoro	2	O135:H11	A	N	-
			Desconocido	A	Lt	-
Caracal <i>Caracal caracal</i>	Mamífero carnívoro	2	O7:H18	A	St	ETEC
			O84:H20	A	st, lt	ETEC
Hiena marrón <i>Hyaena brunnea</i>	Mamífero carnívoro	3	O102:H21	A	St	ETEC
			O:H9	Desconocido	N	-
			O135:H11	Desconocido	St	ETEC
Hiena moteada <i>Crocuta crocuta</i>	Mamífero carnívoro	5	O103:H21	Desconocido	St	ETEC
			O88:H21	Desconocido	N	ETEC
			O124:H21	Desconocido	N	ETEC
			Desconocido	Desconocido	N	-
Serval <i>Leptailurus serval</i>	Mamífero carnívoro	3	O12:H1	A	N	-
			O:H19	B1	N	-
			Desconocido	A	N	-
Chita		3	O124:H19	A	N	EIEC

<i>Acinonyx jubatus</i>	Mamífero carnívoro		O173:H49	A	N	EIEC
Búfalo cafre <i>Syncerus caffer</i>	Mamífero rumiante	1	O27:H18	A	st, stx2	ETEC
Jirafa <i>Giraffa camelopardalis</i>	Mamífero rumiante	3	O8:H8	A	N	ETEC
Addax <i>Addax nasomaculatus</i>	Mamífero rumiante	2	O4:H11	A	st, lt	ETEC
Gran kudú <i>Tragelaphus strepsiceros</i>	Mamífero rumiante	1	O:H18	A	Lt	ETEC
Venado de cola blanca <i>Odocoileus virginianus</i>	Mamífero rumiante	4	O27:H18	A	N	ETEC
			O8:H7	A	N	ETEC
Oryx del cabo <i>Oryx gazella</i>	Mamífero rumiante	2	O170:H8	A	N	-
			O135:H11	A	N	-
Berberisco <i>Ammotragus lervia</i>	Mamífero rumiante	3	O178:H19	A	N	ETEC
Cebra de grévy <i>Equus grevyi</i>	Mamífero rumiante	2	O124:H21	A	N	ETEC
Ciervo rojo <i>Cervus elaphus</i>	Mamífero rumiante	4	O15:H11	A	st, lt	ETEC
			O1:H21	A	Lt	-
			O1:H21	A	N	-
Orix cimitarra <i>Oryx dammah</i>	Mamífero omnívoro	1	O124:H21	A	st, lt	ETEC
Lémur <i>Lemur catta</i>	Mamífero omnívoro	3	O135:H11	Desconocido	N	-
			O8:H7	B1	N	ETEC
			O93:H16	Desconocido	Eae	-

*N (negativo)

En cuanto a la resistencia a antimicrobianos los resultados se observan en la tabla 3, donde el grupo de carnívoros tiene 8 muestras que presentaron una fuerte resistencia a antimicrobianos las cuales pertenecían a las especies Lycaon, Caracal, Hiena marrón, Hiena moteada, Jirafa, Gran kudú, Venado cola blanca, Ciervo rojo, principalmente a Ampicilina, Gentamicina y Trimetropin/Sulfametazol y 7 de las muestras de las especies de Serval, Chita, Búfalo cafre, Addax, Oryx del cabo, Berberisco y Cebra de grévy no presentaron ninguna resistencia. En cuanto al grupo de los omnívoros las muestras de las especies Orix cimitarra y Lémur tuvieron resistencia a Ampicilina, Ampicilina/sulbactam y Trimetropin/sulfametazol.

De acuerdo a estos resultados, las muestras con resistencia a antimicrobianos se pueden relacionar al patotipo al que pertenecen, encontrando que el 46.6 % de las especies pertenecientes al grupo de carnívoros (Caracal, Hiena marrón, Hiena moteada, Jirafa, Gran kudú, Venado cola blanca, Ciervo rojo) corresponden al patotipo ETEC y sólo una de las especies con resistencia (6.6 %) es de patotipo desconocido (Lycaon). En cuanto al grupo de omnívoros, el 100% de las muestras (Orix cimitarra y Lémur) pertenecen al patotipo ETEC.

Tabla 3. Resistencia a antibióticos y grupo filogenético de las cepas de *E. coli*.

Nombre	Cepas	Filogrupo	Resistencia a antibióticos
Lycaon	2	A	AMP y TMP/SMX
Caracal	2	A	AMP, AMP/SAM, CZO, CRO, GEN, CIP y TMP/SMX
Hiena marrón	3	A	TMP/SMX, AMP y GEN
Hiena moteada	5	Desconocido	AMP, GEN, CIP y TMP/SMX
Serval	3	A, B1	N
Chita	3	A	N
Búfalo cafre	1	A	N
Jirafa	3	A	TMP/SMX
Addax	2	A	N
Gran kudú	1	A	AMP, GEN, CIP y TMP/SMX
Venado de cola blanca	4	A	AMP
Oryx del cabo	2	A	N
Berberisco	3	A	N
Cebra de grévy	2	A	N
Ciervo rojo	4	A	AMP
Orix cimitarra	1	A	AMP

Lémur	3	B1	AMP y TMP/SMX
-------	---	----	---------------

*AMP (Ampicilina), TMP/SMX (Trimetoprim-sulfametoxazol), GEN (Gentamicina), CRO (Ceftriaxona), CIP (Ciprofloxacina), CZO (cefazolina) y SAM (Sulbactam). **N (Negativo).

9. Discusión

De acuerdo a los resultados obtenidos, las cepas de este estudio muestran serotipos, factores de virulencia y grupos filogenéticos que se han relacionado a los patotipos ETEC y EIEC. Aunque, el grupo filogenético al que pertenecen corresponde a cepas comensales de *E. coli*, estudios recientes de análisis epidemiológico y de secuencia del genoma sugieren que no existe una línea clara entre *E. coli* comensal y patógena, ya que, como grupo, comparten la mayoría de los factores de patogenicidad y pertenecen a los mismos patotipos y filogrupos, y son independientes del hospedador (Madoshi *et al.*, 2016). Por lo tanto, la patogenicidad de *E. coli* depende de la regulación y la interacción entre una serie de factores de virulencia, y se efectúa por las condiciones ambientales, dado que los animales muestreados no cuentan con un ambiente controlado (agua y alimentación) y ni manejo médico de no ser necesario, debido a esto, cualquier aislado de *E. coli* que presenten genes de virulencia o genes de resistencia antimicrobiana son potencialmente patógenos y dañinos para un huésped susceptible (Dehkordi *et al.*, 2014), esto debido a que cualquiera de estas cepas podría adquirir, expresar y posteriormente diseminar factores de virulencia, generándose así cepas patógenas. Este hecho se ha evidenciado al analizar cepas patógenas de origen animal y humano, encontrándose que, para aquellas que provocan enfermedades intractables, existe un perfil genético común y suelen estar filogenéticamente emparentadas, siendo imposible distinguir el origen humano o animal de las mismas (Clermont *et al.* 2013). Aunado a esto, los factores de virulencia de ETEC y EIEC se encuentran presentes en plásmidos, lo que facilita su diseminación en diferentes ecosistemas, incluyendo el humano (Guillén *et al.*, 2014). Además *E. coli* es un reservorio y transmisor de genes a otros miembros de la microbiota humana o animal.

Aunque hubo muestras que no correspondieron a algún patotipo, el grupo filogenético correspondía a cepas *E. coli* comensales por lo que hay una interacción

entre cepas *E. coli* comensales ETEC y *E. coli* comensales desconocidas lo que facilita la diseminación de genes de virulencia entre ellas.

En cuanto a la resistencia a antimicrobianos se encontró que en ambos grupos Carnívoros (47 %) y Omnívoros (100 %) presentan resistencia principalmente a Ampicilina, Gentamicina y Trimetropin/sulfametazol (tabla 3), dado que el filogrupo al que pertenecen estas muestras son comensales, ya que una alta densidad bacteriana junto con una reserva genética combinada con exposición a antibióticos es una explosiva combinación para la selección de resistencia a los antibióticos en la microbiota comensal (Tenailon *et al.*, 2010). Algunos estudios han documentado la prevalencia de bacterias multirresistentes asociadas a integrones, herramientas moleculares altamente eficientes utilizadas por las bacterias para la adquisición y expresión de resistencia microbiana en microbiota comensal (Caratolli, 2001).

10. Conclusión

Se analizaron las muestras de animales silvestres encontrando que, de acuerdo a su serotipo, genes de virulencia y filogrupos el 76.47 % corresponden al patotipo ETEC y el 5.88 % a EIEC, lo cual representa un factor de riesgo ya que, cualquiera de estas cepas podría adquirir, expresar y posteriormente diseminar factores de virulencia, generándose así cepas patógenas. Además, dichas cepas presentaron resistencia antimicrobiana las cuales son fácilmente transmisibles por plásmidos.

11. Recomendaciones

Debido a que se encontraron patotipos que son patógenos al ser humano y a otras especies y tienen resistencia a antimicrobianos, se recomienda que se generen medidas preventivas y de bioseguridad, para que estas cepas no lleguen a seres vivos susceptibles, así como ver qué mecanismos celulares evitan que se exprese la enfermedad en estos animales silvestres.

12. Bibliografía

- Betancor A., Rumi MV., Gentilini MV., Sardoy C., Irino K., Agostini A., Cataldi A. (2007). Shiga toxin-producing and attaching and effacing *Escherichia coli* in cats and dogs in a high hemolytic uremic syndrome incidence region in Argentina. *FEMS Microbiology Letters*. 267(2):251-256.
- Carattoli A. (2001). Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Veterinary Research*. 32:243-259.
- Carroll D., Wang J., Fanning S., McMahon BJ. (2015). Antimicrobial resistance in wildlife: implications for public health. *Zoonoses and Public Health*. 62 (7), 534-542.
- Clermont O., Christenson JK, Denamur E., Gordon DM. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports*; 5 (1):58-65.
- Croxen MA, Finay BB. (2010). Molecular mechanism of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*. 8:26-38.
- Croxen MA., Law RJ, Scholz R., Keeney KM., Wlodarska M., Finlay BB. (2013). Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia Coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 26; 4: 822-80.
- Debroy C. y Roberts E. (2006). Screening petting zoo animals for the presence of potentially pathogenic *Escherichia coli*. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*.
- Dehkordi FS., Yazdani F., Mozafari J., Valizade Y. (2014). Virulence factors, serogroups and antimicrobial resistance properties of *Escherichia coli* strains in fermented dairy products. *BMC Research Notes*.
- Denamur E. (2011). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 German outbreak: a lesson in genomic plasticity. *Clinical Microbiology and Infection*. 17(8):1124-1125.
- Fujioka M., Kasai K., Miura T., Sato T., Otomo Y. (2009). Rapid diagnostic method for the detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 62(6):476-480.
- Garza JA. (2015). Caracterización fenotípica y molecular de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. En tres etapas de la cadena productiva de carne de bovino. Tesis. UNAM.
- Gordon GM., 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.
- Guenther S., Grobbel M., Heidemanns K., Schlegel M., Ulrich RG, Ewers C., Wieler LH. (2010). First insights into antimicrobial resistance among faecal *Escherichia coli* isolates from small wild mammals in rural areas. *Science of the Total Environment*. 408(17), 3519-3522.
- Guillén L., Millán B. Araque M. (2014). Molecular characterization of *Escherichia coli* strains isolated from homemade dairy foods produced in Mérida, Venezuela. *Infectio*.
- Gyles CL. (2007). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *Journal of Animal Science*. (1 suppl): E45-E62.

- Gyles CL., Fairbrother JM. (2009). In Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. In: Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO, editors. *Escherichia coli*. 4th edition. Ames, Iowa, USA: Wiley-Blackwell.
- Gyles CL., Prescott JF, Songer G., Thoen CO. (2010). *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. 4a ed. EEUU: Wiley-Blackwell.
- Hur J., Lee KM., Lee JH. (2011). Age-dependent competition of porcine enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) with different fimbria genes - short communication. *Acta Veterinaria Hungarica*. 59(4):411-417.
- Madoshi B., Kudirkiene E., Madundo M., Amandus M., Athumani L., Olsen J. (2016). Characterisation of Commensal *Escherichia coli* isolated from apparently healthy cattle and their attendants in Tanzania. *PLoS ONE*. 11(12). E0168160.
- Mainil JG., Daube G. (2005). Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? *Journal of Applied Microbiology*. 98: 1332-1344.
- Martínez RI. (2013). Identificación de genes de virulencia en aislados de *Escherichia coli* de origen caprino. Tesis. UNAM.
- Mazariego K., Cruz A., Ledesma MA., Ochoa SA., Xicoténcatl J. (2010). Longus, a type IV pilus of enterotoxigenic *Escherichia coli*, is involved in adherence to intestinal epithelial cells. *Journal of Bacteriology*. 192(11):2791-2800.
- Mohawk KL, O'Brien AD. (2011). Mouse models of *Escherichia coli* O157:H7 infection and shiga toxin injection. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 258185.
- Nishikawa K. (2011). Recent progress of Shiga toxin neutralizer for treatment of infections by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis (Warsz)*, 59(4):239-247.
- Oliveira M., Viñas I., Usall J., Anguera M., Abadias M. (2012). Presence and survival of *Escherichia coli* o157:H7 on lettuce leaves and in soil treated with contaminated compost and irrigation water. *International Journal of Food Microbiology*. 156:133-140.
- Oludairo O., Kwaga J., Dzikwi A., Kabir J. (2016). Isolation and prevalence of *Escherichia coli* in wild animals at the National Zoological Garden Jos, Nigeria. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*.
- Rice DH., Besser TE. (2003). Faecal culture of wild animals for *Escherichia coli* O157:H7. *Veterinary Record*. 152 (3). 82-83.
- Russo TA., Johnson JR. (2000). Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *Journal of Infectious Diseases*. 181: 1753-1754.
- Scheutz F., Cheasty T., Woodward D., Smith HR. (2004). Designation of O174 and O175 to temporary O groups OX3 and OX7, and six new *E. coli* O groups that include Verocytotoxin-producing *E. coli*(VTEC): O176, O177, O178, O179, O180 and O181. *APMIS*, 112, 9: 569-584.

- Sherlock O., Vejborg RM., Klemm P. (2005). The TibA adhesin/invasin from enterotoxigenic *Escherichia coli* is self-recognizing and induces bacterial aggregation and biofilm formation. *Infection and Immunity*. 73(4):1954-1963.
- Souza V., Castillo A., Rocha M., Sandner L., Silva C., Eguiarte L. (2001). Ecología evolutiva de *Escherichia coli*. *Interciencia*. Vol. 26;10.
- Teinallon O., Skurnik D., Picard B., Denamur E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 207-2017.
- Tenailon O., Skurnik D., Picard D., Denamur E., (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews*. 8:207-217.
- Tornieporth N., John J., Salgado K., De Jesús P., Latham E., Melo MC., Gunzburg S., Riley L. (1995). Differentiation of pathogenic *Escherichia coli* strains in Brazilian Children by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*.
- Wang L., Rothmund D., Curd H., Reeves PR. (2003). Species-wide variation in the *Escherichia coli* Flagellin (H-Antigen) Gene. *Journal of Bacteriology*, 185; 9: 2936- 2943.