

00376

8
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

PLASMIDOS EN *Escherichia coli* Y SU IMPORTANCIA
EN LA EVOLUCION DE LA PATOGENESIS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS
(ECOLOGIA Y CIENCIAS AMBIENTALES)

P R E S E N T A:

MARTHA GRACIELA ROCHA MUNIVE

DIRECTORA DE TESIS: DRA. VALERIA FRANCISCA EUGENIA LEOPOLDINA
DE MARIA DE GUADALUPE SOUZA SALDIVAR

MEXICO, D. F.

1999

270324

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.



Con mucho cariño para José Luis, Martha,
José Antonio, Rafael y Laura Guadalupe...
...¡el mejor equipo!

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Evolución Molecular y Experimental del Instituto de Ecología de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Valeria Souza. Contó con el apoyo económico de los proyectos: DGAPA-UNAM IN208995 y 3675-N de CONACyT.

Agradezco adicionalmente a CONACyT por proporcionarme la ayuda económica para realizar los estudios de posgrado, por medio de una beca de maestría.

INDICE

Resumen.....	2
Introducción.....	3
Material y métodos.....	16
Resultados.....	18
Discusión y conclusiones generales.....	25
Referencias.....	31
Apéndice 1.....	35
Genetic structure of natural populations of <i>Escherichia coli</i> in wild hosts on different continents.	
Apéndice 2.....	53
The presence of the plasmidic genes <i>per</i> , <i>bfp</i> , and EAF as possible markers for the epidemiological survey of EPEC strains: a study of <i>Escherichia coli</i> from wild mammals and humans.	
Apéndice 3.....	61
Resultados del número y clasificación por tamaños de las bandas obtenidas.	
Agradecimientos.....	68

RESUMEN

En este estudio se analizaron los patrones plasmídicos de 347 cepas de *Escherichia coli* aisladas de diferentes hospederos, que incluían mamíferos silvestres y en cautiverio, así como cepas de humanos patógenas y no-patógenas. Se encontraron plásmidos en el 76.6% de las cepas. En promedio, las cepas asociadas a humanos presentan un mayor número de bandas que las asociadas a animales silvestres.

Se escogieron 142 cepas que presentaban plásmidos y se amplificaron por PCR tres regiones plasmídicas: los genes *per*, *bfp* y la sonda EAF, que se hayan involucradas en la lesión A/E (adherencia y esfacelamiento) que producen las cepas patógenas de tipo EPEC (*E. coli* enteropatógenas). La presencia de los tres genes en una misma cepa solo ocurrió en el 71% de las cepas EPEC. El gen *per* se encontró en el 100% de las EPEC y en el 86% de las EHEC (*E. coli* enterohemorrágicas). Ninguna de las cepas de animales silvestres, ni de otro tipo de patógenas o de humanos presentaron estos genes. Lo anterior sugiere que los genes analizados no se encuentran en la poza génica de *E. coli* en la naturaleza y que probablemente fueron adquiridos por transferencia horizontal, a partir de una bacteria diferente a *E. coli*.

ABSTRACT

In this study the plasmidic pattern of 347 strains of *Escherichia coli* isolated from different hosts was analyzed. The hosts included wild and captive mammals, as well as strains from humans, pathogenic and non-pathogenic. They were plasmids in 76.6% of the strains. On the average, the strains associated to humans present more bands than those associated to wild animals.

PCR amplification of three plasmidic genes involved in A/E lesions were performed in 142 strains of *E. coli* that carried plasmids: the genes *per*, *bfp* and the EAF probe. The three genes together were only amplified in 71% of EPEC (enteropathogenic *E. coli*). The gene *per* was prevalent in 100% of EPEC and 86% of EHEC (enterohemorrhagic *E. coli*). None of the strains from wild animals, neither the other human strains, presented these genes.

It was concluded therefore, that in the current description of enteropathogenic *E. coli*, the plasmidic genes that were studied are not part of the genetic background of *E. coli* found in the wild and that they were probably acquired by horizontal transfer, from a bacteria different to *E. coli*.

INTRODUCCIÓN

La bacteria *Escherichia coli* ha sido empleada de manera exitosa en infinidad de estudios genéticos y se considera un modelo o herramienta muy valiosa experimentalmente (Brock y Madigan, 1993). Sin embargo, además de las cepas con las que generalmente se trabaja (como las derivadas de la K12), existen otras cepas de *E. coli* responsables de un gran número de enfermedades clínicas, que ocasionan síntomas similares a los provocados por *Salmonella* o *Shigella*. Las infecciones más comunes ocurren en el tracto digestivo y urinario de humanos y otros mamíferos, donde producen diarrea o infecciones locales invasivas como cistitis, pielonefritis o prostatitis (Schaechter, 1992).

En el estudio de las bacterias patógenas, generalmente se emplea un enfoque médico o epidemiológico, aunque recientemente se ha profundizado más en el enfoque evolutivo, lo que permite comprender mejor la historia natural de la bacteria. Este enfoque ha ayudado a entender como la información genética de la bacteria, aunada a la interacción con su hospedero y a la intervención de elementos genéticos extracromosomales, han contribuido a la formación de los nuevos patógenos (Falkow, 1997).

Con el objetivo de explorar el posible papel de los elementos genéticos accesorios (particularmente los plásmidos), en la evolución de la patogénesis en *E. coli*, se pretende hacer un análisis descriptivo de los patrones plasmídicos en una amplia colección de *E. coli* y localizar en los plásmidos algunos de los genes responsables de la producción de caracteres patógenos.

La colección de cepas IECOL (Instituto de Ecología *E. coli*) es quizá la colección de *E. coli* más completa en el mundo (Souza *et al.*, enviado). Las bacterias que la forman, han sido aisladas de la mayoría de los órdenes de mamíferos que habitan en México y se han obtenido de diversas localidades. En muchos de los casos los hospederos se encuentran totalmente aislados del contacto humano, por lo cual, las poblaciones pueden mantener algunas de las características ancestrales de las bacterias, antes de verse sujetas a fuertes presiones de selección humana como el uso indiscriminado de los antibióticos.

Adicionalmente, al ser aisladas de hospederos diversos que representan hábitats diferentes que colonizar, éstas bacterias presentan una diversidad genética muy alta (Rocha, 1996), razón por la cual representan una poza génica muy amplia para explorar el posible origen de genes plasmídicos involucrados en la patogénesis.

Para tener un mejor entendimiento de la importancia de los elementos accesorios en el proceso de patogenicidad, es necesaria una descripción más detallada de ellos. Los plásmidos están formados generalmente por una doble hebra circular de ADN superenrollada, aunque también existen plásmidos lineales como los que se han observado en *Streptomyces* y *Borrelia burgdorferi*, o bien de ADN de una sola hebra como en algunas especies de *Myxococcus xanthus*. Los plásmidos se replican y mantienen de manera autónoma dentro de la bacteria. Existen plásmidos que se mantienen en un rango muy restringido de bacterias, pero hay otros llamados “promiscuos”, que poseen la habilidad de transmitirse y replicarse en diversas especies (Joset y Guespin-Michel, 1993; Summers, 1996).

Los plásmidos de *E. coli* fueron los primeros en describirse y son probablemente los mejor estudiados. Su tamaño es extremadamente variable, ya que va desde cientos de pares de bases hasta cientos de kilobases (Selander *et al.*, 1987). Debido a que en muchas ocasiones el plásmido tiene un origen diferente al de la bacteria hospedera, su contenido de G+C puede llegar a ser muy diferente al de ésta (Maloy *et al.* 1994).

La información que contienen los plásmidos también es variable, puede no ser esencial para la supervivencia del plásmido o de la bacteria, aunque puede conferir a la bacteria ventaja selectiva en ambientes desfavorables; también existen plásmidos con la información necesaria para que su propia diseminación sea mas exitosa. Sin embargo, en muchos casos, especialmente entre los plásmidos de las bacterias gram-positivas, aún no se han identificado las funciones de ellos. A estos plásmidos se les conoce como crípticos (Brock y Madigan, 1993).

Algunas de las funciones plasmídicas en las que se modifica la interacción de la bacteria hospedera con el medio, se pueden ver en la tabla 1 (Stanish, 1988; Joset y Guespin-Michel, 1993; Maloy *et al.* 1994; Summers, 1996).

Tabla 1.
Funciones codificadas en plásmidos

<p>I. Resistencias:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Antibióticos2. Metales pesados3. Aniones tóxicos4. Agentes intercalantes5. Daño a la radiación6. Bacteriófagos y bacteriocinas7. Sistemas de modificación-restricción especificados en plásmidos
<p>II. Propiedades metabólicas:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Producción de antibióticos y bacteriocinas (colicinas en bacterias coliformes)2. Metabolismo de carbohidratos simples y complejos3. Metabolismo de proteínas y opinas4. Fijación de nitrógeno (genes <i>Nif</i> en <i>Rhizobium</i>)5. Utilización de citrato6. Síntesis de tiamina (<i>Erwinia</i> y <i>Rhizobium</i>)7. Desnitrificación8. Producción de H₂S
<p>III. Cambios en la interacción bacteria-hospedero eucarionte:</p> <ol style="list-style-type: none">2. Diversos factores de virulencia como producción de toxinas, hemolisinas, proteínas de colonización, reguladores transcripcionales, etc.3. Producción de cápsula (<i>Bacillus</i>)4. Formación de tumores (<i>Agrobacterium</i>)5. Transporte de hierro6. Asociación con legumbres y nodulación en raíces (<i>Rhizobium</i>)
<p>IV. Otras propiedades:</p> <ol style="list-style-type: none">2. Formación de vacuolas de gas (<i>Halobacterium</i>)3. Sensibilidad a bacteriocinas (<i>Agrobacterium</i>)4. Variación en la morfología de colonias (<i>Mycobacterium</i>)5. Proteínas de la rizósfera (<i>R. leguminosarum</i>)6. Producción de cuerpos de inclusión (<i>Caedibacter</i>)7. Actividad endopeptidasa (<i>Staphylococcus</i>)8. Quimiotaxis (<i>Agrobacterium</i>)

Una de las primeras funciones plasmídicas descritas fue la transferencia de los plásmidos de una bacteria a otra, la cual realizan los llamados plásmidos conjugativos (Talaro y Talaro, 1999). Por medio de la conjugación, dichos plásmidos, que también se les conoce como factores de fertilidad (o plásmidos F), producen un pili que pone en contacto directo dos células; después de lo cual, los plásmidos se transfieren de una bacteria a otra que puede pertenecer a la misma especie o a otra diferente, siempre y cuando ésta no tenga una copia del mismo plásmido. El proceso de conjugación no está restringido solamente a los grupos de bacterias, ya que existen evidencias de conjugación entre bacterias y otros organismos como levaduras y plantas (Amábile-Cuevas y Chicurel 1992).

Adicionalmente a la conjugación, existen dos métodos de transferencia de información genética, la transformación y la transducción (Talaro y Talaro, 1999). La transformación es un método de transferencia "pasivo" en el que la bacteria toma y expresa ADN exógeno. En la transducción, el ADN es transferido de una bacteria a otra por medio de bacteriófagos, los cuales funcionan como vectores que llevan el ADN entre las diferentes cepas (Summers, 1996).

La transferencia horizontal, tiene repercusiones muy importantes en la biología de las bacterias e incluso de organismos eucariontes. Gracias a los mecanismos de transferencia horizontal, los organismos pueden adquirir características adicionales, incorporando material genético externo, el cual será después heredado a las siguientes generaciones (Maloy *et al.*, 1994).

En estudios previos se ha investigado la composición en número de plásmidos y la presencia de plásmidos de resistencia y colicinogénicos (productores de colicinas) en poblaciones naturales de *E. coli* (Maloy *et al.* 1994). Estas poblaciones de *E. coli* generalmente portan de uno a cinco plásmidos pequeños o dos grandes (Hartl y Dykhuizen, 1984). Boyd y colaboradores (1996) analizaron la estructura de los plásmidos F en la colección ECOR, ellos encontraron diferentes relaciones filogenéticas entre los plásmidos y las cepas bacterianas, lo que confirmó la alta frecuencia en que ha ocurrido la transferencia horizontal (Boyd *et al.*, 1996).

Existen trabajos en los que se han estudiado las cepas colectadas antes de la era de los antibióticos, tal como la colección Murray (Selander *et al.*, 1987). Dicha colección posee cepas únicas que se colectaron antes del uso indiscriminado de los antibióticos, y éstas cepas son muy diferentes a las cepas clínicas multirresistentes. En la era "pre-antibiótica", Hughes y Data (1983) reportaron la presencia de plásmidos crípticos, movilizables, colicinogénicos y uno que poseía resistencia al telurio, sin embargo, no encontraron ninguna resistencia a antibióticos. Jones y Stanley (1992) hicieron también una caracterización molecular de la poza génica de plásmidos presentes en *Salmonella* antes de la diseminación de los antibióticos. Encontraron genes involucrados en el mantenimiento y la transferencia de los plásmidos, en el rearrreglo y sistemas de adquisición de genes, sistemas de reparación de ADN, colicinas y virulencia.

El estudio de los procesos de transferencia horizontal de información genética ha aportado información muy útil para comprender la evolución de las bacterias patógenas. Muchos factores asociados a la patogénesis están codificados en plásmidos, y en repetidas ocasiones se encuentran adyacentes unos con otros, flanqueados por secuencias de inserción o elementos transponibles. La información más reciente sugiere que las bacterias patógenas han evolucionado adquiriendo bloques de información genética relativamente grandes que codifican para factores de virulencia, en lugar de una lenta evolución adaptativa de genes preexistentes (Finlay y Falkow, 1997). Muchos de los determinantes patógenos, al encontrarse en elementos móviles, pueden ser diseminados a otras bacterias por transferencia horizontal. Esta información se integra entonces en el cromosoma o en un plásmido estable, después de lo cual, una selección a favor de este nuevo gen asegura que se mantenga dentro del patógeno (Miller, 1998; Finlay y Falkow, 1997). En principio, estos determinantes de patogénesis, pueden ser transferidos a cualquier bacteria, especialmente a aquellas que se encuentran relacionadas genéticamente, como los miembros no patógenos de la misma especie o de alguna otra cercana. La importancia de la transferencia horizontal de genes ha sido notoriamente resaltada con la reciente dispersión de los genes de resistencia a antibióticos (Falkow, 1996).

Para poder estudiar la evolución de la patogénesis en *E. coli*, es necesario entender los diferentes mecanismos por los que esta bacteria puede actuar como patógeno dentro de un hospedero. Las cepas de *E. coli* que causan infecciones intestinales se dividen en cinco grupos principales de acuerdo al cuadro clínico que producen y a sus factores de virulencia (Levine, 1987):

1. Las cepas enterotoxigénicas (ETEC). Causan la "diarrea del viajero"; éstas bacterias se adquieren por agua o comida contaminada con materia fecal, y son capaces de colonizar el intestino delgado, donde producen toxinas del tipo LT (termolábiles) o ST (termoestables), que desencadenan la secreción del tejido (Levine, 1987; O'Brien y Holmes, 1996).
2. Las cepas enterohemorrágicas (EHEC). Causan la colitis hemorrágica, producen citotoxinas muy potentes, son capaces de destruir la membrana de los vasos sanguíneos y pueden causar la muerte. El serotipo O157:H7 ha sido responsable de varias epidemias a nivel mundial por contaminación de alimentos (Riley *et al.*, 1983; Levine, 1987).
3. Las cepas enteroinvasivas (EIEC). Ocupan selectivamente regiones del colon, para lo cual necesitan proteínas de membrana específicas. Causan daño celular y una respuesta inflamatoria intensa. Estas cepas están muy relacionadas con *Shigella*, tanto en su bioquímica, como en su genética y patogénesis (Levine, 1987; Nataro y Kaper, 1998).
4. Las cepas enteropatógenas (EPEC). Producen una lesión típica en el intestino de sus hospederos, que se conoce como adherencia y esfacelamiento ("attaching and effacing" o A/E). Debido a la importancia médica de esta enfermedad, se han determinado muchos de los mecanismos y los genes involucrados en la lesión A/E (Donnenberg y Kaper, 1992; Donnenberg *et al.*, 1997; Nataro y Kaper, 1998).
5. Las cepas enteroagregativas (EAEC). Producen una agregación característica en el intestino que se conoce como adherencia agregativa. Producen una secreción en la mucosa que atrapa a las bacterias en biofilms y que tiene un efecto citotóxico, lo cual desarrolla una diarrea mucosa (Nataro y Kaper, 1998).

Asimismo, se ha observado que cada una de las categorías anteriores, presentan serotipos específicos (tabla 2).

Tabla 2.
Serotipos característicos de las diferentes *E. coli* causantes de diarrea*

Categoría	Serogrupo	Antígeno H asociado
ETEC	O6	H16
	O8	H9
	O11	H27
	O15	H11
	O20	NM
	O25	H42, NM
	O27	H7
	O78	H11, H12
	O128	H7
	O148	H28
	O149	H10
	O159	H20
	O173	NM
	EHEC	O26
O55		H7
O111ab		H8, NM
O113		H21
O117		H14
O157		H7
EIEC	O28ac	NM
	O29	NM
	O112ac	NM
	O124	H30, NM
	O136	NM
	O143	NM
	O144	NM
	O152	NM
	O159	H2, NM
	O164	NM
O167	H4, H5, NM	
EPEC	O55	H6, NM
	O86	H34, NM
	O111	H2, H12, NM
	O119	H6, NM
	O125ac	H21
	O126	H27, NM
	O127	H6, NM
	O128	H2, H12
	O142	H6
EAEC	O3	H2
	O15	H18
	O44	H18
	O86	NM
	O77	H18
	O111	H21
	O127	H2
	O?*	H10

*Tomado de Nataro y Kaper, 1998. ** Antígeno O no tipificable por métodos convencionales.

Las cepas de tipo EPEC resultan particularmente interesantes para estudiar el problema de la evolución de la patogénesis, por la estrecha relación que se da con sus hospederos y por la presencia de una gran cantidad de genes (tanto cromosomales como plasmídicos) que se hallan involucrados (Donnenberg y Kaper, 1992; Donnenberg *et al.*, 1997). Donnenberg y Kaper (1992) propusieron un modelo de tres etapas en las que la bacteria coloniza a su hospedero y produce la lesión A/E de acuerdo a las observaciones que se tenían de cultivo de tejidos *in vitro* (figura 1). El proceso de patogenicidad según este modelo es el siguiente: las cepas EPEC en un principio forman microcolonias densas en la superficie del tejido epitelial del intestino en un patrón conocido como adherencia localizada (Cravioto, *et al.*, 1979). Esta adherencia a las células epiteliales depende de la formación de acumulaciones de filamentos (conocidas como "bundle forming pilus" o BFP) que crean una red de fibras que se enlazan juntas y se adhieren al enterocito (figura 1A). El gen *bfp* se encuentra en un plásmido de alrededor de 90 Kb, llamado plásmido EAF, que es muy importante para la virulencia de las EPEC (Girón *et al.*, 1991).

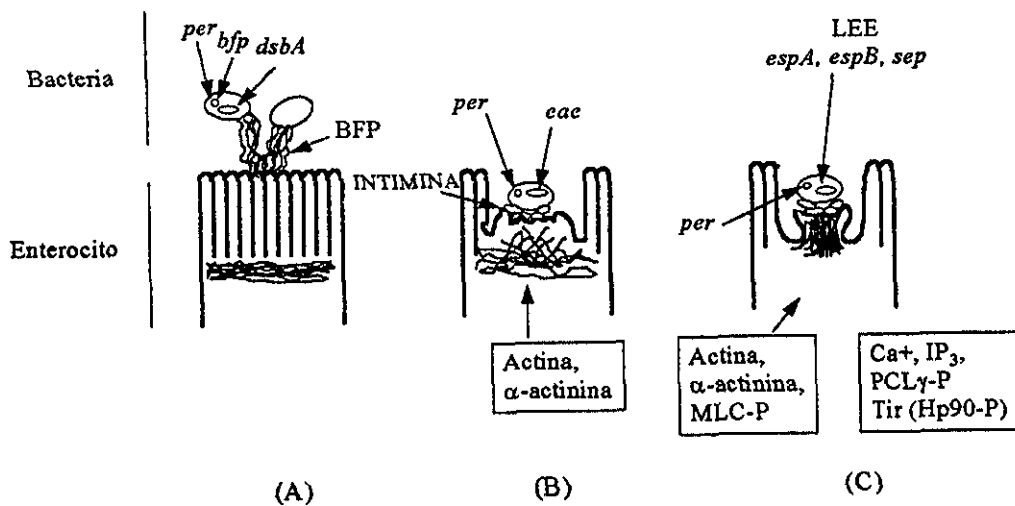


Figura 1. Modelo de tres etapas según Donnenberg y Kaper (1992). En la fase inicial ocurre una adherencia de la bacteria al enterocito por medio del pili BFP (A). En la segunda etapa la bacteria secreta proteínas que activan la transducción de señales y el rearreglo de las proteínas del citoesqueleto (B). En la fase final se da la adherencia íntima mediada por la proteína intimina (C).

El BFP es un miembro de la familia de fimbrias IV, que produce una lipoproteína de la membrana externa de la bacteria; los 14 genes que producen el pili se encuentran agrupados dentro de un operon (Ramer *et al.*, 1996; Soheli *et al.*, 1996; Stone *et al.*, 1996). Los pili de tipo IV son organelos de superficie que median la adherencia de muchos patógenos gram (-). Sin embargo, se sabe poco de su biogénesis y aún no se conocen todas las reacciones necesarias para su ensamble. Además del gen *bfp*, existe un gen llamado *dsbA* que produce una enzima periplasmática responsable de la formación de enlaces disulfuro de las subunidades *bpf* (Zhang y Donnenberg, 1996).

Cuando las EPEC se unen a las células epiteliales, activan señales en las células del huésped (figura 1B, 1C). Existen al menos dos moléculas mensajeras secundarias: el trifosfato de inositol (IP_3) y el Ca^{2+} , que se liberan poco después de que las EPEC han interactuado con las células del hospedero, probablemente debido a la activación de la fosfolipasa C del hospedero (Kenny y Finlay, 1997). Las EPEC, también inducen la fosforilación de la cadena ligera de miosina y la fosforilación de la tirosina en una proteína de la bacteria llamada Tir (“translocated intimin receptor”, conocida anteriormente como Hp90) que actúa como receptor de la intimina y otras dos proteínas de menor tamaño necesarias para la adherencia mas estrecha (Kenny *et al.*, 1997).

Después se produce la lesión de A/E, en la que ocurren rearrreglos del citoesqueleto y la transformación de los enterocitos para formar estructuras en forma de pedestal (figura 1C). En estas estructuras se da la adhesión íntima de las bacterias. En este proceso están involucradas proteínas de secreción y un sistema secretor de tipo III que inducen a la transducción de señales en las células epiteliales (Jarvis *et al.*, 1995; Kenny y Finlay, 1995; Donnenberg *et al.*, 1997; Kenny y Finlay, 1997).

Los genes cromosomales necesarios para la lesión A/E se encuentran en una isla de patogenicidad de 35,480 pb llamada “locus para el esfacelamiento del enterocito” (LEE, del inglés “locus of enterocyte effacement”).

El término de isla de patogenicidad se acuñó debido al hecho de que en un gran número de casos, los genes de virulencia en bacterias, se encuentran en grandes bloques contiguos de ADN insertados en el cromosoma (Knapp *et al.*,

1986). Con la observación de que muchos patógenos comparten la presencia de estos bloques, su descubrimiento ha permitido explicar el mayor mecanismo evolutivo por el cual se dio el origen de la patogénesis. Algunos ejemplos de estas son los genes para producción de hemolisina en UTI ("urinary tract infections"), los genes para la lesión A/E en EPEC, sistemas secretores en *S. typhimurium*, reguladores transcripcionales en *Helicobacter pylori*, o toxinas en *Clostridium difficile* (Finlay y Falkow, 1997). Estas secuencias generalmente se encuentran flanqueadas por secuencias de inserción o transposones que sugieren que se adquirieron por recombinación, y además se insertan en el cromosoma en lo que se han llamado "hot spots", que son regiones del cromosoma más susceptibles a inserciones o a unión de fagos. Tal es el caso de las EPEC y UTI, en que se han insertado en el mismo sitio del genoma (minuto 82), adyacentes al gen *selC* (que codifica para el tRNA de la selenocisteína) (Blum *et al.*, 1994; McDaniel *et al.*, 1995). Sin embargo, ambos patógenos tienen productos muy diferentes y las secuencias de ambas islas no son homólogas (Donnenberg *et al.*, 1997).

El contenido de G+C del locus LEE es de 38.4%, que es mucho menor a la composición normal en *E. coli* (50-51%), lo que sugiere que este locus proviene de una fuente externa (McDaniel *et al.*, 1995).

En el modelo de patogénesis de las EPEC, en la última fase ocurre la adhesión más estrecha que está mediada por la intimina (otro producto del locus LEE). La expresión de estos genes está regulada por el producto del gen plasmídico llamado *per* (plasmid-encoded regulator) que aumenta la expresión del gen de la intimina, así como de otros genes cromosomales y plasmídicos, este gen se encuentra también en el plásmido EAF (Gómez-Duarte y Kaper, 1995; Tobe *et al.*, 1996).

Hicks y colaboradores (1998) utilizando como modelo experimental la técnica de cultivo de órganos *in vitro* con células del tejido intestinal, observaron que las EPEC interactúan de manera diferente con estas células y propusieron una modificación al modelo de Donnenberg y Kaper, en el que ocurren cuatro etapas (figura 2).

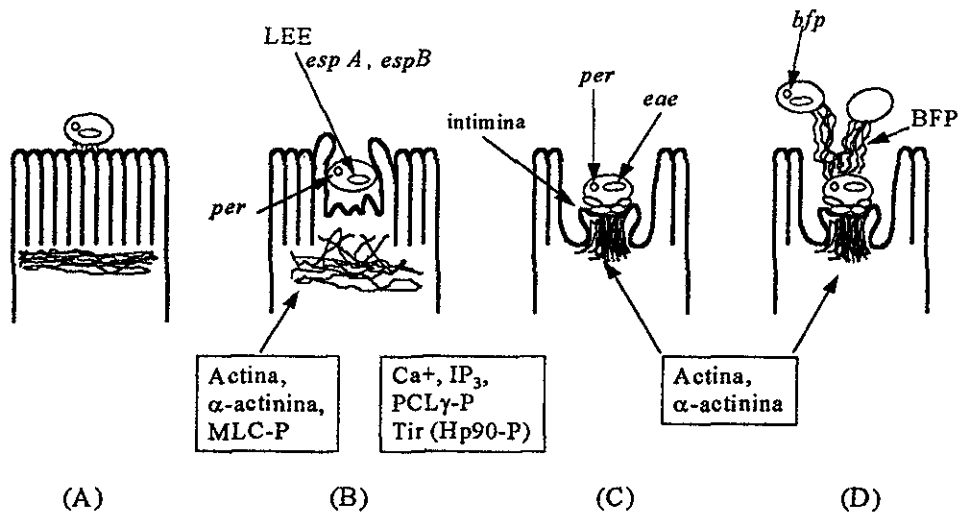


Figura 2. Modificación al modelo de Donneberg y Kaper, según Hicks *et al.* (1998). Las fases son las siguientes: adhesión inicial mediada por una fimbria diferente al BFP (A), transducción de señales y rearrreglos del citoesqueleto (B), adhesión íntima bacteria-enterocito mediada por la intimina (C) y finalmente, la adhesión bacteria-bacteria mediada por BFP para dar el patrón de adherencia en microcolonias (D).

Anteriormente se había observado que las cepas que producen intimina son capaces de formar la lesión A/E aunque carezcan del plásmido EAF y por tanto, del gen *bfp* (Knutton *et al.*, 1987). Lo anterior sugería que el papel del gen *bfp* podría ser más importante en etapas posteriores a la inicial. Hicks y colaboradores demostraron que las cepas que carecían del gen de la intimina no formaban la lesión aunque poseyeran el *bfp*. De tal manera que se replanteó el papel del *bfp*, y se propuso que éste es necesario para la agrupación tridimensional de las bacterias en la formación de microcolonias, ya que los pili BFP intervienen en la unión de las propias bacterias, la cual ocurre después de la adhesión íntima a las células del intestino (Figura 2D). Por otro lado, la adhesión inicial está dada por adhesinas diferentes al BFP (Figura 2A) (Hicks *et al.*, 1998).

El conocer los mecanismos involucrados en las patogénesis de las EPEC, ha ayudado a entender la manera en que evolucionan las bacterias al convertirse en patógenas. Al comparar diferentes bacterias cuyos genes involucrados en la patogénesis están bien caracterizados (como en el caso de las EPEC), es muy notable el hecho de que existe un número reducido de estrategias que siguen las bacterias patógenas. Cada vez se conocen nuevos determinantes de patogenicidad con mecanismos similares que son compartidos en especies de bacterias diferentes (Finlay y Falkow, 1997). Por lo anterior, resulta de gran importancia el comprender cuales son los factores que producen que un microorganismo se convierta en patógeno y cause una infección, de manera que se puedan diseñar estrategias de control de los mismos y que se conozca la parte de la bacteria o del proceso infeccioso que es mas susceptible de ser atacado (Falkow, 1997).

Usando un modelo experimental en conejos (con la cepa RDEC-1 que es muy similar a las EPEC en humanos), Sjogren y colaboradores (1994) demostraron el papel que pudo haber desempeñado la transferencia horizontal en el desarrollo de las cepas de tipo EHEC. Al introducir por medio de un bacteriófago una toxina del tipo Shiga a la cepa RDEC-1, los conejos en lugar de presentar la diarrea típica causada por la RDEC-1, presentaron un cuadro clínico muy similar al producido por las EHEC.

De entre los factores que se han descrito para el caso particular de las cepas EPEC, se ha observado que los plásmidos son cruciales para su patogénesis (Donnenberg y Kaper, 1992; Donnenberg *et al.*, 1997). Además de este grupo de cepas patógenas de *E. coli*, en los otros tipos (ETEC, EIEC, EHEC) existen genes plasmídicos responsables de la producción de enterotoxinas, pili y adhesinas que les confieren propiedades virulentas (Millon, 1993). En otras enterobacterias causantes de diarrea también se ha demostrado que los plásmidos se encuentran entre los principales determinantes de la patogenicidad, aunque aún es necesario conocer el origen y la dispersión de estos en los diferentes linajes (Falkow, 1996). El plásmido EAF (figura 3), porta varios de los genes indispensables para la patogénesis de las EPEC y se encuentra bien caracterizado (Girón *et al.*, 1991; Franke *et al.*, 1994; Gómez-Duarte y Kaper, 1995).

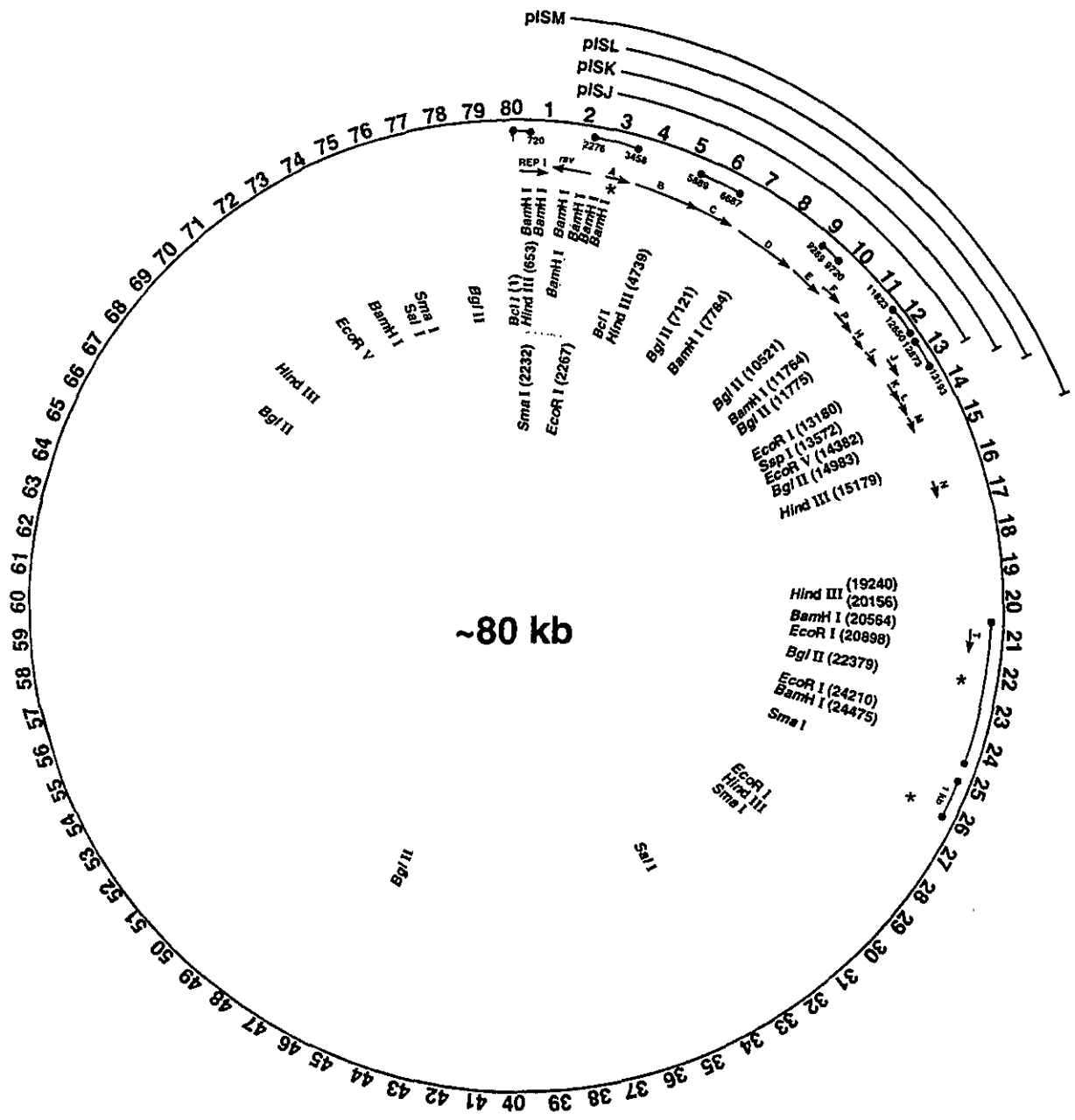


Figura 3. Mapa genético del plásmido EAF (tomado de Soheli *et al.* 1996). El símbolo * aparece en las regiones amplificadas en este estudio.

MATERIAL Y MÉTODOS

I. Análisis de los patrones plasmídicos

Se analizaron los patrones plasmídicos de 347 cepas de *E. coli* aisladas de diferentes mamíferos y de humanos (patógenas y no-patógenas), así como del ambiente secundario de la bacteria (aire, desagüe y lodos) (tabla 3). El procedimiento de extracción utilizado para obtener los patrones plasmídicos de las cepas, se encuentra explicado en la sección de metodología del Apéndice I.

Tabla 3.
Cepas de *E. coli* analizadas

Número de cepas	Hospedero	Nombre común	Orden	Tipo de ambiente o de patógeno
2	<i>Bos taurus</i>	Vaca	Artiodactyla	Amb. primario
2	<i>Ovis aries</i>	Borrego	Artiodactyla	Amb. primario
1	<i>Odocoileus virginianus</i>	Venado cola blanca	Artiodactyla	Amb. primario
2	<i>Tayassu tajacu</i>	Pecarí	Artiodactyla	Amb. primario
3	<i>Canis familiaris</i>	Perro	Carnivora	Amb. primario
5	<i>Canis latrans</i>	Coyote	Carnivora	Amb. primario
4	<i>Urocyon cinereoargenteus</i>	Zorro gris	Carnivora	Amb. primario
3	<i>Felis catus</i>	Gato	Carnivora	Amb. primario
1	<i>Felis concolor</i>	Puma	Carnivora	Amb. primario
4	<i>Panthera onca</i>	Jaguar	Carnivora	Amb. primario
2	<i>Lutra longicaudis</i>	Nutria de río	Carnivora	Amb. primario
3	<i>Procyon lotor</i>	Mapache	Carnivora	Amb. primario
2	<i>Nasua narica</i>	Coati	Carnivora	Amb. primario
3	<i>Balaenoptera physalus</i>	Ballena	Cetacea	Amb. primario
3	<i>Tursiops truncatus</i>	Delfín común	Cetacea	Amb. primario
3	<i>Tadarida brasiliensis</i>	Murciélago	Chiroptera	Amb. primario
3	<i>Carollia brevicauda</i>	Murciélago	Chiroptera	Amb. primario
2	<i>Desmodus rotundus</i>	Vampiro	Chiroptera	Amb. primario
3	<i>Leptonycteris nivalis</i>	Murciélago de Saussure	Chiroptera	Amb. primario
1	<i>Antrozous pallidus</i>	Murciélago	Chiroptera	Amb. primario
1	<i>Myotis velifer</i>	Murciélago	Chiroptera	Amb. primario
3	<i>Sylvilagus sp</i>	Conejo cola de algodón	Lagomorpha	Amb. primario
3	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Conejo europeo	Lagomorpha	Amb. primario
3	<i>Romerolagus diazi</i>	Teporingo	Lagomorpha	Amb. primario
1	<i>Philander opossum</i>	Tlacuachín de cuatro ojos	Didelphimorphia	Amb. primario
1	<i>Didelphis virginiana</i>	Tlacuache	Didelphimorphia	Amb. primario
3	<i>Equus caballus</i>	Caballo	Perissodactyla	Amb. primario
1	<i>Tapirus bairdii</i>	Tapir	Perissodactyla	Amb. primario

Tabla 3.
(Continuación)

Número de cepas	Hospedero	Nombre común	Orden	Tipo de ambiente o de patógeno
2	<i>Tapirus terrestris</i>	Tapir	Perissodactyla	Amb. primario
1	<i>Alouatta pigra</i>	Mono aullador	Primates	Amb. primario
1	<i>Alouatta palliata</i>	Mono aullador	Primates	Amb. primario
3	<i>Dipodomys merriami</i>	Rata canguro	Rodentia	Amb. primario
3	<i>Liomys pictus</i>	Ratón	Rodentia	Amb. primario
2	<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i>	Capybara	Rodentia	Amb. primario
1	<i>Baiomys musculus</i>	Ratón pigmeo	Rodentia	Amb. primario
2	<i>Habromys</i>	Ratón	Rodentia	Amb. primario
1	<i>Nyctomys sp</i>	Rata	Rodentia	Amb. primario
3	<i>Oryzomys</i>	Rata	Rodentia	Amb. primario
1	<i>Peromyscus boylii</i>	Ratón	Rodentia	Amb. primario
1	<i>Peromyscus megalops</i>	Ratón	Rodentia	Amb. primario
1	<i>Peromyscus perfulvus</i>	Ratón	Rodentia	Amb. primario
2	<i>Sigmodon mascotensis</i>	Rata	Rodentia	Amb. primario
2	<i>Trichechus manatus</i>	Manatí	Sirenia	Amb. primario
2	<i>Dasypus sp.</i>	Armadillo	Xenarthra	Amb. primario
2	<i>Tamandua mexicana</i>	Hormiguero	Xenarthra	Amb. primario
25	<i>Homo sapiens</i>	Humano	Hominidae	No-patógenas
83	<i>Homo sapiens</i>	Humano	Hominidae	Agregativas, EPEC, EHEC, UTI, EHEC, ETEC.
78	Ambiente secundario	-----	-----	Aire, desagüe, lodos

Una vez extraídos los plásmidos, se hizo una clasificación de las bandas observadas de acuerdo a su tamaño (Apéndice 3). Los datos del número de bandas se agruparon con tres criterios diferentes: el contacto con humanos, la dieta y el orden del hospedero. Para cada tratamiento se calculó la media, desviación estándar, error estándar y se realizó un prueba de Wilcoxon/Kruskal-Wallis para determinar si las diferencias entre tratamientos eran significativas.

II. Amplificación de genes patógenos

Una vez identificadas las cepas que poseían plásmidos, se seleccionaron tres genes plasmídicos involucrados en la lesión A/E de las cepas EPEC: los genes *per*, y *bfpA* y la sonda EAF (figura 3). Estos genes se amplificaron por PCR en 142 cepas con plásmidos. Los oligos fueron diseñados con el programa Primer 3 (Rozen y Skaletsky, 1996) y las condiciones del PCR se explican en el apéndice 2.

RESULTADOS

I. Análisis de los patrones plasmídicos

Los resultados obtenidos del número de bandas observadas, forman parte de una descripción más amplia de la estructura genética de *E. coli* para la colección IECOL, por lo cual, forman parte de la publicación que se anexa en el apéndice 1.

El número de bandas observadas y su tamaño aproximado, así como algunas de las características de las cepas empleadas (orden y dieta del hospedero) se pueden observar en el apéndice 3. En esta descripción de resultados se aumenta una columna llamada "contacto humano"; ésta se refiere a que tan cerca se encontraban las cepas muestreadas de las poblaciones humanas.

El resultado mas notable, fue la presencia de plásmidos en la mayoría de las cepas (el 76.6%). El intervalo de tamaños de las bandas fue muy variable: mientras que las bandas más pequeñas midieron menos de 5 Kpb, las mayores eran de hasta cientos de kilobases (ver apéndice 3). La distribución del número de bandas en todas las cepas se ajusta a una distribución de poisson ($\chi^2=81$ $p<0.001$) (figura 4). En la figura se puede observar que hay más cepas sin ningún plásmido, de las esperadas con una distribución al azar, es decir, que existen muchas cepas que han perdido sus plásmidos.

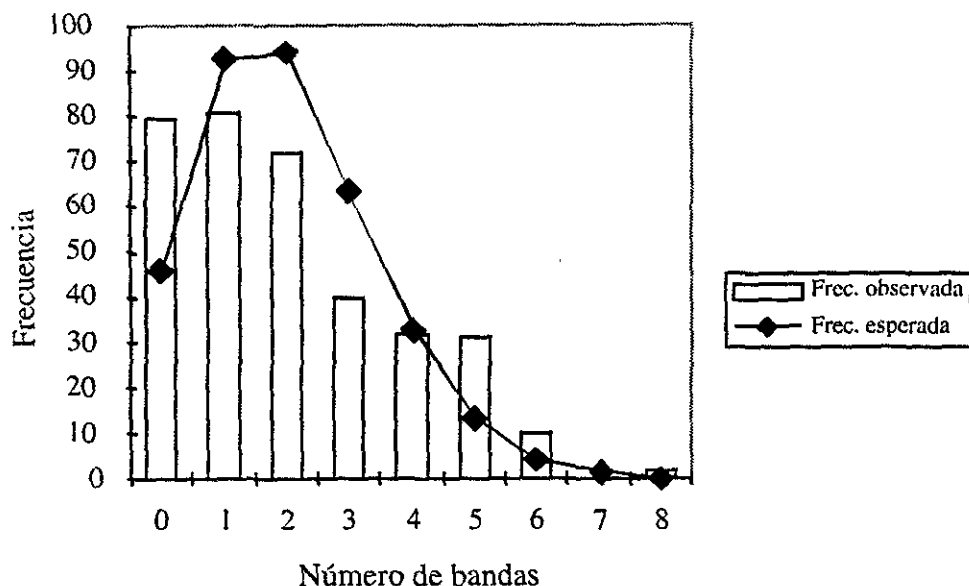


Figura 4. Frecuencias observadas del número de bandas por cepa y frecuencias esperadas en una distribución de Poisson.

Los diferentes tratamientos: contacto con humanos, dieta y orden del hospedero, se analizaron de manera independiente. Para el caso del contacto con humanos, los resultados pueden observarse en la tabla 4 y la figura 5. Como se puede ver, hay una tendencia a presentar un mayor número de bandas en las cepas asociadas a humanos que en el resto de las cepas; por otra parte, las cepas asociadas a animales silvestres, que están aisladas geográficamente de las poblaciones humanas, presentan un menor número de bandas.

Tabla 4. Estadística del número de bandas por contacto humano

Contacto	n	Media	Desv. Est.	Error est.	χ^2	p
0-silvestre	89	1.202	1.198	0.127		
1-sitio cercano a humanos	16	1.687	1.740	0.435		
2-semicautiverio,	14	1.714	1.489	0.398		
3-cautiverio	26	2.192	1.939	0.380		
4-humanas	202	2.410	1.856	0.130		
					28.98	0.0000

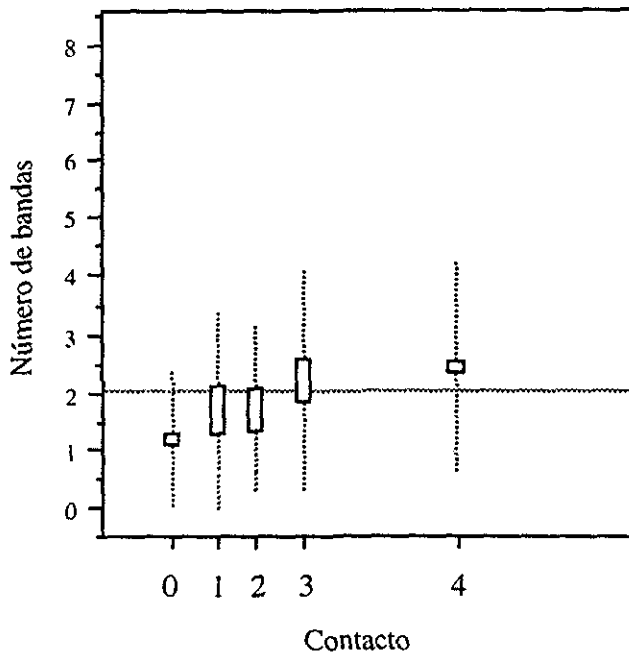


Figura 5. Número promedio de bandas para los diferentes contactos con humanos. En los cuadros se incluyen los errores estándar y con líneas punteadas la desviación estándar.

En el caso de las diferentes dietas hay un mayor número de bandas en las cepas aisladas de carnívoros, frugívoros y piscívoros que en el resto de los tratamientos, por otra parte, las cepas asociadas a omnívoros presentan un menor número de bandas (tabla 5, figura 6).

Tabla 5. Estadística del número de bandas por dieta

Dieta	n	Media	Desv. Est.	Error est.	χ^2	p
1-Omnívoro	249	1.690	1.525	0.096		
2-Herbívoro	48	2.729	2.049	0.295		
3-Carnívoro	6	4.000	1.264	0.516		
4-granívoro	23	2.608	2.083	0.434		
5-Insectívoro	7	2.428	2.370	0.895		
6-Frugívoro	3	4.000	1.732	1.000		
7-Piscívoro	6	4.000	2.529	1.032		
8-Hematófago	2	3.000	1.414	1.000		
9-Nectarívoro	3	2.333	2.081	1.201		
					30.72	0.0002

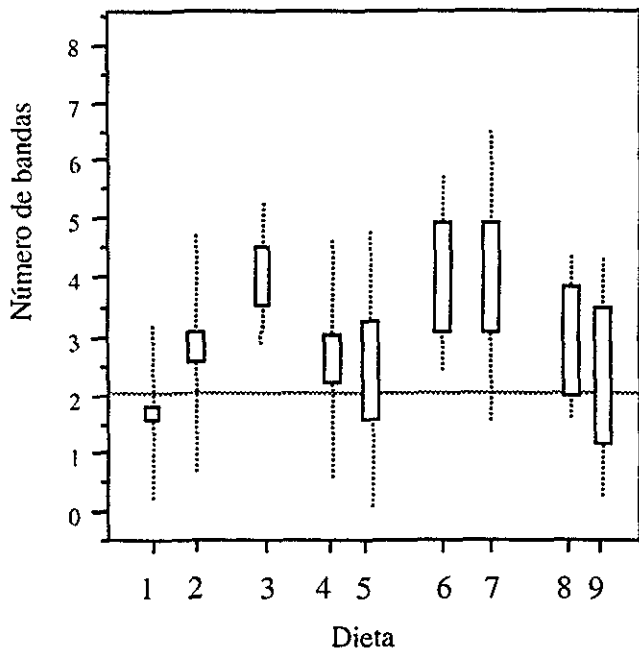


Figura 6. Número promedio de bandas para las diferentes dietas. En los cuadros se incluyen los errores estándar y con líneas punteadas la desviación estándar.

Finalmente, para el caso de los diferentes órdenes, se observa un mayor número de bandas en roedores, perisodáctilos y sirenios, mientras que los cetáceos tienen un número menor de bandas. (tabla 6, figura 7).

Tabla 6. Estadística del número de bandas por orden

Orden	n	Media	Desv. Est.	Error est.	χ^2	p
1-Marsupiales	7	0.857	0.899	0.340		
2-Chiroptera	13	1.538	1.898	0.526		
3-Primates	8	1.375	1.302	0.460		
4-Xenartra	6	1.500	0.836	0.341		
5-Lagomorpha	9	1.333	1.500	0.500		
6-Rodentia	235	2.263	1.804	0.117		
7-Cetacea	3	0.000	0.00	0.000		
8-Carnivora	35	1.771	1.681	0.284		
9-Sirenia	2	3.000	0.000	0.000		
10-Artiodactyla	19	1.105	1.523	0.349		
11-Perissodactyla	10	2.300	1.888	0.597		
					26.11	0.003

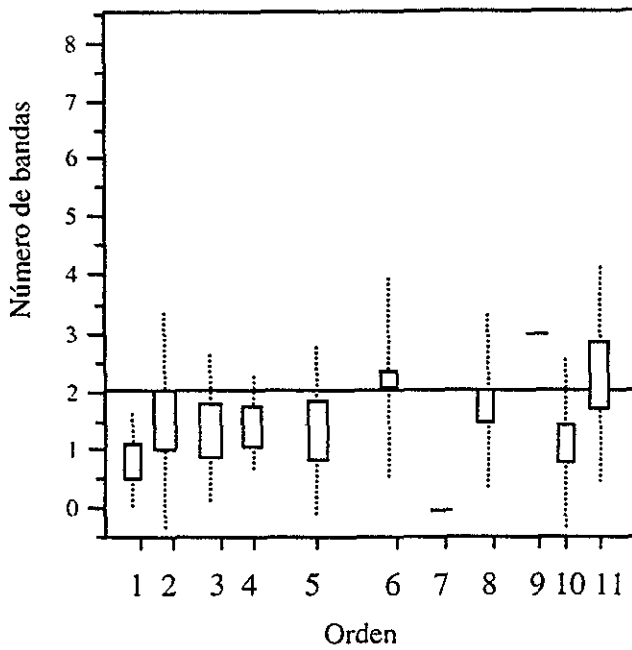


Figura 7. Número promedio de bandas para los diferentes órdenes. En los cuadros se incluyen los errores estándar y con líneas punteadas la desviación estándar.

Los resultados anteriores demuestran que los tres tratamientos influyen en la distribución del número de bandas. Sin embargo, al analizar los tres juntos, se observó que la mayor influencia en el número de bandas se da según la cercanía que se tiene a hospederos humanos (tabla 7).

Tabla 7. Efecto de los diferentes tratamientos en la distribución de las bandas

Tratamiento	Número de parámetros	χ^2	p
Contacto	4	16.00	0.003
Dieta	8	11.93	0.154
Orden	10	11.94	0.289

II. Amplificación de genes patógenos

En cuanto a los genes amplificados por PCR (tabla 8), éstos se lograron amplificar solamente en las cepas de tipo EPEC y en algunas EHEC, obteniéndose productos de tamaño variable (ver apéndice 2).

Tabla 8.
Productos de PCR amplificados

Región amplificada	Tamaño del fragmento	Ubicación aproximada en el plásmido EAF (min)
EAF	397pb	25
<i>perC</i> y <i>D</i>	734pb	22
<i>bfpA</i>	1152pb	3

Debido a que éstos genes se amplificaron únicamente en cepas humanas, en la tabla 9 se muestran los resultados para éstas cepas (apéndice 2).

Tabla 9.
Resultados del PCR para cepas aisladas de humanos

Tipo de cepa	Número de cepas	Negativo para los tres genes	Positivo para los tres genes	Positivo para <i>per</i> y EAF	Positivo para <i>per</i> y <i>bfp</i> .	Positivo solo para <i>per</i>
EPEC	14	0	9	1	2	2
EHEC	14	3	0	4	2	5
EIEC	2	2	0	0	0	0
ETEC	3	3	0	0	0	0
UTI	4	4	0	0	0	0
No-patógenas	7	7	0	0	0	0

Los tres fragmentos juntos, se amplificaron exclusivamente en 71% (9 cepas) de las EPEC, y sólo el gen *per* fue amplificado en todas las EPEC. Aunque el 86% (11 cepas) de las cepas de tipo EHEC, presentaron al menos uno de los fragmentos, ninguna de ellas presentó los tres fragmentos juntos. Todas las cepas de animales silvestres y de otros tipos de patógenos humanos dieron resultados negativos para los tres genes.

Si se calculan las frecuencias observadas de los genes patógenos en todas las cepas, así como las frecuencias esperadas (tabla 10), se puede observar que la amplificación de los genes aislados ocurre en mucho menor frecuencia de la esperada, mientras que los casos en que los genes se amplifican juntos están en mayor frecuencia de la esperada, a excepción de la pareja EAF-*bfp*, que no ocurrió en ningún caso.

Tabla 10.
Frecuencias de los genes amplificados

Genes amplificados	Frecuencia observada	Frecuencia esperada
Solo <i>per</i>	7	20.44
Solo <i>bfp</i>	0	9.65
Solo EAF	0	10.46
<i>per</i> y <i>bfp</i>	4	2.07
<i>per</i> y EAF	5	2.24
EAF y <i>bfp</i>	0	1.06
<i>per</i> , <i>bfp</i> y EAF	9	0.227
Ninguno de los tres	117	95.72

DISCUSION Y CONCLUSIONES GENERALES

A pesar del amplio conocimiento que hasta ahora se ha acumulado, aún permanecen muchas preguntas sin contestar en lo que concierne a la historia natural y la evolución de *E. coli*. Se podría esperar que, así como esta bacteria ha servido de modelo en los estudios de biología molecular, en un momento dado, llegue también a ser un modelo que nos permita entender la evolución y ecología de otras bacterias. Adicionalmente *E. coli* puede ayudar a comprender un proceso de gran importancia biológica y médica: la evolución de la patogénesis y la evolución de la relación parásito-hospedero. Es de suma importancia el entender los mecanismos por los cuales una bacteria que comúnmente es parte de la flora intestinal de mamíferos y aves, llega a convertirse en un patógeno y dañar gravemente a su hospedero.

No debe olvidarse que la virulencia depende de muchos factores, sin embargo, se ha observado que la herencia o el cambio en uno solo de éstos factores puede alterar drásticamente el tipo de infección o enfermedad que causa el microorganismo. Por ejemplo, las cepas de tipo EHEC contienen muchos de los genes que presentan las EPEC, incluyendo la isla de patogenicidad insertada en el gen *selC*, sin embargo, estas cepas causan colitis hemorrágica en lugar de gastroenteritis en humanos (Nataro y Donnenberg, 1998). De manera que probablemente las cepas EHEC surgieron a partir de un simple evento genético en el que la toxina se transfirió por medio de un bacteriófago, desde el organismo que normalmente la porta (*Shigella dysenteriae*) a una cepa de tipo EPEC (Falkow, 1996).

Por medio de análisis de genética de poblaciones con la técnica de electroforesis de isoenzimas, Whittam y colaboradores (1993) demostraron que la cepa O157:H7 causante de cuadros clínicos muy severos (incluyendo colitis hemorrágica), está relacionada de manera muy cercana a otro grupo de cepas (las O55), que producen diarrea infantil. Lo anterior sugiere que esta nueva cepa patógena se originó a partir de una cepa del tipo O55, a la cual se adicionaron por transferencia horizontal, los genes productores de toxinas a un genoma capaz de producir diarrea. Este sencillo evento pudo haber generado a un nuevo

patógeno, causante de una enfermedad marcadamente diferente y probablemente le este dando a la bacteria una ventaja selectiva en su supervivencia o transmisibilidad.

Algunos de los mecanismos empleados por las bacterias para interactuar con su medio, y algunos otros que les confieren caracteres de patogenicidad, están codificados por elementos extracromosomales como los plásmidos (Joset y Guespin-Michel, 1993).

En el presente trabajo se analizaron los patrones plasmídicos de 347 cepas de *Escherichia coli* de diversos orígenes. El resultado mas notable, fue la presencia de plásmidos en la mayoría de las cepas. Aunque la descripción de los patrones no incluyó la identificación de funciones específicas de las bandas observadas.

La extracción de los plásmidos permitió reconocer la presencia de éstos en las cepas aisladas de los diferentes hospederos y ambientes. El número de bandas en una cepa, esta determinado en gran medida por las características del hospedero. Específicamente, el haber encontrado un mayor número de bandas en las cepas asociadas a humanos, comprueba una vez más, que el hombre ha ejercido fuertes presiones de selección sobre las bacterias, promoviendo el flujo de información genética en elementos extracromosomales como los plásmidos. Por otra parte, si se mapean los números de bandas en una filogenia (Figura 8), su distribución parece ser aleatoria. Es necesario entonces, hacer un análisis de tipo cualitativo, para determinar las funciones de los diferentes plásmidos y dar así una explicación de su distribución en la naturaleza.

Debido a que los plásmidos pueden conferir ventajas a la bacteria en determinados ambientes, es indispensable entonces identificar a los plásmidos portadores de resistencias a antibióticos, de resistencia a ciertos iones, los productores de colicinas o de proteínas degradadoras de compuestos orgánicos complejos. Esta determinación permitiría entender el papel que están desempeñando estos elementos extracromosomales, al estar distribuidos tan ampliamente en la muestra estudiada.

En trabajos anteriores, se ha descrito la presencia de diversos plásmidos en cepas aisladas antes del uso indiscriminado de los antibióticos (por ejemplo

Hughes y Data, 1983). Estos trabajos ya describen funciones de los plásmidos que están relacionadas con la adaptación de la bacteria a su medio y con el mantenimiento del propio plásmido. Dichos plásmidos podrían ser similares a los encontrados en las cepas colectadas en mamíferos silvestres.

Para el caso de genes específicos asociados con la patogenicidad en *E. coli*, se pudieron amplificar exitosamente los genes *per*, *bfp*, y la región específica para EAF de la que se desconoce su función (Girón *et al.*, 1991; Franke *et al.*, 1994; Gómez-Duarte y Kaper, 1995). Al haber realizado las amplificaciones por PCR, se han sondeado diversos puntos dentro del mapa del plásmido y se ha evidenciado su presencia en las cepas patógenas. También se demostró que estos tres genes viajan juntos en el plásmido, debido a que se encuentran en mayor frecuencia de la esperada.

La ausencia de los genes analizados en las cepas silvestres de *E. coli*, comprueba que estos genes no se encuentran en la poza génica de esta bacteria en la naturaleza. Algunas de estas cepas silvestres, sin embargo, sí presentan genes cromosomales necesarios para la lesión A/E, que se encuentran en el locus LEE (Sandner *et al.*, en preparación), de manera que la adquisición de los genes plasmídicos se puede considerar un evento posterior en la historia evolutiva de las EPEC, que fue necesario para completar el cuadro clínico y la lesión A/E. Otro resultado que apoya esta teoría es que cuando se analizan las cepas que poseen los tres genes plasmídicos, en una filogenia construida previamente con genes cromosomales (Souza *et al.*, enviado), éstas se distribuyen únicamente en ciertos clados donde se hayan las cepas patógenas en general, y no a lo largo de toda la filogenia, lo que descarta la posibilidad de que se trate de genes ancestrales y es más congruente con un evento de transferencia posterior. Recientemente Boyd y Hartl (1998) demostraron que la inserción de genes cromosomales involucrados en la patogenicidad de *E. coli*, ha ocurrido en diversas ocasiones, de manera que el grupo causante de la misma enfermedad demostró no ser monofilético. En este estudio, se observa que lo mismo pudo haber ocurrido para el caso del plásmido EAF.

Hasta el momento existe ya evidencia de que algunos patógenos evolucionan adquiriendo grandes segmentos de información por medio de transferencia horizontal de genes (Falkow, 1996). En el caso de los genes del plásmido EAF,

se ha propuesto que han sido adquiridos de una fuente externa, por la presencia de su homología del 82.8% con la secuencia de inserción de IS630 de *Shigella sonnei*, y porque la secuencia de nucleótidos del gen *perD* muestra mas de un 70% de identidad con el transposon Tn7 y con IS630 (Jerse *et al.*, 1990; Gómez-Duarte y Kaper, 1995). Otra evidencia es que el contenido de GC de *perABC* es de 29.6%, que es muy diferente al del cromosoma de *E. coli*.

Una prueba adicional que se realizó para buscar el ancestro de estos genes, fue el amplificarlos en otras enterobacterias cercanas a *E. coli*, como *Salmonella* o *Shigella* (datos no mostrados) y en ninguna de ellas se logró amplificar. Con los resultados obtenidos en este trabajo, se apoya la idea de que los genes plasmídicos *per*, *bfp* y la región específica EAF fueron adquiridos por transferencia horizontal de alguna bacteria no emparentada con *E. coli*.

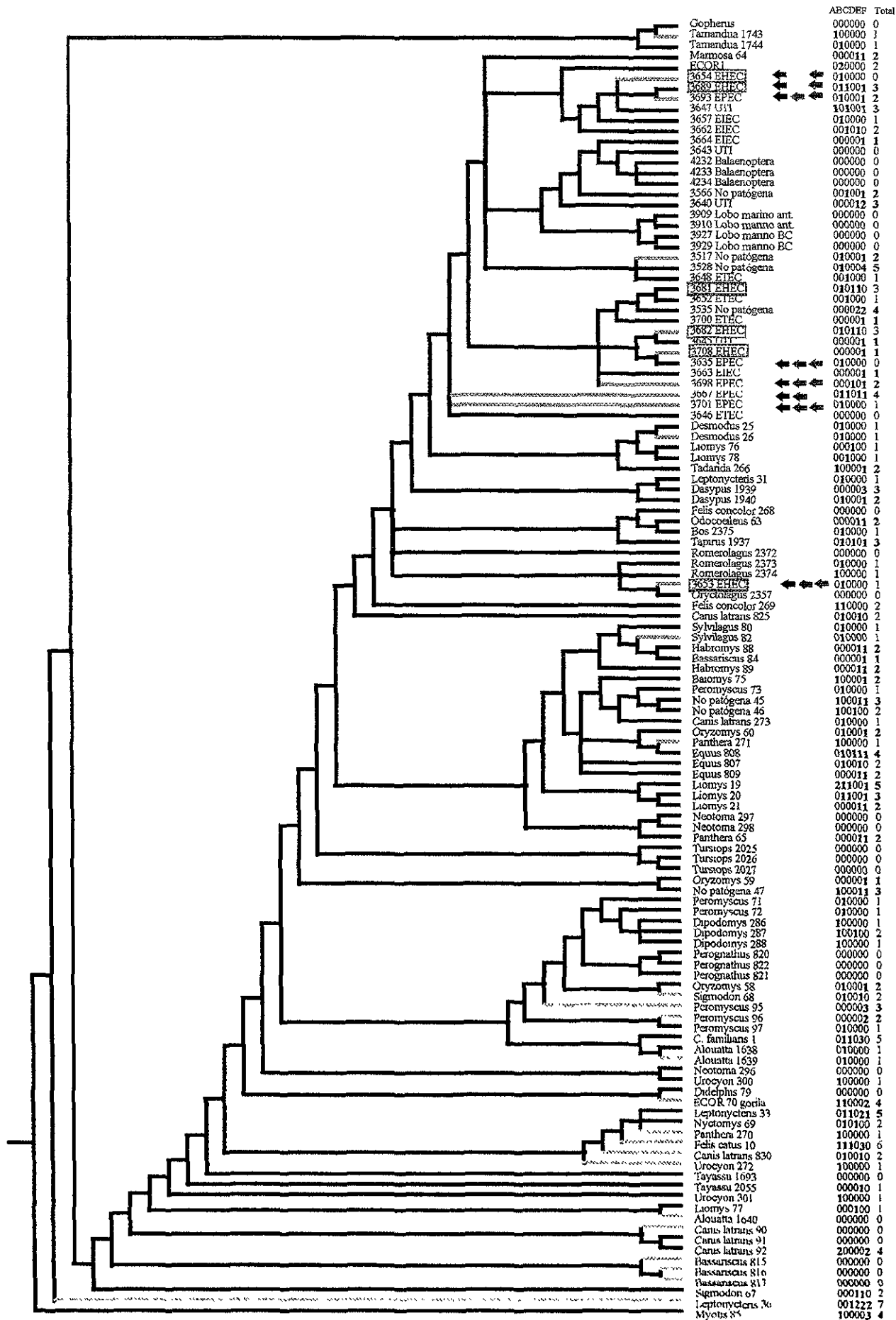


Figura 8. Filogenia de las cepas obtenida con marcadores cromosomales (Rocha, 1996), en la que se mapean los genes amplificados por PCR y los números de bandas observadas para cada cepa. Las columnas se refieren al tamaño de las bandas (A=>100Kb, B=de 50 a 100 Kb, C= de 25 a 50 Kb, D= de 10 a 25 Kb, E=de 5 a 10 Kb y F= <5Kb). Las líneas grises en la filogenia muestran las cepas que contienen genes del locus LEE (resultados de Sandner *et al.*, en preparación). Las flechas en colores indican la presencia del producto de PCR de los genes *per* (rojo), *bfpA* (azul) y sonda EAF (verde). Se resaltan en una caja de color las cepas de tipo EPEC (amarillo) y EHEC (rojo) que son en las que se esperaban encontrar los genes analizados.

REFERENCIAS:

- Amábile-Cuevas, C. F., y M. E. Chicurel. 1992. Bacterial plasmids and gene flux. *Cell* **70**:189-199.
- Blum, G., M. Ott, A. Lischewski, A. Ritter, H. Imrich, H. Tschape, y J. Hacker. 1994. Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from t-RNA specific loci in the chromosome of an *Escherichia coli* wild-type pathogen. *Infect. Immun.* **62**:606-614.
- Boyd, E. F., C. W. Hill, S. M. Rich, y D. L. Hartl. 1996. Mosaic structure of plasmids from natural populations of *Escherichia coli*. *Genetics* **143**:1091-1100.
- Boyd, E. F., y D. L. Hartl. 1998. Chromosomal regions specific to pathogenic isolates of *Escherichia coli* have a phylogenetic clustered distribution. *J. Bacteriol* **180**:1159-1165.
- Brock, T. D., y M. T. Madigan. 1993. *Microbiología*. Prentice-Hall, México. 956pp.
- Cravioto, A., R. J. Gross, S. M. Scotland, y B. Rowe. 1979. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr. Microbiol.* **3**:95-99.
- Donnenberg, M. S., y J. B. Kaper. 1992. Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **60**(10):3953-3961.
- Donnenberg, M. S., J. B. Kaper, y B. B. Finlay. 1997. Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. *Trends. Microbiol.* **5**(3):109-114.
- Falkow, S. 1996. The evolution of pathogenicity in *Escherichia*, *Shigella* and *Salmonella*. En: F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, y H. E. Umbarger (eds.). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D.C., EUA. p.2723-2729.
- Falkow, S. 1997. What is a pathogen? *ASM News.* **63**(7):359-365.
- Finlay, B. B., y S. Falkow. 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**:136-169.
- Girón, J. A., A. S. Y. Ho, y G. K. Schoolnik. 1991. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **254**:710-713.
- Gómez-Duarte, O. G., y J. B. Kaper. 1995. A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **63**(5):1767-1776.

- Hartl, D. L., y D. E. Dykhuizen. 1984. The population structure of *Escherichia coli*. *Ann. Rev. Genet.* **18**:31-68.
- Hicks, S., G. Frankel, J. B. Kaper, G. Dougan, y A. D. Phillips. 1998. Role of intimin and bundle-forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to pediatric intestinal tissue in vitro. *Infect. Immun.* **66**:1570-1578.
- Hughes, V. M., y N. Datta. 1983. Conjugative plasmids in bacteria of the "pre-antibiotic era". *Nature* **302**:725-726.
- Jarvis, K. G., J. A. Girón, A. E. Jerse, T. K. McDaniel, M. Donnenberg, y J. B. Kaper. 1995. Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**:7996-8000.
- Jones, C., y J. Stanley. 1992. *Salmonella* plasmids of the pre-antibiotic era. *J. Gen. Microbiol.* **138**:189-197.
- Joset, F., y J. Guespin-Michel. 1993. *Prokaryotic Genetics*. Blackwell science, USA. 454pp.
- Kenny, B., y B. B. Finlay. 1995. Protein secretion by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for transducing signals to epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**:7991-7995.
- Kenny, B., A. Abe, M. Stein, y B. B. Finlay. 1997. Enteropathogenic *Escherichia coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract. *Infect. Immun.* **65**:2606-2612.
- Kenny, B., y B. B. Finlay. 1997. Intimin-dependent binding of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells triggers novel signaling events, including tyrosine phosphorylation of phospholipase C-g1. *Infect. Immun.* **65**:2528-2536.
- Kenny, B., R. DeVinney, M. Stein, D. J. Reinscheid, E. A. Frey, y B. B. Finlay. 1997. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfer its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* **91**:511-520.
- Knapp, S., J. Hacker, T. Jarchau, W. Goebel, y W. Large. 1986. Large, unstable inserts in the chromosome affect virulence properties of uropathogenic *Escherichia coli* O6 strain 536. *J. Bacteriol.* **168**:22-30.
- Knutton, S., M. M. Baldini, J. B. Kaper, y A. S. McNeish. 1987. Role of plasmid-encoded adherence factors in adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to Hep-2 cells. *Infect. Immun.* **55**:78-85.
- Levine, M. M. 1987. *Escherichia coli* that causes diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* **155**:377-389.
- Maloy, S. R., J. E. Cronan, y D. Freifelder. 1994. *Microbial genetics*. 2nd ed. Jones and Bartlett Publishers, Boston. 484 pp.

- McDaniel, T. K., K. G. Jarvis, M. Donnenberg, y J. B. Kaper. 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. **92**:1664-1668.
- Miller, R.V. 1998. Intercambio de genes bacterianos en la naturaleza. *Investigación y Ciencia* **85**:13-18.
- Millon, A. 1993. Mécanismes moléculaires de pathogénicité des *Escherichia coli* inducteurs de diarrhées chez l'homme et l'animal. *Rev.Méd.Vet.* **144**(11):857-878.
- Nataro, J. P., y J. B. Kaper. 1998. Diarrheogenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**: 142-201.
- O'Brien, A. D., y R. K. Holmes. 1996. Protein toxins of *Escherichia coli* and *Salmonella*. En: F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter. y H. E. Umbarger (eds.). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D.C., EUA. p.2788-2802.
- Ramer, S. W., D. Bieber, y G. K. Schoolnik. 1996. BfpB, an outer membrane lipoprotein required for the biogenesis of bundle-forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **178**:6555-6563.
- Riley, L. W., R. S. Remis, S. D. Helgerson, H. B. McGee, J. G. Wells, B. R. Davis, R. J. Hebert, E. S. Olcott, L. M. Johnson, N. T. Hargrett, P. A. Blake, y M. L. Cohen. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* **308**:681-685.
- Rocha, M. 1996. Estructura genética de poblaciones naturales de *Escherichia coli* en mamíferos silvestres. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. 75pp.
- Sandner, L., L. Eguiarte, A. Navarro, O. Rodríguez, A. Cravioto, y V. Souza. The LEE locus genes *eaeA* and *espB* are independent and widespread in non pathogenic *E.coli* from wild mammals. Datos no publicados.
- Schaechter, M. 1992. *Escherichia coli*, general biology. *Encyclopedia of Microbiology*, volumen 2. Academic Press, EUA. p.115-124.
- Selander, R.K., D. A. Caugant, y T. S. Whittam. 1987. Genetic structure and variation in natural populations of *Escherichia coli*. En: F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter. y H. E. Umbarger (eds.). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D.C., EUA. p.1625-1648.
- Sjogren, R., R. Neill, D. Rachmilewitz, D. Fritz, J. Newland, D. Sharpnack, C. Colleton, J. Fondacaro, P. Gemski, y E. Boedeker. 1994. Role of Shiga-like toxin I in bacterial enteritis: comparison between isogenic *Escherichia coli* strains induced in rabbits. *Gastroenterol.* **106**:306-317.

- Sohel, I., J. L. Puente, S. W. Ramer, D. Bieber, C. Wu, y G. K. Schoolnik. 1996. Enteropathogenic *Escherichia coli*: Identification of a gene cluster coding for bundle-forming pilus morphogenesis. *J. Bacteriol.* **178**(9):2613-2628.
- Souza, V., M. Rocha, A. Valera, y L. E. Eguiarte. 1999. Genetic structure of natural populations of *Escherichia coli* in wild hosts on different continents. Enviado a *Applied and environmental microbiology*.
- Stanish, V. A. 1988. Identification and analysis of plasmids at the genetic level. En *Methods in Microbiology*, 2(1), pp.11-47.
- Stone, K. D., H.-Zhang, L.K. Carlson, y M. S. Donnenberg. 1996. A cluster of fourteen genes from enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient for the biogenesis of a type IV pilus. *Molec. Microbiol.* **20**(2): 325-337.
- Summers, D. K. 1996. *The biology of plasmids*. Blackwell, Oxford. 157pp.
- Talaro, K. P., y A. Talaro. 1999. *Foundations in Microbiology*. Tercera edición. McGraw-Hill, EUA. 554pp.
- Tobe, T., G. K. Schoolnik, I., Sohel, V. H. Bustamante, y J. L. Puente. 1996. Cloning and characterization of *bfpTVW*, genes required for the transcriptional activation of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **21**(5):963-975.
- Whittam, T. S., M. L. Wolfe, K. Wachsmuth, F. Ørskov, Y. Ørskov, y R. A. Wilson. 1993. Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea. *Infect. Immun.* **61**(5):1619-1629.
- Zhang H., y M. S. Donnenberg. 1996. DsbA is required for stability of the type IV pilin of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Molec. Microbiol.* **21**:787-797.

Apéndice 1

Genetic Structure of Natural Populations of *Escherichia coli* in Wild Hosts on Different Continents

VALERIA SOUZA^{1*}, MARTHA ROCHA¹, ALDO VALERA¹ AND LUIS E. EGUIARTE¹

¹ Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, Apartado Postal 70-275, México D.F. 04510, México

Running title: Genetic Diversity and Host Specificity in *E. coli*.

* Corresponding Author Mailing address: Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 70-275, México D.F. 04510, México. Phone: 525 622 9006, Fax: 525 622 8995. E-mail: souza@servidor.unam.mx

ABSTRACT

Current knowledge of genotypic and phenotypic diversity in the species *Escherichia coli* is based almost entirely on strains recovered from humans or zoo animals. In this study we analyzed a collection of 202 strains obtained from 81 mammalian species representing 39 families and 14 orders in Australia and the Americas, a reptile and 10 families of birds collected in Mexico. The strains were characterized genotypically by multifocus enzyme electrophoresis (MLEE) and phenotypically by patterns of sugar utilization, antibiotic resistance and plasmid profile. MLEE analysis yield an estimated genetic diversity of $H=0.682$ for 11 loci. The observed genetic diversity in this sample is the greatest reported for *E. coli*. However, this genetic diversity is not randomly distributed; geographic effects and host taxonomic group accounted for most of the genetic differentiation. The kinds and number of sugars utilized by the strains varied between host taxonomic group and country of origin. Strains isolated from bats were found to exploit the greatest range of sugars while those from primates utilize the fewest. Toxins are more frequent in strains from rodents from both continents. Strains from wild mammalian hosts were, on average, resistant to a larger number of antibiotics than strains from humans and mammals living close to human settlements. On average, strains recovered from hosts in cities carried more plasmids than did strains isolated from wild mammals. Previous studies have shown that natural populations of *E. coli* harbor an extensive genetic diversity that is organized in a limited number of clones. However, knowledge of this worldwide bacterium has been limited. Here we suggest that the strains from a wide range of wild hosts from different regions of the world presents an ecotypic structure where adaptation to the host plays an important role in the population structure.

Introduction

Escherichia coli is an abundant, and usually harmless, commensal of the human digestive flora (41). Nevertheless, pathogenic strains are an important cause of sickness and mortality throughout the world, particularly for children in third world countries (5). *E. coli* is also a common member of the microbial commensal community of mammals and birds. Surprisingly, little is known about the natural history, and genetic structure of *E. coli* in populations of wild animals (41, 50). The standard reference collection of strains for this species, the ECOR collection (33), contains a number of strains isolated from 5 non-human mammalian orders, but most of them were recovered from domestic or

1 zoo animals (33). The relevance of this limited sample has been questioned on the basis of possible cross-
2 contamination from human host (41).

3 The first attempt to assess the genetic structure and diversity of *Escherichia coli* was made by Milkman who
4 analyzed 829 isolates obtained mainly from human (26). Examining four loci, using multi-locus enzyme electrophoresis
5 (MLEE), he determined that the average genetic diversity of this species was $H=0.23$. Subsequent studies that extended
6 the work of Milkman were primarily concerned with the genotypic and phenotypic variation among strains isolated from
7 the commensal faecal flora of humans and those responsible for neonatal septicemia, cystitis, pyelonephritis and
8 diarrhoeal disease (7,37, 40, 47,49, 50). Other studies have focused on various aspects of this species' natural history
9 such as the turnover of strains in a single host (6), the sharing of clones among hosts (7), and the genetic structure and
10 diversity of *E. coli* in its primary and secondary habitats (34, 46, 48). These and other studies have formed the basis of
11 the clonal paradigm for the genetic structure of bacterial populations in general (10, 15, 16, 20, 25, 45) and have been
12 reviewed by Selander et al. (41) and by Whittam (50).

13 The objective of this study was to extend our understanding of the variation and genetic structure of *E. coli* by
14 examining strains from a large variety of wild mammalian and avian hosts. We assessed the genotypic and phenotypic
15 diversity and genetic relatedness of 202 *E. coli* strains isolated mostly from mammals in Australia, and America, as well
16 as birds from Mexico. We also study a few strains from Africa (35), 13 strains from the ECOR collection and K12 as
17 reference. *E. coli* sampled from mammals were the primary focus of this work, and strains were taken from 81 species
18 representing 39 families and 14 orders of mammals (32) in the Americas, Australia. We determined plasmid profiles,
19 resistance to six antibiotics, production of two toxins and the utilization of 12 sugars and analyzed how these phenotypic
20 characters varied by host taxonomic group and geographic origin.

21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains. The complete list of hosts sampled by diet and geographic origin as well as their taxonomic
classification by order and proximity to human environment is presented in Appendix 1.

Strain isolation. Strains collected in Mexico, Costa Rica and Venezuela were recovered from captive or wild
mammals and birds. Fecal samples were transported in swab/transport system containing Aimes media (DIFCO).
Mexican samples were suspended in 1 ml of Luria broth and incubated; an aliquot was then streaked for single colonies
on a minimal lactose plate. More than one isolate was sometimes taken from a single host individual. The Mexican
samples were processed as following: After incubation the Lac⁺ colonies were tested for growth on minimal citrate
plates. The Lac⁺ Cit⁻ colonies were then tested to confirm that they matched the biochemical characteristics of *E. coli*:
gas+, H₂S-, urea-, methyl red+, Voges-Proskauer- (13). While the Australian strains were cultured from anal/cloacal or
from fecal samples from wild mammals. A primary isolation of the strains was carried out by streaking the sample on a
MacConkey plate to obtain single colonies. Only one isolate was taken from each individual host. Subsequently,
single colonies from each plate were restreaked twice onto MacConkey plates. Colonies morphologically consistent
with *E. coli* were then tested for growth on minimal lactose and minimal citrate plates. All Lac⁺ Cit⁻ colonies were
tested to confirm that they matched the biochemical characteristics of *E. coli*: phenylalanine-, H₂S-, urea- indole+
methyl red+ Voges-Proskauer (13). In both laboratories, all incubations were carried out overnight at 37 °C. Following
isolation all strains were immediately stored at -80°C

In addition to the newly isolated strains, 13 strains from the *E. coli* reference collection (ECOR, 33), the
sequenced K12 strain MG1655 (2) and 6 strains from yellow baboons (*Papio cynocephalus*) were included in the
analysis (35).

MLEE analysis. Multi-locus enzyme electrophoresis using cellulose acetate membranes was carried out in
tris-Glycine buffer, pH 8.5 (18). Ten enzymes were used: ADH (alcohol dehydrogenase), ARK (arginine kinase),
G6PDH (glucose-6- phosphate dehydrogenase), IDH (isocitrate dehydrogenase), MDH (malate dehydrogenase), ME
(malic enzyme), MPI (mannose-6-phosphate isomerase), PEP (peptidase), PGM (phosphoglucosmutase) and XDH
(xanthine dehydrogenase), 11 loci were resolved with those enzymes since ME showed two loci. All of the strains were
examined at least twice to confirm their electrophoretic type (Table 1).

Biotype analysis. All strains were taken from freezer cultures and grown on MacConkey plates. A single
colony of each strain was tested for growth on minimal plates containing 0.4% (27) of one of the following sugars:
adonitol (Ado), arabinose (Ara), dulcitol (Dul), inositol (Ino), maltose (Mal), mannitol (Man), raffinose (Raf), rhamnose
(Rha), salicin (Sal), sucrose (Suc), sorbitol (Sor), trehalose (Tre) and xylose (Xyl).

Antibiotic resistance and toxin production. Resistance to each of 6 antibiotics was tested using Luria broth
plates supplemented with one of the following antibiotics: ampicillin (50 µg/ml), chloramphenicol (12 µg/ml),
kanamycin (50 µg/ml), neomycin (50 µg/ml), streptomycin (50 µg/ml) and tetracycline (25 µg/ml). The concentrations
were based on previous studies of *E. coli* (27, 35).

1 Strains were also tested for haemolysin production with heart infusion agar supplemented with blood (5%) and
2 for verotoxin production (VT) with Rainbow Agar O157™ (Biolog, Inc). Rainbow Agar O157™ is not a direct test for
3 VT production, rather it detects a trait that has been found to be highly correlated with VT production in clinically
4 pathogenic strains such as O157:H7 (44). This strain is glucuronidase negative, while other VT producing strains
5 typically over-produce β -galactosidase relative to β -glucuronidase and it is the production of these two compounds that
6 Rainbow Agar™ has the ability to detect.

7 **Plasmid analysis.** Isolated colonies were grown in TB medium and plasmids were extracted with the alkaline
8 lysis procedure (12). Plasmid profiles were run in 0.7% agarose gel and stained with ethidium bromide. Megaplasmids
9 were extracted directly in horizontal agarose gels with a modified procedure from Eckhardt (12). For purposes of
10 statistical analysis, the observed plasmid bands were assigned to categories according to their size.

11 **Statistical analysis.** The isolates were grouped on the basis of the taxonomic order of the host from which
12 they were isolated, host diet and host geographic origin. These groups are naturally confounded (Carnivora usually eat
13 meat) and it is not possible to separate their contribution to phenotypic or genetic diversity. For example, Australia
14 lacks native primates and Mexico lacks Monotremes. To partially compensate for these confounding effects, various
15 subsets of the data were used in the analyses.

16 Average genetic diversity per locus was estimated as: $H = \sum h_j/m$, where m equals the number of loci scored and
17 $h_j = n/(n-1)(1-\sum p_{ij}^2)$, p_{ij} is the frequency of allele i at locus j , and n is the number of multilocus genotypes (ET's) (31,
18 39). Standard error of H was obtained with the ETDIV program (46). The pairwise genetic distance between all strains
19 was expressed as a distance matrix of the proportion of loci at which dissimilar alleles occurred (39). Contingency
20 coefficients were calculated to test for the association of phenotypic traits (36). As contingency coefficients do not range
21 from -1 to 1 as is the case for parametric measures of association, the absolute value of the coefficients are not presented
22

23 We used modified G_{st} statistics to analyze the data. For example, the proportion of genetic variation
24 attributable to geographic effects is $(H_T - H_G)/H_T$, where H_G is the arithmetic average of the H 's calculated separately for
25 Electrotypes (ETs) from each locality, and H_T is the diversity of all strains regardless of locality (30, 31, 39). The
26 statistical significance of G_{st} was analyzed with a chi-squared test of independence, using the formula: $\chi^2 = nG_{st}(a-1)$,
27 where n is the number of individuals and a is the total number of alleles; degrees of freedom are $(k-1)(a-1)$, where k is
the number of subdivisions (16).

28 The frequencies of different biotype traits were compared using χ^2 tests or by Fisher's Exact Tests where
29 appropriate (36).

30
31 Phylogenetic analysis Esto hay que cambiarlo de acuerdo al nuevo arbol

32 RESULTS

33
34
35 **Allozyme analysis.** The 202 strains examined are of 187 genotypes (electrophoretic types, ETs). The number
36 of alleles per locus averaged 6.8 (Table 2, range 4-9). Null alleles were detected at all loci except MDH. The locus
37 with the greatest allelic diversity was ME2 (0.80) and G6PD was the least variable (0.441) (Table 2). The average
38 allelic diversity ($H \pm SE$) for the 11 loci was 0.682 ± 0.034 for the 187 ETs, and for the 202 isolates we obtained an H
39 $= 0.673 \pm 0.034$. This genetic diversity ranges from $H = 0.489$, in the human related strains of the ECOR collection,
40 to $H = 0.705$ in the strains isolated from Mexican mammals (Table 3).

41 The genetic differentiation for host order, geography, and between rodents (australian and mexican) was
42 significantly different from zero. The country of origin explained 4.7% of the diversity. Partitioning the strains on the
43 basis of host order revealed that host taxonomy explained 7.5% of the genetic diversity of the total isolates. In Mexico,
44 strains were obtained from nine orders of mammals and host taxonomy explained 11% (data not shown in table) of the
45 diversity in these isolates. The partitioning of strains from Mexico by locality accounted for only 3% of the total genetic
46 diversity (data not shown in table). In contrast, the comparison of strains isolated from rodents in Mexico and Australia
47 revealed that geographic effects explained 9.8% of the genetic diversity.

48 Figure 1 presents a dendrogram generated by an NJ tree for the 202 strains in this collection. The tree shows 7
49 very deep branches with a genetic distance (measured as proportion of mismatches) above 0.6. It is in the main cluster
50 (C1 and C2), where the ECOR collection is represented. We observed that cluster A of ECOR is mainly grouped in the
51 C1 cluster, along with K12 (MG161645), while the ECOR groups B1, C and D are found together in our cluster C2.
52 Two strains from ECOR group A (7 and 23) are also in cluster C2. In cluster C1 we also found a tight group of
53 Monotremata and Marsupials and a group of Mexican Carnivores. However, cluster C2 is the most diverse group in the
54 tree, with strains from both Australian and Mexico. It is interesting that in this cluster strains from different hosts and
55 continents have identical ETs; this phenomenon is not common in the rest of the tree. Cluster A has a group of
56 Carnivores from Mexico, while cluster B has a large group of rodents from Mexico. Cluster D is represented mostly by
57 a large group of rodents from Mexico and a group of Chiroptera from the same country. Strains from Australian rodents

1 cluster mainly in E and F. Strains from birds and primates are scattered in deep branches from different clusters, but also
2 in group G, indicating that these hosts are colonized by very diverse and divergent *E. coli* strains.

3 **Biotype analysis.** A minority of the strains could utilize adonitol, arabinose, dulcitol, inositol, or salicin,
4 while most strains could ferment maltose, mannose, rhamnose, sorbose, trehalose and xylose (Table 4). For 10 of the
5 12 substrates tested, the proportion of strains able to exploit a substrate varied significantly depending on the taxonomic
6 group of the host from which they were isolated (Table 4). The ability of the strains to ferment maltose, rhamnose and
7 xylose was independent of host taxonomic group. Overall, strains isolated from hosts with diversified diets such as
8 rodents, birds and marsupials could ferment the greatest number of substrates, while strains from hosts with very
9 specialized diets like: Monotremata, Cetacea, Xenarthra and Sirenia could exploit fewer sugars.

10 Geographic effects on the frequency of sugar utilization could also be detected. Comparing strains isolated from
11 rodents in Australia and Mexico revealed that, for mannitol, 32% (N=16) of the strains from Australia compared to 85%
12 (N=30) of those from Mexico could ferment this sugar ($P<0.001$). Similarly, 32% of strains from Australian rodents can
13 ferment raffinose compared to 64% of the strains from Mexican rodents ($P<0.02$).

14 Of the antibiotics tested, resistance to streptomycin was most frequent while resistance to chloramphenicol was
15 rare (Table 5). Contrasting the frequency of resistance between strains isolated from Australia and Mexico showed that
16 resistance to antibiotics was more frequent among strains from Mexico than among strains from Australia. Overall,
17 9.6% of strains from Australia were resistant to one or more antibiotics compared to 41% of strains from Mexico. There
18 were an insufficient number of strains with resistance to permit a detailed analysis of the distribution of antibiotic
19 resistance as a function of host taxonomic group. However, considering the Mexican isolates alone, strains isolated from
20 bats tended to have a much higher frequency of antibiotic resistance; For example, 46% were ampicillin resistant, 100%
21 streptomycin resistant and 15% presented neomycin resistance; none was resistant to the other antibiotics.

22 The mean number of plasmids for all strains was 1.6. In Mexican strains we observed an average of 1.7
23 plasmids per strain, while in the Australian strains this average was 0.4 plasmids per strain ($\chi^2 = 322.8$, $p<0.001$)

24 Overall, 44% of the strains produced more β -galactosidase relative to β -glucuronidase ('verotoxin positive') and
25 2% of strains produced haemolysin. No difference in the overall frequency of haemolysins or 'verotoxin production'
26 between strains from Australia and Mexico could be detected (Table 6, $p=0.32$). However, the frequency of verotoxin
27 production varied with the host taxonomic group from which the strains were isolated (Table 6). Among the Mexican
28 isolates, the frequency of positive strains ranged from 7% for strains isolated from Artiodactyls to 68% in strains isolated
29 from rodents ($p<0.01$). Isolates from Australian rodents also showed a higher than average frequency of verotoxin
30 production compared to strains from marsupials ($p<0.05$).

31 Concordance analysis of the phenotypic traits using the strains isolated from Mexico reveal that the presence or
32 absence of these traits are not independent (Table 7). Three major forms of association were detected: 1) The co-
33 occurrence of the ability to utilize the less frequently fermented sugars such as dulcitol and inositol. 2) The co-
34 occurrence of the inability to exploit sugars utilized by most strains such as xylose and trehalose. 3) The negative
35 association of two traits; for example, where the ability to exploit one sugar (e.g., salicin) results in a lower than
36 expected frequency of strains able to exploit a second sugar (e.g., sucrose). Resistance to various antibiotics was also
37 found to co-occur in a strain more often than would be expected by chance. Resistance to ampicillin was associated with
38 the ability to utilize arabitol, adonitol, dulcitol and salicin. Also the ability to exploit salicin was found to be more
39 frequently associated with streptomycin resistance than expected. Similar kinds of association are seen in the strains
40 from Australia (results not presented).

41 We observed an unexpected result in the pattern of resistance to antibiotics in Mexico when we divided the
42 samples by the distance of the host to human environment (Table 8). In *E. coli*, associated with wild animals in
43 isolated places, we obtained evidence of resistance to more antibiotics (average 0.45 ± 0.09 S.E., Table 8) than in the
44 other human related sources from Mexico (weighted average of all the other sources = 0.43 ± 0.01). The ECOR
45 collection has the highest antibiotic resistance (average = 0.68 ± 0.02 S.E., data not shown in table). We observed that
46 most of the multiresistant strains from wild mammals did not have any plasmids, suggesting that the genes for
47 antibiotic resistance are chromosomal in the wild strains. On the other hand, plasmid number is correlated with human
48 contact. We observed a higher number of plasmids in the sample from Mexico City and ECOR but the lower numbers
49 were observed in the isolated fauna of Australia (Table 8).

50 51 DISCUSSION

52
53 The average genetic diversity (H) for the 11 loci in this collection of *E. coli* was 0.682. We intentionally
54 selected a wide range of "good and informative characters" based on the analysis done by Selander and collaborators
55 (41). The observed H would change if other loci were selected or if the MLEE were performed with starch and
56 discontinuous buffer with a different pH (18). For example, based on 11 loci, the H was originally determined to be 0.42
57 for the ECOR collection (33). Subsequently, the number of loci examined was increased to 35 resulting in H declining
58 to 0.34 (41). The sample of the ECOR analyzed by us with the rest of the strains gave a little higher estimate

1 ($H=0.489$) than previous studies (33, 41). This result reflects the fact that we selected 13 strains of the ECOR that
2 represented 5 clades and several different hosts (41). In any case, estimated H from our collection is higher than the
3 diversity reported for any collection of *E. coli* (6, 26, 34, 37, 41, 46-48) and higher than most studied bacteria (8, 9, 10,
4 14, 28, 29, 38, 42, 45). However, comparisons of genetic diversity among species are not straightforward. One
5 problem concerns the way in which bacterial species are defined (11). For example, until recently the genus *Salmonella*
6 consisted of several serologically defined species, where some species consisted of a single clone. Currently, the many
7 serovars of *Salmonella* are now classified as a single species, *S. enterica* (42).

8 It appears that clinical *E. coli* is genetically more diverse than others opportunistic pathogens of humans (7, 41,
9 49) as *Neisseria meningitidis* (8), *Haemophilus influenzae* (28), *Bordetella bronchiseptica* (29) and *Legionella*
10 *pneumophila* (38). However, studies of free-living bacteria such as *Bacillus* spp. have determined a very high genetic
11 diversity (10, 20). This is also true of many of the *Rhizobium* species (14, 45).

12 Although the sample includes isolates from all of the major mammalian orders (98.3% of the species are within
13 those orders, 31), isolates from some minor orders are lacking. Nevertheless, when we add 10 isolates from 10 different
14 birds (a very distinct group of *E. coli*, Figure 1) the genetic diversity increased only 0.2%. The geographic scope of the
15 sample is also patchy, with only a few strains from Africa or Asia and none from either polar region. The results
16 suggest, however, that filling these gaps may not significantly increase estimates of the genetic diversity of *E. coli*. For
17 example, the Mexican mammalian samples alone, the genetic diversity was estimated as 0.698 ± 0.048 (data not shown
18 in Table). Inclusion of the Australian samples, which represent an isolated continent with a unique mammalian fauna,
19 lowered the estimate of the genetic diversity by 1%.

20 Previous studies of *E. coli* suggest that much of the observed allelic variation is selectively neutral and this,
21 coupled with a large effective population size, can explain much of this species' genetic diversity (41, 50). Population
22 structure has been thought to account for little of the observed diversity (6, 11, 21, 41). However, genetic diversity in
23 this collection of *E. coli* is probably ecologically structured. This is most apparent when levels of diversity are
24 compared between *E. coli* isolated from human hosts and those isolated from mammals as a whole. Estimates of genetic
25 diversity using strains isolated from human fecal samples range from 0.45 to 0.54 (41, 50). This is about two thirds of
26 the diversity found in this collection of *E. coli*. However, there is a caveat associated with this observation. The
27 majority of strains from humans were isolated from people living in the developed countries of the West. Although
28 some studies have included strains from Tonga even these are suspect since Tonga, was used as a military base by both
29 US and New Zealand forces during WWII (4). It is therefore possible that the diversity of *E. coli* from humans is
30 underestimated. A high degree of genetic diversity ($H=0.61$) has been found in *E. coli* isolated from sewage (34). These
31 sewage samples undoubtedly represent two quite distinct sources of strains: those from the species' primary habitat, the
32 lower intestinal tract, and those from its secondary habitat, the environment. Whittam and collaborators (46-48) have
33 shown that *E. coli* populations inhabiting sympatric primary and secondary habitats are quite distinct from one another
34 in terms of their clonal composition (50).

35 All the statistical analyses lead to the supposition that host diet and geographic origin as well as taxonomy of
36 the host, structures the genetic relationships among *E. coli* strains. Ten percent of the genetic diversity from rodents
37 from two continents (Australia and North America) can be explained on geography alone. This contrasts with the
38 observation that spatial structure accounts for only 2% of the genetic diversity among strains isolated from humans
39 living in North America and Europe (27). That spatial structure accounts for so little of the genetic diversity of *E. coli*
40 from humans probably reflects the fact that the samples are derived from a single, highly mobile host species. The much
41 larger geographic component of diversity observed in the strains from rodents can be attributed to both Australia's long
42 isolation and to the distinct rodent communities of the two continents. The dendrogram depicted in Figure 1 provides
43 additional support for the observation that host and geographic effects contribute to the genetic structure of *E. coli*
44 populations. For example, strains isolated from Rodents and Carnivores seem to cluster more often than other hosts, as
45 do Australian strains. In addition, all the ECOR strains from humans that were included in the analysis are present in a
46 cluster. Interestingly, all the ECOR from *Perisodactyla* are together, even if in the original tree they belong to separated
47 clusters. The only human ECOR that is not in C1 is isolated from Tonga (this strain was in Cluster D in the original
48 tree, 40). Even though if our ECOR sample is very small, our new tree apparently is separating the ECOR collection
49 more by the host specie than the previous tree.

50 The type and range of sugars that can be exploited by *E. coli* strains is associated with the taxonomic group of
51 the host from which the strains were isolated (Table 3). Significant heterogeneity in sugar utilization also resulted when
52 strains were grouped on the basis of host diet. Nevertheless, these results are somewhat ambiguous. This may reflect the
53 joint problem of sample size for the diet grouping (for example, 4 dietary modes among the 14 bat hosts) and the
54 inevitable interactions between host taxonomy and diet. Overall, *E. coli* from the less represented hosts with specialized
55 diets (monotremes, dolphins, *Xenarthra* and *Sirenia*) exploited the fewest sugars, the strains from hoofed mammals used
56 also few sugars; while bacteria from birds, marsupials and rodents could utilize the larger number of sugars. The
57 frequency with which strains can exploit some sugars was also found to vary with the geographic origin of the strains.

1 For example, a greater proportion of strains from Mexican rodents can utilize raffinose and mannitol than strains from
2 Australian rodents.

3 The observation that the frequency of substrate utilization may be influenced by the host and geographic origin
4 of *E. coli* strains, makes comparisons with previously published studies difficult. The majority of strains (69%) in
5 ECOR that were isolated from strictly herbivorous mammals could exploit raffinose, whereas in this study less than
6 half the strains recovered from the herbivorous groups could utilize raffinose (27, 33, 41). Only 30% of ECOR strains
7 can ferment sorbose, as compared to the 82% frequency of utilization observed in this study (27, 33, 41). No ECOR
8 strains could use salicin, while in this study 9% of the strains did so, in contrast with 41% in a population of strains
9 from yellow baboons (35).

10 In addition to substrate utilization, verotoxin production, (measured with Rainbow Agar™ as over-production
11 of β -galactosidase relative to β -glucuronidase) also appears to be influenced by host taxonomy. Since verotoxins are more
12 frequent in strains from rodents from both continents, this is consistent with the idea of rodents as reservoir hosts of
13 many diseases (1). On the other hand, Artiodactyls have strains with the lower % of verotoxin production, contrary to
14 the belief that domestic cattle naturally harbor verotoxin producing *E. coli* (i. e. O157:H7) (43,44).

15 Host digestive physiology and anatomy clearly vary among mammal species and reflect the interaction of
16 phylogeny and diet. Host diet will in turn influence the kinds of growth substrates available to *E. coli*. As a result, the
17 species will be confronted with very different biotic and abiotic environments in different host species. Our study
18 suggests that these different environments result in *E. coli* exhibiting some degree of host specificity. Further work is
19 required to determine the mechanisms responsible for this specificity and the role that such specificity plays in *E. coli*'s
20 evolution .

21 The number and size of plasmids is highly variable in *E. coli*, ranging from hundreds of bp to several hundred
22 kilobase pairs. Their G+C content can vary widely and is often different from that of their usual bacterial host,
23 indicating a variety of sources from which plasmids (or part of them) are derived (3, 19, 22-24). This is why no pattern
24 had been observed in the number of plasmids in these bacteria (3, 23). However, we observed that, with human
25 proximity, the number of plasmids per strain increases. This could be the reflection of the acquisition of accessory
26 elements due the increase of densities of both hosts and bacteria in the cities, which could facilitate the movement of
27 plasmids among strains of *E. coli* as well as among other related bacteria. Such exchange was observed by Boyd et al.
28 (3) who analyzed the structure of F-related plasmids in the ECOR collection. They found different phylogenetic
29 relationships between the plasmids and between the bacterial strains, suggesting that horizontal transfer occurs at high
30 rates within the ECOR collection.

31 32 33 ACKNOWLEDGMENTS

34 We wish to thank the numerous colleagues who assisted us in obtaining samples : David Gordon, Blanca Hernández,
35 Jordan Goluvov, Meli Mandrujano, Rodrigo Medellín, Saul Aguilar, Osiris Gaona, Angeles Mendoza, Gabriel Pérez,
36 Luis Medrano, Adolfo Navarro, Juan Castillo, Alejandro Zavala, Benjamin Morales, Ricardo Frias, Alejandro
37 Velázquez, Hector Arita, Carlos Alvarez, José Charles, Hilary Charles, Alvaro Miranda, David Valenzuela, Luisa
38 Sandner, René Cerritos and Jorge Ortega. We also thank Antonio Cruz for valuable technical assistance and, Pilar
39 Beltrán, Robert K. Selander, Daniel Piñero, Rodolfo Dirzo, Brandon Gaut, Andrew Peek, and Juan Nuñez who read the
40 ms and gave useful comments. Richard Goldstein kindly provided the MG1655 strain of K12 *E. coli* and Dan
41 Dykhuizen the yellow baboon strains. This research was supported by DGAPA-UNAM IN208995 grant to V.S.,
42 CONACYT 3675-N grant to L.E.E. and V. S., M. R. was supported by a graduate student scholarship from
43 CONACYT.

44 45 46 LITERATURE CITED

- 47 1. Baquero, F., and J. Blazquez. 1998. Evolution of antibiotic resistance. Trends in Ecology and Evolution 12:482-
48 488.
- 49 2. Blattner, F. R., I. G. Plunkett, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D.
50 Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J.
51 Rose, B. Mau, and Y. Shao. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. Science
52 277:1453-1462.
- 53 3. Boyd, E. F., C. W. Hill, S. M. Rich, and D. L. Hartl. 1996. Mosaic structure of plasmids from natural
54 populations of *Escherichia coli*. Genetics 143:1091-1100.
- 55 4. Campbell, I. C. 1992. Island Kingdom: Tonga Ancient & Modern. Canterbury University Press, Christchurch.
- 56 5. Cravioto, A., A. Tello, A. Navarro, J. Ruiz, H. Villafán, F. Uribe, and C. Eslava. 1991 Association of
57 *Escherichia coli* Hep-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. Lancet 337:262-264.
- 58 6. Caugant, D. A., B. R. Levin, and R. K. Selander. 1981. Genetic diversity and temporal variation in the *E. coli*
population of a human host. Genetics 98:467-490.

- 1 7. Caugant, D. A., B. R. Levin, G. Lidin-Janson, T. S. Whittam, C. Svanborg Eden, and R. K. Selander.
2 1983. Genetic diversity and relationships among strains of *Escherichia coli* in the intestine and those causing
3 urinary tract infections. *Prog. Allergy* 33:203-227.
- 4 8. Caugant, D. A., L. F. Mocca, C. E. Frasci, L. O. Frøholm, W. D. Zollinger, and R. K. Selander. 1987.
5 Genetic structure of *Neisseria meningitidis* populations in relation to serogroup, serotype, and outer membrane
6 protein pattern. *J. Bacteriol.* 169:2781-2792.
- 7 9. Denny, T. P., M. N. Gilmour, and R. K. Selander. 1988. Genetic diversity and relationships of two pathovars of
8 *Pseudomonas syringe*. *J. Gen. Microbiol.* 134:1949-1960.
- 9 10. Duncan, K. E., N. Ferguson, K. Kimura, X. Zhou, and C. A. Istock. 1994. Fine-scale genetic and phenotypic
10 structure in natural populations of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*: implications for bacterial
11 evolution and speciation. *Evolution* 48:2002-2025.
- 12 11. Dykhuizen, D. E. and L. Green. 1991. Recombination in *Escherichia coli* and the definition of biological specie.
13 *J. Bacteriol.* 173:7257-7268.
- 14 12. Eckhardt, T. 1978. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid*
15 1:584-588.
- 16 13. Ewing, W. H. 1986. Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae. 4th Ed., Elsevier Science
17 Publishing Co., New York.
- 18 14. Gordon, D. M., M. Wexler, T. B. Reardon, and P. J. Murphy. 1995. The genetic structure of *Rhizobium*
19 populations. *Soil Biol. Biochem.* 27:491-499.
- 20 15. Guttman, D. S., and D. E. Dykuizen. 1994. Clonal divergence in *Escherichia coli* as a result of recombination,
21 not mutation. *Science* 266:1380-1383.
- 22 16. Hagen, M. J., and J. L. Hamrick. 1996. Population level processes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*: the
23 role of founder effects. *Molec. Ecol.* 5:707-714.
- 24 17. Hartl, D. L., and D. Dykhuizen. 1984. The population genetics of *Escherichia coli*. *Ann. Rev. Genet.* 18:31-68.
- 25 18. Hebert, P. D. N., and M. J. Beaton. 1993. Methodologies for Allozyme Analysis Using Cellulose Acetate
26 Electrophoresis. Helena Laboratories, USA.
- 27 19. Hughes, V. M., and N. Datta. 1983. Conjugative plasmids in bacteria of the "pre-antibiotic era". *Nature, London*
28 302:725-726.
- 29 20. Istock, C. A., K. E. Duncan, N. Ferguson, and X. Zhou. 1992. Sexuality in a natural population of bacteria
30 -*Bacillus subtilis* challenges the clonal paradigm. *Mol. Ecol.* 1:95-103.
- 31 21. Jensen, R. A. 1985. Biochemical pathways can be traced backward through evolutionary time. *Mol. Biol. Evol.*
32 2:92-108.
- 33 22. Jones, C., and J. Stanley. 1992. *Salmonella* plasmids of the pre-antibiotic era. *J. Gen. Microbiol.* 138:189-197.
- 34 23. Joset, F., and J. Guespin-Michel. 1993. Prokaryotic Genetics. Blackwell science, USA.
- 35 24. Maloy, S. R., J. E. Cronan, and D. Freifelder. 1994. Microbial genetics. 2nd ed. Jones and Bartlett Publishers,
36 Boston.
- 37 25. Maynard Smith, J., N. H. Smith, M. O'Rourke, and B. G. Spratt. 1993. How clonal are bacteria? *Proc. Natl.*
38 *Acad. Sci., USA.* 90:4384-4388.
- 39 26. Milkman, R. 1973. Electrophoretic variation in *Escherichia coli* from natural sources. *Science* 182:1024-1026.
- 40 27. Miller, R. D., and D. L. Hartl. 1986. Biotyping confirms a nearly clonal population structure in *Escherichia coli*.
41 *Evolution* 40:1-12.
- 42 28. Musser, J. M., S. J. Barenkamp, D. M. Granoff, and R. K. Selander. 1986. Genetic relationships of
43 serologically nontypable and serotype b strains of *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* 52:183-191.
- 44 29. Musser, J. M., D. A. Bemis, H. Ishikawa, and R. K. Selander. 1987. Clonal diversity and host distribution in
45 *Bordetella bronchiseptica*. *J. Bacteriol.* 169:2793-2803.
- 46 30. Nei, M. 1977. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Hum. Genet. Lond.*
47 41:225-233.
- 48 31. Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals.
49 *Genetics* 89:583-590.
- 50 32. Nowak, R. M. 1991. Walker's mammals of the world. 5th. ed. John Hopkins University Press, Baltimore.
- 51 33. Ochman, H., and R. K. Selander. 1984. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J.*
52 *Bacteriol.* 157:690-693.
- 53 34. Pupo, G. M., and B. J. Richardson. 1995. Biochemical genetics of a natural population of *Escherichia coli*:
54 seasonal changes in alleles and haplotypes. *Microbiology* 141:1037-1044.
- 55 35. Routman, E., R. D. Miller, J. Philips-Conroy, and D. L. Hartl. 1985. Antibiotic resistance and population
56 structure in *Escherichia coli* from free-ranging African yellow baboons. *Appl. Environ. Microbiol.* 50:749-754.
- 57 36. Seigel, S. 1956. Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences. McGraw Hill, Inc., London.

- 1 37. Selander, R. K., and B. R. Levin. 1980. Genetic diversity and structure in *Escherichia coli*. *Science* **210**:545-
2 547.
- 3 38. Selander, R. K., R. M. McKinney, T. S. Whittam, W. F. Bibb, D. J. Brenner, F. S. Nolte, and P. E.
4 Pattison. 1985. Genetic structure of populations of *Legionella pneumophila*. *J. Bacteriol.* **163**:1021-1037.
- 5 39. Selander, R. K., D. A. Caugant, H. Ochman, J. M. Musser, and T. S. Whittam. 1986. Methods of multilocus
6 enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**:873-
7 884.
- 8 40. Selander, R. K., T. K. Korhonen, V. Vaisanen-Rhen, P. H. Williams, P. E. Pattison, and D. A. Caugant.
9 1986. Genetic relationships and clonal structure of strains of *Escherichia coli* causing neonatal septicaemia and
10 meningitis. *Infect. Immun.* **52**:213-222.
- 11 41. Selander R. K., D. A. Caugant, and T. S. Whittam 1987. Genetic structure and variation in natural populations
12 of *Escherichia coli*, p. 1625-1648. In F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M.
13 Schaechter and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular
14 biology. American Society of Microbiology, Washington, DC.
- 15 42. Selander, R. K., P. Beltran, N. H. Smith, R. Helmuth, F. A. Rubin, D. J. Kopecko, K. Ferris, B. D. Tall,
16 A. Cravioto, and J. M. Musser. 1990. Evolutionary genetic relationships of clones of *Salmonella* serovars
17 that cause human typhoid and other enteric fevers. *Infect. Immun.* **58**:2262-2275.
- 18 43. Schaechter, M., R. Curtis, J. Ingraham, E. Lin, K. Brooks, B. Magasanik, D. Neidhardt, W. Reznikoff, M.
19 Riley, and E. Umbarger. 1996. The view from here, p. 1625-1648. In F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B.
20 Low, B. Magasanik, M. Schaechter and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*:
21 cellular and molecular biology. American Society of Microbiology, Washington, DC.
- 22 44. Smith, H. R., and S. M. Scotland. 1988. Vero cytotoxin-producing strains of *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.*
23 **26**:77-85.
- 24 45. Souza, V., L. Eguiarte, G. Avila, R. Cappello, C. Gallardo, J. Montoya, and D. Piñero. 1994. Genetic
25 structure of *Rhizobium etli* biovar *phaseoli* associated with wild and cultivated bean plants (*Phaseolus*
26 *vulgaris* and *Phaseolus coccineus*) in Morelos, Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1260-1268.
- 27 46. Whittam, T. S., H. Ochman, and R. K. Selander. 1983a. Geographic components of linkage disequilibrium in
28 natural populations of *Escherichia coli*. *Mol. Biol. Evol.* **1**:67-83.
- 29 47. Whittam, T. S., H. Ochman, and R. K. Selander. 1983b. Multilocus genetic structure in natural populations
30 of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**:1751-1755.
- 31 48. Whittam, T. S. 1989. Clonal dynamics of *Escherichia coli* in its natural habitat. *Antonie van Leeuwenhoek.*
32 **55**:23-32.
- 33 49. Whittam, T. S., M. L. Wolfe, I. K. Wachsmuth, F. Ørskov, I. Ørskov, and R. A. Wilson. 1993. Clonal
34 relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea. *Infect.*
35 *Immun.* **61**:1619-1629.
- 36 50. Whittam T. S. 1996 Genetic variation and evolutionary processes in natural populations of *Escherichia coli*, 2708-
37 2728. In F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter and H. E. Umbarger (ed.),
38 *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. American Society of
39 Microbiology, Washington, DC.

1
2
3Table 1. The *Escherichia coli* strains examined in this study with their electrophoretic profile.

Hostspecies (strain reference)	Locus										
	IDH	PEP	PGM	ARK	ME1	ME2	MPI	ADH1	MDH	6G	XDH1
<i>Gopherus flavomarginatus</i> (57)	0	2	4	1	4	9	7	1	3	3	2
<i>Tachyglossus aculeatus</i> (TA309)	2	3	3	3	2	6	4	3	3	0	2
<i>Tachyglossus aculeatus</i> (TA310)	2	3	4	3	2	6	3	3	3	3	3
<i>Tachyglossus aculeatus</i> (TA311)	3	3	4	3	2	6	3	3	3	3	4
<i>Ornithorhynchus anatinus</i> (TA319)	3	3	4	3	3	6	3	3	4	3	4
<i>Ornithorhynchus anatinus</i> (TA32)	2	3	3	3	2	6	4	3	3	3	3
<i>Marmosa camescens</i> (64)	4	3	5	3	3	7	3	3	2	3	4
<i>Didelphis virginiana</i> (79)	5	3	5	3	2	5	4	7	2	4	4
<i>Didelphis virginiana</i> (2048)	3	3	5	3	3	6	5	0	3	3	4
<i>Didelphis virginiana</i> (2049)	4	4	3	2	4	6	3	0	3	3	3
<i>Didelphis virginiana</i> (2050)	3	3	5	3	4	7	5	0	2	3	4
<i>Philander opossum</i> (1698)	3	3	3	2	2	7	4	4	3	3	5
<i>Cercatetus concinnus</i> (TA002)	2	4	3	2	3	7	3	3	5	3	4
<i>Antechinus bellus</i> (TA148)	2	4	3	2	3	7	3	3	3	3	4
<i>Antechinus flavipes</i> (TA237)	2	3	2	2	4	0	3	4	3	3	4
<i>Antechinus swainsonii</i> (TA153)	1	4	1	1	3	6	1	3	3	3	2
<i>Dasyurus geoffroi</i> (TA124)	1	3	3	1	3	7	2	2	3	3	3
<i>Dasyurus hallucatus</i> (TA260)	2	4	2	2	1	6	3	0	1	3	4
<i>Dasyurus maculatus</i> (TA036)	3	3	2	3	3	6	4	3	3	3	3
<i>Sminthopsis macroura</i> (TA244)	2	4	2	2	4	7	5	4	3	3	4
<i>Sminthopsis murina</i> (TA151)	2	2	2	2	4	7	3	3	3	3	4
<i>Sminthopsis delichura</i> (TA 120)	1	4	1	1	3	7	1	2	3	3	2
<i>Bettongia penicillata</i> (TA115)	3	4	4	3	2	6	5	4	3	3	0
<i>Lagorchestes hirsutus</i> (TA263)	2	3	2	2	3	7	3	0	3	3	4
<i>Macropus eugenii</i> (TA052)	3	3	2	3	3	6	4	3	3	3	3
<i>Macropus fuliginosus</i> (TA004)	2	3	3	2	3	6	3	3	5	3	4
<i>Macropus giganteus</i> (TA057)	2	4	2	2	4	7	3	3	5	2	4
<i>Petrogale lateralis</i> (TA135)	3	3	0	2	3	6	3	3	3	3	3
<i>Perameles nasuta</i> (TA020)	2	3	2	2	2	7	3	3	4	2	4
<i>Petaurus breviceps</i> (TA243)	1	4	2	2	2	4	3	4	3	3	4
<i>Pseudocheirus peregrinus</i> (TA022)	2	4	2	2	3	7	3	3	5	3	4
<i>Trichosurus vulpecula</i> (TA038)	2	4	3	2	3	5	3	3	5	3	4
<i>Phascolarctos cinereus</i> (TA003)	1	3	1	1	2	6	2	2	3	3	2
<i>Sorex sp.</i> (238)	2	1	1	2	2	5	3	4	2	2	2
<i>Sorex sp.</i> (240)	6	2	4	2	3	8	7	0	4	3	4
<i>Tachyglossus aculeatus</i> (TA051)	2	4	3	2	4	7	4	3	5	2	4
<i>Tadarida brasiliensis</i> (259)	5	1	3	3	3	7	2	3	3	0	4
<i>Tadarida brasiliensis</i> (261)	5	1	3	3	3	7	2	3	4	3	4
<i>Tadarida brasiliensis</i> (266)	4	1	3	2	3	6	2	3	3	3	4
<i>Desmodus rotundus</i> (25)	4	2	0	4	3	5	1	3	2	3	4
<i>Desmodus rotundus</i> (26)	4	2	2	4	3	5	1	3	2	3	5
<i>Leptonycteris nivalis</i> (31)	3	2	2	2	3	5	1	2	2	2	3
<i>Leptonycteris nivalis</i> (33)	3	2	2	2	3	3	3	2	4	3	2
<i>Leptonycteris nivalis</i> (36)	3	1	3	2	3	5	5	2	6	4	2
<i>Carollia brevicauda</i> (40)	3	1	3	2	3	5	4	2	6	2	2

<i>Carollia brevicauda</i> (41)	0	1	3	2	3	5	4	2	6	3	2
<i>Carollia brevicauda</i> (42)	2	1	4	2	3	6	4	2	6	3	4
<i>Nyctophilus geoffroyi</i> (TA225)	2	2	2	2	4	0	2	4	3	3	4
<i>Alouatta palliata</i> (1638)	1	4	4	2	4	6	6	5	2	3	3
<i>Alouatta palliata</i> (1639)	2	4	4	2	4	6	6	5	2	3	4
<i>Alouatta palliata</i> (1640)	1	4	4	2	4	6	6	5	2	3	5
<i>Alouatta palliata</i> (1731)	3	5	4	4	3	3	4	0	2	3	3
<i>Alouatta pigra</i> (1699)	4	4	5	3	4	4	5	0	4	3	2
<i>Ateles geoffroyi</i> (1669)	0	2	2	2	2	6	3	5	4	4	2
<i>Papio cynocephalus</i> (B184)	3	3	2	2	3	7	3	3	3	4	4
<i>Papio cynocephalus</i> (B197)	2	3	0	2	3	7	3	3	3	4	4
<i>Papio cynocephalus</i> (B307)	2	3	1	2	3	6	3	3	2	3	4
<i>Papio cynocephalus</i> (B349)	2	3	2	2	3	7	4	3	3	4	4
<i>Papio cynocephalus</i> (B427)	3	3	2	2	1	4	3	3	1	3	4
<i>Papio cynocephalus</i> (B430)	3	3	2	3	3	7	3	3	3	3	4
ECOR7orangutan	3	4	4	2	3	7	4	3	3	3	4
<i>Homo sapiens</i> (45)	3	2	2	3	3	5	4	0	3	3	3
<i>Homo sapiens</i> (46)	4	2	2	3	2	5	4	0	3	3	3
<i>Homo sapiens</i> (47)	1	2	3	3	2	5	4	0	3	3	3
ECOR1hum.Iowa	4	3	5	3	3	7	4	3	3	3	4
ECOR5hum.Iowa	5	3	2	5	4	8	6	3	2	3	3
ECOR8hum.Iowa	5	3	3	0	3	7	3	3	3	3	0
ECOR10hum.NYork	3	3	5	5	4	7	4	3	3	3	4
ECOR11hum.Sweden	3	3	5	3	3	5	0	3	3	3	4
ECOR12hum.Sweden	4	3	5	3	3	6	5	4	3	3	4
ECOR26hum.Mass	2	3	4	2	3	7	3	2	3	3	3
ECOR41hum.Tonga	2	3	3	2	1	6	3	2	1	3	3
<i>Sylvilagus</i> sp.(80)	3	3	3	3	4	6	4	7	4	0	4
<i>Oryctolagus cuniculus</i> (2355)	2	4	3	2	3	7	3	3	3	3	4
<i>Oryctolagus cuniculus</i> (2356)	2	0	3	2	2	6	3	3	2	3	4
<i>Oryctolagus cuniculus</i> (2357)	2	5	3	2	4	8	3	3	2	3	4
<i>Romerolagus diazi</i> (2372)	2	3	3	2	3	6	3	3	2	3	4
<i>Romerolagus diazi</i> (2373)	2	3	3	2	3	7	3	3	2	3	4
<i>Romerolagus diazi</i> (2374)	2	3	3	2	3	7	3	3	2	3	4
<i>Dasypus</i> sp.(2395)	3	3	1	1	2	6	3	2	3	3	2
<i>Dasypus</i> sp.(2396)	1	3	1	1	2	7	3	2	3	4	2
<i>Nyctomys</i> sp.(69)	1	3	3	2	3	3	1	3	4	3	4
<i>Baiomys musculus</i> (75)	3	2	3	2	3	5	5	6	4	4	4
<i>Habromys</i> sp.(88)	4	3	3	2	4	4	5	5	5	4	4
<i>Habromys</i> sp.(89)	3	3	3	2	3	5	5	8	5	3	4
<i>Peromyscus</i> sp.(71)	3	2	3	2	3	3	4	4	5	3	4
<i>Peromyscus</i> sp.(72)	3	2	3	4	3	3	4	4	5	3	4
<i>Peromyscus</i> sp.(73)	0	0	2	2	3	3	4	8	2	3	4
<i>Peromyscus megalops</i> (95)	2	3	3	3	2	5	6	3	5	3	4
<i>Peromyscus boylii</i> (96)	2	3	4	3	3	5	6	5	6	3	4
<i>Peromyscus boylii</i> (97)	1	3	4	3	3	5	6	6	6	3	4
<i>Oryzomys</i> sp.(58)	2	5	3	2	3	3	6	3	6	4	4
<i>Oryzomys</i> sp.(59)	2	2	3	3	2	5	4	5	2	4	4
<i>Oryzomys</i> sp.(60)	2	2	3	3	2	5	4	6	6	3	5

<i>Sigmodon mascotensis</i> (67)	1	3	4	2	3	5	5	3	5	3	2
<i>Sigmodon mascotensis</i> (68)	2	3	3	2	3	3	5	3	5	3	5
<i>Neotoma albigula</i> (296)	4	2	4	2	3	7	7	5	4	3	4
<i>Neotoma albigula</i> (297)	3	2	3	2	2	8	4	3	5	3	2
<i>Neotoma albigula</i> (298)	6	2	3	2	2	8	4	3	5	3	3
<i>Zyomys argurus</i> (TA140)	2	3	3	2	3	7	3	3	2	3	4
<i>Zyomys argurus</i> (TA141)	4	3	2	2	3	7	3	3	3	3	3
<i>Zyomys argurus</i> (TA150)	4	4	1	2	3	7	2	3	2	2	4
<i>Rattus rattus</i> (TA201)	2	3	2	2	3	7	3	3	3	3	4
<i>Rattus rattus</i> (TA063)	3	4	3	2	3	7	2	3	2	2	3
<i>Rattus lutreolus</i> (TA053)	3	2	4	2	3	7	4	4	2	4	4
<i>Rattus lutreolus</i> (TA107)	3	4	4	2	3	6	4	3	3	3	4
<i>Rattus fuscipes</i> (TA216)	1	2	2	1	3	6	2	2	3	3	2
<i>Rattus fuscipes</i> (TA001)	4	4	3	2	3	7	4	3	3	4	4
<i>Pseudomys apodemoides</i> (TA093)	1	4	2	1	3	7	2	2	3	4	3
<i>Pseudomys apodemoides</i> (TA096)	4	3	1	2	3	7	4	3	3	3	4
<i>Mus musculus</i> (TA072)	2	3	3	2	3	7	3	3	2	3	4
<i>Mus musculus</i> (TA074)	2	4	2	2	3	7	3	3	3	3	4
<i>Mus musculus</i> (TA105)	3	4	2	3	3	7	4	3	2	2	3
<i>Mus musculus</i> (3490)	3	4	3	1	3	8	3	3	3	4	3
<i>Mus musculus</i> (3491)	2	4	2	1	3	8	3	2	3	4	3
<i>Mus musculus</i> (3492)	3	4	2	2	3	8	2	2	2	4	3
<i>Notomys mitchelli</i> (TA098)	2	4	3	2	3	7	3	3	3	3	4
<i>Notomys mitchelli</i> (TA100)	2	3	2	2	3	7	4	3	3	4	4
<i>Notomys mitchelli</i> (TA102)	2	3	2	1	4	7	2	2	3	3	2
<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i> (2079)	3	2	3	3	2	6	4	3	3	3	0
<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i> (2080)	3	3	3	3	2	6	4	3	3	3	0
<i>Liomys pictus</i> (76)	3	2	3	3	2	6	1	3	5	3	4
<i>Liomys pictus</i> (78)	3	2	3	4	2	6	1	3	5	4	4
<i>Liomys pictus</i> (19)	5	3	3	2	3	5	4	6	5	3	2
<i>Liomys pictus</i> (20)	5	3	3	4	3	3	4	6	5	3	2
<i>Liomys pictus</i> (21)	5	3	3	4	3	5	4	6	5	3	2
<i>Dipodomys merriami</i> (286)	3	2	3	3	3	6	3	5	5	2	3
<i>Dipodomys merriami</i> (287)	3	2	3	3	3	3	2	5	5	2	4
<i>Dipodomys merriami</i> (288)	3	2	3	3	3	3	3	5	5	2	4
<i>Perognathus penicillatus</i> (820)	2	2	3	2	3	3	7	5	4	3	4
<i>Perognathus penicillatus</i> (821)	2	2	3	2	3	3	7	4	4	3	0
<i>Perognathus penicillatus</i> (822)	2	2	3	2	3	3	7	5	4	3	0
<i>Tursiops truncatus</i> (2025)	2	3	3	3	3	6	4	5	3	2	4
<i>Tursiops truncatus</i> (2026)	2	3	3	4	3	6	4	5	3	2	4
<i>Tursiops truncatus</i> (2027)	2	3	2	4	3	6	4	5	3	2	4
<i>Felis concolor</i> (268)	3	3	2	3	2	6	4	3	1	3	2
<i>Felis concolor</i> (269)	3	3	3	2	1	6	5	3	3	3	0
<i>Felis catus</i> (8)	4	3	3	2	3	6	4	5	3	3	3
<i>Felis catus</i> (9)	4	3	3	2	3	3	3	5	3	3	4
<i>Felis catus</i> (10)	4	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3
<i>Panthera onca</i> (65)	3	3	4	2	2	7	5	3	6	4	3
<i>Panthera onca</i> (66)	3	3	4	2	2	7	5	3	6	4	3
<i>Panthera onca</i> (270)	3	3	4	2	3	3	3	4	6	3	3

<i>Lutra longicaudis</i> (1930)	2	2	3	0	3	6	3	3	2	3	3
<i>Lutra longicaudis</i> (1931)	2	3	3	3	3	6	3	4	3	3	4
<i>Lutra longicaudis</i> (1932)	2	3	2	2	3	6	2	3	2	3	4
<i>Bassariscus astutus</i> (84)	4	4	2	3	4	4	0	4	5	3	4
<i>Bassariscus astutus</i> (815)	2	4	3	2	3	5	4	3	4	4	2
<i>Bassariscus astutus</i> (816)	2	4	3	2	3	5	4	3	2	3	2
<i>Bassariscus astutus</i> (817)	2	4	2	2	3	3	4	2	2	3	2
<i>Nasua narica</i> (2060)	4	0	3	2	3	7	3	3	2	3	3
<i>Nasua narica</i> (2062)	2	3	3	2	3	7	2	2	3	3	3
<i>Procyon lotor</i> (2064)	5	2	5	3	3	7	3	4	2	4	0
<i>Procyon lotor</i> (2065)	5	2	5	3	3	7	3	4	2	4	0
<i>Procyon lotor</i> (2066)	5	2	3	2	3	5	2	2	2	0	0
<i>Canis latrans</i> (90)	3	4	4	3	4	4	4	3	2	4	1
<i>Canis latrans</i> (91)	3	4	4	3	3	5	4	4	3	4	1
<i>Canis latrans</i> (92)	3	4	4	3	3	5	4	4	3	4	1
<i>Canis latrans</i> (824)	3	3	3	2	3	6	4	3	1	4	4
<i>Canis latrans</i> (825)	3	3	3	3	3	6	4	3	3	3	4
<i>Canis latrans</i> (830)	0	3	3	4	3	3	4	5	3	3	3
<i>Canis familiaris</i> (1)	2	3	3	4	3	3	6	5	3	3	4
<i>Canis familiaris</i> (2)	2	3	4	4	3	5	6	4	2	3	4
<i>Canis familiaris</i> (3)	2	3	4	4	3	3	6	5	2	3	4
<i>Urocyon cinereoargenteus</i> (272)	4	4	4	3	1	1	0	3	3	3	1
<i>Urocyon cinereoargenteus</i> (299)	3	2	4	2	1	1	5	5	3	3	3
<i>Urocyon cinereoargenteus</i> (300)	4	4	4	2	3	5	5	5	3	3	4
<i>Urocyon cinereoargenteus</i> (301)	4	4	4	3	3	5	5	5	4	3	2
ECOR23elephant	3	4	4	2	3	7	4	3	3	3	4
<i>Trichechus manatus</i> (1735)	4	5	6	5	3	6	7	0	2	3	3
<i>Trichechus manatus</i> (1736)	4	5	6	3	3	6	7	0	2	3	3
<i>Tapirus bairdii</i> (1666)	4	3	4	2	3	6	5	0	5	3	4
<i>Tapirus bairdii</i> (1667)	0	3	4	2	3	8	5	5	5	3	4
<i>Tapirus bairdii</i> (1668)	0	3	4	2	3	8	4	4	5	4	3
<i>Tapirus bairdii</i> (1937)	2	1	3	0	3	6	3	4	2	3	4
<i>Tapirus terrestris</i> (2381)	4	3	4	3	2	7	4	4	3	4	4
<i>Tapirus terrestris</i> (2382)	4	3	4	3	3	5	5	3	3	4	3
<i>Equus caballus</i> (807)	3	2	4	2	3	5	4	0	5	3	4
<i>Equus caballus</i> (808)	4	2	3	2	3	5	3	0	6	3	4
<i>Equus caballus</i> (809)	3	2	3	2	3	6	4	0	5	3	4
ECOR45pig	2	3	3	2	3	7	2	2	3	3	3
<i>Tayassu tajacu</i> (2055)	1	3	3	2	3	7	3	3	3	3	3
<i>Odocoileus virginianus</i> (63)	2	2	3	2	2	7	3	3	2	3	1
<i>Odocoileus virginianus</i> (1984)	5	4	4	2	3	6	3	3	3	3	3
<i>Odocoileus virginianus</i> (1985)	3	3	4	2	2	6	4	0	3	3	4
ECOR27giraffe	2	3	3	2	3	7	3	2	3	3	3
<i>Bos taurus</i> (2376)	5	3	4	2	3	7	4	3	2	3	4
<i>Bos taurus</i> (2379)	6	2	3	3	2	7	3	4	3	3	0
ECOR33sheep	2	3	3	2	3	6	3	2	3	3	3
<i>Ovis aries</i> (1965)	4	3	3	2	4	6	3	3	3	3	3
<i>Ovis aries</i> (1966)	4	3	3	2	4	6	3	4	3	3	3
<i>Ovis aries</i> (1967)	3	3	5	3	2	5	5	0	3	3	4

<i>Sula nebowxi</i> (137)	4	7	5	4	3	0	2	3	2	4	3
<i>Aquila chrysaetus</i> (55)	5	6	6	2	4	0	1	2	2	3	3
<i>Aratinga canicularis</i> (48)	5	6	4	3	3	0	1	3	1	3	4
<i>Calothorax lucifer</i> (207)	6	2	4	2	2	0	3	3	2	2	4
<i>Amazilia beryllina</i> (225)	3	4	4	2	1	0	1	3	1	1	4
<i>Henicorhina leucophrys</i> (151)	4	3	5	3	3	0	2	5	2	3	3
<i>Basileuterus belli</i> (108)	4	3	4	2	3	0	1	2	2	1	3
<i>Atlapetes brunneinucha</i> (126)	3	2	5	3	3	0	2	3	2	3	4
<i>Passer domesticus</i> (345)	6	7	4	4	2	0	3	3	2	4	4
<i>Empidonax sp.</i> (161)	4	3	2	3	4	0	1	4	2	1	2

Table 2. The number of alleles and allelic diversity for 13 loci in 238 *E. coli* strains

Locus	No. of Alleles	h
ADH-1	9	0.736
ARK	6	0.617
G6PD	5	0.441
IDH	7	0.778
MDH	6	0.730
ME 1	4	0.531
ME 2	9	0.800
MPI	8	0.786
PEP	8	0.697
PGM	7	0.727
XDH-1	6	0.654
Average	6.8	0.682

Table 3. Genetic diversity and genetic differentiation in *Escherichia coli* from different geographical origins and different host phylogeny and diet.

Level of analysis	Origin of the strain	N	N alleles	H	G _{st} (±S.E.)	p
Geographic	Australia	41	4.18	0.566	0.047 (0.014)	0.00001
	Mexico*	131	6.82	0.705		
	ECOR	13	2.73	0.489		
Host order	Carnivora	29	4.55	0.653	0.075 (0.017)	0.00001
	Rodentia	48	4.82	0.657		
	Marsupialia	25	4.27	0.603		
	Primates	22	4.36	0.658		
	Chiroptera	14	4.18	0.665		
	Artiodactyla	11	3.09	0.511		
	Perisodactyla	10	3.18	0.608		
Aves	10	3.36	0.630			
Host diet	Omnivore	66	5.45	0.646	0.025 (0.007)	0.126
	Granivore	28	4.91	0.645		
	Carnivore	12	4.27	0.671		
	Herbivore	50	5.82	0.645		
	Insectivore	23	4.36	0.672		
Host diet	Mexico	110	6.74	0.698	0.044 (0.012)	0.0052
Host diet	Australia	41	4.18	0.566	0.01 (0.01)	1

Australia	Rodents	16	2.91	0.515		
	Marsupials	19	3.55	0.552	0.036 (0.011)	0.184
Rodents	Australia	16	2.91	0.515		
	Mexico	30	4.73	0.639	0.098 (0.03)	0.00001

^a The Mexican sample includes samples from 10 birds

Table 4. Variation in sugar utilization among *Escherichia coli* strains as a function of host taxonomic group.

Host Group ^a	N	Percent Utilization													Total Sugars
		Ado	Ara	Dul	Ino	Mal	Man	Raf	Ram	Sal	Sor	Suc	Tre	Xyl	
Aves	10	20	10	50	40	80	80	40	90	50	100	80	100	90	13
Artiodactyla	12	0	0	8	0	100	25	50	75	0	58	33	91	75	9
Carnivora	33	6	0	39	0	100	76	67	91	0	91	70	100	100	10
Cetacea	3	33	0	0	0	100	0	0	100	0	100	100	100	100	7
Chiroptera	12	29	0	79	29	93	100	79	93	50	86	100	100	93	12
Insectivora	2	50	0	0	0	100	100	50	33	50	50	50	100	50	10
Lagomorpha	7	14	43	0	0	100	100	43	57	0	100	43	100	100	10
Marsupialia	28	4	4	11	11	100	86	39	86	4	89	71	100	100	13
Montremata	5	0	0	0	0	100	0	0	80	0	100	60	100	100	6
Perissodactyla	9	33	0	0	0	100	56	33	67	0	89	22	100	78	9
Primates	24	5	5	14	0	100	54	50	68	0	55	64	91	91	11
Rodentia	51	10	4	10	2	90	64	50	78	10	84	70	90	90	13
b		*	***	***	***	ns	***	*	ns	***	***	**	*	ns	***
ECOR	13			32				39	81	0	39	11			

^a does not include the single isolate from an elephant and a dessert turtle.

^b χ^2 analysis included only those host groups where N>10,

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

Table 5. Overall frequency of antibiotic resistance in *E. coli* and comparison of frequencies between strains isolated from Australia and México.

Trait	Percent Positive			χ^2
	All Strains	México (N=135)	Australia (N=46)	
Ampicillin	13.4	18.5	5.8	*
Chloramphenicol	0.8	0.6	0	ns
Streptomycin	23.9	32.6	5.8	***
Kanamycin	2.1	3.3	0	ns
Neomycin	3.4	2.6	0	ns
Tetracycline	5.9	7.8	0	*

† Significance levels as presented in Table 4

1
2 Table 6. Frequency of dark colonies in rainbow agar in *E. coli* strains isolated from various wild hosts.

Country	Group	N	%Positive
México	Artiodactyla	11	8
	Carnivora	29	47
	Chiroptera	13	61
	Perissodactyla	10	70
	Primates	22	32
	Rodentia	30	67
Australia	Marsupialia	19	35
	Rodentia	18	67

3
4
5
6 Table 7. The association of various phenotypic traits in *E. coli* isolated in México[‡].
7

	Ara	Ado	Dul	Ino	Mal	Man	Raf	Rha	Sal	Sor	Suc	Tre	Xyl	Amp	Str	Kan	Neo
Ado	0																
Dul	0	0															
Ino	0	p†	p														
Mal	0	0	0	p													
Man	0	0	0	0	0												
Raf	0	0	p	0	0	0											
Rha	0	0	p	0	0	0	0										
Sal	0	p	p	p	0	0	-	0									
Sor	0	0	0	0	a	0	0	a	0								
Suc	0	0	p	0	0	0	p	0	-	0							
Tre	0	0	0	0	a	a	0	0	0	0	0						
Xyl	0	0	0	0	a	0	0	a	0	a	a	a					
Amp	p	p	p	0	0	-	0	0	p	0	0	0	0				
Str	0	0	0	0	0	-	0	0	p	0	0	0	0	p			
Kan	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	p	0		
Neo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	p	0	p	
Tet	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	p	p	p

8
9 ‡ Only those associations found to be significant at the p<0.01 level are presented.

10 † p denotes the joint presence of a rare trait, a the joint absence of a common trait, and - the negative
11 association of two traits.

1
2
3
4
5
6
7
8
9

Table 8. Antibiotic resistance and plasmid number in *Escherichia coli* isolated from different sources in relation to their proximity to human environment.

Country	Proximity to human environment *	Source	n	Average of total plasmids (±S.E.)	Average number of antibiotic resistance (±S. E.)
Australia	More than 100 miles from city	Wild mammals	46	0.45 (0.09)	0.19 (0.01)
Mexico	More than 100 miles from city	Wild mammals	86	1.20 (0.12)	0.58 (0.06)
Mexico	Less than 100 miles from city	Wild mammals	14	1.55 (0.42)	0.42 (0.09)
Mexico	Zoo	Wild mammals	9	1.86 (0.45)	0.33 (0.17)
Mexico	Cities	Domestic mammals	23	2.09 (0.42)	0.47 (0.08)
Mexico and USA	Cities	ECOR and non-pathogenic	14	2.62 (0.65)	0.66 (0.09)

* 10 strains were excluded from the analysis because field data were not complete.

Appendix 1. The host characteristics and geographical origins of *Escherichia coli* from wild mammals and birds.

Host species (strain number)	Order	Diet	Proximity to humans	Country
<i>Gopherus flavomarginatus</i> (57)	Reptilia	Herbivore	Wild	Mexico
<i>Tachyglossus aculeatus</i> (TA309-311)	Monotremata	Insects	Wild	Australia
<i>Ornithorhynchus anatinus</i> (TA319-320)	Monotremata	Insects	Wild	Australia
<i>Marmosa canescens</i> (64)	Marsupialia	Omnivore	Wild	Mexico
<i>Didelphis virginiana</i> (79, 2048-2050)	Marsupialia	Omnivore	Wild	Mexico
<i>Philander opossum</i> (1698)	Marsupialia	Omnivore	Wild	Mexico
<i>Cercatus concinnus</i> (TA002)	Marsupialia	Omnivore	Wild	Australia
<i>Antechinus bellus</i> (TA148)	Marsupialia	Insects	Wild	Australia
<i>Antechinus flavipes</i> (TA237)	Marsupialia	Insects	Wild	Australia
<i>Antechinus swainsonii</i> (TA153)	Marsupialia	Insects	Wild	Australia
<i>Dasyurus geoffroi</i> (TA124)	Marsupialia	Carnivore	Wild	Australia
<i>Dasyurus hallucatus</i> (TA260)	Marsupialia	Carnivore	Wild	Australia
<i>Dasyurus maculatus</i> (TA036)	Marsupialia	Carnivore	Wild	Australia
<i>Sminthopsis macroura</i> (TA244)	Marsupialia	Insects	Wild	Australia
<i>Sminthopsis murina</i> (TA151)	Marsupialia	Insects	Wild	Australia
<i>Sminthopsis delichura</i> (TA120)	Marsupialia	Insects	Wild	Australia
<i>Bettongia penicillata</i> (TA115)	Marsupialia	Herbivore	Wild	Australia
<i>Lagorchestes hirsutus</i> (TA263)	Marsupialia	Herbivore	Wild	Australia
<i>Macropus eugenii</i> (TA052)	Marsupialia	Herbivore	Wild	Australia
<i>Macropus fuliginosus</i> (TA004)	Marsupialia	Herbivore	Wild	Australia
<i>Macropus giganteus</i> (TA057)	Marsupialia	Herbivore	Wild	Australia
<i>Petrogale lateralis</i> (TA135)	Marsupialia	Herbivore	Wild	Australia
<i>Perameles nasuta</i> (TA020)	Marsupialia	Insects	Wild	Australia
<i>Petaurus breviceps</i> (TA243)	Marsupialia	Omnivore	Wild	Australia
<i>Pseudocheirus peregrinus</i> (TA022)	Marsupialia	Herbivore	Wild	Australia
<i>Trichosurus vulpecula</i> (TA038)	Marsupialia	Omnivore	Wild	Australia
<i>Phascolarctos cinereus</i> (TA003)	Marsupialia	Herbivore	Wild	Australia
<i>Sorex</i> sp.(238, 240)	Insectivora	Insects	Wild	Mexico
<i>Tachyglossus aculeatus</i> (TA051)	Chiroptera	Insects	Wild	Australia
<i>Tadarida brasiliensis</i> (259, 261, 266)	Chiroptera	Insects	Wild	Mexico

<i>Desmodus rotundus</i> (25, 26)	Chiroptera	Blood.	Close to city	Mexico
<i>Leptonycteris nivalis</i> (31, 33, 36)	Chiroptera	Nectar	Close to city	Mexico
<i>Carollia brevicauda</i> (40, 41, 42)	Chiroptera	Nectar	Wild	Mexico
<i>Nyctophilus geoffroyi</i> (TA225)	Chiroptera	Insects	Wild	Australia
<i>Alouatta palliata</i> (1638-1639)	Primates	Herbivore	Wild	Mexico
<i>Alouatta palliata</i> (1731)	Primates	Herbivore	Zoo	Costa Rica
<i>Alouatta pigra</i> (1699)	Primates	Herbivore	Wild	Mexico
<i>Ateles geoffroyi</i> (1669)	Primates	Herbivore	Wild	Mexico
<i>Papio</i> (B184-430)	Primates	Omnivore	Wild	Africa
ECOR7 Orangutan	Primates	Omnivore	Zoo	EUA
<i>Homo sapiens</i> (45-47)	Primates	Omnivore	City	Mexico
ECOR1hum.Iowa	Primates	Omnivore	City	EUA
ECOR5hum.Iowa	Primates	Omnivore	City	EUA
ECOR8hum.Iowa	Primates	Omnivore	City	EUA
ECOR10hum.NYork	Primates	Omnivore	City	EUA
ECOR11hum.Sweden	Primates	Omnivore	City	Europe
ECOR12hum.Sweden	Primates	Omnivore	City	Europe
ECOR26hum.Mass	Primates	Omnivore	City	EUA
ECOR41hum.Tonga	Primates	Omnivore	City	Australia
<i>Sylvilagus</i> sp.(80)	Lagomorpha	Herbivore	Wild	Mexico
<i>Oryctolagus cuniculus</i> (2355-2357)	Lagomorpha	Herbivore	Wild	Mexico
<i>Romerolagus diazi</i> (2372-2374)	Lagomorpha	Herbivore	Close to city	Mexico
<i>Dasyopus</i> sp.(2395-2396)	Xerantha	Omnivore	Wild	Mexico
<i>Nyctomys</i> sp.(69)	Rodentia	Granivore	Wild	Mexico
<i>Baiomys musculus</i> (75)	Rodentia	Granivore	Wild	Mexico
<i>Habromys</i> sp.(88-89)	Rodentia	Granivore	Close to city	Mexico
<i>Peromyscus</i> sp.(71-73)	Rodentia	Granivore	Wild	Mexico
<i>Peromyscus megalops</i> (95)	Rodentia	Granivore	Wild	Mexico
<i>Peromyscus boylii</i> (96, 97)	Rodentia	Granivore	Wild	Mexico
<i>Oryzomys</i> sp.(58-60)	Rodentia	Granivore	Wild	Mexico
<i>Sigmodon mascotensis</i> (67, 68)	Rodentia	Omnivore	Wild	Mexico
<i>Neotoma albigula</i> (296-298)	Rodentia	Omnivore	Wild	Mexico
<i>Zyomys argurus</i> (TA140, 141, 150)	Rodentia	Granivore	Wild	Australia
<i>Rattus rattus</i> (TA201, 063)	Rodentia	Omnivore	Close to city	Australia
<i>Rattus lutreolus</i> (TA053, 107)	Rodentia	Omnivore	Wild	Australia
<i>Rattus fuscipes</i> (TA 001, 216)	Rodentia	Omnivore	Wild	Australia
<i>Pseudomys apodemoides</i> (TA093, 096)	Rodentia	Herbivore	Wild	Australia
<i>Mus musculus</i> (TA072, 074, 105)	Rodentia	Omnivore	City	Australia
<i>Mus musculus</i> (3490-3492)	Rodentia	Omnivore	City	Mexico
<i>Notomys mitchelli</i> (TA098, 100, 102)	Rodentia	Granivore	Wild	Australia
<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i> (2079-2080)	Rodentia	Herbivore	Zoo	Venezuela
<i>Liomys pictus</i> (76, 78)	Rodentia	Granivore	Wild	Mexico
<i>Liomys pictus</i> (19-21)	Rodentia	Granivore	Zoo	Mexico
<i>Dipodomys merriami</i> (286-288)	Rodentia	Granivore	Wild	Mexico
<i>Perognathus penicillatus</i> (820-822)	Rodentia	Granivore	Wild	Mexico
<i>Tursiops truncatus</i> (2025-2027)	Cetacea	Carnivore	Wild	Mexico
<i>Felis concolor</i> (268, 269)	Carnivora	Carnivore	Wild	Mexico
<i>Felis catus</i> (8-10)	Carnivora	Omnivore	Domestic	Mexico
<i>Panthera onca</i> (65, 66, 270)	Carnivora	Carnivore	Wild	Mexico

<i>Lutra longicaudis</i> (1930-1932)	Carnivora	Carnivore	Zoo	Mexico
<i>Bassariscus astutus</i> (84, 815-817)	Carnivora	Omnivore	Wild	Mexico
<i>Nasua narica</i> (2060, 2062)	Carnivora	Omnivore	Wild	Mexico
<i>Procyon lotor</i> (2064-2066)	Carnivora	Omnivore	Wild	Mexico
<i>Canis latrans</i> (90-92, 824, 825, 830)	Carnivora	Omnivore	Wild	Mexico
<i>Canis familiaris</i> (1-3)	Carnivora	Omnivore	Domestic	Mexico
<i>Urocyon cinereoargenteus</i> (272, 299-301)	Carnivora	Omnivore	Wild	Mexico
ECOR23elephant	Paquiderma	Herbivore	Zoo	EUA
<i>Trichechus manatus</i> (1735, 1736)	Sirenia	Herbivore	Wild	Mexico
<i>Tapirus bairdii</i> (1666-1668, 1937)	Perissodactyl	Herbivore	Wild	Mexico
<i>Tapirus terrestris</i> (2381-2382)	Perissodactyl	Herbivore	Wild	Venezuela
<i>Equus caballus</i> (807-808)	Perissodactyl	Herbivore	Domestic	Mexico
ECOR45pig	Perissodactyl	Herbivore	Domestic	Asia
<i>Tayassu tajacu</i> (2055)	Artiodactyl	Herbivore	Wild	Mexico
<i>Odocoileus virginianus</i> (63, 1984, 1985)	Artiodactyl	Herbivore	Wild	Mexico
ECOR27giraffe	Artiodactyl	Herbivore	Zoo	EUA
<i>Bos taurus</i> (2376, 2379)	Artiodactyl	Herbivore	Domestic	Mexico
ECOR33sheep	Artiodactyl	Herbivore	Domestic	EUA
<i>Ovis aries</i> (1965-1967)	Artiodactyl	Herbivore	Close to city	Mexico
<i>Sula nebowxi</i> (137)	Aves	Carnivore	Wild	Mexico
<i>Aquila chrysaetus</i> (55)	Aves	Carnivore	Wild	Mexico
<i>Aratinga canicularis</i> (48)	Aves	Frugivore	Wild	Mexico
<i>Calothorax lucifer</i> (207)	Aves	Nectar	Wild	Mexico
<i>Amazilia beryllina</i> (225)	Aves	Nectar	Wild	Mexico
<i>Henicorhina leucophrys</i> (151)	Aves	Insects	Wild	Mexico
<i>Basileuterus belli</i> (108)	Aves	Insects	Wild	Mexico
<i>Atlapetes brunneinucha</i> (126)	Aves	Insects	Wild	Mexico
<i>Passer domesticus</i> (345)	Aves	Granivore	Wild	Mexico
<i>Empidonax</i> sp.(161)	Aves	Insects	Wild	Mexico

1

Apéndice 2

THE PRESENCE OF THE PLASMIDIC GENES *per*, *bfp* AND EAF AS POSSIBLE MARKERS FOR THE EPIDEMIOLOGICAL SURVEY OF EPEC STRAINS: A STUDY OF *Escherichia coli* FROM WILD MAMMALS AND HUMANS.

Rocha, M.¹, V. Souza¹, A. Navarro² and A. Cravioto³.

¹ Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Apartado postal 70-275, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., CP 04510, México.

² Facultad de Medicina, Departamento de Salud Pública, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., CP 04510, México.

³ Facultad de Medicina, Director, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., CP 04510, México.

ABSTRACT

PCR amplification of three plasmidic genes involved in A/E lesions were performed in 142 strains of *E. coli* from wild mammals and human hosts. The three genes together were only amplified in 71% of EPEC. The *per* gene was prevalent in 100% of EPEC and 86% of EHEC.

Escherichia coli has been recognized as an important pathogen that causes diarrhea in humans. It has been classified into five different categories on the basis of pathogenic mechanisms: enterotoxigenic (ETEC), enteropathogenic (EPEC), enteroinvasive (EIEC), enterohemorrhagic (EHEC), and enteroadherent (13). Since EPEC produces acute and persistent infantile diarrhea, the genes and mechanisms involved in its virulence have been studied extensively (3, 4, 13).

It is known that several chromosomal and plasmidic genes are required to initiate the full virulence of EPEC leading to the pathology known as “attaching and effacing” (A/E) lesion (16). The chromosomal genes are part of a pathogenicity island known as LEE locus (9, 14, 15), whilst the plasmidic genes are found in a 60 MDa plasmid called EAF (“EPEC adherence factor”) (7, 17).

The role of plasmidic genes in the pathogenesis of EPEC, was first demonstrated by Baldini et al. (1). Nataro et al. (17) observed a decrease in virulence of the EPEC strains which lost the EAF plasmid. Since then, many plasmidic genes involved in EPEC pathogenesis have been identified (4, 6, 7, 8, 10, 11, 23).

The first step in EPEC infection is the characteristic adherence to epithelial cells in microcolonies, a pattern termed as localized adherence (LA) (2, 20) with the genes responsible for this phenotype being encoded in the EAF plasmid (7). LA is produced by rope-like bundles of filaments which emanate from the bacterial surface, and are termed bundle forming pilus (BFP) (7). Purified BFP protein is composed of a single polypeptide subunit (*bfpA*), but downstream *bfpA* there exists a complete cluster of at least 12 open reading frames that code for proteins required for the pilus biogenesis (21, 22). Tobe et al. (23) have reported a region (*bftTVW*), which increases the transcription of the type IV fimbrial gene *bfpA*. This plasmidic region is almost identical to the previously described *per* (plasmid encoded regulatory region) (8), which appears to be a global regulator of virulence genes in EPEC. The gene *perA* increases the transcription of several genes in the LEE locus, such as the protein secretion system genes (*sep*) and the secreted protein *espB*, that are required to trigger host signal transduction pathways resulting in the effacement of microvilli and cytoskeletal rearrangements (4, 12). This plasmidic regulatory system also controls the late expression of the gene of the LEE locus for intimin (*eaeA*), which enables the bacteria to have a close relationship with its host (4, 8, 11, 12).

However, *E. coli* is not just a harmful bacteria, since most of the time it is a common member of the commensal microbial community of warm blooded animals. This fact can be useful, from an ecological point of view, to explore the evolution of pathogenicity in this bacteria.

Horizontal gene transfer appears to be a major source of virulence determinants, and some authors have suggested that non-pathogenic bacteria become pathogenic when they acquire plasmids or other mobile elements which harbour the virulent traits (5). However, the actual origin of these novel genes remains unclear, and it is unknown whether the genes come from distantly related bacteria other than *E. coli*, or if they originate from closely related bacteria, even *E. coli* from different hosts.

The purpose of the present study was to analyze a wide sample of *E. coli* from wild mammals in Mexico (18) as a possible reservoir of plasmidic pathogenic determinants. Strains of wild and captive mammals from different localities in Mexico were collected, and a total of 98 strains of *E. coli* were isolated. The sample represents the vast biological diversity of Mexico since strains were obtained from 38 mammalian genus representing 22 families and 10 mammalian orders (including Didelphimorphia, Artiodactyla, Perissodactyla, Chiroptera, Rodentia, Carnivora, Cetacea, Sirenia, Lagomorpha and Primates) (Table 1). In the present analysis, we also included 37 pathogenic strains from different groups (EPEC, EHEC, ETEC and UTI, which were determined according to their serotype), and 7 non-pathogenic strains from human hosts were also included (Table 2).

PCR amplification was performed in order to amplify three plasmidic regions involved in attaching and effacing lesion. The specific primers used to amplify a fragment of the *per* and *bfpA* genes were: 5'-TAAGAAACAAGAAAGAATT-CAC-3' and 5'-CATTGCAAATAAGATTTT-3' for *per*, and 5'-CTCACTTCCGGTGCTAGGAG-3' and 5'-TGGTTATTTCAATGTATAAAATACTTC-3' for *bfpA*.

Conditions for the PCR were as follows: 96°C for 40 secs. to denature DNA, 60°C for 1 min. to anneal the primers (high annealing temperature was chosen to ensure specificity of the reaction) and 72°C for 1 min. to extend the strand. These conditions were repeated for 30 cycles using a Perkin-Elmer PCR reagent system and DNA thermal cycler 480 according to manufacturer's instructions.

The third amplified region was the EAF probe, previously reported to be highly conserved among EPEC strains (6). Even though the actual function of the EAF sequence still remains unknown, the high specificity and sensitivity of the probe allowed a good assay for the fast diagnosis of EPEC infections (6,10). PCR for EAF probe was performed as described by Franke et al. (6).

The PCR products were run in an agarose gel and stained with ethidium bromide. The three fragments together were exclusively amplified in 71% of EPEC, and only the *per* gene was amplified in all EPEC strains (Tables 1 and 2). Even though 86% of EHEC strains harbour at least one of the fragments, none of them contained the three fragments together. All wild type strains gave negative results for the three plasmidic genes, which was a surprising result because there is evidence that some of these wild type strains do harbour pathogenic characters from chromosomal genes (19). It was concluded therefore, that in the current description of enteropathogenic *E. coli*, the plasmidic genes that were studied are not part of the genetic background of *E. coli* found in the wild.

There is evidence that some pathogens evolve acquiring large segments of information by means of horizontal gene transfer (5). Findings support the idea that the genes analyzed were acquired from another source other than *E. coli*.

Previous evidence demonstrated that within the EAF probe, a small region showed 82.8% homology to an insertion sequence of *Shigella sonnei* (IS630) and the nucleotidic sequence of *perD* showed more than 70% identity with transposon Tn7 and IS630 (6, 8, 10). Although the EAF fragment and the *per* sequences do not overlap, the homology to the same insertion sequence suggests that both genes could be part of the same mobile genetic element. Additionally, the G+C content of *perABC* is 29.6%, which is markedly different from that of *E. coli*.

The alternative explanation of the similarity with *Shigella*, is that these genes were originated in an ancestral Enterobacteria. Nevertheless, a phylogeny of the strains was constructed (data not shown) and pathogenic strains which harbour plasmidic genes were found through all the clades of the tree and not in a particular ancestral clade. It suggests that the *per* cluster and other plasmidic traits were acquired by an EPEC-like strain by means of horizontal transfer.

Horizontal transfer has become an important field in pathogenicity evolution research, because of the selective advantage of carrying virulence determinants in mobile elements allows them to spread rapidly and efficiently (5). In the evolution of EPEC, the transfer of the EAF plasmid may have an additional impact in epidemiological surveys. Plasmidic genes and more specifically *per*, was found to be a good EPEC marker due to its persistence in EPEC strains, and by applying an easy technique such as PCR good predictions of an EPEC strain can be obtained. If ambiguities persist researchers can probe other plasmidic regions such as *bfp* or EAF probe to corroborate their results.

Acknowledgments

This work was supported by grants IN208995 from DGAPA-UNAM and 3675-N from CONACyT. Acknowledgment is given to J.L.Puente for providing interesting suggestions and some of the oligonucleotides, Aldo Valera and Antonio Cruz for technical support, L. E. Eguiarte and J. Golubov for reading the manuscript.

REFERENCES:

1. Baldini, M. M., J. B. Kaper, M. M. Levine, D. C. Candy, and H. W. Moon. 1983. Plasmid-mediated adhesion in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Pediatr. Gastroenterol.* **2**:534-538.
2. Cravioto, A., R. J. Gross, S. M. Scotland, and B. Rowe. 1979. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr. Microbiol.* **3**:95-99.
3. Donnenberg, M. S., and J. B. Kaper. 1992. Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **60**:3953-3961.
4. Donnenberg, M. S., J. B. Kaper, and B. B. Finlay. 1997. Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. *Trends. Microbiol.* **5**:109-114.
5. Falkow, S. 1996. The evolution of pathogenicity in *Escherichia*, *Shigella* and *Salmonella*, p. 2723-2729. *In* F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
6. Franke, J., S. Franke, H. Schmidt, A. Schwarzkopf, L. H. Wieler, G. Baljer, L. Beutin, and H. Karch. 1994. Nucleotide sequence analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence factor probe and developing of PCR for rapid detection of EPEC harboring virulence plasmids. *J. Clin. Microbiol.* **32**:2460-2463.
7. Girón, J. A., A. S. Y. Ho and G. K. Schoolnik. 1991. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science.* **254**:710-713.
8. Gómez-Duarte, O. G., and J. B. Kaper. 1995. A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **63**:1767-1776.
9. Jarvis, K. G., Giron, J.A., Jerse, A. E., McDaniel, T. K., Donnenberg, M. S., and J. B. Kaper. 1995. Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a specialized secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**:7996-8000.
10. Jerse, A. E., W. C. Martin, J. E. Galen, and J. B. Kaper. 1990. Oligonucleotide probe for detection of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence factor of localized adherent EPEC. *J. Clin. Microbiol.* **28**:2842-2844.
11. Kaper, J. B., and O. G. Gómez-Duarte. 1997. The *per* regulator of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Molec. Microbiol.* **63**:179-181.
12. Kenny, B., A. Abe, M. Stein, and B. B. Finlay. 1997. Enteropathogenic *Escherichia coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract. *Infect. Immun.* **65**:2606-2612.
13. Levine, M. M. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* **155**:377-389.
14. McDaniel, T. K., Jarvis, K. G., Donnenberg, M. S., and J. B. Kaper. 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**:1664-1668.

15. **McDaniel, T. K., and J. B. Kaper.** 1997. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. *Mol. Microbiol.* **23**:399-407.
16. **Moon, H. W., S. C. Whipp, R. A. Argenzio, M. M. Levine, and R. A. Giannella.** 1983. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect. Immun.* **41**:1340-1351.
17. **Nataro, J. P., K. O. Maher, P. Mackie and J. B. Kaper.** 1987. Characterization of plasmids encoding adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **55**:2370-2377.
18. **Rocha, M.** 1996. Undergraduate thesis. Universidad Nacional Autónoma de México.
19. **Sandner, L., L. E. Eguiarte, A. Navarro, O. Rodríguez, A. Cravioto, and V. Souza.** Unpublished data.
20. **Scaletsky, Y. C. A., M. L. M. Silva, and L. R. Trabulsi.** 1984. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect. Immun.* **45**:534-536.
21. **Sohel, I., J. L. Puente, S. Ramer, D. Bieber, C. Wu, and G. K. Schoolnik.** 1996. Enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a gene cluster coding for bundle forming pilus morphogenesis. *J. Bacteriol.* **178**:2613-2628.
22. **Stone, K. D., H. Zhang, L. K. Carlson, and M. S. Donnenberg.** 1996. A cluster of fourteen genes from enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient for the biogenesis of a type IV pilus. *Mol. Microbiol.* **20**:325-337.
23. **Tobe, T., G. K. Schoolnik, I. Sohel, V. H. Bustamante, and J. L. Puente.** 1996. Cloning and characterization of *bfpTVW*, genes required for the transcriptional activation of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **21**:963-975.

Table 1. List of strains and PCR results

<i>Number of strains</i>	<i>Hosts</i>	<i>Families</i>	<i>Order</i>	<i>per</i> **	<i>bfp</i> **	<i>EAF</i> **
7	Cow, sheep, white tailed deer, peccary	Bovidae, Cervidae, Tayassuidae	Artiodactyla	0	0	0
27	Dog, coyote, gray fox, cat, cougar, jaguar, otter, raccoon, coati	Canidae, Felidae, Mustelidae, Procyonidae	Carnivora	0	0	0
6	Fin whale, bottlenose dolphin	Balaenopteridae, Delphinidae	Cetacea	0	0	0
13	Different bats	Molossidae, Phyllostomidae, Vespertilionidae	Chiroptera	0	0	0
9	Cotton tailed rabbit, european rabbit, volcano rabbit	Leporidae	Lagomorpha	0	0	0
2	Four eyed opossum, large american opossum.	Didelphidae	Didelphimorphia	0	0	0
6	Horse, tapir	Equidae	Perissodactyla	0	0	0
46	Human, howler monkey	Hominidae, Cebidae	Primates	25	13	14
20	Kangaroo rat, spiny pocket mice, capybara, pygmy mice, deer mice, vesper rat, rice rat, deer mice	Heteromyidae, Hydrochaeridae, Muridae	Rodentia	0	0	0
2	Manatee	Trichechidae	Sirenia	0	0	0
4	Armadillo, lesser anteater	Dasypodidae, Myrmecophagidae	Xenarthra	0	0	0

** Number of strains that gave positive result in PCR amplification.

Table 2. PCR results for human strains

<i>Type of strain</i>	<i>Number of strains</i>	<i>Negative for the three genes</i>	<i>Positive for the three genes</i>	<i>Positive only for per and EAF</i>	<i>Positive only for per and bfp.</i>	<i>Positive only for per</i>
EPEC	14	0	9	1	2	2
EHEC	14	3	0	4	2	5
EIEC	2	2	0	0	0	0
ETEC	3	3	0	0	0	0
UTI	4	4	0	0	0	0
Non-pathogenic	7	7	0	0	0	0

Apéndice 3

Resultados del número y clasificación por tamaños de las bandas obtenidas

Num. cepario	Hospedero (Tipo de patógeno en cepas humanas o ambiente)	Num. de bandas	Tamaño (Kb)						Con-tacto	Dieta	Orden
			>100	100-50	50-25	25-10	10-5	<5			
1	<i>Canis familiaris</i>	5	0	1	1	0	3	0	3	1	8
2	<i>Canis familiaris</i>	1	0	1	0	0	0	0	3	1	8
3	<i>Canis familiaris</i>	1	0	1	0	0	0	0	3	1	8
8	<i>Felis catus</i>	1	0	1	0	0	0	0	3	1	8
9	<i>Felis catus</i>	5	0	1	1	0	3	0	3	1	8
10	<i>Felis catus</i>	6	1	1	1	0	3	0	3	1	8
19	<i>Liomys pictus</i>	5	2	1	1	0	0	1	2	4	6
20	<i>Liomys pictus</i>	3	0	1	1	0	0	1	2	4	6
21	<i>Liomys pictus</i>	2	0	0	0	0	1	1	2	4	6
25	<i>Desmodus rotundus</i>	1	0	1	0	0	0	0	1	8	2
26	<i>Desmodus rotundus</i>	1	0	1	0	0	0	0	1	8	2
31	<i>Leptonycteris nivalis</i>	1	0	1	0	0	0	0	1	9	2
33	<i>Leptonycteris nivalis</i>	5	0	1	1	0	2	1	1	9	2
36	<i>Leptonycteris nivalis</i>	7	0	0	1	2	2	2	1	9	2
40	<i>Carollia brevicauda</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	6	2
41	<i>Carollia brevicauda</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	6	2
42	<i>Carollia brevicauda</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	6	2
45	<i>Homo sapiens</i>	3	1	0	0	0	1	1	4	1	6
46	<i>Homo sapiens</i>	2	1	0	0	1	0	0	4	1	6
47	<i>Homo sapiens</i>	3	1	0	0	0	1	1	4	1	6
58	<i>Oryzomys</i>	2	0	1	0	0	0	1	0	4	6
59	<i>Oryzomys</i>	1	0	0	0	0	0	1	0	4	6
60	<i>Oryzomys</i>	2	0	1	0	0	0	1	0	4	6
63	<i>Odocoileus virginianus</i>	2	0	0	0	0	1	1	0	2	10
64	<i>Marmosa canescens</i>	2	0	0	0	0	1	1	0	1	1
65	<i>Panthera onca</i>	2	0	0	0	0	1	1	0	3	8
66	<i>Panthera onca</i>	2	0	0	0	0	1	1	0	3	8
67	<i>Sigmodon mascotensis</i>	2	0	0	0	1	1	0	0	1	6
68	<i>Sigmodon mascotensis</i>	2	0	1	0	0	1	0	0	1	6
69	<i>Nyctomys sp</i>	2	0	1	0	1	0	0	0	2	6
71	<i>Peromyscus perfulvus</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	4	6
72	<i>Peromyscus perfulvus</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	4	6
73	<i>Peromyscus perfulvus</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	4	6
75	<i>Baiomys sp</i>	2	1	0	0	0	0	1	0	1	6
76	<i>Liomys pictus</i>	2	1	0	0	1	0	0	0	4	6
77	<i>Liomys pictus</i>	1	0	0	0	1	0	0	0	4	6
78	<i>Liomys pictus</i>	1	0	0	1	0	0	0	0	4	6
79	<i>Didelphis virginiana</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
80	<i>Sylvilagus sp</i>	1	0	1	0	0	0	0	1	2	5
81	<i>Sylvilagus sp</i>	6	1	2	1	1	1	0	1	2	5
82	<i>Sylvilagus sp</i>	1	0	1	0	0	0	0	1	2	5
84	<i>Bassariscus astutus</i>	1	0	0	0	0	0	1	0	1	8
85	<i>Myotis velifer</i>	4	1	0	0	0	0	3	0	5	2
88	<i>Habromys</i>	2	0	0	0	0	1	1	1	4	6
89	<i>Habromys</i>	2	0	0	0	0	1	1	1	4	6
90	<i>Canis latrans</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	8
91	<i>Canis latrans</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	8

Apéndice 3 (continuación)

Num. cepario	Hospedero (Tipo de patógeno en cepas humanas o ambiente)	Num. de bandas	Tamaño (Kb)						Con-tacto	Dieta	Orden
			>100	100-50	50-25	25-10	10-5	<5			
92	<i>Canis latrans</i>	4	2	0	0	0	0	2	0	1	8
95	<i>Peromyscus megalops</i>	3	0	0	0	0	0	3	0	4	6
96	<i>Peromyscus boylii</i>	2	0	0	0	0	0	2	0	4	6
97	<i>Peromyscus boylii</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	4	6
259	<i>Tadarida brasiliensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	5	2
261	<i>Tadarida brasiliensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	5	2
266	<i>Tadarida brasiliensis</i>	2	1	0	0	0	0	1	0	5	2
268	<i>Felis concolor</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	3	8
269	<i>Felis concolor</i>	2	1	1	0	0	0	0	0	3	8
270	<i>Panthera onca</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	3	8
271	<i>Panthera onca</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	3	8
272	<i>Urocyoncinereoar-genteus</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	1	8
273	<i>Canis latrans</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	1	8
275	<i>Antrozous pallidus</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	5	2
286	<i>Dipodomys merriami</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	4	6
287	<i>Dipodomys merriami</i>	2	1	0	0	1	0	0	0	4	6
288	<i>Dipodomys merriami</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	4	6
296	<i>Neotoma sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	6
297	<i>Neotoma sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	6
298	<i>Neotoma sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	6
299	<i>Urocyoncinereoar-genteus</i>	4	2	0	0	0	1	1	0	1	8
300	<i>Urocyoncinereoar-genteus</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	1	8
301	<i>Urocyoncinereoar-genteus</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	1	8
807	<i>Equus caballus</i>	2	0	1	0	0	1	0	3	2	11
808	<i>Equus caballus</i>	4	0	1	0	1	1	1	3	2	11
809	<i>Equus caballus</i>	2	0	0	0	0	1	1	3	2	11
815	<i>Bassariscus astutus</i>	0	0	0	0	0	0	0	3	1	8
816	<i>Bassariscus astutus</i>	0	0	0	0	0	0	0	3	1	8
817	<i>Bassariscus astutus</i>	0	0	0	0	0	0	0	3	1	8
820	<i>Perognathus penicillatus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	4	6
821	<i>Perognathus penicillatus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	4	6
822	<i>Perognathus penicillatus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	4	6
824	<i>Canis latrans</i>	2	0	1	0	0	1	0	0	1	8
825	<i>Canis latrans</i>	2	0	1	0	0	1	0	0	1	8
830	<i>Canis latrans</i>	2	0	1	0	0	1	0	0	1	8
1638	<i>Alouatta palliata</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	2	3
1639	<i>Alouatta palliata</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	2	3
1640	<i>Alouatta palliata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3
1666	<i>Tapirus bairdii</i>	6	1	0	2	1	1	1	0	2	11
1667	<i>Tapirus bairdii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	2	11
1668	<i>Tapirus bairdii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	2	11
1669	<i>Ateles geoffroyi</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	2	3
1692	K12	1	0	1	0	0	0	0	4	1	6
1693	<i>Tayassu tajacu</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	2	10
1694	<i>Tayassu tajacu</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	2	10
1697	<i>Philander opossum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
1698	<i>Philander opossum</i>	2	0	0	0	0	0	2	0	1	1
1699	<i>Alouatta pigra</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3
1700	<i>Alouatta pigra</i>	2	1	1	0	0	0	0	0	2	3
1731	<i>A.palliata</i>	4	1	0	0	0	0	3	3	2	3
1735	<i>Trichechus manatus</i>	3	1	2	0	0	0	0	0	2	9

Apéndice 3 (continuación)

Num. cepario	Hospedero (Tipo de patógeno en cepas humanas o ambiente)	Num. de bandas	Tamaño (Kb)						Con-tacto	Dieta	Orden
			>100	100-50	50-25	25-10	10-5	<5			
1736	<i>Trichechus manatus</i>	3	1	2	0	0	0	0	0	2	9
1743	<i>Tamandua</i>	1	1	0	0	0	0	0	2	5	4
1744	<i>Tamandua</i>	1	0	1	0	0	0	0	2	5	4
1930	<i>Lutra longicaudis</i>	0	0	0	0	0	0	0	2	7	8
1931	<i>Lutra longicaudis</i>	0	0	0	0	0	0	0	2	7	8
1932	<i>Lutra longicaudis</i>	2	1	1	0	0	0	0	2	7	8
1936	<i>Tapirus</i>	0	0	0	0	0	0	0	2	2	11
1937	<i>Tapirus</i>	3	0	1	0	1	0	1	2	2	11
1939	<i>Dasybus</i>	3	0	0	0	0	0	3	2	1	4
1940	<i>Dasybus</i>	2	0	1	0	0	0	1	2	1	4
1965	<i>Ovis aries</i>	1	0	0	0	0	1	0	1	2	10
1966	<i>Ovis aries</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	2	10
1967	<i>Ovis aries</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	2	10
1984	<i>Odocoileus virginianus</i>	0	0	0	0	0	0	0	2	2	10
1985	<i>Odocoileus virginianus</i>	2	0	2	0	0	0	0	2	2	10
2025	<i>Tursiops truncatus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	7	7
2026	<i>Tursiops truncatus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	7	7
2027	<i>Tursiops truncatus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	7	7
2048	<i>Didelphis virginiana</i>	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1
2049	<i>Didelphis virginiana</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
2050	<i>Didelphis virginiana</i>	2	0	0	0	1	1	0	0	1	1
2055	<i>Tayassu tajacu</i>	1	0	0	0	0	1	0	0	2	10
2056	<i>Tayassu tajacu</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	2	10
2057	<i>Tayassu tajacu</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	2	10
2060	<i>Nasua</i>	1	0	0	1	0	0	0	0	1	8
2062	<i>Nasua</i>	2	0	2	0	0	0	0	0	1	8
2064	<i>Procyon lotor</i>	4	0	2	0	0	0	2	0	1	8
2065	<i>Procyon lotor</i>	2	0	0	0	0	2	0	0	1	8
2066	<i>Procyon lotor</i>	5	0	1	1	0	2	1	0	1	8
2078	<i>Hydrochaeris sp</i>	2	0	1	0	0	1	0	3	1	6
2079	<i>Hydrochaeris sp</i>	2	0	0	1	1	0	0	3	1	6
2080	<i>Hydrochaeris sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	3	1	6
2081	ECOR 1	2	0	2	0	0	0	0	4	1	6
2084	ECOR 4	4	0	0	0	0	2	2	4	1	6
2085	ECOR 5	3	0	0	0	0	0	3	4	1	6
2087	ECOR 7	2	1	0	1	0	0	0	3	2	3
2088	ECOR 8	4	0	0	0	1	1	2	4	1	6
2090	ECOR 10	5	0	1	0	1	1	2	4	1	6
2091	ECOR 11	5	0	1	0	1	1	2	4	1	6
2092	ECOR 12	2	0	0	0	0	0	2	4	1	6
2100	ECOR 20	7	0	1	0	1	1	4	3	2	10
2103	ECOR 23	3	0	2	0	0	0	1	3	2	0
2106	ECOR 26	0	0	0	0	0	0	0	4	1	6
2107	ECOR 27	2	0	1	1	0	0	0	3	2	10
2110	ECOR 30	1	0	1	0	0	0	0	0	2	10
2121	ECOR 41	4	0	1	1	1	1	0	4	1	6
2125	ECOR 45	0	0	0	0	0	0	0	3	1	10
2140	ECOR 60	5	0	1	0	2	2	0	4	1	6
2141	ECOR 61	0	0	0	0	0	0	0	4	1	6
2150	ECOR 70	4	1	1	0	0	0	2	4	1	6
2355	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1	0	0	0	0	0	1	0	2	5

Apéndice 3 (continuación)

Num. cepario	Hospedero (Tipo de patógeno en cepas humanas o ambiente)	Num. de bandas	Tamaño (Kb)						Con-tacto	Dieta	Orden
			>100	100-50	50-25	25-10	10-5	<5			
2356	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	2	0	1	0	0	0	1	0	2	5
2357	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	2	5
2372	<i>Romerolagus diazi</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	2	5
2373	<i>Romerolagus diazi</i>	1	0	1	0	0	0	0	1	2	5
2374	<i>Romerolagus diazi</i>	1	1	0	0	0	0	0	1	2	5
2376	<i>Bos taurus</i>	1	0	1	0	0	0	0	3	2	10
2379	<i>Bos taurus</i>	2	0	1	0	0	0	1	3	2	10
2381	<i>Tapirus terrestris</i>	5	0	2	0	0	1	2	3	2	11
2382	<i>Tapirus terrestris</i>	3	0	2	0	0	0	1	3	2	11
2395	<i>Dasybus</i>	1	0	0	0	0	0	1	0	1	4
2396	<i>Dasybus</i>	1	0	0	0	0	0	1	0	1	4
3507	No patógenas	4	0	0	1	0	0	3	4	1	6
3510	No patógenas	2	0	2	0	0	0	0	4	1	6
3517	No patógenas	2	0	1	0	0	0	1	4	1	6
3524	No patógenas	0	0	0	0	0	0	0	4	1	6
3528	No patógenas	5	0	1	0	0	0	4	4	1	6
3530	No patógenas	1	0	1	0	0	0	0	4	1	6
3531	No patógenas	3	0	1	0	0	0	2	4	1	6
3532	No patógenas	2	0	1	0	0	0	1	4	1	6
3535	No patógenas	4	0	0	0	0	2	2	4	1	6
3536	No patógenas	1	0	0	0	0	0	1	4	1	6
3544	No patógenas	3	0	0	0	1	1	1	4	1	6
3546	No patógenas	5	0	0	0	1	2	2	4	1	6
3552	No patógenas	2	0	0	0	1	1	0	4	1	6
3559	No patógenas	3	0	0	2	0	0	1	4	1	6
3560	No patógenas	2	0	1	0	0	1	0	4	1	6
3561	No patógenas	2	0	1	0	0	1	0	4	1	6
3562	No patógenas	1	0	1	0	0	0	0	4	1	6
3566	No patógenas	2	0	0	1	0	0	1	4	1	6
3568	No patógenas	8	0	1	2	1	2	2	4	1	6
3571	No patógenas	1	0	0	0	0	0	1	4	1	6
3580	No patógenas	1	0	0	0	0	1	0	4	1	6
3587	No patógenas	4	0	1	1	0	1	1	4	1	6
3599	No patógenas	2	0	1	0	0	1	0	4	1	6
3600	No patógenas	4	0	0	0	2	2	0	4	1	6
3606	No patógenas	1	0	0	0	0	0	1	4	1	6
3608	Agregativas	0	0	0	0	0	0	0	4	1	6
3611	Agregativas	0	0	0	0	0	0	0	4	1	6
3613	Agregativas	1	0	0	0	0	0	1	4	1	6
3614	Agregativas	0	0	0	0	0	0	0	4	1	6
3615	Agregativas	0	0	0	0	0	0	0	4	1	6
3618	Agregativas	3	0	0	3	0	0	0	4	1	6
3620	Agregativas	2	0	0	0	1	0	1	4	1	6
3622	Agregativas	1	0	1	0	0	0	0	4	1	6
3623	Agregativas	2	0	0	1	1	0	0	4	1	6
3625	Agregativas	4	0	0	1	1	1	1	4	1	6
3628	Agregativas	1	0	0	1	0	0	0	4	1	6
3629	Agregativas	2	0	0	0	1	1	0	4	1	6
3631	Agregativas	3	0	0	0	1	2	0	4	1	6
3632	Agregativas	0	0	0	0	0	0	0	4	1	6
3633	Agregativas	2	0	0	0	0	0	2	4	1	6

Apéndice 3 (continuación)

Num. cepario	Hospedero (Tipo de patógeno en cepas humanas o ambiente)	Num. de bandas	Tamaño (Kb)					Contacto	Dieta	Orden	
			>100	100-50	50-25	25-10	10-5				<5
3634	EPEC	2	0	0	0	0	0	2	4	1	6
3635	EPEC	0	1	0	0	0	0	0	4	1	6
3636	EHEC	2	0	0	0	1	1	0	4	1	6
3638	UTI	0	0	0	0	0	0	0	4	1	6
3639	UTI	3	0	0	1	0	1	1	4	1	6
3640	UTI	3	0	0	0	0	1	2	4	1	6
3641	ETEC	2	0	0	1	1	0	0	4	1	6
3642	Aire	1	0	0	0	0	0	1	4	1	6
3643	UTI	0	0	0	0	0	0	0	4	1	6
3644	UTI	0	0	0	0	0	0	0	4	1	6
3645	UTI	1	0	0	0	0	0	1	4	1	6
3646	ETEC	0	0	0	0	0	0	0	4	1	6
3647	UTI	3	1	0	1	0	0	1	4	1	6
3648	ETEC	1	0	0	1	0	0	0	4	1	6
3649	UTI	0	0	0	0	0	0	0	4	1	6
3650	EHEC	4	0	0	0	0	2	2	4	1	6
3651	EPEC	2	0	0	0	0	0	2	4	1	6
3652	ETEC	1	0	0	1	0	0	0	4	1	6
3653	EHEC	1	0	1	0	0	0	0	4	1	6
3654	EHEC	1	0	1	0	0	0	0	4	1	6
3655	ETEC	2	0	0	0	0	0	2	4	1	6
3656	Aire	0	0	0	0	0	0	0	4	1	6
3657	Aire	1	0	1	0	0	0	0	4	1	6
3658	Aire	0	0	0	0	0	0	0	4	1	6
3659	EPEC	3	0	2	0	0	0	1	4	1	6
3660	EPEC	4	0	2	1	1	0	0	4	1	6
3661	Aire	3	0	0	0	1	2	0	4	1	6
3662	EIEC	2	0	0	1	0	1	0	4	1	6
3664	EIEC	1	0	0	0	0	0	1	4	1	6
3665	EIEC	1	0	0	0	0	1	0	4	1	6
3666	EIEC	3	0	0	0	0	0	3	4	1	6
3667	EPEC	4	0	1	1	0	1	1	4	1	6
3668	Aire	3	0	0	0	0	0	3	4	1	6
3669	Aire	4	0	0	0	0	0	4	4	1	6
3670	EIEC	2	0	0	0	0	1	1	4	1	6
3671	Aire	0	0	0	0	0	0	0	4	1	6
3672	EIEC	1	0	0	0	0	0	1	4	1	6
3673	EIEC	3	0	0	0	0	1	2	4	1	6
3674	Aire	0	0	0	0	0	0	0	4	1	6
3675	EIEC	0	0	0	0	0	0	0	4	1	6
3676	EIEC	0	0	0	0	0	0	0	4	1	6
3677	EIEC	1	0	0	1	0	0	0	4	1	6
3678	EHEC	2	0	0	1	0	0	1	4	1	6
3679	UTI	3	0	0	0	0	2	1	4	1	6
3680	Aire	1	0	0	0	0	0	1	4	1	6
3681	EHEC	3	0	1	0	1	1	0	4	1	6
3682	EHEC	3	0	1	0	1	1	0	4	1	6
3683	ETEC	3	0	0	0	0	0	3	4	1	6
3684	ETEC	5	0	0	1	0	1	3	4	1	6
3685	UTI	3	0	0	0	0	1	2	4	1	6
3686	UTI	3	0	0	0	0	0	3	4	1	6

Apéndice 3 (continuación)

Num. cepario	Hospedero (Tipo de patógeno en cepas humanas o ambiente)	Num. de bandas	Tamaño (Kb)					Con-tacto	Dieta	Orden	
			>100	100-50	50-25	25-10	10-5				<5
3688	UTI	3	0	0	0	0	0	3	4	1	6
3689	EHEC	3	0	1	1	0	0	1	4	1	6
3690	UTI	4	0	0	1	2	0	1	4	1	6
3691	EHEC	4	0	0	0	1	1	2	4	1	6
3692	EHEC	2	0	0	0	0	1	1	4	1	6
3693	EPEC	2	0	1	0	0	0	1	4	1	6
3694	Aire	6	0	1	1	1	0	3	4	1	6
3695	Aire	2	0	1	0	1	0	0	4	1	6
3696	Aire	5	0	0	1	1	0	3	4	1	6
3697	EHEC	4	0	0	1	2	0	1	4	1	6
3698	EPEC	2	0	0	0	1	0	1	4	1	6
3699	UTI	2	0	0	0	0	0	2	4	1	6
3700	EPEC	1	0	0	0	0	0	1	4	1	6
3701	EPEC	1	0	1	0	0	0	0	4	1	6
3702	EHEC	2	0	0	0	0	0	2	4	1	6
3703	EPEC	1	0	1	0	0	0	0	4	1	6
3704	EPEC	2	0	0	1	0	0	1	4	1	6
3705	EPEC	0	0	0	0	0	0	0	4	1	6
3706	EPEC	4	0	1	0	1	1	1	4	1	6
3707	EPEC	5	0	1	0	0	2	2	4	1	6
3708	EHEC	1	0	0	0	0	0	1	4	1	6
3709	Aire	0	0	0	0	0	0	0	4	1	6
3710	UTI	0	0	0	0	0	0	0	4	1	6
3711	EPEC	6	0	0	0	2	2	2	4	1	6
3712	Aire	0	0	0	0	0	0	0	4	1	6
3713	EPEC	5	0	0	1	2	1	1	4	1	6
3714	EHEC	4	0	0	1	2	1	1	4	1	6
3715	EPEC	2	0	0	1	1	0	0	4	1	6
3716	EPEC	2	0	1	1	0	0	0	4	1	6
3717	EPEC	3	0	0	0	1	0	2	4	1	6
3719	EHEC	5	0	0	1	2	1	1	4	1	6
3720	Desagüe	2	0	0	0	0	1	1	4	1	6
3722	Desagüe	5	0	0	1	2	0	2	4	1	6
3723	Desagüe	0	0	0	0	0	0	0	4	1	6
3724	Desagüe	3	0	0	0	1	1	1	4	1	6
3725	Desagüe	0	0	0	0	0	0	0	4	1	6
3743	Desagüe	8	0	1	1	1	2	3	4	1	6
3744	Desagüe	0	0	0	0	0	0	0	4	1	6
3745	Desagüe	6	0	0	0	0	2	4	4	1	6
3746	Desagüe	1	1	0	0	0	0	0	4	1	6
3748	Desagüe	6	1	0	0	0	2	3	4	1	6
3749	Desagüe	2	1	0	0	0	1	0	4	1	6
3750	Desagüe	2	1	1	0	0	0	0	4	1	6
3751	Desagüe	0	0	0	0	0	0	0	4	1	6
3752	Desagüe	1	0	0	1	0	0	0	4	1	6
3753	Desagüe	5	1	0	0	0	1	3	4	1	6
3759	Desagüe	2	0	1	1	0	0	0	4	1	6
3839	Lodos	5	0	2	0	1	1	1	4	1	6
3840	Lodos	3	0	1	0	0	0	2	4	1	6
3841	Lodos	5	0	1	0	0	1	3	4	1	6
3842	Lodos	5	0	1	0	0	1	3	4	1	6

Apéndice 3 (continuación)

Num. cepario	Hospedero (Tipo de patógeno en cepas humanas o ambiente)	Num. de bandas	Tamaño (Kb)						Con-tacto	Dieta	Orden
			>100	100-50	50-25	25-10	10-5	<5			
3843	Lodos	5	0	1	0	0	1	3	4	1	6
3844	Lodos	6	0	2	1	1	1	1	4	1	6
3845	Lodos	3	0	1	0	0	0	2	4	1	6
3846	Lodos	0	0	0	0	0	0	0	4	1	6
3847	Lodos	5	0	1	0	0	1	3	4	1	6
3848	Lodos	1	0	1	0	0	0	0	4	1	6
3849	Lodos	5	0	2	1	1	1	1	4	1	6
3850	Lodos	4	0	0	0	0	1	3	4	1	6
3851	Lodos	5	0	1	0	0	1	3	4	1	6
3852	Lodos	5	0	1	0	0	1	3	4	1	6
3853	Lodos	3	0	1	0	0	1	1	4	1	6
3854	Lodos	0	0	0	0	0	0	0	4	1	6
3855	Lodos	0	0	0	0	0	0	0	4	1	6
3856	Lodos	1	0	0	0	0	0	1	4	1	6
3857	Lodos	1	0	0	0	0	0	1	4	1	6
3858	Lodos	0	0	0	0	0	0	0	4	1	6
3859	Lodos	1	0	0	1	0	0	0	4	1	6
3860	Lodos	4	0	0	0	0	0	4	4	1	6
3861	Lodos	4	0	0	0	1	0	3	4	1	6
3862	Lodos	6	0	0	1	0	2	3	4	1	6
3863	Lodos	2	0	0	0	1	1	0	4	1	6
3864	Lodos	1	0	0	0	0	0	1	4	1	6
3865	Lodos	0	0	0	0	0	0	0	4	1	6
3866	Lodos	0	0	0	0	0	0	0	4	1	6
3867	Lodos	0	0	0	0	0	0	0	4	1	6
3868	Lodos	0	0	0	0	0	0	0	4	1	6
3869	Lodos	4	0	0	0	1	0	3	4	1	6
3870	Lodos	5	0	1	1	0	1	2	4	1	6
3871	Lodos	5	0	0	0	1	2	2	4	1	6
3872	Lodos	3	0	0	0	1	0	2	4	1	6
3873	Lodos	5	0	0	1	1	1	2	4	1	6
3874	Lodos	2	0	1	0	0	0	1	4	1	6
3875	Lodos	5	0	0	2	1	1	1	4	1	6
3876	Lodos	6	0	0	2	1	1	2	4	1	6
3877	Lodos	6	0	0	0	1	1	4	4	1	6
3878	Lodos	6	0	0	0	1	1	4	4	1	6
3879	Lodos	2	0	1	0	1	0	0	4	1	6
3880	Lodos	0	0	0	0	0	0	0	4	1	6
3881	Lodos	4	0	0	0	0	2	2	4	1	6
3882	Lodos	2	0	0	0	0	2	0	4	1	6
3883	Lodos	4	0	0	0	0	3	1	4	1	6
3884	Lodos	0	0	0	0	0	0	0	4	1	6
3885	Lodos	3	0	0	0	1	1	1	4	1	6
3886	Lodos	4	0	0	0	1	1	2	4	1	6

*Los números que se emplearon son, para el contacto humano: 0-silvestre, 1-sitio cercano a humanos, 2-semicautiverio, 3-cautiverio (mascotas), 4-humanas; para la dieta: 1-Omívoro, 2-Herbívoro, 3-Carnívoro, 4-granívoro, 5-Insectívoro, 6-Frugívoro, 7-Piscívoro, 8-Hematófago, 9-Nectarívoro y para el orden: 1-Marsupiales, 2-Chiroptera, 3-Primates, 4-Xenartra, 5-Lagomorpha, 6-Rodentia, 7-Cetacea, 8-Carnívora, 9-Sirenia, 10-Artiodactyla, 11-Perissodactyla

AGRADECIMIENTOS

Debo agradecer a todas las personas que ayudaron en la elaboración de esta tesis, en su planteamiento, en la metodología, la discusión y la revisión del manuscrito.

A la Dra. Valeria Souza, gracias a quien pronto seré maestra en Ciencias, porque es altamente responsable de mi formación académica, porque gracias a ella he podido crecer como bióloga y porque gracias a ella se realizó esta tesis. Por su paciencia, apoyo, motivación, cariño y también por ser una jefa consentidora ¡MIL GRACIAS!

Por supuesto, al Dr. Luis Eguiarte, quien siempre ha apoyado y aportado valiosísimas ideas para esta tesis y los proyectos que giran alrededor de ella, dándoles solidez académica.

Muy especialmente a los miembros de mi jurado: al Dr. Alejandro Cravioto, quien no obstante tener muchos deberes que cumplir, siempre mostró mucho interés y mucha disponibilidad para apoyar este trabajo, a la Dra. Carmen Gómez, cuyas preguntas siempre robustecieron el proyecto. A los doctores Roberto Cabrera, Carlos Amábile y Edmundo Calva, quienes revisaron cuidadosamente el manuscrito y por sus atinados comentarios y sugerencias.

El trabajo experimental no hubiera sido posible sin la ayuda de muchas personas que me introdujeron en el mundo de los plásmidos y la biología molecular, además de quienes me ayudaron durante los experimentos:

A Armando Navarro, por proporcionarnos todas las cepas que necesitamos y por la caracterización de los serotipos de la colección.

A los CFNitas Oscar Rodríguez y Memo Dávila por su hospitalidad y por presentarme las primeras técnicas moleculares, principalmente al enseñarme la extracción en minipreps y Eckhardt's, que fueron tan útiles.

A mi gran amiga María Elena Chánez, quien me enseñó a hacer los Melton preps y por su asesoría con el PCR. Luisa Sandner y Minerva Martínez por montar y ayudarme con el PCR. A Omar Chassin por ayudarme con los programas de análisis de secuencias y diseño de oligos.

A la buenísima bióloga molecular Rosalinda Tapia, quien siempre tenía una respuesta cuando las cosas no salían bien.

A mis entusiastas ayudantes: Carlos Lozano por su invaluable ayuda en la extracción de plásmidos a gran escala, a Elvia y Yani por su ayuda y haber hecho más agradables los últimos experimentos.

A Víctor Bustamante y José Luis Puente, que aunque aún no salen las hibridaciones, mostraron gran interés y me apoyaron mucho, dándome todas las facilidades para trabajar en su laboratorio.

A Gerardo Garfias y Arturo Silva por ayudarme en la recta final.

En la parte no académica, debo agradecer a todas las personas que hicieron que el tiempo pasara mas rápido:

A Gerardo Garfias, quien desde un principio trató por todos los medios de que aprovechara mejor el poco tiempo libre, y quien siempre estuvo dispuesto a escuchar y compartir mi trabajo. Su alegría, vitalidad, motivación y cariño, han hecho que trabaje (y viva) con mas entusiasmo.

A Aldo Valera, quien estuvo siempre para apoyar, escuchar, consolar, para compartir cansancios, en fin, el mejor amigo que tuve durante mi estancia en el laboratorio.

A todos los cuates del laboratorio, gracias a quienes el trabajo es mas agradable, por la ayuda que siempre me brindaron y también con quienes compartí la pesadilla de las materias: Clau, Valérie, René, Toño, Lulú, Minerva, Arturo, Alejandro, Aura, Rodrigo, la recién llegada Lau, etc.

A mi querida amiga Mireya Alcaraz, con quien compartí la motivación más grande para terminar la maestría, con quien he compartido muchos proyectos y con quien lleve a cabo uno de los mas bonitos. Por su amistad, su cariño y su alegría, por las veces que nos entraba la depre al mismo tiempo y por todas las veces que hemos disfrutado de la vida juntas.

A mi otra gran amiga, María Elena Chánez, que aunque tuvo la mala idea de casarse, me ha brindado una hermosa amistad durante muchos años, me ha entendido y apoyado todo el tiempo. Y sobre todo, quien ha compartido conmigo su vida y con quien he compartido la mía.

A mis amigos, que aunque pasan y pasan los años, seguimos juntos, y aunque nuestros intereses nos comienzan a separar geográficamente, se que siempre estarán cerca: Daniel Navarro, Jorge Calderón y Fidel Armendáriz.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**