



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

IDENTIFICACIÓN DE GRUPOS FILOGENÉTICOS Y PROCESOS
EVOLUTIVOS EN CEPAS PATÓGENAS DE *ESCHERICHIA COLI* EN
BISONTES (*BISON BISON*) Y CARNÍVOROS DE LA RESERVA DE LA
BIOSFERA DE JANOS, CHIHUAHUA, MÉXICO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL

PRESENTA:

JONATHAN JOSUÉ LÓPEZ ISLAS

COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR: DR. DANIEL MARTÍNEZ GÓMEZ. UAM-X

ASESOR: DR. CARLOS ALBERTO ESLAVA CAMPOS. FACULTAD DE MEDICINA

ASESOR: M. EN C. INDA MARCELA OCHOA FIGUEROA. FMVZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD Y
PRODUCCIÓN ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA

Identificación de grupos filogenéticos y procesos evolutivos
en cepas patógenas de *Escherichia coli* en bisontes (*Bison*
bison) y carnívoros de la Reserva de la Biosfera de Janos,
Chihuahua, México

TESIS

Para obtener el grado de

Maestría En Ciencias De La Salud Y Producción Animal

PRESENTA

JONATHAN JOSUÉ LÓPEZ ISLAS

Comité Tutorial

Director: Dr. Daniel Martínez Gómez. UAM-X

Asesor: Dr. Carlos Alberto Eslava Campos. Facultad de Medicina

Asesor: M. en C. Inda Marcela Ochoa Figueroa. FMVZ

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, Julio del 2018

Índice	Pag.
Resumen.....	4
Abstract.....	5
Introducción.....	6
Transferencia Horizontal de Genes.....	8
Criterios de clasificación de <i>E. coli</i> y sus incongruencias	14
Determinación de Serotipos y serogrupos en <i>E. coli</i>.....	14
Clasificación por Patotipos.....	15
Determinación de Filogrupos.....	17
Análisis de fondos genéticos.....	19
Factores sigma.....	20
Preguntas de investigación.....	25
Hipótesis.....	25
Objetivo general.....	26
Objetivos específicos.....	26
Material y métodos.....	27
Resultados.....	39
Comparación en la presencia de Factores de Virulencia.....	39
Análisis de la diversidad de Factores de Virulencia y estructura de la población.....	41
Presencia de filogrupos y serogrupos.....	44
Establecimiento de genotipos a través de HRM.....	51
Evaluación de variantes en <i>rpoD</i> en cepas de <i>E. coli</i> PGV RBJ de bisontes y carnívoros.....	54
Discusión.....	59
Conclusiones.....	63

Agradecimientos.....	64
Bibliografía.....	65

Resumen

Escherichia coli es un organismo causante de enfermedades entéricas de importancia en salud pública. Estos procesos infecciosos son resultado, de la gran gama y combinación de factores de virulencia (FV) que posee. Estos FV le confiere diferentes características patógenas, por las cuales se han agrupado en diferentes patotipos tanto intestinales como extraintestinales. Estos FV han sido adquiridos a través de un proceso evolutivo conocido como transferencia horizontal de genes (THG). Esta diversificación lo han perfilado como un modelo para el estudio de la evolución de la patogenicidad. La adquisición de FV en *E. coli*, se ha intentado asociar a determinantes genéticas, sin embargo, estas asociaciones no han sido claras, ya que la presencia de FV parece ser un proceso aleatorio. Este resultado podría estar influenciado por aspectos geográficos y temporales, ya que los eventos evolutivos están determinados por espacio-tiempo. Tomando en cuenta lo anterior, el estudio de evolución de microorganismos en sus microambientes naturales se vuelve necesario para una mayor comprensión. Se ha observado diferencias metabólicas en *E. coli* O157:H7, en animales de granja, influenciada por sus diferentes sistemas digestivos. Este estudio consideró la importancia del espacio-tiempo, considerando el área geográfica y el microambiente (monogástrico-rumiante). Por lo cual se analizaron 13,284 cepas de *E. coli* aisladas de bisontes para la presencia de algún gen de virulencia, para lo cual se obtuvieron 73 cepas con al menos un FV y 61 cepas de *E. coli* aisladas de carnívoros previamente y tipificadas con FV. Se les analizó la presencia de filogrupos y serogrupos para ver su asociación con FV, para lo cual se comprobó que aun en una escala regional, estas dos características no determinan la presencia de FV. En nuestro estudio asociamos la presencia de FV a variantes en el factor sigma *rpoD*, como fondo genético, para el cual se observó una asociación con genes asociados a Toxinas Shiga, observando que se requiere un fondo genético para la adquisición de FV.

Abstract

Escherichia coli is a causative organism of enteric diseases of importance in public health. These infectious processes are the result of the wide range and combination of virulence factors (VF) that it has. These VF confers different pathogenic characteristics, for which they have been grouped into different pathotypes, both intestinal and extraintestinal. These FV have been acquired through an evolutionary process known as horizontal gene transfer (THG). This diversification has shaped it as a model for the study of the evolution of pathogenicity. The acquisition of FV in *E. coli*, we have tried to associate genetic determinants, however, these associations have not been clear, since the presence of VF seems to be a random process. This result could be influenced by geographical and temporal aspects, since the evolutionary events are determined by space-time. Taking into account the above, the study of evolution of microorganisms in their natural microenvironments becomes necessary for a better understanding. Metabolic differences have been observed in *E. coli* O157: H7, in farm animals, influenced by their different digestive systems. This study considered the importance of space-time, considering the geographical area and the microenvironment (monogastric-ruminant). Therefore, 13,284 strains of *E. coli* isolated from bison were analyzed for the presence of a virulence gene, for which 73 strains were obtained with at least one FV and 61 strains of *E. coli* isolated from carnivores previously and typified with FV . They were analyzed for the presence of phylogroups and serogroups to see their association with VF, for which it was found that even on a regional scale, these two characteristics do not determine the presence of VF. In our study, we associated the presence of VF to variants in the sigma *rpoD* factor, as a genetic background, for which an association with genes associated with Shiga Toxins was observed, noting that a genetic background is required for the acquisition of VF.

Introducción

Escherichia coli es un microorganismo con una variabilidad genética significativa; en esta especie se han descrito, en comparación con otras enterobacterias, la mayor cantidad de cepas patógenas y comensales con diferentes características genéticas. La plasticidad genética de este microorganismo, es decir su capacidad para integrar nuevo material genético a su genoma, es lo que ha permitido la aparición de variantes patógenas. Por esta característica *E. coli* ha sido ampliamente estudiada como modelo de evolución de la patogenicidad y adquisición de genes en procariontes (Vila, Sáez-López, J. R. Johnson, et al. 2016; Touchon et al. 2009).

En términos generales, el genoma de *E. coli* podría dividirse en dos partes, en la primera; que se encuentra conservada en varias cepas de esta especie; se ubican secuencias de genes que codifican para enzimas que participan en procesos metabólicos básicos, por lo que se le ha llamado “genoma núcleo”. En la segunda existen regiones donde se encuentran secuencias que corresponden a sitios de inserción o recombinación de fagos y plásmidos, por lo cual se le ha llamado “genoma extendido”. Curiosamente en este microorganismo esta parte representa el 58% del genoma total, es decir una proporción mayor que la primera (que representa sólo el 42%) y se considera que fue adquirido a través de mecanismos de transferencia horizontal de genes (THG), tales como: conjugación, transducción y transformación (Touchon et al. 2009; Bohlin et al. 2014). La integración de este nuevo material genético da pauta de algunos de los procesos evolutivos a los cuales ha estado sometida esta bacteria. La capacidad de *E. coli* para regular y mantener este nuevo material genético, ha despertado el interés de varios investigadores, como ya se mencionó (Grad et al. 2013; Delannoy et al. 2017; Rasko et al. 2008; Vila, Sáez-López, J R Johnson, et al. 2016).

E. coli es uno de los microorganismos comensales presentes en el tracto gastrointestinal de muchas especies animales. Aunque forma parte de la microbiota normal, debido a la adquisición de material genético o “elementos genéticos móviles” (EGM), han surgido algunas variantes patógenas con

capacidad de afectar humanos y animales, modificando su condición como comensal. Estas variantes patógenas producen enfermedades entéricas, urinarias y septicémicas de importancia en salud pública y animal a nivel mundial (Barrick et al. 2009; Croxen y Finlay 2010; Clements et al. 2012; Berger et al. 2016).

La capacidad de *E. coli* patógena para infectar un amplio espectro de hospedadores, es resultado de una diversificación genética eficiente y una fuerte presión de selección (Robins-Browne et al. 2016). La emergencia en los últimos años, de enfermedades septicémicas asociadas a nuevas variantes patógenas de *E. coli* alrededor del mundo, sugiere que este proceso aún continúa, permitiendo la evolución de la patogenicidad en este microorganismo (Brzuszkiewicz et al. 2011; Strober 2017). Este proceso evolutivo continuo, es lo que ha hecho a *E. coli* patógena, un modelo ideal para el estudio de la evolución de la patogenicidad en bacterias.

La diversificación de la patogenicidad en *E. coli* indicaría una alta capacidad para adquirir factores de virulencia (FV). No obstante la presencia de estos en solo determinadas cepas, sugiere que deben de existir algunas condiciones para su adquisición, integración y regulación (Messinger y Ostling 2009; Köhler y Dobrindt 2011; Escobar-Paramo et al. 2004). Con el fin de establecer las condiciones que permitieron la adquisición de genes de virulencia en *E. coli*, se ha intentado correlacionar sus diferentes patótipos, con algunas características genéticas o fenotípicas, para de esta forma identificar en los distintos subgrupos, las condiciones que determinan la presencia de factores de virulencia (Vila, Sáez-López, J R Johnson, et al. 2016; Robins-Browne et al. 2016; Clermont et al. 2015).

En trabajos anteriores, aislamos 66 cepas de *E. coli* PGV de la Reserva de la Biosfera de Janos (RBJ), provenientes de distintos Carnívoros entre los cuales se incluyen coyotes (*Canis latrans*), Zorras del desierto (*Vulpes macrotis*) y Zorrillos (*Mephitis mephitis*). Las cepas de *E. coli* PGV RBJ mostraron diferentes perfiles en la presencia de genes de virulencia, entre las cuales se encontraron cepas atipas de *E. coli* entero patógena (EPEC), las cuales se evaluaron en cultivo celular, mostrando la capacidad de formar lesiones típicas de pedestal.

La distribución por patotipos de los FV, es compatible con la idea de una adquisición no tan amplia, determinada por alguna característica genética, en cada cepa, relacionado tal vez con sus mecanismos de regulación de la expresión genética dentro del genoma (fondo genético específico). En *E. coli* estos factores específicos que le permiten adquirir y regular ciertos genes de virulencia, determinarían su permanencia en el genoma, mostrando con ello que no es un proceso aleatorio.

Transferencia Horizontal de Genes

La transferencia horizontal de genes (THG) es el proceso mediante el cual se transmite información genética de manera no genealógica. Es decir permite a los microorganismos adquirir genes de forma rápida y eficiente para adaptarse a distintas condiciones ambientales, permitiéndoles evolucionar (Polz et al. 2013). Los tres mecanismos principales por los cuales se lleva a cabo esta transmisión de material genético son: 1) la conjugación, proceso mediante el cual se transfiere ADN de una bacteria a otra por medio de un *pili*; 2) la transformación, proceso por el cual, ADN ambiental puede ser captado e incorporado por una célula competente; y 3) la transducción, en la cual la transferencia de ADN de una célula a otra se lleva a cabo por un bacteriófago (Soucy et al. 2015). En el caso de bacterias patógenas, la THG es el principal mecanismo por el cual se adquieren genes que aumentan su capacidad para sobrevivir y adaptarse a nuevos hospedadores, por ejemplo genes resistencia a agentes antimicrobianos, genes metabólicos y genes que codifican para factores de virulencia como: sistemas de secreción, proteínas efectoras, fimbrias, exotoxinas e incluso islas de patogenicidad (Sachs et al. 2011; Raskin et al. 2006; Transmission et al. 2015).

En *E. coli*, la THG ha sido esencial para la generación de nuevas variantes patógenas alrededor del mundo (Hacker y Carniel 2001; Sandner et al. 2001; Loukiadis et al. 2006; Brzuszkiewicz et al. 2011; Baumler et al. 2012; Kyle et al. 2012; Skippington y Ragan 2012; Huddleston 2014; Blasdel et al. 2017; Connolly et al. 2015; Mercat et al. 2016; Hakim et al. 2017). Un análisis de radio-divergencia con secuencias de genes de virulencia mostró que existen amplias variaciones

dentro de una población y que la presencia de determinados FV no evita la adquisición de otros (Bohlin et al. 2014).

Algunas teorías evolutivas, como “La Hipótesis de la Reina Roja” o “La Carrera de armamentos” sugieren que la adquisición de genes podría ser resultado de una competencia entre microorganismos y los mecanismos de defensa naturales presentes en los hospedadores. De esta forma para que un microorganismo pueda mantenerse replicándose dentro de un hospedador, necesitaría la adquisición de material genético que le permitiera sobrevivir, generándose con ello variantes llamadas patógenas (Altizer et al. 2003; Nowak 2004; Sachs et al. 2011; Soucy et al. 2015).

Inicialmente se pensaba que la THG ocurría entre organismos relacionados filogenéticamente; tal es el caso de *E. coli* y *Shigella spp*, donde se ha demostrado la transmisión de FV, como toxinas Shiga y el gen *ial*, asociado a variantes de *E. coli* invasivas. Dado que la adquisición de material genético implica que los microorganismos receptores deban ser capaces de regular la expresión de los genes recibidos, al estar filogenéticamente emparentados o compartir características fisiológicas, la regulación podría ser más fácil. Estudios posteriores han mostrado que la THG ocurre entre microorganismos de distintas especies, y que los genes se intercambian preferentemente entre microorganismos que tienen un tamaño similar de genoma, una composición similar de G/C, rutas similares de utilización de carbono y tolerancia al oxígeno. Estas poblaciones de bacterias, que intercambian material genético, se les ha llamado “*Exchange communities*”. (Petersen et al. 2007; Skippington y Ragan 2012; Khot y Fisher 2013; Zuo et al. 2013; Ud-Din y Wahid 2014; Bohlin et al. 2014; Servin 2014).

En algunos casos la transferencia de material genético ocurre entre microorganismos de una misma especie en un sitio o área en específico, permitiendo con ello la aparición de subgrupos. Esta diversificación es dependiente de la especie involucrada y del espacio-tiempo, es decir una población de un microorganismos que se diversifica en un área no será igual a otra o la misma en un tiempo distinto (Sato et al. 1994; Nowak 2004; Jones et al.

2008; Poulin et al. 2011; Kurvers et al. 2014; The et al. 2016). En algunos casos, el material genético adquirido se inserta en regiones altamente conservadas como tRNA, regiones UTR's o cerca de regiones promotoras, esto es porque se requiere de regiones conservadas para su integración. Esta situación facilita que el material genético adquirido sea regulado y transcrito (Brüssow et al. 2004; Gal-Mor y Finlay 2006; Croxen y Finlay 2010; Vila et al. 2016).

La adquisición de nuevos genes, es un proceso complicado que involucra un aumento en el gasto energético y consumo de sustratos, lo que implicaría una disminución en la tasa de crecimiento o de replicación. Además, algunos de los genes o material genético adquirido podrían tener un efecto tóxico para la bacteria receptora, tal es el caso de algunas toxinas o proteínas que pudieran alterar rutas de expresión y regulación de genes (David A. Baltrus 2013). Para controlar estas situaciones, las bacterias cuentan con un sistema de evasión de adquisición de material genético, conocido como sistema de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR). Este sistema emplea enzimas con actividad de endonucleasa, para cortar secuencias reconocidas por exposiciones previas, lo que permite la eliminación de material genético nuevo (England y Whitaker 2013; Samson et al. 2013). En el caso de eventos de THG mediados bacteriófagos, la transferencia esta también modulada por el reconocimiento de receptores específicos y por otros fagos, a través de señales peptídicas que permitan el establecimiento de una fase lisogénica (Erez et al. 2017; Samson et al. 2013).

Algunas teorías sobre la evolución de la patogenicidad bacteriana plantean que, dado que la expansión del genoma tiene un límite, es más probable que ocurra una reducción conforme sucede la coevolución de especies, originando con ello organismos más especializados (Little et al. 2010; Nowak 2004; Toft y Andersson 2010; Weinert y Welch 2017).

Si bien, la ganancia de material genético podría representar una ventaja de sobrevivencia para una población de bacterias, su regulación y expresión tendría un papel importante. En el caso de los microorganismos receptores de genes de

virulencia, la regulación transcripcional inadecuada del material adquirido, podría inducir una respuesta inmune en el hospedador generando la eliminación de otras variantes que no hayan recibido este material, alterando con ello la estructura de la comunidad. En este aspecto, la regulación del nuevo material genético adquirido es crucial para su permanencia en el genoma de la especie (Miskinyte et al. 2013; David A. Baltrus 2013). Una de las formas de regulación transcripcional de material genético, es la expresión de proteínas tipo histonas (H-NS), las cuales pueden silenciar el nuevo material genético adquirido (David A Baltrus 2013; Gal-Mor y Finlay 2006; Connolly et al. 2015; Discovery et al. 2017).

La adquisición-mantenimiento de nueva información genética está asociada con el medio ambiente, es decir la ganancia de genes permite a un microorganismo sobrevivir cuando las condiciones en el medio cambian, eliminándose aquellas variantes no portadoras de este nuevo material o que no lo expresen. Dado que son las condiciones ambientales determinan la expresión de los nuevos genes, y esta respuesta la que selecciona a los individuos, la adquisición y mantenimiento de nuevo material genético está asociado con el medio ambiente (Hacker y Carniel 2001; Nowak 2004).

Si bien, la adquisición de nuevos genes a través de THG ha proporcionado a las bacterias patógenas una variedad de genes de virulencia, la pérdida de genes también puede favorecer su adaptación a un nuevo nicho. Estudios desarrollados con distintas especies de *Shigella* y cepas patógenas de *E. coli*, mostraron una mayor tasa de pérdida de genes en *Shigella* sp., en comparación con *E. coli*. En *Shigella* se encontraron 447 pseudogenes, derivados de 978 mutaciones en todo su genoma. Esta pérdida de la función de genes ha sido descrita como patoadaptividad y pudiera tratarse de un mecanismo subestimado de patogénesis que permite a *Shigella* su sobrevivencia del intracelular. Algunos ejemplos de genes, cuya pérdida ha ayudado a *Shigella* a adaptarse a este estilo de vida son los genes que codifican para una lisina descarboxilasa (*cadA*), proteasa de superficie (*ompT*) y transporte de aminoácidos (*argT*). Esta adaptación no se limita a *Shigella*, ya que la pérdida de actividad de lisina

descarboxilasa se ha encontrado en EPEC, ETEC, STEC y EAEC.(Gal-Mor y Finlay 2006; Raskin et al. 2006; Croxen et al. 2013; Albalat y Cañestro 2016).

Como ya se mencionó, los genes que se han adquirido de forma horizontal están bajo un fuerte proceso de regulación donde participan diversos factores transcripcionales. En el caso de la isla LEE (locus of enterocyte effacement) está conformado por cinco operones (LEE1, LEE2, LEE3, LEE4 y LEE5). Los operones LEE1, LEE2 y LEE3 codifican para los componentes estructurales del T3SS; el operón LEE4 codifica para los componentes del poro (llamado translocon) y el operón LEE5 codifica las proteínas intimina y Tir (Connolly et al., 2015). La regulación transcripcional de los operones LEE es extremadamente compleja. A nivel central, se controla mediante dos sistemas reguladores integrales codificados dentro de la isla LEE. El primero de ellos es la proteína Ler, la cual activa la transcripción en cada uno de los operones y el segundo, el complejo *grlR/A*, formado por un regulador global activador (*GrlA*) y el regulador global represor (*GlrR*) (Franzin y Sircili, 2014). Otros sistemas fuera de la isla de patogenicidad actúan también como reguladores de LEE, algunos de ellos regulando de forma negativa la expresión, tal es el caso de las proteínas asociadas a nucleótidos H-NS, las cuales se unen a las regiones reguladoras de los operones impidiendo la transcripción (Connolly et al., 2015). Por otro lado, la proteína *perC*, codificada en el plásmido EAF (factor de adherencia), el factor de integración del huésped (IHF) codificado en fagos promueven positivamente la expresión *ler* (Franzin y Sircili, 2014, Stavrinides et al. 2008; Sachs et al. 2011; Connolly et al. 2015; Berger et al. 2016; Browning y Busby 2016).

La divergencia mediada por THG en algunos microorganismos es un proceso ecológico-evolutivo donde está presente la recombinación genética, la reparación del ADN, la integración de ADN; y la regulación, silenciamiento y expresión de genes. La divergencia también está modificada por la presión de selección hacia determinados locus, en determinados ambientes o microambientes (Hacker y Carniel 2001; Nowak 2004; Awadalla 2003; Heilmann et al. 2010; Schwab et al. 2011; Berger et al. 2016). Lo anterior sugiere que la

divergencia en *E. coli*, fue resultado de la adquisición de material genético; y estuvo determinado por factores específicos de regulación génica y sus interacciones ambientales (Typas et al. 2007; Tourret y Denamur 2016; Ades et al. 2003).

Touchon y colaboradores (2009) analizaron el genoma de 21 cepas de *E. coli*, e identificaron los genes conservados en todos los genomas y el conjunto de genes no ortólogos. Los resultados obtenidos arrojaron que en promedio el genoma de *E. coli* contiene 4721 genes, con un genoma central de 1976 genes. Los genes restantes por cada genoma (genoma extendido) se agrupan en un pangenoma, el cual contiene aproximadamente 17838 genes. Como ya se ha mencionado, la producción de enfermedad se debe a la presencia de FV en el genoma extendido en las variantes patógenicas de *E. coli*. Bajo este criterio, *E. coli* puede dividirse en 3 grupos: 1) comensales gastrointestinales, 2) patógenas gastrointestinales y 3) patógenas extraintestinales. No obstante, en pacientes con enfermedades gástricas se la logrado aislar cepas de *E. coli* patógenas extraintestinales, y en infecciones extraintestinales, se ha logrado el aislamiento de cepas patógenas gastrointestinales, lo cual demuestra de que aún faltan de comprender varios aspectos sobre la patogenicidad de *E. coli* (Dobrindt et al. 2015).

Como ya se ha mencionado, *E. coli* forma parte de la microbiota normal comportándose como comensal o simbiote, participando en procesos de síntesis de vitaminas, no obstante se han descrito también variantes patógenas con capacidad de producir diversas infecciones intestinales y sistémicas. Un análisis de 300 aislamientos de *E. coli* a partir de heces de humanos, mostró que en cualquier momento una persona lleva una cepa predominante que constituye más de la mitad de las colonias aisladas, con la presencia de otras cepas presentes en varias proporciones, entre ellas variantes patógenas (Tenailon et al. 2010).

Criterios de clasificación de *E. coli* y sus incongruencias

Determinación de Serotipos y serogrupos en *E. coli*

Uno de los criterios para clasificar las variantes de *E. coli*, está basado en características estructurales del LPS, el cual como se sabe consiste de tres partes: lípido A, formado por dos unidades de glucosamina unidas por enlaces β en las cuales se esterifican ácidos grasos; un núcleo, compuesto de heptosas (ácido 3-desoxi-D-manooctulosónico) y hexosas (N-acetilglucosamina); y la cadena O, un polímero de longitud variable formado de oligosacáridos, en este los carbohidratos que lo componen son neutros o aminados y en raras ocasiones inusuales, como 6-desoxihexosas y 3,6-didesoxihexosas.

Mientras el lípido A es una estructura conservada, la cadena O es una estructura altamente diversa, con repeticiones de cuatro a seis carbohidratos (Putker et al. 2015; Sperandeo et al. 2017). A través de pruebas serológicas, estas variaciones en el LPS han podido ser asociadas a grupos causantes de enfermedad con virulencia conocida. A la fecha se describen tres antígenos relevantes en esta asociación, el antígeno somático “O” (cadena O), el cual define al serogrupo; el antígeno flagelar “H”, el cual determina el serotipo; y según el caso, el antígeno capsular “K”. Se han descrito 186 variantes en el antígeno “O”, 54 en el antígeno “H” y 60 en el antígeno “K”, las combinaciones de estos antígenos definen a una cepa y permite asociarla con casos de enfermedad (Fratamico et al. 2016). Dado que en muchos procesos infecciosos las cepas presentes de *E. coli* poseen lipopolisacárido (LPS), esta clasificación ha sido muy útil en la atención de pacientes (Tenailon et al. 2010; Köhler y Dobrindt 2011; Koli et al. 2011; Vila, Sáez-López, J R Johnson, et al. 2016).

El LPS forma parte de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, una estructura altamente permeable que permite el paso de nutrientes y que protege a las bacterias contra algunos agentes nocivos externos como son antimicrobianos (Sperandeo et al. 2017). No obstante uno de sus partes, el lípido A es proinflamatoria y puede producir shock endotóxico. Esta actividad se debe a que el LPS es un PAMP (patrón molecular asociado a patógenos), el cual puede

ser reconocido por receptores de reconocimiento a patrones (PRR's), como son los receptores TLR y receptores tipo Nod (NLR). Su reconocimiento por parte de los receptores TLR4 y NLRP3 enciende varias rutas de señalización, incluyendo el inflammasoma, para la producción de citocinas (Lee et al. 2015; Yen et al. 2015; Yen et al. 2016). Esta respuesta se presenta durante el proceso de infección cuando se ha desencadenado algún daño, ya que también forma parte de la microbiota normal y es uno de los primeros organismos en establecerse y colonizar el intestino, observándose una tolerancia conforma a su establecimiento y participación en síntesis de nutriente (Conway y Cohen 2015).

No obstante algunos investigadores como Malik y col. (2017); Cha y col. (2017); y Delannoy y col. (2013), han demostrado que la presencia de un serogrupo en *E. coli*, no determina su capacidad para la adquisición de genes de virulencia, teniendo por un lado, dentro de un mismo serogrupo diferente distribución en genes de virulencia, ausencia de FV. Muchos de estos serogrupos tienen características de distribución geográfica, como el serogrupo O55 el cual está más ampliamente distribuido en Europa, lo que implica que su capacidad patógena se debe más a un proceso evolutivo localizado, vinculado a la adquisición de FV y su capacidad de regulación, debido a una presión de selección que ha permitido la sobrevivencia de variantes patógenas en determinadas áreas (Blanco et al. 2005; Müller et al. 2006; Kyle et al. 2012; Delannoy et al. 2017).

Clasificación por Patotipos

Debido a que muchos serogrupos comparten FV, otra forma de clasificar las variantes causantes de enfermedad es por su patogénesis, vinculada a la presencia de diferentes FV en su genoma, de esta forma tenemos patotipos intestinales y extraintestinales. Los patótipos de *E. coli* que se asocian con alteraciones en el intestino se conocen colectivamente como *E. coli* patógenas intestinales (IPEC) o *E. coli* diarreogénicas (DEC). Los patotipos intestinales son: *E. coli* productoras de Shigatoxian (STEC), entre ellas, *E. coli* entero hemorrágico (EHEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli*

enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* adherente difusa (DAEC). Los patotipos extraintestinales (ExPEC) son *E. coli* uropatogénica (UPEC) y *E. coli* asociada a la meningoencefalitis (MNEC) (Croxen y Finlay 2010; Dobrindt et al. 2015; Vila, Sáez-López, J R Johnson, et al. 2016; Servin 2005; Servin 2014; Smith et al. 2013). No obstante, con el avance del tiempo se ha visto la aparición de nuevos patotipos alrededor del mundo, con combinaciones de diferentes FV, algunas de están clasificándose dentro del grupo de *E. coli* productoras de Shiga toxinas (STEC) o no STEC, como dos grandes rubros, lo que hace más difícil su clasificación (Kaper et al. 2004). En algunos casos llamadas Cepas híbridas por tener FV de virulencia asociados a dos diferentes patotipos. Estos brotes son de importancia, debido a sus afecciones en salud pública, como el brote de Alemania en el 2011. El cual estuvo asociado a un serogrupo O104, en primera instancia haciendo pensar que era una EAEC, en sus análisis genéticos la presencia de genes *aggr*, *aaIC*, *aatA* entre otros genes, confirmaba el patotipo EAEC, pero la presencia de un bacteriófago acarreador de una verotoxina, como también se le conoce a las shigatoxinas, estableció la presencia de un nuevo patotipo *E. coli* enteroagregativo hemorrágico (EAHEC) (Brzuszkiewicz et al. 2011; Ahmed et al. 2012). El aislamiento de *E. coli* de campo, en diversos estudios ha mostrado la variabilidad de algunas cepas en cuanto a su capacidad para portar FV, estos FV transmitidos por TGH están asociados de igual forma a Enterobacterias filogenéticamente cercanas a *E. coli*, permitiéndole tener un recurso genético, tanto fuera del grupo de *E. coli* como dentro de este (Cid et al. 1999; Sandner et al. 2001; Blanco et al. 2005; Loukiadis et al. 2006; Aslani y Alikhani 2011; Wu et al. 2013; Bihannic et al. 2014; Beraldo et al. 2014; Hakim et al. 2017). Con el fin de buscar una relación genética, varios estudios se han centrado en estudiar las diferencias filogenéticas de las FV, para establecer un patrón de distribución entre diferentes patotipos de *E. coli*, sin embargo, se ve ha visto que conforme aumenta el número de estudios y de aislamiento, la presencia de cepas con diferente proporción de FV incrementa, no permitiendo establecerlas en un patotipo determinado (Blanco et al. 2005; Barrick et al. 2009; Brzuszkiewicz et al. 2011; Agus et al. 2014; Ahmed et al. 2012; Del Canto et al.

2012; Grad et al. 2013; Wu et al. 2013; Tozzoli et al. 2014; Lu et al. 2016). Aunado a esto para que algún gen de virulencia permanezca dentro del genoma depende de una fuerte regulación, no basta solo adquirirlo, debe ser capaz de ser silenciado, expresado y regulado, para ser funcional. Si bien la adquisición de material genético permite una ventaja evolutiva, también existe un costo-beneficio, lo que implica que las variantes exitosas en mantener un o más FV dentro de su genoma, son las que persisten, debido a la presión de selección, lo que explica que la adquisición de genes de virulencia tenga un fondo genético (David A. Baltrus 2013; Blasdel et al. 2017; Stanhope et al. 2001; Messinger y Ostling 2009; Gordon et al. 2017).

Eventualmente durante los brotes de enfermedades producidas por algún patotipo de *E. coli*, algunas de las cepas aisladas poseen una amplia gama de factores de virulencia, no correspondiendo a un patotipo común, sino a la combinación de algunos patotipos. Por esta razón algunos autores como Robins-Browne y colaboradores (2016) han cuestionado, si la clasificación por patotipos sigue siendo relevante en nuestros días. Por otro lado, estudios realizados por Malik y colaboradores, (2017) muestran que la virulencia de una cepa no está determinada por el serotipo, ni por presencia de todos los FV, considerados clave para un patotipo.

Determinación de filogrupos

En busca de establecer un patrón evolutivo acorde a la presencia genes asociados a la virulencia, *E. coli* se ha clasificado con base a la presencia o ausencia de genes metabólicos en 7 filogrupos, los cuales son: A, B1, B2, C, D, E y F (Clermont et al. 2013). En un inicio Clermont y colaboradores (2000) desarrollaron un sistema de tipificación en *E. coli*, empleando tres genes; *yjaA*, *chuA* y un fragmento de ADN llamado TSPE.C2, con este sistema de clasificación se ha podido dividir esta especie en filogrupos. En sus trabajos, estos investigadores evaluaron 230 cepas, mostrando la existencia de 4 filogrupos definidos: A, B1, B2, y D, la mayoría de las cepas patógenas estuvieron agrupadas en el filogrupo B2. Actualmente se han descrito 6 filogrupos, adicionando los filogrupos E y C, y se ha

observado que tanto cepas patógenas como no patógenas pueden encontrarse ubicadas en cualquiera de los filogrupos (Bohlin et al. 2014; O. Clermont et al. 2000; Clermont et al. 2013; Escobar-Páramo et al. 2004; Kaper et al. 2004). Si bien estos datos podrían sugerir que no existen características genéticas relevantes asociadas con la virulencia, otros investigadores han propuesto análisis diferentes. Escobar-Paramo y col. (2004), realizaron estudios filogenéticos con genes metabólicos, asociando los perfiles genéticos encontrados, con la presencia de genes de virulencia. Concluyendo que la asociación entre la presencia de genes metabólicos y FV, no es determinante, por lo cual no pueden asociarse cepas patógenas a un filogrupo determinado, otra de las características de los filogrupos es que parece tener una distribución geográfica y por el número de muestras puede ser que el fenómeno evolutivo no sea tan evidente (Souza y Rocha 1999; Science et al. 2017; Chase y Myers 2011; Stephens et al. 2016).

En diferentes estudios donde se han realizado aislamiento de *E. coli* de humanos, animales domésticos y animales de vida silvestre, se han encontrado con cepas que muestran diferentes combinaciones de genes de virulencia. Algunas de estas no pueden clasificarse en uno de los patotipos ya descritos, tampoco en uno de los filogrupos propuestos por Clermont, ya que existen cepas que no tienen los perfiles de genes metabólicos considerados en esta clasificación. Esta situación ha llevado a considerar a varios autores, la existencia de nuevos filogrupos (Escobar-Páramo et al. 2004; Lieberman et al. 2013; Lu et al. 2016). Por otro lado Carlos y col. (2010) muestran que los genes metabólicos propuestos por Clermont, tienen una distribución asociada con el hospedero, ya que una gran proporción de cepas aisladas de humanos y cerdos, comparten marcadores moleculares propuestos por Clermont, mientras que una mayor proporción de cepas aisladas de vacas, ovejas y cabras comparten otro de los marcadores moleculares. Lo que implicaría que la presencia de estos marcadores moleculares está determinada más por eventos evolutivos por un microambiente como es el rumen o estómago, y es independiente de la presencia de FV, y la adquisición de estos tiene otro fondo genético (Bouvet et al. 2017).

Análisis de fondos genéticos

Siguiendo el planteamiento de la existencia de un fondo genético específico, para la adquisición de FV, algunos autores como Bohlin y col. (2014), realizaron un comparación y una correlación entre la presencia de FV en el genoma extendido y un fondo genético presente en el genoma núcleo, para lo cual encontraron una correlación positiva vinculada al genoma núcleo con la presencia de factores de virulencia entre las 53 cepas analizadas, ellos tomaron en consideración el gen *mutT* (asociado a la hiper-mutabilidad) y su radio de divergencia en la filogenia de *E. coli* para encontrar una asociación entre la presencia del gen y la presencia de FV, vinculada a su capacidad de adaptabilidad. En su trabajo observaron que el genoma núcleo ha estado bajo una fuerte presión de selección, lo que ha permitido que se siga conservado. También que el genoma núcleo está relacionado a la presencia de los patotipos y de los filogrupos, mientras que la correlación entre el gen *mutT* y los FV no es significativa, observando que el gen *mutT* ha tenido modificaciones en las diferentes cepas analizadas y las cuales han estado sujetas a presión de selección (Bohlin et al. 2014).

En estudios más recientes, desarrollados por García-Gutiérrez y col. (2015), se ha sugerido que la ganancia de FV en cepas patógenas podría estar asociada con el sistema CRISPR. Bajo este concepto, en las cepas no patógenas, este sistema podría funcionar como un sistema de defensa en contra de la adquisición de material genético. No obstante, los resultados obtenidos por estos investigadores no muestran una correlación, sugiriendo que la presencia de CRISPR no determina la adquisición de FV.

Cabe resaltar que la mayoría de estos estudios que intentan vincular las características de virulencia a características genéticas, utilizan para sus análisis cepas aisladas de diferentes partes del mundo incluyendo las reportadas en la colección ECOR, por lo cual algunas correlaciones podrían estar enmascaradas. De acuerdo con Chase y Myers (2011), los procesos evolutivos pueden ser afectados por diversos factores a nivel local, por lo tanto, la escala espacial puede

influir en la presencia de patrones en los microorganismos. En macroecología, es ampliamente aceptado que un proceso ecológico-evolutivo está determinado tanto por el momento, el espacio y los procesos que influyen en la divergencia o especiación de determinado organismo (Stephens et al. 2016). Implicando que los factores ambientales o externos de los organismo y microorganismos, son un factor influyente en la evolución lo que permite la existencia de nuevas variantes. Algunos de estos factores son determinantes para el mantenimiento de la virulencia en una cepa. Autores como Bleibtreu y col. (2014), observan como en cepas de *E. coli* almacenadas en refrigeración, las cuales se han vuelto a crecer y a guardar durante varios años, pierden y disminuyen su virulencia, la cual es provocada por mutaciones generadas en *rpoS*, debido a que está bajo una fuerte presión de selección de forma natural, evitando que se presenten pocas variaciones, por el contrario en un laboratorio la presión de selección hacia este gen disminuye, permitiendo la aparición de variantes, las cuales generan pérdida o disminución de la virulencia.

Factores sigmas

En células procariontes existe un complejo enzimático dependiente del ADN, llamado ARN polimerasa (RNAP), el cual es encargado de llevar a cabo la transcripción del ADN. Esta holoenzima RNAP bacteriana consta de 6 subunidades: la subunidad β y β' , que forman el sitio activo, una subunidad dimérica, denominada α , una subunidad ω y una subunidad que establece una unión reversible llamado factores σ (Davis et al. 2017; Browning y Busby 2016). Muchas de las bacterias constan de diferentes factores σ , los cuales reconocen secuencias promotoras afines y esto permite asegurar que los genes dentro del genoma se expresen en momento adecuado y cuando sea necesario para la viabilidad celular (Davis et al. 2017).

Los factores son requeridos para el inicio de la transcripción, debido a que permite la unión de la RNAP al ADN, formando un complejo abierto y dando inicio a la transcripción. Diferentes factores sigma son utilizados para expresar genes, bajo diferentes condiciones tales como estrés (choque térmico e inanición), regulando

procesos de transcripción como la formación del flagelo (Paget 2015; Zhang et al. 2016). *E. coli* al igual que *Shigella* spp. especies filogenéticamente emparentadas tienen siete factores sigma. Los factores sigma que se muestran se pueden dividir en dos clases, σ_{70} y σ_{54} ; la familia de σ_{70} puede ser dividida en seis principales grupos (*rpoD*, *rpoS*, *rpoH*, *rpoE*, *fliA* y *fecI*). Mientras que la familia de σ_{54} solo tiene a *rpoN* (Cook y Ussery 2013).

El proceso de transcripción comienza con el ensamblaje de subunidades $\alpha\beta\beta'\omega$ dentro del núcleo del complejo RNAP. Una vez ensambladas las subunidades se une el factor sigma completando la holoenzima, una vez formada se dirige a regiones -10 y -35 corriente abajo del promotor, las cuales son secuencias de genes que comprenden al regulón del factor sigma (Chauhan et al. 2016; Zhang et al. 2016). Actuando de forma específica el factor sigma tiene un rol crucial en la apertura de la región -10 del promotor de la secuencia de ADN de doble cadena y en la unión de la cadena de ADN no molde. Formando una estructura de burbuja conocida como complejo abierto que permite que la RNAP se una y donde la cadena que será leída queda atrapada entre las subunidades β y β' , para empezar la lectura y la síntesis del RNA (Paget 2015). En el caso de *rpoN* no tiene los sitios canónicos de reconocimiento en la posición -10 y -35 corriente abajo del promotor, su sitio de unión son las regiones -12 y -24 corriente abajo del promotor. Durante el inicio de la transcripción, existe la presencia de transcritos de pequeños tamaños (de 2-15 nucleótidos), conocidos como secuencias abortivas, algunos de estos generados por la poca asociación entre los factores sigma y la secuencia transcrita (Browning y Busby 2016; Ades et al. 2003; Binder et al. 2016).

Se sabe que para que se inicia la transcripción es necesario el reconocimiento de los factores sigma a una secuencia y que variantes en la secuencia tanto en los factores sigma como en la secuencia transcrita, disminuye o bloquea el proceso de transcripción y que solo basta la alteración en la secuencia de tres nucleótidos para que el proceso se vea alterado (Leibman y Hochschild 2007; Lane y Darst 2006; Campagne et al. 2014). Además de que muchos de estos factores están involucrados con otros factores transcripcionales asociados a la expresión de

genes para su sobrevivencia como son: *fecI* asociado a la síntesis del citrato férrico, regulando el gen *fec* para el transporte de hierro; *rpoE* asociado a condiciones de estrés extracitoplásmico; *rpoF* asociado a la síntesis del sistema flagelar en *E. coli*; *rpoH* expresado durante condiciones de choque térmico; *rpoS* el cual regula el crecimiento y la fase estacionaria dependiendo de los recursos energéticos que tenga; *rpoN* regula la expresión de genes asociados a la eliminación de nitrógeno y *rpoD* asociado a biogénesis de LPS (Cook y Ussery 2013; Klein y Raina 2015).

Autores como López-Leal y col. (2016), han visto que la evolución en los factores sigma no ha sido a través de THG, si no un proceso de divergencia entre cepas, lo que involucra diferentes procesos de selección, lo que ha generado un proceso de diferenciación hacia algunos promotores. En conjunto con lo antes mencionado, su inactivación por mutaciones debida a la pérdida de presión de selección, vinculado a la pérdida de la virulencia y que son elementos requeridos y específicos para el inicio de la transcripción de genes y vinculados a procesos de sobrevivencia incluyendo la regulación de FV, son elementos de fondo genético posibles para la determinación de la presencia de FV (Bleibtreu et al. 2014; Campagne et al. 2014).

Si se considera que las infecciones por esta bacteria se han presentado como re-emergentes alrededor del mundo, en conjunto de lo antes mencionado: la aparición de nuevos patotipos, con nuevas combinaciones de factores de virulencia, toma relevancia. En estudios recientes se reporta la presencia de distintos patotipos de *E. coli*, algunos asociados a enfermedades en humanos, en heces de rumiantes domésticos, silvestres, como los bisontes (*Bison bison*) y diferentes mamíferos como el grupo de los carnívoros, como marmotas (Sandner et al. 2001; Olesen et al. 2012; Kudva y Stasko 2013; Massot et al. 2017; Lu et al. 2016). Si bien, en estos reportes se analiza la presencia de genes de virulencia, no se ha hecho un análisis filogenético para establecer en estas cepas silvestres sus filogrupos y con ello la congruencia con respecto a la adquisición de genes de virulencia. Es por eso la importancia del estudio, de un conjunto de cepas con FV, de un área

geográfica determinada, en sus condiciones naturales, tomando en cuenta la influencia del microambiente, como anteriormente se mencionó, que estaría representado por la diferencia en estructuras anatómicas y funciones de los aparatos digestivos de distintos taxones. Por lo cual para el estudio de características evolutivas de cepas patógenas de *E. coli* la mejor fuente de recursos son cepas aisladas de animales de vida silvestre.

En un estudio previo realizado, se logró patotipificar 66 cepas provenientes de carnívoros ubicados en la Reserva de la Biosfera de Janos (RBJ). Las cepas encontradas en este estudio se asociaron a patotipos EPEC y EHEC, y se evaluó su patogenicidad en cultivo celular. Considerando los reportes previos, donde se menciona que los rumiantes domésticos y silvestres pueden ser reservorios de algunas variantes de *E. coli* patógenas, se contempló una posible transmisión entre carnívoros y rumiantes silvestres de la RBJ cuestionándose, además, ¿Qué filogrupos podrían estar involucrados en este fenómeno? y ¿Es posible que se presente procesos evolutivos en las cepas durante esta transmisión? Para demostrar lo anterior se analizaron las características genéticas y fenotípicas de las cepas provenientes de bisontes, en conjunto con las obtenidas de carnívoros, en esta zona geográfica (RBJ). Además de lo anterior, dada la importancia de la regulación genética en los procesos de adquisición de genes, ¿Los factores sigma podrían estar asociados a la adquisición de FV? Los factores sigma son requeridos para el reconocimiento de promotores específicos para el inicio de la transcripción, ubicados a -10 y -35 pb, corriente abajo del promotor. Estos factores se ensamblan en conjunto con la enzima RNAP durante la transcripción de genes (Chauhan et al. 2016; Davis et al. 2017). Considerando lo anterior en este trabajo se propone aplicar estos conceptos, en el estudio de la evolución bacteriana, a través del estudio de cepas de patógenas y a patógenas de microorganismos de una región ecológica particular en una escala de tiempo específico, entendiendo que los procesos de regulación en la adquisición de nuevo material genético pueden verse moldeados por esta presión de selección mediada por el entorno. En este trabajo se propone relacionar la presencia de FV con la presencia de variantes de factores sigma que puedan regular la expresión de estos factores de

virulencia. Si bien estos elementos se encuentran altamente conservados (Cho et al. 2014), una variación podría determinar que una cepa pueda o no regular la expresión de un FV, afectando con ello su permanencia en el genoma.

Preguntas de investigación.

1. ¿Las cepas de *E. coli* PGV aisladas de carnívoros (*Canis latrans*, *Mephitis mephitis* y *Vulpes macrotis*) y Rumiantes (*Bison bison*) de la Reserva de la Biosfera de Janos Chihuahua, mostrarán los mismos FV, patotipos, serogrupos y filogrupos?
2. ¿Los patrones de factores de virulencia observados en las cepas de *E. coli* PGV aisladas de carnívoros (*Canis latrans*, *Mephitis mephitis* y *Vulpes macrotis*) y Rumiantes (*Bison bison*) de la Reserva de la Biosfera de Janos Chihuahua está asociado a variaciones genéticas en el factor *rpoD*?

Hipótesis

1. Las cepas de *E. coli* PGV de diferentes taxones compartirán FV, patotipos, serogrupos y filogrupos por encontrarse en una misma área geográfica.
2. Los patrones de FV encontrados en las cepas de *E. coli* PGV estará asociado a variaciones en el factor sigma *rpoD*, mostrando que la adquisición no es proceso aleatorio y depende de características genéticas en cada cepa.

Objetivo general.

Identificar variantes del factor sigma *rpoD* en los distintos patotipos, filogrupos y serogrupos de *E. coli* presentes en dos taxones diferentes de la Reserva de la Biósfera Janos, Chihuahua, a través de un análisis de desnaturalización del ADN de alta resolución (High Resolution Melt) o HRM, con el fin de establecer posibles procesos evolutivos en estas cepas.

Objetivos particulares:

- 1) Establecer si ambos taxones comparten patotipos, filogrupos y serogrupos de *E. coli*.
- 2) Analizar mediante HRM de las variantes en *rpoD* y la similitud entre las cepas aisladas

Materiales y métodos.

Área de estudio. Rancho Ecológico El Uno ubicada dentro de la Reserva de la biosfera de Janos, Chihuahua México, ubicada en el Municipio de Janos en el noroeste de Chihuahua, México. Las coordenadas del Rancho Ecológico El Uno son: 108° 25, 36" Oeste y 30° 50'17" Norte. El Rancho Ecológico El Uno pertenece a la asociación The Nature Conservancy, cuenta con 18 500 Ha, donde se encuentra una de las manadas de bisontes más grandes de México. Los tipos de vegetación es pastizal con matorral (Figura 1).

La reserva de la biosfera de Janos está delimitada al norte por los Estados Unidos de Norteamérica y al este con Sonora, localizada entre los meridianos 108° 56'49" y 108° 56' 22" Oeste y los paralelos 31° 11' 7" y 30° 11' 27" Norte. Cuenta con una superficie de 5 264 Km² que incluyen en el norte parte de la Sierra Madre Occidental y en el oeste parte del Desierto Chihuahuense, lo que resulta en un rango de altitud de los 1200 a los 2700 msnm. Presenta dos tipos de clima; árido templado, con una temperatura media anual de 15.7°C y una precipitación anual de 381 mm (77% de las lluvias entre abril y agosto) y en la región serrana, un clima templado húmedo, con una temperatura media anual de 11.8°C y una precipitación anual de 552mm. Los tipos de vegetación predominantes dentro de la Reserva de la Biosfera de Janos Chihuahua son Pastizales, matorrales y bosques (Pacheco et al. 2000) (Figura 1).

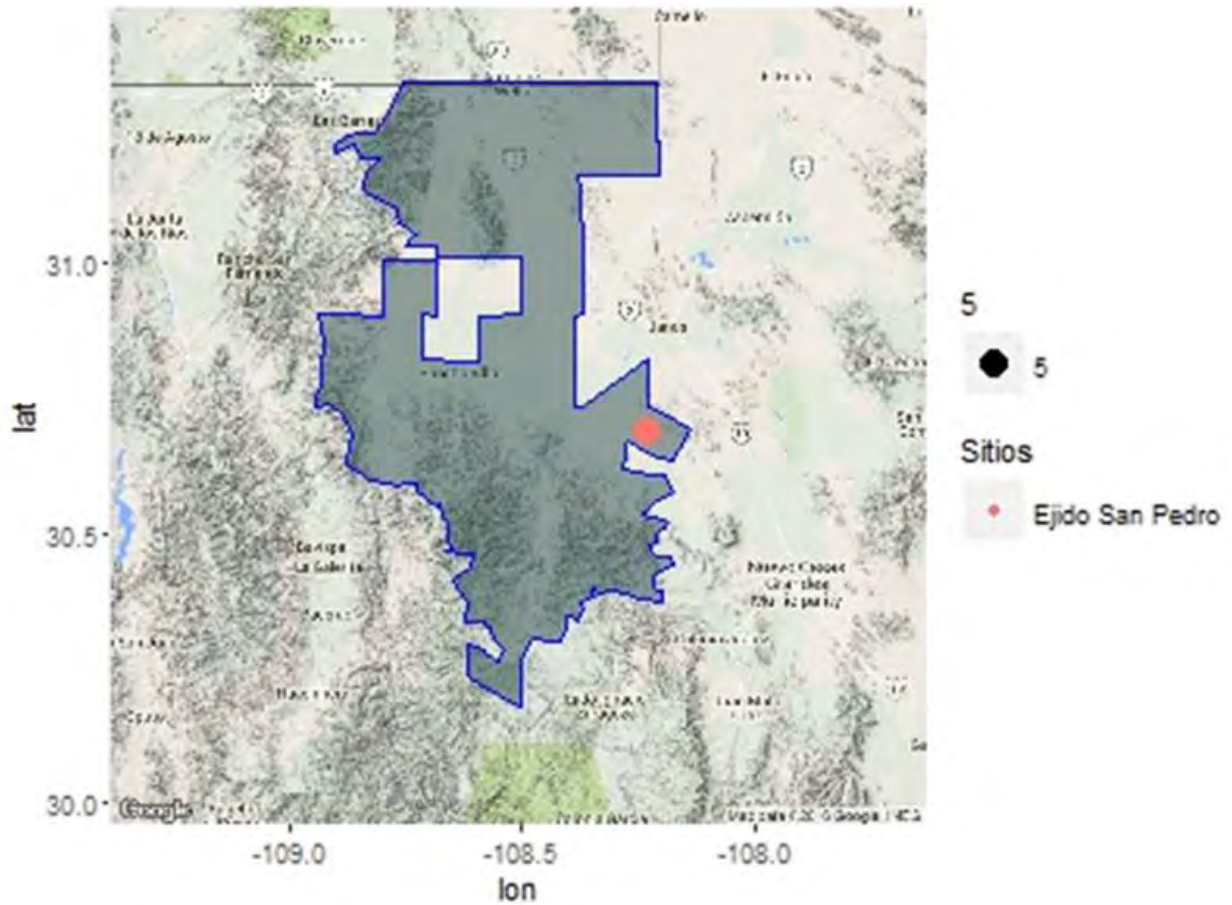


Figura 1. Mapa de la RBJ. Se muestra el punto de muestreo donde se localiza el Rancho en Uno donde se encuentran los bisontes que fueron muestreados

Toma de muestras. La colecta de muestras se realizó durante el manejo anual de Bisontes (2014, 2015 y 2016) realizado en el Rancho Ecológico El Uno. El manejo de bisontes se efectúa la primera semana de noviembre, el manejo de bisontes tiene una duración de dos días. El manejo incluye el arriado de los animales, para introducirlos a la manga de manejo. Una vez dentro de la manga de manejo se va movilizandolos uno por uno para entrar en un Shut de manejo para ganado, una vez dentro del Shut se tomaron las muestras de heces directas del recto de los individuos, marcando cada muestra con el número de arete del animal muestreado. Las muestras se guardaron en guantes estériles para posteriormente conservarlas en refrigeración hasta su análisis en el laboratorio. Los animales muestreados, fueron todos los bisontes mayores a un año de edad.

Análisis de las heces. Las heces fueron pesadas, y se tomaron 2 gramos los cuales fueron sembrados en 10 ml de caldo nutritivo por 20 horas a 37°C. Posteriormente se recuperaron 1ml del caldo previamente homogenizado con vortex, para realizar una dilución 1/100. De cada dilución se recuperaron 50 µl, los cuales fueron sembrados en cajas petri con medio Levin Eosina-Azul de Metileno por plaqueo y asa de vidrio, posteriormente se incubaron a 37°C por 20 horas, cada dilución fue plaqueada por duplicado. Después de este tiempo las colonias de *E. coli* (coloración verde metálico) fueron recuperadas al azar de ambas cajas y sembradas en cajas petri con medio Levin Eosina-Azul de Metileno en guía de 36 con asa microbiológica. En total se recuperaron 108 cepas por cada individuo, dividido en 3 cajas de 36 colonias sembradas en guía, a las cuales se les analizó la presencia de genes de virulencia. Las heces fueron analizadas en el Laboratorio de Microbiología Agropecuaria de la Universidad Autónoma de México, unidad Xochimilco (UAM-X).

Cepas de Carnívoros: Las cepas de *E. coli* portadores de genes de virulencia de la Reserva de la Biosfera de Janos (PGV-RBJ), fueron aisladas y recuperadas de muestras de hisopados rectales de carnívoros, durante los años 2014 y 2015, en un estudio previo. Estas cepas de *E. coli* PGV-RBJ fueron identificadas, genotipificadas y evaluadas en cultivo celular. En estas cepas de *E. coli* PGV-RBJ se identificaron los genes *stx1*, *stx2*, *escV*, *eae* y *bfpB*. Entre estas cepas aisladas de carnívoros en la reserva de la biosfera de Janos se encuentran cepas atípicas de EPEC (*escV+*, *eae+*, *bfpB-*), cepas productoras de shigatoxinas y cepas con genes asociados a lesiones de esfacelamiento (Cuadro 3). Los carnívoros de los cuales se recuperaron las cepas PGV son coyotes (*Canis latrans*), zorras del desierto (*Vulpes macrotis*) y zorrillos listados (*Mephitis mephitis*).

Cepas Control: Se cuenta con 6 cepas control: EPEC O127:H6 (E2348/69), EHEC O157:H7 (EOL933), ETEC O78:H11 (H10407), EAEC O42: NM, EIEC O143: NM y UPEC O73: NM. Las cepas de EPEC O127:H6, EHEC O157:H7 y ETEC O78:H11 son cepas ATCC. Las cepas de EAEC, EIEC y UPEC (CFT),

proviene de pacientes humanos con procesos entéricos, proporcionadas por el Dr. Carlos A. Eslava Campos, del Hospital Infantil Federico Gómez.

Extracción de ADN de las cepas *E. coli* de Bisontes y de las cepas de *E. coli* PGV-RBJ y de las cepas, por medio de la PCR: Las cepas de carnívoros y las cepas control fueron sembradas en tubos de 10 ml con Caldo nutritivo por 20 hrs a 37°C. Las cepas de bisontes fueron sembradas en pool de 36, en tubos de vidrio de 10 ml con Caldo nutritivo por 20 hrs a 37°C. Posteriormente los tubos de vidrio se centrifugaron (centrifuga CLAY ADAMS Brand DYNAC centrifuge) a 800 x g por 15 minutos, se decantaron y se recuperó la pastilla en microtubos de 1.5 ml.

Para la extracción de ADN se adiciono a cada muestra 600 µl de buffer de extracción (10 mM Tris-HCl pH 8, 400 mM NaCl, 20 mM EDTA pH 8.0 y 1% de dodecil sulfato de sodio) y 8 µl de proteinasa K (20mg/ml), se incubaron en un baño en seco (WISP-SA Dry Bath Incubator) por 1 hr a 56 °C. Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron (Hermle LaborTechnik GmbH - Z 160 M Microlitre Centrifuge) a 5500 x g durante 5 min, el sobrenadante fue transferido a un nuevo microtubo. A este sobrenadante se le agrego 500 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y se homogenizó con ayuda de un mezclador (IKA MS3 Basic) por 30 segundos. Está mezcla se centrifugo a 10500 x g por 2 min y el sobrenadante se transfirió a un nuevo microtubo. Al sobrenadante recuperado se le agrego 50 µl de acetato de sodio 3M a un pH 6 y se homogenizo por inversión, después se le agrego 10 ul de acrilamida lineal (2% acrilamida, 100 mM TBE pH 8.0), y se homogenizo. Posteriormente se precipito el ADN, adicionando 1 ml de etanol al 100% frío y se incubaron en hielo por 5 min, a continuación, cada muestra se centrifugo (Thermo Scientific MicroCL 17R) a 17000 x g a 4 °C durante 15 minutos. Se decanto él sobrenadante y se adiciono etanol al 70% frío a cada muestra. Esta mezcla se centrifugo a 17000 x g a 4 °C durante 15 min. El sobrenadante se decantó para recuperar la pastilla. Después se dejó secando durante 30 minutos a 37 °C en la estufa de incubación para evaporar restos de alcohol, por último, se resuspendió la pastilla en 50 µl de solución TE (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8). Se realizó un gel de agarosa para electroforesis para

comprobar la extracción de ADN, estas muestras de ADN se utilizaron para los siguientes análisis. En el caso de las muestras de los bisontes sembradas en pool de 36, cuando una muestra de ADN resulto positiva algún gen de virulencia, se regreso a la muestra original y se sembraron en pool de 6, estos pools de 6 se les realizo el procedimiento de extracción antes mencionado y se volvieron a evaluar a la presencia de algún gen de virulencia. Los pools de 6 que resultaron positivos a al menos un gen de virulencia, se regresó a la muestra original y se evaluaron por individual cada cepa, de esta forma se aisló en individual las cepas PGV.

Determinación de genes de virulencia. Las cepas aisladas de los bisontes fueron analizadas para la detección de algún FV de los patotipos EHEC, EPEC, ETEC, EAEC, EIEC. Las cepas de los carnívoros fueron analizadas para la detección de los FV's, de los patotipos ETEC, EAEC y EIEC, cuyos perfiles faltaba analizar en las cepas de los carnívoros.

Se utilizaron ocho juegos de iniciadores para amplificar segmentos de los genes: *eae*, *lt*, *st*, *escV*, *bfpB*, *stx-1*, *stx-2*, *aggR* y *ial*, incluyendo 4 en una PCR multiplex (*stx-1*, *stx-2*, *escV* y *bfpB* (Cuadro 1). Los genes *lt*, *st*, *eae* fueron desarrollados para este trabajo.

Cuadro 1. Secuencia de iniciadores para la PCR			
Nombre Secuencia(sentido/contrasentido)	Pertenece	Función	Amplicon (bp) Referencia
<i>eae</i> 3'-GGGGACATTTTAGTCA-5'/ 5'-GATCAGAAGCGAGTTGTGG-3'	EPEC	Necesario para la unión íntima a las células epiteliales. Asociada a las lesiones A/E (ataque y esfacelamiento)	600 En este estudio
<i>escV</i> 3'-GGCTCTCTCTTTATGGCTG-5'/ 5'-CCTTTTACAACTTCATCGCC-3'	EPEC EHEC	gen conservado, que pertenece a la isla de patogenicidad LEE.	534 Muller. Et. al., 2006
<i>bfpB</i> 3'-GATAAACTGATACTGGGCAGC-5'/ 5'-AGTGACTGTTCCGGAAGCAC-3'	EPEC	Subunidad del paquete formador de pili. Factor de adherencia ubicado dentro de un plásmido (EAF).	826 Muller. Et. al., 2006
<i>stx1</i> 3'-GGCGTTCTTATGTAATGACTGC-5'/ 5'-ATCCACGGACTCTTCCATC-3'	EHEC	Ubicado dentro de un fago. Producción de la toxina Shiga tipo 1	250 Muller. Et. al., 2006
<i>stx2</i> 3'-CGTTTTGACCATCTTCGCTCG-5'/ 5'-AGCGTAAGGCTTCTGCTGTG-3'	EHEC	Ubicado dentro de un fago. Producción de la toxina Shiga tipo 2	325 Muller. Et. al., 2006

st 3'-TAGAGACCGGTATTACAGAAATCTGA-5'/ 5'-TCATCCCGAATTCTGTTATATATGTC-3'	ETEC	Ubicado dentro de un plásmido. Enterotoxina termoestable	282 En este estudio
lt 3'-GGTTGGCAATTTTTATTTCTGTA-5'/ 5'-ATTACAACAAAGTTCACAGCAGTA-3'	ETEC	Localizada en el plásmido <i>pEnt</i> . Enterotoxina termolábil	183 En este estudio
aggr 3'-CTAATTGTACAATCGATGTGA-5'/ 5'-ATGAAGTAATTCTTGAAT-3'	EAEC	Activador transcripcional, requerido para la expresión de la fimbria de adherencia agregativa.	308 Morin et. al., 2013
ial 3'-GGTATGATGATGATGAGTCCA-5'/ 5'-GGAGGCCAACAAATTATTTCC-3'	EIEC	Locus asociado a la invasividad, ubicado dentro del plásmido <i>inv</i> , requerido para la invasión celular.	650 López-Saucedo et. al., 2003
chuA 5'-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3'/ 5'-ATGGTACCGGACGAACCAAC-3'	Filogrupos	Receptor de membrana externa de hemina, para la captación de hierro.	288 Clermont et. al., 2013
yjaA 5'-CAAACGTGAAGTGCAGGAG-3'/ 5'-AATGCGTTCCTCAACCTGTG-3'	Filogrupos	Proteína inducida por estrés. Utilizada como marcador molecular	211 Clermont et. al., 2013
TspE4c2 5'-CACTATTCGTAAGGTCATCC-3'/ 5'-AGTTTATCGCTGCGGGTCGC-3'	Filogrupos	Fragmento cromosomal utilizado como marcador molecular.	152 Clermont et. al., 2013
arpA1 5'-AACGCTATTCGCCAGCTTGC-3'/ 5'-TCTCCCATAACCGTACGCTA-3'	Filogrupos	Proteína asociada a la familia de las ankirinas. De igual forma asociada a la regulación del Acetil-CoA sintetasa.	400 Clermont et. al., 2013
arpAgpE 5'-GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC-3'/ 5'-GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGAG-3'	Filogrupos		301 Clermont et. al., 2013
trpAgpC 5'-AGTTTTATGCCAGTGCGAG-3'/ 5'-TCTGCGCCGGTCACGCC-3'	Filogrupos	Operon del Triptófano sintetasa las tres primeras subunidades	219 Clermont et. al., 2013
trpBA 5'-CGGCGATAAAGACATCTTAC-3'/ 5'-GCAACGCGGCCTGGCGGAAG-3'	Filogrupos	Operon de Triptófano sintetasa subunidad alfa y beta	489 Clermont et. al., 2013
rpoD 5'-AGGAGCTGGGCAAAAAGTG-3'/ 5'-AATTTTTGCGAGCCAGTTC-3'	Factor transcripcional	Uno de los principales factores sigma que ayuda a la transcripción de genes, en condiciones de estrés y crecimiento.	680 En este estudio

Las condiciones de los ciclos de la PCR para cada par de iniciadores fueron:

aggr: Desnaturalización inicial de 94°C por 5 min. Seguido de 30 ciclos de 94°C por 1 min, 56°C por 1 min y 72°C por 1:30 min; por último, una extensión final de 72°C por 5 min.

ial: Desnaturalización inicial de 94°C por 5 min. Seguido de 30 ciclos de 94°C por 1 min, 50°C por 1 min y 72°C por 30 seg; por último, una extensión final de 72°C por 5 min.

eaē: Desnaturalización inicial de 94°C por 5 min. Seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 50°C por 1 min y 72°C por 1 min; por último, la extensión final 72° por 5 min.

Multiplex: Desnaturalización inicial de 94°C por 5 min. Seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 50°C por 1 min y 72°C por 1 min; por último, la extensión final 72° por 5 min.

It y st: Desnaturalización inicial de 95°C por 5 min. Seguido de 95°C por 1 min, 52°C por 45 seg y de 72°C por 45 seg; por último, la extensión final 72° por 5 min.

Análisis de la diversidad y estructura de los FV, dentro de la población de *E. coli*, pertenecientes a los bisontes y carnívoros de la RBJ. Se realizó una curva de acumulación como una función del esfuerzo de muestreo, donde se asume que la riqueza total es el número de especies que se encontrarían con un esfuerzo infinito (asíntota). Un estimador ideal, de una curva de acumulación, debería alcanzar su propia asíntota mucho antes que la curva de acumulación de especies observadas, y aproximarse a ella de un modo no sesgado. Esta curva de acumulación se realizó para la presencia de FV, para mostrar que la forma de aislamiento y de identificación, permite observar el mayor número de combinaciones posibles, de los FV.

Para cuantificar la diversidad específica de los FV, se analizó la diversidad de FV presentes en las cepas, por individuo a través del índice de Shannon, el cual refleja la heterogeneidad de una comunidad sobre la base de dos factores: el número de especies presentes (en este caso los FV) y su abundancia relativa. Es una medida del grado de incertidumbre asociada a la selección aleatoria de un

individuo en la comunidad (Pla, 2006). Para evaluar si hay diferencia estadística, que nos muestre variaciones en la presencia de FV, entre los distintos taxones, se calculó la riqueza de los FV y se realizó una prueba Kruskal-Wallis, con la cual podemos comparar dos grupos independientes, con distribución aleatoria.

Se realizó un análisis de la estructura de la metacomunidad; entendido como el conjunto de comunidades locales conectadas a través de la dispersión de al menos algunas de las especies que las componen (Leibold et al., 2004). En el presente trabajo las comunidades están representadas por los individuos, ya sean bisontes o carnívoros, mientras que la especie compartida son las cepas de *E. coli* PGV representadas por los FV. Con el fin de ver si su distribución está determinada por algún posible gradiente.

Para realizar el análisis de la diversidad y estructura de los FV, dentro de la población de *E. coli*, pertenecientes a los bisontes y carnívoros de la RBJ, como antes se mencionó, se utilizó el programa R-Studio con las paqueterías *diversityR* y paquetería básica de R-studio.

Identificación serológica para la determinación del serogrupo y serotipo: Se realizó pruebas serológicas para determinar los serogrupos presentes, en las cepas aisladas de los Carnívoros y de los bisontes de la RBJ, con la presencia de algún FV. Las pruebas serológicas fueron realizadas con ayuda del laboratorio de investigación, ubicado en la torre de Biomédicas de la Universidad Nacional, Autónoma de México (UNAM).

Obtención de antígeno somático: Cada una de las cepas de *E. coli* PGV RBJ fue sembrada en tubos inclinados, con medio TSA, de 16X150 e incubados a 37°C durante 24h, posteriormente se añadió 10ml de solución salina hasta cubrir el pico de flauta y se dejó reposar, para remover las colonias crecidas en el agar. El contenido obtenido fue vaciado a otro tubo de ensaye para esterilizarlo a 110°C durante 2h y se le agregó 10ml de formalina.

Obtención de antígeno flagelar: En tubos de 16X150, se preparó medio semisólido, a los cuales se les agregó tubos de Durham y fueron inoculados con

asas bacteriológicas dentro de los tubos de Durham, posteriormente se incubaron a 30°C durante 2 semanas y se revisó el movimiento flagelar. Se tomó con una asa bacteriológica parte del crecimiento presente en la superficie y se inoculó en caldo biotriptasa previamente esterilizado, para ser incubados a 30°C durante 24h, se les agregó formalina para ser tapados con cinta de cera y proceder a homogenizarlos.

Procedimiento de serotipificación: 1) Antígenos somáticos; en tres placas de Elisa de fondo romo para cada muestra fueron agregados 50µl de suero somático de O1 a O187 y en cada pocillo 40µl del antígeno somático previamente preparado. Cada una de las placas fueron incubadas a 50°C durante 24h, y una vez pasado este tiempo se realizó la lectura, dependiendo del grado de aglutinación el cual se clasifica en negativo, +1, +2, +3 y +4.

Una vez finalizado el paso anterior se preparó diluciones, colocando 100µl del suero de interés de A1 a A12 y de B a H se agregó 50 µl de solución salina. Con una pipeta multicanal se tomó 50µl del suero de la A1 a A12 para homogenizar a los demás pocillos de la B a la H, posteriormente en cada columna se agregarán 40µl del antígeno correspondiente. Las placas fueron incubadas a 50°C durante 24h, se realizó la lectura para determinar el grado de aglutinación y determinar el título de 1:100 a 1:12800. Se seleccionan las cepas positivas para realizar sus diluciones con sueros puros, en los cuales se les asignaron títulos de 1:50 a 1:6400, en los pocillos de A1 a A12 se agregó 80µl de S.S con 20µl del suero puro correspondiente de la columna y de B a H se agregarán 50µl de S.S, se tomó con una pipeta multicanal 50µl de la fila A para homogenizar de la B a la H. Al igual que en las diluciones anteriores en cada una de las columnas se agregó 40µl del antígeno correspondiente, las placas se incubaron a 50°C durante 24h y se obtuvo su lectura; 2) Antígeno flagelar; para la obtención del antígeno flagelar se realizó el mismo procedimiento de los anteriores pasos descritos, con la excepción de que las placas fueron incubadas por 2h en cada paso.

Análisis de filogrupos. Las cepas aisladas de carnívoros y bisontes, previamente genotipificadas para algún FV, fueron analizadas para la detección de los filogrupos. Se identificaron los diferentes filogrupos, empleando las secuencias reportadas para cada uno de los 6 filogrupos presentes y el protocolo propuesto por Clermont y col. (2000) y Clermont y col. (2013) para *E. coli*. Y la determinación de los filogrupos fue según el protocolo de Clermont y col. (2013) (Cuadro 2). Las secuencias para la determinación de filogrupos son: *chuA*, *yjaA*, TspE4c2, *arpA1*, *arpAgpE*, *trpAgpC* y *trpBA* (Cuadro 1), Las constantes fueron tomadas de igual forma de Clermont (2013).

Quadruplex genotype				Phylo-group	Next step
<i>arpA</i> (400 bp)	<i>chuA</i> (288 bp)	<i>yjaA</i> (211 bp)	TspE4.C2 (152 bp)		
+	-	-	-	A	
+	-	-	+	B1	
-	+	-	-	F	
-	+	+	-	B2	
-	+	+	+	B2	
-	+	-	+	B2	Could be confirmed by testing <i>ibeA</i> gene ^a
+	-	+	-	A or C	Screen using C-specific primers. If C+ then C, else A
+	+	-	-	D or E	Screen using E-specific primers. If E+ then E, else D
+	+	-	+	D or E	Screen using E-specific primers. If E+ then E, else D
+	+	+	-	E or clade I	Screen using E-specific primers. If E- then clade I, confirm using cryptic clade primers ^b
-	-	+	-	Clade I or II	Confirm using cryptic clade primers ^b
-	(476) ^c	-	-	Clade III, IV or V	Confirm using cryptic clade primers ^b
-	-	-	+	Unknown	Perform MLST
-	-	+	+	Unknown	Perform MLST
+	-	+	+	Unknown	Perform MLST
+	+	+	+	Unknown	Perform MLST
-	-	-	-	Unknown	Confirm <i>Escherichia</i> identification using <i>uidA</i> or <i>gadA/B</i> ^d , if positive screen using cryptic clade primers ^b and/or perform MLST

Cuadro 2. Criterio de clasificación de filogrupos. Cuadro tomado del Original de Clermont y col. (2013), en cual se puede observar que el criterio de clasificación depende de la combinación de secuencias amplificadas,

Análisis estadístico multivariante. Se realizó una matriz de covarianza, a partir de datos de ausencia y presencia de FV, entre los factores; serogrupo y filogrupo. Esta matriz de covarianza fue utilizada para evaluar la correlación que existe, para algún FV y la pertenencia a un serogrupo o algún filogrupo. La correlación fue graficada en una Matriz de dispersión. Para el análisis multivariante y la Matriz de dispersión se utilizó el programa R-estudio, con las paqueterías; ggplot2, foreign y psych.

Análisis del factor sigma *rpoD* por medio del análisis de desnaturalización de alta resolución (High Resolution Melt) o HRM en las cepas controles. A través del análisis HRM, se evaluaron las cepas controles (EHEC, EPEC, ETEC, EAEC, EIEC y UPEC), para determinar las variaciones polimórficas en el factor Sigma *rpoD* y designar cuantos cluster se diferencian y denominarlos según su agrupación. Para lo cual se utilizó el equipo de Rotor Gene Q, (Quiagen), con el programa Screen clust (Quiagen) (Šimenc y Potočnik 2011; Tamay de Dios et al. 2013; Andini et al. 2017). Para la amplificación se escogió el factor sigma *rpoD* (Cuadro 1), las condiciones de la PCR fueron: desnaturalización inicial de 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C por 1 min y 72°C por 1 min, estas condiciones del PCR fueron parte del diseño de iniciadores, para este trabajo. Posteriormente se realizó la desnaturalización (MELT), en donde cada 0.2°C fue incrementando la temperatura de desnaturalización, hasta llegar a una temperatura de 84°C, para diferenciar los polimorfismos en base a la cantidad de enlaces de hidrogeno presentes entre GC (Andini et al. 2017). Para el análisis de HRM se utilizó el programa ScreenClust® el cual a partir de las temperaturas de desnaturalización realiza matrices de covarianza para las correlaciones y un análisis principal de componentes para establecer diferentes grupos (Reja et al. 2010). Primero se determinó una comparativa entre las cepas control para establecer el número de genotipos presentes.

Análisis del factor sigma *rpoD* por medio del análisis de desnaturalización de alta resolución (High Resolution Melt) o HRM en las cepas aisladas de bisontes y carnívoros. A través del análisis HRM, se compararon en las cepas aisladas de bisontes y carnívoros con FV, las variaciones polimórficas en el factor Sigma *rpoD* y determinar a qué clúster pertenecen. Para lo cual se utilizó el equipo de Rotor Gene Q, (Quiagen), con el programa Screen clust (Quiagen) (Šimenc y Potočnik 2011; Tamay de Dios et al. 2013; Andini et al. 2017). Para la amplificación se escogió el factor sigma *rpoD* (Cuadro 1), las condiciones de la PCR fueron: desnaturalización inicial de 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C por 1 min y 72°C por 1 min, estas condiciones del PCR fueron parte del diseño de iniciadores, para este trabajo. Posteriormente se realizó

la desnaturalización (MELT), en donde cada 0.2°C fue incrementando la temperatura de desnaturalización, hasta llegar a una temperatura de 84°C, para diferenciar los polimorfismos en base a la cantidad de enlaces de hidrogeno presentes entre GC (Andini et al. 2017). Para el análisis de HRM se utilizó el programa ScreenClust® el cual a partir de las temperaturas de desnaturalización realiza matrices de covarianza para las correlaciones y un análisis principal de componentes para establecer diferentes grupos (Reja et al. 2010). Primero se determinó una comparativa entre las cepas control para establecer el número de genotipos presentes. El análisis HRM puede observar variaciones en la temperatura de desnaturalización, por la temperatura de ruptura en los enlaces de hidrogeno y su proporción en base a la cantidad de CG, se pueden observar polimorfismos (Reja et al. 2010; Ghorashi et al. 2013; Souza y Falcão 2014; Harrison y Hanson 2017; Ohshima et al. 2017).

Resultados

Comparación en la presencia de Factores de Virulencia

En el año 2014 se muestrearon 42 bisontes de la RBJ. De cada muestra se logró recuperar 108 aislados de *E. coli*, dando un total de 4,536 aislados en el año 2015. En este mismo año, se realizó un segundo muestreo, tomando muestras de 81, de igual forma recuperando 108 muestras por cada individuo, teniendo un total de 8,748 del segundo muestreo. Se analizaron un total de 13,284 cepas provenientes de bisontes, para la detección de algún gen de virulencia. Solo en ocho individuos se aislaron cepas con la presencia de al menos un gen de virulencia, cuatro individuos del primer muestreo y cuatro individuos del segundo muestreo. En total se aislaron 73 cepas de bisontes, de las cuales 11 no tienen ningún gen de virulencia y 62 con al menos un gen de virulencia.

Los perfiles de genes de virulencia para las 62 cepas de los bisontes fueron: 3 cepas *stx*-1+, 29 cepas *stx*-2+, 3 cepas *escV*+, 5 cepas *eae*+, 1 cepa *ial*+, 2 cepa *escV*+*bfpB*+, 3 cepas *stx*1-+*stx*-2+, 9 cepas *stx*-2+ *laL*+, 1 cepa *eae*+*laL*+, 1 cepa *escV*+ *ial*+, 1 cepa *stx*-2+*eae*+*ial*+, 1 cepa *escV*+*eae*+*ial*+, 2 cepa *escV*+*bfpB*+*ial*+, 1 cepa *escV*+*bfpB*+*eae*+*ial*+

En las 61 cepas aisladas de diferentes especies de carnívoros (coyotes, zorras del desierto y zorrillos), se les analizó la presencia de genes de virulencia asociada a patotipos de ETEC, EAEC y EIEC. Sin embargo, en las cepas de los carnívoros no se obtuvo ningún amplificado para presencia de los genes evaluados (*ial*, *st*, *lt* y *aggr*). Teniendo un total de 134 cepas genotipificadas asociadas a algún patotipos. Teniendo perfiles asociado a tres patotipos diferentes los cuales son EHEC, EPEC (atípica y típicas) y EIEC, y diferentes combinaciones entre ellos (Cuadro 3).

Individuo	Taxón	N° de cepas: genes de virulencia	Patotipo asociado
20-Bvul	Carnívoro	1: <i>escV</i> 2: <i>eae</i> 6: <i>escV-eae</i>	EPEC-EHEC EPEC aEPEC
26-Bcoy	Carnívoro	3: <i>stx1-stx2</i>	EHEC
35-Bcoy	Carnívoro	17: <i>stx2</i>	EHEC
39-Bvul	Carnívoro	4: <i>eae</i> 10: <i>escV</i>	EPEC EPEC-EHEC
Coy-3	Carnívoro	2: <i>stx1-stx2</i>	EHEC
Meph-15	Carnívoro	12: <i>escV</i>	EPEC-EHEC
Meph-18	Carnívoro	3: <i>stx1</i>	EHEC
B-17	Rumiante	1: <i>eae</i> 1: <i>stx1-eae</i> 2: <i>stx1</i> 2: <i>stx2</i> 2: comensales 3: <i>stx1-stx2</i>	EPEC EPEC-EHEC EHEC EHEC EHEC
B-28	Rumiantes	2: comensales 4: <i>stx2-ial</i> 13: <i>stx2</i>	EHEC-EIEC EHEC
B-3	Rumiante	1: <i>ial</i> 1: <i>escV-eae-ial</i> 1: <i>escv-bfpB-eae-ial</i> 2: <i>escV-bfpB</i> 2: <i>escV-bfpB-ial</i> 3: <i>escV</i>	EIEC aEPEC-EIEC EPEC-EIEC aEPEC EPEC-EIEC EHEC-EPEC

B-46	Rumiante	1: <i>stx1</i> 2: <i>stx2-eae</i> 3: <i>stx2</i>	EHEC EPEC-EHEC EHEC
B-60	Rumiante	1: comensal 2: <i>eae</i>	EPEC
B-63	Rumiante	3: comensal 3: <i>stx2</i>	
B-64	Rumiante	1: comensal 1: <i>stx2-eae-ial</i> 3: <i>stx2</i> 5: <i>stx2-ial</i>	EHEC-EPEC-EIEC EHEC EHEC-EIEC
B-66	Rumiante	2: comensales 2: <i>eae</i> 5: <i>stx2</i>	EPEC EHEC

Cuadro 3, **Presencia de genes de virulencia en las cepas aisladas de carnívoros y bisontes de la RBJ por individuo.** Se muestra los diferentes genes de virulencia y la cantidad de cepas recuperadas por cada individuo de los dos diferentes taxones, además de patotipos asociados en la RBJ.

Las cepas provenientes de carnívoros carecen de perfiles asociados a EIEC, además de tener pocas combinaciones entre la presencia de genes de virulencia, estableciéndose dos perfiles asociados a dos patotipos específicos EHEC y EPEC. Sin embargo, la presencia de genes como *stx1*, *stx2*, *escV* y *eae*, es compartido entre ambos taxones, funcionando como recurso genético entre ambas poblaciones para el intercambio de material genético entre ambas poblaciones de *E. coli* (Cuadro 3).

Análisis de la diversidad de Factores de Virulencia y estructura de la población

La curva de acumulación muestra que, conforme se aumentó el número de cepas aisladas y genotipificadas, se obtuvieron un mayor número de combinaciones posibles, alcanzando una asíntota. De esta forma mostrando que con el esfuerzo

de muestra aplicado para la detección de FV, nos permite realizar análisis de diversidad (Figura 2).

El análisis de diversidad de FV muestra que los individuos con mayor diversidad de FV son: B-3 y B17 con 6 variantes cada uno y B-64 con 4 variantes diferentes, estos tres individuos muestran un índice de Shannon mayor a uno (Cuadro 4). Mientras que los demás individuos su diversidad es menor a uno teniendo menos de tres variantes dentro de su diversidad genética. En el caso de los que su

Sitio	20-Bvul	39-Bvul	Meph-15	B-17	B-28	B-3	B-46	B-60	B-63	B-64	B-66
Diversidad	0.8486	0.9556	0.5359	1.7201	0.8246	1.9792	1.0114	0.6365	0.6931	1.1682	0.9950

diversidad es 0 es porque solo tienen un FV.

Cuadro 4. índice de Shannon. Se muestra el índice de diversidad por individuo refiriéndose a la diversidad en genes de virulencia contenida en los individuos con cepas PGV.

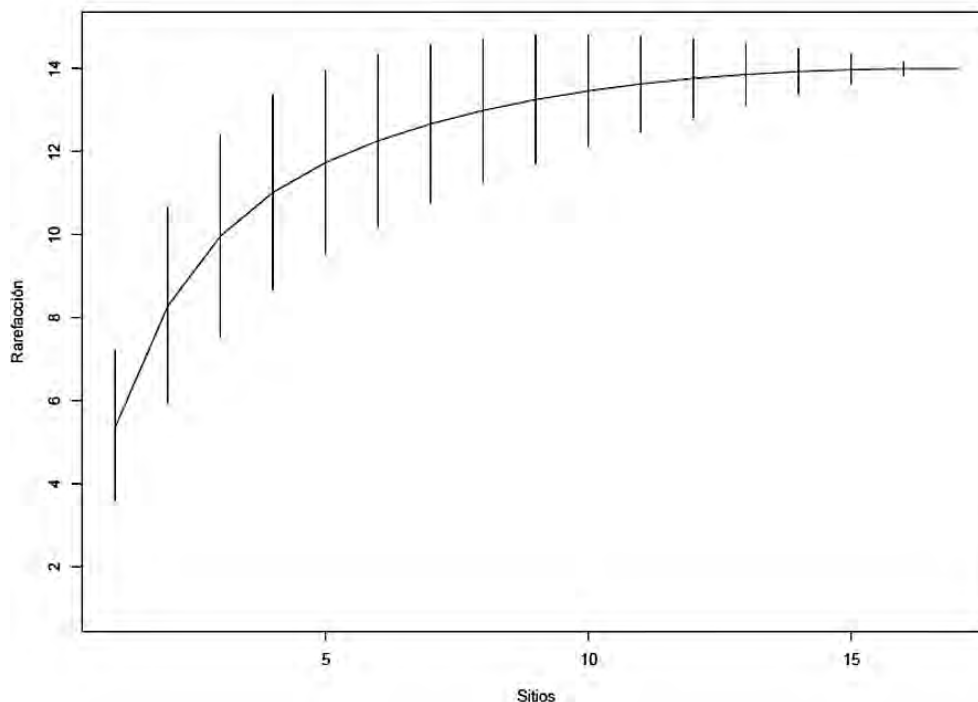


Figura 2. Curva de acumulación de FV encontrados. Se muestra la curva de acumulación de genes de virulencia, mostrando que se pudieron aislar la mayoría de los genes y sus combinaciones posibles.

La prueba estadística de Kruskal-Wallis mostro que la riqueza en la presencia de FV difiere entre los dos taxones, para lo cual se obtuvo una $p = 0.034$ por lo cual al ser $p < 0.05$, muestra que la riqueza difiere entre la población de carnívoros y de rumiantes (Figura 3). Posteriormente se analizó la estructura de la metacomunidad de *E. coli* PGV, de los individuos de ambos taxones, según los criterios de Leibold y Mikkelsen (2002). La metacomunidad de genes detectados de *E. coli* muestra un recambio en la presencia de genes de virulencia, además que en el análisis de Coherencia muestra una significancia de una $p < 0.05$, al igual que el recambio y el agrupamiento resultan ser muy significativos con una $p > 0.05$. Este tipo de patrón, indican que la metacomunidad tiene una estructura Clemensiana, es decir, que los genes de virulencia de cada población realmente pertenecen a un solo conjunto de genes y que su distribución a través de los individuos responde a algún gradiente se están intercambiando según (Figura 4 y Cuadro 5). (Figura 4 y Cuadro 5).

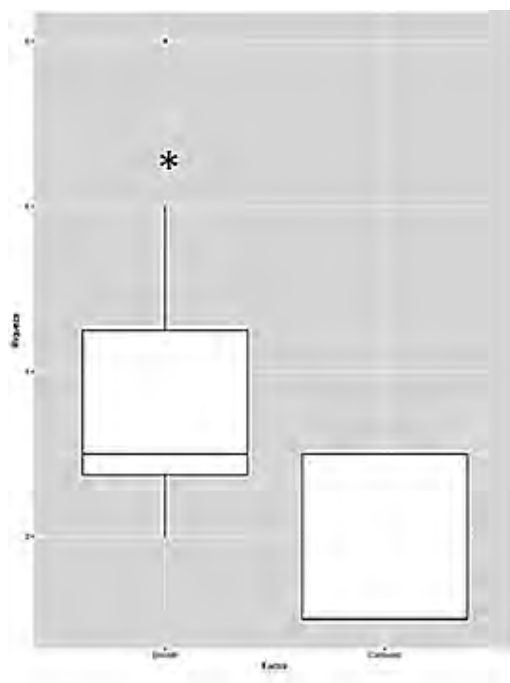


Figura 3 Varianza en la presencia de FV. Con un valor de $p = 0.03452$ a través de una prueba de chi-squared = 4.4686, se observa que el grupo de los Rumiantes o bisontes se obtuvo una diferencia mayor en la presencia de genes de virulencia

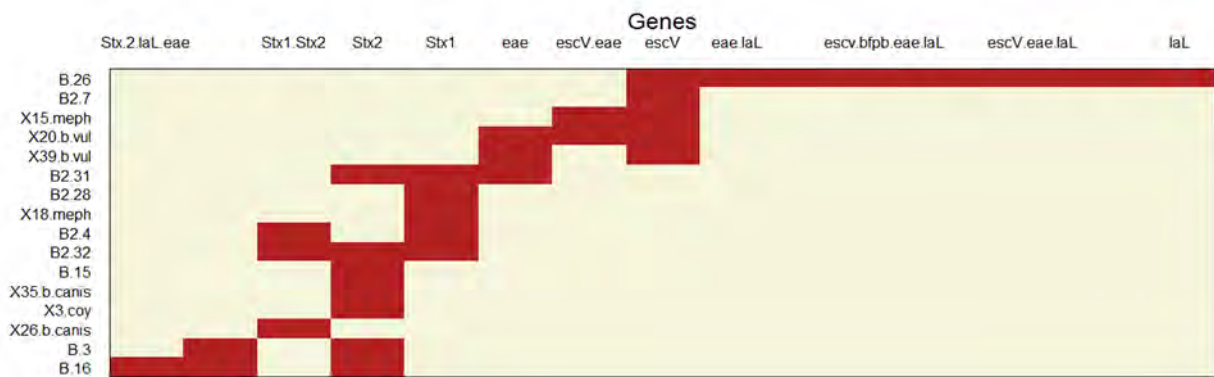


Figura 4. Estructura de la metacomunidad de FV de *E. coli*. A través del análisis de comunidad propuesto por Leibold y Mikkelsen (2002), se puede ver que la organización pertenece a una estructura de anidación.

Matriz	Coherencia				Recambio				Agrupamiento		Estructura
	p	Z	media	varianza	p	Z	media	varianza	índice	P	
Separado en cada cepa	0.22219	1.2206	16.258	5.1265	5.13E-10	-6.2152	177.333	17.484	2.1568	9.32E-05	Clementsiana
Combinación en cada cepa	0.020833	2.3109	33.116	10.0026	5.87E-05	-4.0178	332.069	28.1075	2.2413	3.13E-06	

Cuadro 5. **Valores estadísticos para el análisis de la estructura de la metacomunidad.** Se puede observar que para una matriz generada por combinaciones de genes las pruebas de Coherencia, Agrupamiento y Recambio hay un nivel de significancia con una $p < 0.05$, teniendo una estructura Clementsiana.

Presencia de filogrupos y serogrupos

Los filogrupos detectados en las cepas PGV RBJ pertenecientes a los bisontes y carnívoros, fueron cuatro de los siete filogrupos establecidos por Clermont y col. (2013). Los filogrupos encontrados fueron: A, B2, D y E. Su distribución de estos cuatro filogrupos, sólo fue en las cepas de los carnívoros (Cuadro 6). El filogrupo A esta presente en 3 cepas del Meph 18; el filogrupo B2 en 12 cepas del Meph 15; el filogrupo D se encuentra en 3 cepas del 35B- Coy, 1 cepa del 39Br-Vul y 1 cepa del Meph 15, su distribución parece ser por individuo. Mientras 115 cepas de los dos taxones muestran, un patrón desconocido en la presencia de genes metabólicos propuestos por Clermont, presentando la combinación de *arpA+*, *yjaA+* y *TspE4 C2+* (Cuadro 2). A demás de esto se observa que la presencia de

estos filogrupos es por individuos que por conjunto de genes de virulencia. De igual forma se analizó la presencia de serogrupos en algunas de las cepas de *E. coli* encontrando 12 serogrupos entre ellos: O10, O139, O153, O17, O175, O21, O22, O26, O75, O8, O93 y un O sin determinar (O?), mientras que la presencia del antígeno flagelar se encontró 11 variantes y una sin indefinida (H?) (Cuadro 6). Mientras que serotipos como el O21:H21 y O75:H38 se encuentra solo en un individuo, el serotipo O153:H7 y O139:H21 se encuentra distribuido dentro de diferentes carnívoros, pero no en algún bisonte. Se puede observar también que los serogrupos analizados de bisontes tiene una distribución por individuo, no por taxón. Como podemos ver en la Matriz de dispersión. Se observa que no hay una relación o una interacción entre los serogrupos y los filogrupos que determine la presencia de algún gen de virulencia (Figura 5).

Algunos de los serogrupos como O153:H7, O139:21 y O21:H21 se encuentran relacionados a cepas productoras de Shigatoxinas. El O153:H7 se ha encontrado asociado a enteritis hemorrágica en conejos, en este caso las cepas recuperadas no tenían ningún gen que codifique para alguna Shigatoxina, y en algunos casos tienen un perfil de aEPEC con la presencia de *escV+eae+*. Mientras que las cepas O139:21 y O21:21 están asociadas a procesos entéricos en humanos por presencia de Shigatoxinas.

Filogrupo	Cepa	O:	H:	Taxón	Genes de virulencia					
					<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>escV</i>	<i>bfpB</i>	<i>eae</i>	<i>ial</i>
A	Meph 18-7	O93	H?	Carnívoro						
	Meph 18-8	O93	H?	Carnívoro						
	Meph 18-17	O93	H?	Carnívoro						
	Meph 15-1	O153	H6	Carnívoro						
	Meph 15-2	O153	H6	Carnívoro						
	Meph 15-5	O153	H49	Carnívoro						

B2	Meph 15-6	O139	H49	Carnívoro						
	Meph 15-8	O139	H6	Carnívoro						
	Meph 15-21	O153	H6	Carnívoro						
	Meph 15-22	O153	H6	Carnívoro						
	Meph 15-23	O139	H6	Carnívoro						
	Meph 15-24	O139	H49	Carnívoro						
	Meph 15-27	O153	H6	Carnívoro						
	Meph 15-28	O139	H6	Carnívoro						
D	35-BCoy16	O ?	H11	Carnívoro						
	35-BCoy24	O ?	H11	Carnívoro						
	35-BCoy31	O ?	H11	Carnívoro						
	39-BrVul26	O153	H7	Carnívoro						
	Meph 15-12	O153	H49	Carnívoro						
E	20-BVul12	O153	H21	Carnívoro						
	39-BrVul29	O139	H21	Carnívoro						
	20-BVul4	O153	H21	Carnívoro						
	20-BVul5	O153	H21	Carnívoro						
	20-BVul6	O153	H21	Carnívoro						
	20-BVul7	O153	H21	Carnívoro						
	20-BVul8	O153	H21	Carnívoro						
	20-BVul25	O153	H21	Carnívoro						
	20-BVul28	O153	H21	Carnívoro						
	20-Bvul30	O175	H16	Carnívoro						

DESCONOCIDO	26-BCoy3	O75	H38	Carnívoro						
	26-BCoy6	O17	H18	Carnívoro						
	26-BCoy19	O75	H38	Carnívoro						
	35-BCoy5	O ?	H11	Carnívoro						
	35-BCoy9	O ?	H11	Carnívoro						
	35-BCoy14	O ?	H11	Carnívoro						
	35-BCoy17	O ?	H11	Carnívoro						
	35-BCoy21	O ?	H11	Carnívoro						
	35-BCoy23	O ?	H11	Carnívoro						
	35-BCoy26	O21	H21	Carnívoro						
	35-BCoy27	O21	H21	Carnívoro						
	35-BCoy28	O ?	H11	Carnívoro						
	35-BCoy30	O ?	H11	Carnívoro						
	35-BCoy32	O ?	H11	Carnívoro						
	35-BCoy33	O ?	H11	Carnívoro						
	35-BCoy35	O21	H21	Carnívoro						
	35-BCoy36	O21	H21	Carnívoro						
	39-BrVul5	O153	H7	Carnívoro						
	39-BrVul7	O153	H7	Carnívoro						
	39-BrVul8	O153	H7	Carnívoro						
	39-BrVul18	O153	H7	Carnívoro						
	39-BrVul20	O153	H7	Carnívoro						
	39-BrVul23	O139	H21	Carnívoro						
	39-BVul23	O139	H21	Carnívoro						
	39-BVul24	O153	H7	Carnívoro						
	39-BrVul25	O153	H7	Carnívoro						
	39-BrVul27	O139	H?	Carnívoro						
	39-BrVul31	O153	H7	Carnívoro						

39-BrVul28	O139	H21	Carnívoro							
Coy 3-19	O153	H28	Carnívoro							
Coy 3-31	O153	H28	Carnívoro							
B-3(6) 1	O22	H8	Rumiante							
B-3(6) 2	O22	H8	Rumiante							
B-3(6) 4	O22	H8	Rumiante							
B-3(6) 5	O22	H8	Rumiante							
B-3(6) 6	O22	H8	Rumiante							
B-3(6) 7	O22	H8	Rumiante							
B-3(6) 8	O22	H8	Rumiante							
B-3(6) 9	O22	H8	Rumiante							
B-3(6) 10	O22	H8	Rumiante							
B-3(6) 11	O22	H8	Rumiante							
B-3(6) 15	O22	H8	Rumiante							
B-3(6) 16	O22	H8	Rumiante							
B-3(6) 30	O22	H8	Rumiante							
B-3(6) 31	O22	H8	Rumiante							
B-3(6) 32	O22	H8	Rumiante							
B-3(6) 33	O22	H8	Rumiante							
B-3(4)3	O22	H8	Rumiante							
B-3(4)5	O22	H8	Rumiante							
B-3(4)6	O22	H8	Rumiante							
B-15(3) 1	O?	H21	Rumiante							
B-15(3) 2	O?	H21	Rumiante							
B-15(3) 3	O?	H21	Rumiante							
B-15(3) 4	O?	H21	Rumiante							
B-15(3) 5	O110	H21	Rumiante							
B-15(3) 7	O?	H21	Rumiante							

B-16(1) 27	O22	H8	Rumiante						
B-16(1) 28	O22	H8	Rumiante		Green				Dark Blue
B-16(1) 29	O22	H8	Rumiante		Green				Dark Blue
B-16(1) 32	O22	H-	Rumiante		Green			Red	Dark Blue
B-16(3)8	O22	H8	Rumiante		Green				Dark Blue
B-16(3)11	O22	H8	Rumiante		Green				Dark Blue
B-16(3)12	O22	H8	Rumiante		Green				Dark Blue
B-16(3)18	O22	H8	Rumiante		Green				
B-16(3)33	O22	H8	Rumiante		Green				
B-16(3)34	O22	H8	Rumiante		Green				
B-26(2)1	O26	H11	Rumiante			Light Blue			
B-26(2)2	O26	H11	Rumiante			Light Blue			
B-26(2)3	O26	H-	Rumiante			Light Blue		Red	Dark Blue
B-26(2)4	O26	H11	Rumiante			Light Blue			
B-26(2)5	O26	H11	Rumiante						Dark Blue
B-26(6)3	O26	H-	Rumiante			Light Blue	Yellow		
B-26(6)6	O26	H-	Rumiante			Light Blue	Yellow	Red	Dark Blue
B-26(6)11	O26	H-	Rumiante			Light Blue	Yellow		Dark Blue
B-26(6)14	O26	H-	Rumiante			Light Blue	Yellow		Dark Blue
B-26(6)22	O26	H-	Rumiante			Light Blue			Dark Blue
B-26(6)30	O26	H-	Rumiante			Light Blue	Yellow		
B-26(6)31	O26	H-	Rumiante					Red	Dark Blue
B2-14-3-(1)	O79	H-	Rumiante		Green				
B2-14-3-(15)	O79	H-	Rumiante		Green				
B2-14-3-(19)	O79	H-	Rumiante		Green				
B2-14-3-(24)	O79	H-	Rumiante						

B2-4-3-(5)	O79	H7	Rumiante							
B2-14-3-(6)	O?	H14	Rumiante							
B2-14-3-(9)	O79	H7	Rumiante							
B2-14-3-(12)	O10	H-	Rumiante							
B2-14-3-(13)	O8	H14	Rumiante							
B2-7-1-(15)	O8	H14	Rumiante							
B2-7-1-(14)	O8	H14	Rumiante							
B2-7-1-(26)	O8	H14	Rumiante							
B2-31-2-(1)	O112ab	H2	Rumiante							
B2-31-2-(4)	O112ab	H2	Rumiante							
B2-31-2-(8)	O8	H14	Rumiante							
B2-31-2-(16)	O8	H14	Rumiante							
B2-31-2-(22)	O8	H14	Rumiante							
B2-31-2-(25)	O8	H14	Rumiante							
B2-31-2-(30)	O8	H14	Rumiante							
B2-31-2-(31)	O8	H14	Rumiante							
B2-31-2-(32)	O112ab	H2	Rumiante							
B2-31-2-(34)	O8	H14	Rumiante							
B2-31-3-(24)	O8	H14	Rumiante							
B2-49-1-(2)	O79	H-	Rumiante							
B2-49-1-(5)	O79	H-	Rumiante							

B2-49-1-(7)	O79	H-	Rumiante							
B2-49-1-(9)	O79	H-	Rumiante							
B2-49-1-(28)	O79	H-	Rumiante							
B2-49-1-(33)	O79	H7	Rumiante							

Cuadro 6. **Presencia de Filogrupos y serogrupos en las cepas PGV RBJ en bisontes y carnívoros.** Se establece la presencia de filogrupos en las distintas cepas y la diferente distribución de genes de virulencia, además de la presencia de los serogrupos en estas. Los FV presentes en las cepas PGV RBJ, están rellenos por diferentes colores; rojo (*stx1*), verde (*stx2*), azul rey (*escV*), amarillo (*bfpB*), rojo ladrillo (*eae*) y azul cielo (*ial*)

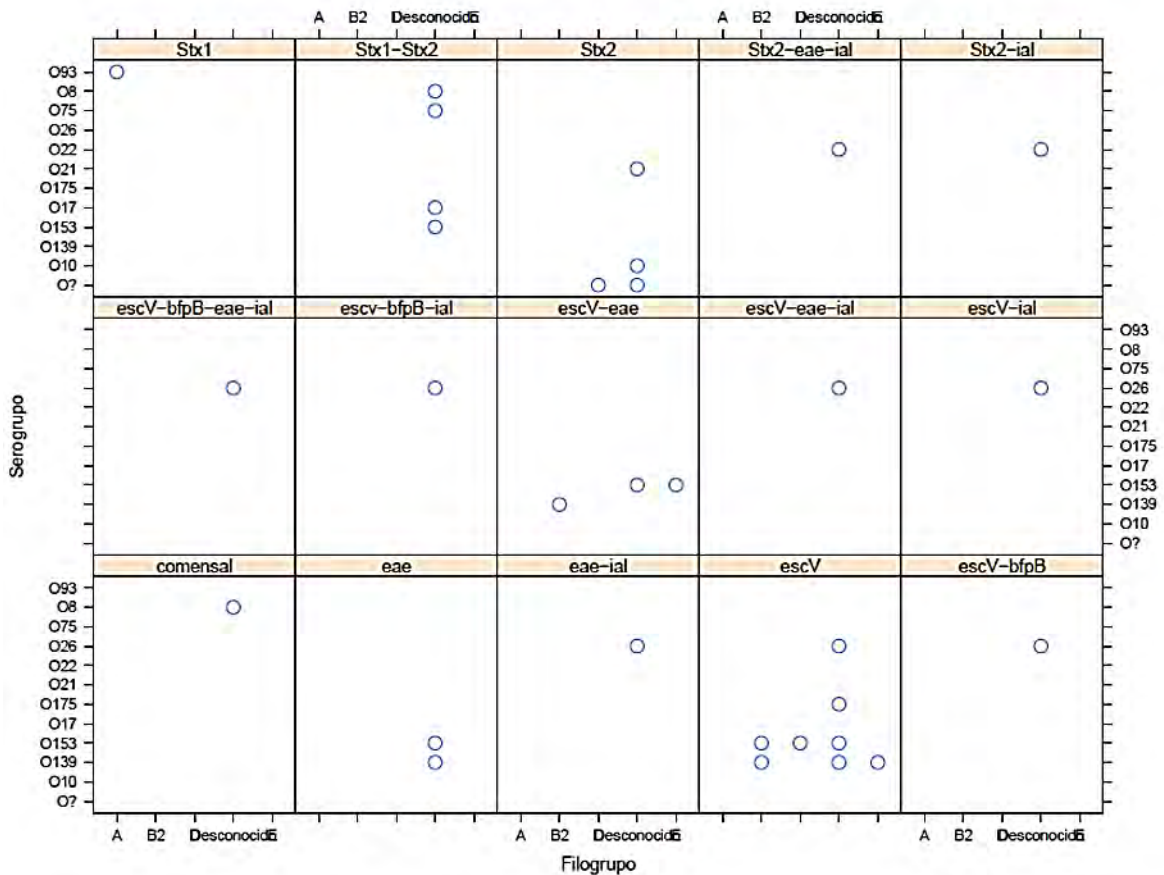


Figura 5 Grafica de dispersión entre los filogrupos y los serogrupos asociados a algún factor de virulencia. Se observa que no hay la presencia de alguna agrupación que este determinado por la presencia de los filogrupos o de Serogrupos

Establecimiento de genotipos a través de HRM

El análisis de las cepas control mostró que hay tres diferentes genotipos y que las cepas control comparten características genéticas, con base en el análisis de polimorfismos en el factor sigma *rpoD*. El análisis principal de componentes muestra la probabilidad de pertenencia de las cepas control; EPEC, EHEC, ETEC, EAEC, EIEC y CFT, en tres agrupaciones, es decir, se presentan tres genotipos de *rpoD* para los seis distintos patotipos. Se renombraron los clústeres en; 1) clúster EHEC el cual contiene a EHEC, EPEC, ETEC, 2) clúster EAEC, el cual contiene a EAEC y CFT y 3) el clúster EIEC. Los cuales se usarán para los siguientes análisis. Este resultado es coherente con los indicios de un común origen de entre estas cepas y la divergencia de EIEC (Cuadro 7 y Figura 6).

Nombre	Clúster	Probabilidad de pertenencia		
		Clúster 1	Clúster 2	Clúster 3
EPEC	Clúster 2	0.0000	1.0000	0.0000
EHEC	Clúster 2	0.0000	1.0000	0.0000
ETEC	Clúster 2	0.0000	1.0000	0.0000
EAEC	Clúster 1	1.0000	0.0000	0.0000
EIEC	Clúster 3	0.0000	0.0000	1.0000
CFT	Clúster 1	1.0000	0.0000	0.0000

Cuadro 7 **Genotipos presentes en *E. coli* para diferentes Patotipos, por las variantes en *rpoD***. Se muestra las diferentes agrupaciones, establecidas por las variantes polimórficas en *rpoD*. Las agrupaciones se realizaron por la probabilidad de pertenencia de cada cepa en los clústeres formados.

Cluster Plot

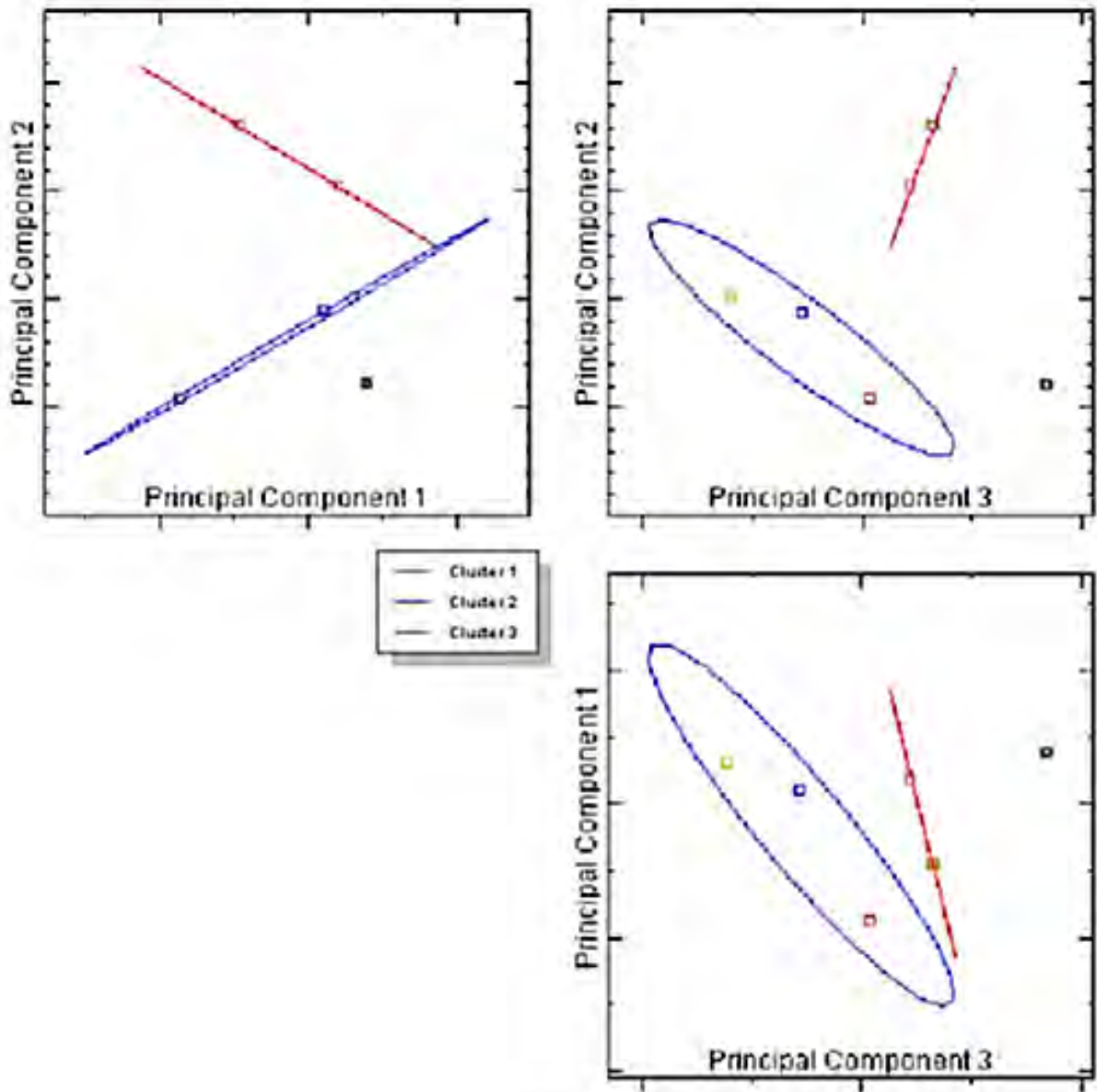


Figura 6. Análisis principal de componentes en tercera dimensión, de las cepas tipos (EHEC, EPEC, ETEC, EAEC, EIEC, UPEC). Se observa que las cepas tipo se agrupan tres clústeres por su probabilidad de pertenencia. El clúster 1 (Rojo) en el cual se encuentra las cepas EAEC y CFT; el clúster 2 (Azul) en el cual se agrupan las cepas EHEC, EPEC y ETEC; el clúster 3 (Verde) que contiene la cepa EIEC. Observando que se cuenta con tres perfiles genéticos para *rhoD*

Evaluación de variantes en *rpoD* en cepas de *E. coli* PGV RBJ de bisontes y carnívoros.

Las cepas de *E. coli* PGV RBJ de Carnívoros y bisontes, mostraron la presencia de dos, de los tres posibles clústeres previamente establecidos (EHEC, ETIEC, EAEC). En un análisis aleatorio de 14 muestras de bisontes y 12 muestras de carnívoros. Se obtuvieron mayores probabilidades de similitudes a los clústeres EHEC y EIEC (4 y 25 respectivamente). Mientras que las probabilidades de similitud, para el clúster EAEC, fueron menos del 45%, por lo cual no se identifica alguna cepa perteneciente al clúster EAEC. El clúster EAEC fue asociado a los patotipos EAEC UPEC. En estas cepas, tampoco se obtuvo ningún gen de virulencia para el patotipo EAEC (Figura 7 y Cuadro 8). Sin embargo, podría ser un indicador de que se trata de una población, al tener una misma homología en el gen *rpoD*. Para descartar que sea un genotipo de población se analizaron las muestras por bloques.

Cuando se analizó las muestras por bloques, se observa que tenemos en la RBJ los tres clústeres previamente establecidos. La distribución de los tres clústeres está presente en las cepas de *E. coli* PGV RBJ de carnívoros y bisontes, mostrando la presencia de tres diferentes genotipos en *rpoD*, en las cepas aisladas de *E. coli* PGV RBJ. En las cepas de los carnívoros, el análisis principal de componentes muestra, a partir de las probabilidades de pertenencia, que las principales agrupaciones o clústeres fueron EHEC y EIEC. En clúster de EAEC solo se obtuvieron 4 cepas (Figura 8).

Cluster Plot

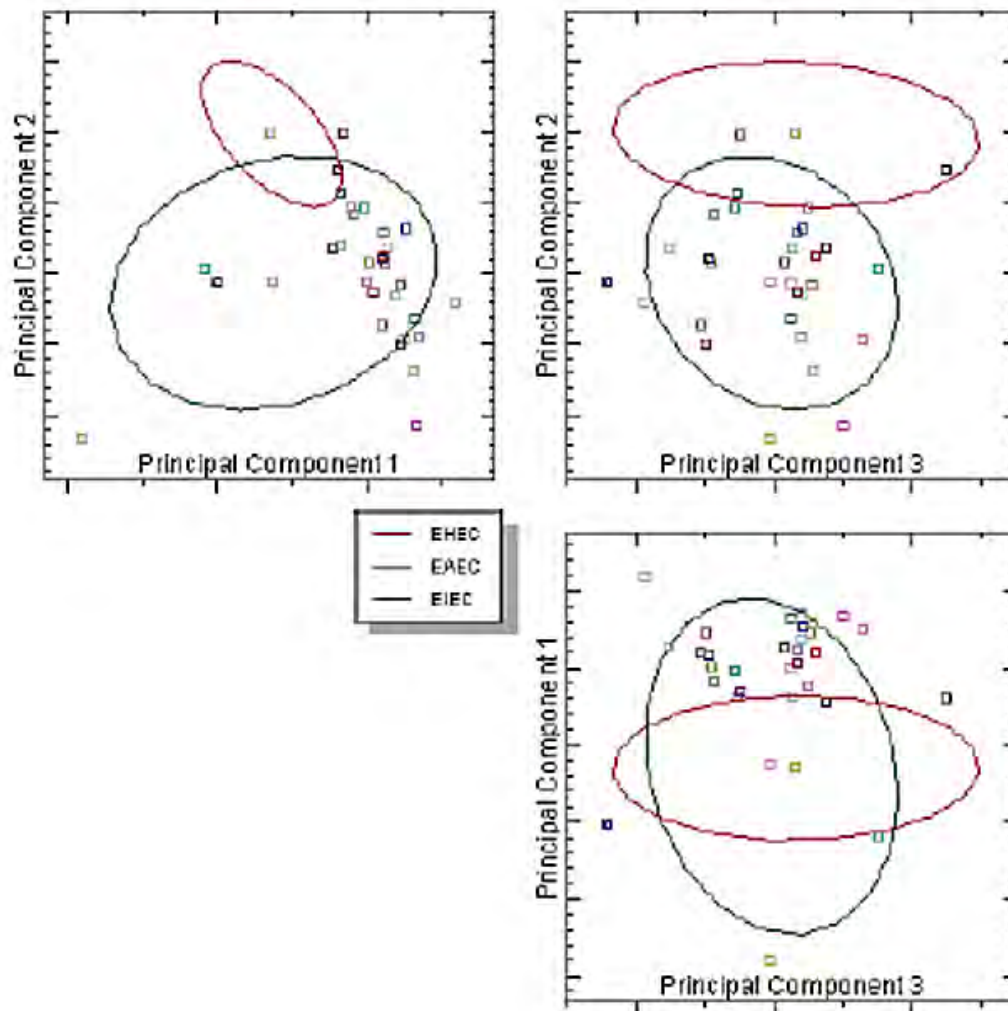


Figura 7 **Análisis principal de componentes en tercera dimensión, para el factor *rpoD* de cepas de Bisontes y carnívoros.** Se muestra el APC realizado para una muestra aleatoria de cepas con genes de virulencia de ambos taxones, en el se observa que se encuentran representados en su mayoría por los clústeres renombrados por sus perfiles: EHEC (clúster 2) y EIEC (clúster3). Mostrando la posible existencia de solo dos genotipos de *rpoD* en las cepas aisladas de la RBJ

		Probabilidad de pertenencia a los Clústeres		
Nombre	Clúster renombrado	EHEC	EAEC	EIEC
EHEC	EHEC	0.9881	0.0000	0.0119
EAEC	EAEC	0.0000	0.9855	0.0145
EIEC	EIEC	0.0000	0.0249	0.9751
E. coli 5dh	EIEC	0.0007	0.0071	0.9921
Meph 15-1	EIEC	0.0001	0.0005	0.9994
Meph 15-12	EIEC	0.0000	0.0022	0.9978
Meph 15-23	EHEC	0.9990	0.0000	0.0010
Meph 15-27	EIEC	0.0000	0.0004	0.9996
Meph 18-7	EIEC	0.0000	0.0046	0.9954
Meph 18-8	EIEC	0.0637	0.0045	0.9318
20-B vul 6	EIEC	0.0047	0.0041	0.9912
20-B vul 7	EIEC	0.0001	0.0052	0.9948
26-B coy 6	EIEC	0.4910	0.0013	0.5076
35-B coy 28	EHEC	0.7781	0.0004	0.2216
35-B coy 30	EIEC	0.0040	0.0061	0.9898
39-Br vul 8	EIEC	0.0021	0.0052	0.9927
29-Br vul 18	EIEC	0.0237	0.0023	0.9740
B-3(6)1	EIEC	0.0231	0.1349	0.8420
B-3(6)5	EIEC	0.6211	0.0121	0.3668
B-3(6)8	EHEC	0.7478	0.0072	0.2450
B-3(6)9	EIEC	0.0562	0.1306	0.8132
B-3(6)13	EHEC	0.9010	0.0012	0.0977
B-3(6)16	EIEC	0.0000	0.2892	0.7108
B-3(6)29	EIEC	0.0960	0.4124	0.4916
B-3(6)32	EIEC	0.0050	0.7526	0.2424
B-16(1)28	EIEC	0.4765	0.0459	0.4777
B-16(1)32	EIEC	0.0000	0.3177	0.6823
B-26(6)31	EIEC	0.0784	0.0054	0.9162
B2-4(3)2	EIEC	0.1981	0.0013	0.8006
B2-4(6)2	EIEC	0.0000	0.1560	0.8440
B2-4(3)14	EIEC	0.5882	0.0007	0.4111
B2-49(1)33	EIEC	0.0690	0.0012	0.9298

Cuadro 8. Tabla de Pertenencia a algún clúster, de las cepas aisladas de la RBJ de los bisontes y carnívoros. Se muestra la tabla de contingencia del APC, en el cual muestra la probabilidad de pertenencia a alguno de los tres clústeres (EHEC, EAEC y EIEC) y su tipicidad.

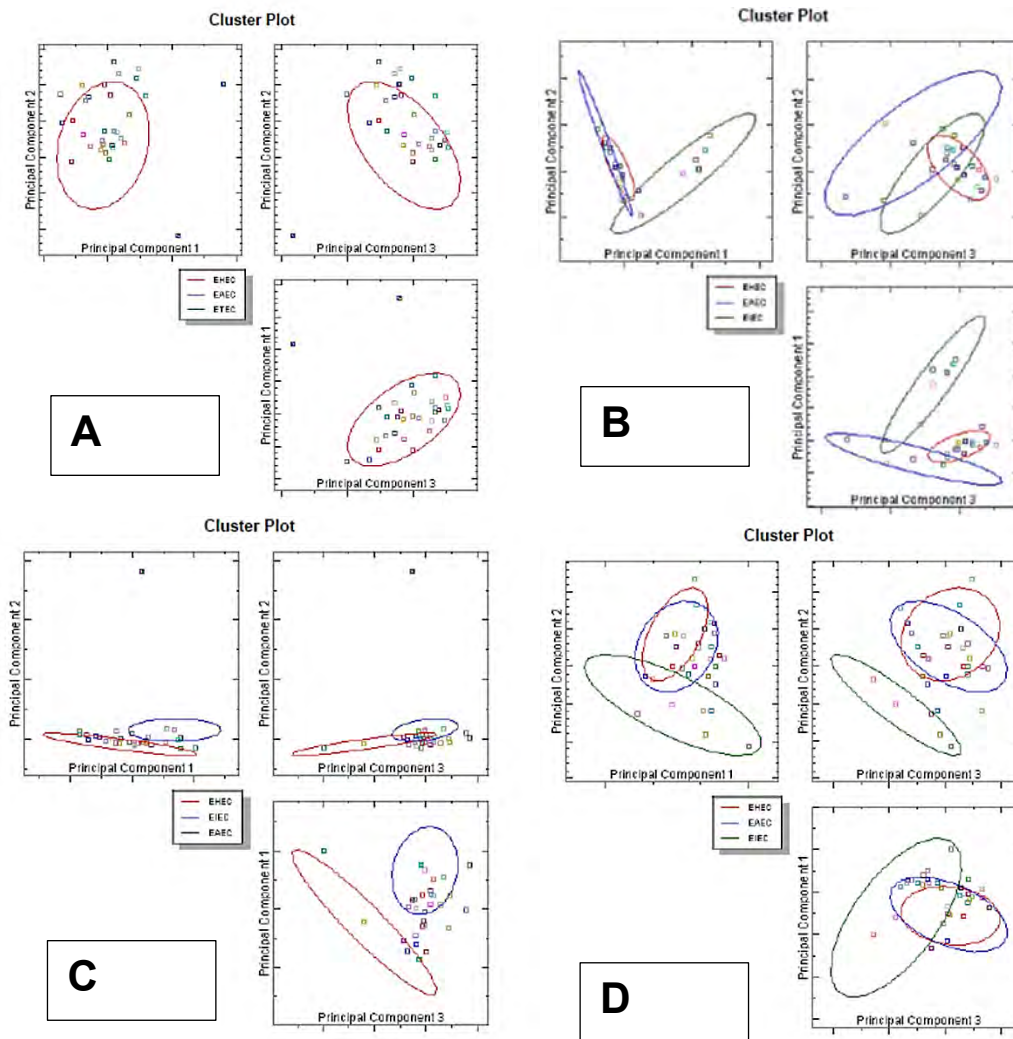


Figura 8 Análisis Principal de Componentes en tercera dimensión por taxón y su agrupación dentro de los tres genotipos: EHEC (Rojo), EIEC (azul) y EAEC (verde). En el bloque A y B se muestra las cepas provenientes de carnívoros, en la cual los clústeres que contienen más cepas con mas del 50% de probabilidad de pertenencia son: EHEC y EIEC. En los bloques C y D son las cepas provenientes de bisontes, la mayor cantidad de cepas con una probabilidad mayor al 50% de probabilidad de pertenencia, son representadas por el clúster EHEC

Para el caso de las cepas recuperadas de bisontes de igual forma los Clústeres principales son EHEC y EIEC, pero existe la presencia de cepas como el genotipo de EAEC. Como se había visto las cepas de ambos Taxones corresponden a una misma población o metacomunidad, sin embargo, los clústeres de agrupación muestran que aun en una misma población hay variantes genéticas en los factores sigma. Estas variaciones genéticas parecen estar vinculadas a la presencia de

algunos FV. Se observa en el cuadro 9, la presencia de FV asociados a patotipos EPEC y EHEC se encuentran en el clúster de EHEC. Se puede observar que 31 *stx2*, 8 *stx1-stx2* y 6 *escV-eae* se encuentran el clúster de EHEC, como antes se mencionó este clúster representa una variante del factor sigma *rpoD*, confirmando la asociación de variantes en factores sigma que permiten la presencia de FV para estos genes. Mientras que en el clúster EIEC se nota la presencia de genes asociados a *ial* asociado a cepas invasivas, mientras el clúster EAEC parece ser el que presenta más FV.

FACTORES DE VIRULENCIA	EAEC	EHEC	EIEC
COMENSAL	5	5	1
<i>eae</i>	4	2	5
<i>eae-ial</i>	1	0	0
<i>escV</i>	1	6	18
<i>escV-bfpB</i>	1	0	1
<i>escV-bfpB-ial</i>	1	0	1
<i>escV-eae</i>	0	6	1
<i>escV-eae-bfpB-ial</i>	1	0	0
<i>escV-eae-ial</i>	1	0	0
<i>escV-ial</i>	1	0	0
<i>ial</i>	0	0	1
<i>stx1</i>	0	6	0
<i>stx1-eae</i>	1	0	0
<i>stx1-stx2</i>	0	8	0
<i>stx2</i>	3	31	12
<i>stx2-eae</i>	1	1	0
<i>stx2-eae-ial</i>	0	0	1
<i>stx2-ial</i>	1	2	4

Cuadro 9. FV y sus combinaciones dentro de las cepas de *E. coli* PGV RBJ y su distribución en los tres distintos clústeres (EAEC, EHEC y EIEC), Se muestra como están distribuido los FV de las cepas de *E. coli* PGV RBJ de bisontes y carnívoros, en los tres distintos genotipos encontrados del factor sigma *rpoD*, los cuales se agruparon en los tres distintos clústeres. Observando que el clúster EHEC contiene los FV asociados a los patotipos EPEC y EHEC,

Discusión

Los resultados sugieren que la determinante para la presencia de algún FV es la participación de factores σ y la presencia de polimorfismos dentro de los factores sigma. Debido a que los factores sigma están bajo presión de selección, permitiendo la existencia de algunas variantes, Posiblemente estas variantes se deban a procesos evolutivos localizados, pero que mantienen secuencias conservadas, para los procesos de transcripción. El análisis HRM permitió la existencia de 3 genotipos, para los 6 patotipos reconocidos (Figura 6), esto genotipos concuerdan con las relaciones filogenéticas vistas por algunos investigadores. Estas relaciones filogenéticas emparentan los patotipos EHEC, EPEC y ETEC; los patotipos EAEC y UPEC, y el que se encuentra más distante de estos EIEC (CITA). Encontrando una posible determinante genética asociada a la presencia de FV. Algunos autores como Bohilin y col. (2014), observaron que dentro del genoma núcleo había asociación con la presencia de FV. Autores como Bleibtreu y col. (2014) y Cho y col. (2014), habían mencionado la importancia de los factores σ para mantener la virulencia y mantener un gen por presión de selección, por lo cual los consideramos candidatos idóneos relacionados a la adquisición de FV.

Las 134 cepas mostraron diversas combinaciones de genes de virulencia, indicando que las poblaciones de *E. coli* dentro de un mismo individuo pueden variar. En otros trabajos se han recuperado solo una cepa o se realiza la extracción de ADN de las heces, de medios de cultivo, el las cuales determinación la presencia de genes de virulencia, como si fuese una población heterogena. (Escobar-Paramo et al. 2004; Loukiadis et al. 2006; Bashir et al. 2012; Gonzales et al. 2013; Liu et al. 2014; Luo et al. 2016; Oh et al. 2016; Hakim et al. 2017). Las 108 colonias recuperadas por individuo, nos permitió observar que las poblaciones de *E. coli* no se comportan heterogéneamente, obteniendo diversas variantes (Figura 2)..

Al ser una población de cepas de *E. coli*, aisladas de una determinada zona geográfica, se puede inferir la posibilidad de transferencia de material genético

entre diferentes de *E. coli*, al conformar una metacomunidad en la cual pueden fluctuar los FV. En otros estudios se hace la asociación de aislados de distintas zonas geográficas, por lo cual puede comportarse como un proceso aleatorio la adquisición de material genético. (Souza y Rocha 1999; Escobar-Paramo et al. 2004; Le Gall et al. 2007; Tenaillon et al. 2010; Clermont et al. 2013).

En las cepas de *E. coli* PGV RBJ, se encuentran los tres genotipos establecidos por HRM. Los genotipos representativos en las cepas aisladas de *E. coli* PGV RBJ, son los genotipos EHEC y EIEC. Podemos observar que el genotipo EHEC contiene la mayor cantidad de genes *stx1*, *stx2*, y la combinación entre ambos. El análisis principal de componentes muestra una alta probabilidad de pertenencia de las cepas que tienen estos genes con el genotipo EHEC. Este resultado nos permite decir que, si hay asociación entre la presencia de FV y variantes en los factores σ , para corroborar este hecho faltaría evaluar, los demás factores σ . Se ha visto que cada factor sigma interactúa en procesos diferentes como la presencia de flagelo o estrés en el caso de *rpoD*, y esto es importante ya que se ha visto que los genes que codifican para la producción de toxinas Shiga se encienden en condiciones de estrés ambiental (Melton-celsa 2014; Lee et al. 2016; Smith et al. 2014; Tozzoli et al. 2014; Paget 2015).

Al analizar la diversidad de FV y la estructura de la metacomunidad, observamos que la diversidad difiere entre los diferentes taxones (Figura 3). Sin embargo, en su estructura como una metacomunidad de *E. coli*, como reportan Leibold y Mikkelsen (2002), tiene una estructura Clemensiana, lo que quiere decir que los FV de las cepas de *E. coli* de los distintos taxones, pertenecen a un mismo conjunto de FV, los cuales se comparten entre las diferentes cepas y obedecen a algún gradiente, ya sea ambiental o genético. Este tipo de análisis se puede aplicar a nivel molecular, al hablar de elementos móviles, que pueden ser adquiridos o transmitidos entre diversas poblaciones, siempre y cuando compartan un nicho, características genéticas y zonas geográficas. Características que cumple la dinámica de la THG (Koonin 2016; Soucy et al. 2015).

Al igual que en diversos estudios, se observa que las combinaciones de FV no son exclusivas de los patotipos ya descritos, pueden estar en distintas combinaciones los FV, sin poder localizarlas en algún patotipo en específico (Lu et al. 2016). Además, se han utilizado criterios para establecer la presencia de características genéticas asociada a la presencia de FV y patotipos. Uno de los criterios ha sido la presencia de filogrupos en diferentes cepas de *E. coli*. En las cepas de *E. coli* PGV RBJ aisladas de bisontes y carnívoros solo se encontraron 4 filogrupos, distribuidos en 20 de las cepas de los carnívoros (Cuadro 6). Sin embargo, estos 4 filogrupos están distribuidos por individuos. Dos de estos filogrupos presentes en las cepas de *E. coli* PGV RBJ, que se reportan con características de patógenas son; el B2 y el E, donde se encuentran las cepas reportadas como atípicas. Sin embargo las cepas aisladas de *E. coli* que pertenecen al grupo B2, solo tenían un FV (Smith et al. 2013; Servin 2014; Vila et al. 2016; Clermont et al. 2017). Mientras que las demás cepas de *E. coli* PGV RBJ aisladas de bisontes y carnívoros, presento un patrón desconocido para la presencia de algún filogrupo. Este patrón de filogrupo desconocido, está presente en las cepas de *E. coli* PGV RBJ de carnívoros y de bisontes.

Algunos autores como Carlos y col. (2010), mencionan que la presencia de estos genes metabólicos, con los cuales se desarrollan los filogrupos, están relacionadas a al tipo de digestión o dieta. Estos genes metabólicos no son transferidos a través de mecanismos de la THG, si están bajo el efecto de presión de selección, lo que puede hacer variar su presencia en diferentes cepas. Varios de los procesos de presión de selección también esta está influenciado por la competencia, es por lo cual algunos autores mencionan como la microbiota también ejerce la evolución de *E. coli* en el intestino (Miskinyte et al. 2013; De Sordi et al. 2017).

se infiere que La presencia de genes de virulencia no corresponde un filogrupo determinado, a diferencia de otros estudios donde analizan cepas de varias partes del mundo, lo que pudiese haber enmascarado la determinación genética de un filogrupo hacia algún FV (Olivier Clermont et al. 2000; Escobar-Paramo et al.

2004;). En este estudio como en el estudio de Lu y col. (2016), fue en una zona geográfica determinada, permitiendo eliminar la incertidumbre y probando que la presencia de un filogrupo no determina la presencia de un gen de virulencia.

Otro de las asociaciones que se han hecho a la presencia de FV, es la presencia de determinados serogrupos (Aslani y Alikhani 2011; Pizarro et al. 2013; Wang et al. 2013; Beraldo et al. 2014; Iguchi et al. 2015), en este estudio se obtuvieron diversos serogrupos, si bien parecería que los serogrupos están asociados a la presencia de un FV, dentro de los serogrupos varia la presencia de los FV. se observa que la presencia de un serogrupo, corresponde más a los individuos, que por la presencia de algún FV. Si bien los serogrupos O153 y O175 asociado a la presencia de toxinas, ninguna cepa con estos serogrupos tuvo la presencia de alguna toxina (Scaletsky et al. 2010; Tennant et al. 2009; Smith et al. 2014; Scaletsky et al. 2010; Bugarel et al. 2011). Otra de los serogrupos interesantes es el serogrupos O21, asociada a procesos infecciosos en niños, y productora de toxinas, en la cual si se encontró el gen *stx2* (Regina et al. 2005). Sin embargo, al igual que los filogrupos la presencia de algún serogrupo no determina la presencia de algún gen de virulencia como se ve en la Figura 5.

Conclusiones

- 1) Se logró establecer que por individuo se pueden alojar poblaciones de *E. coli* con diversos patrones en genes de virulencia.
- 2) Se logró demostrar que a pesar de que los rumiantes mostraban una mayor diversidad en cepas de *E. coli* PGV, en comparación con los carnívoros, estas formaban parte de una metacomunidad, con los FV como elementos móviles entre las distintas cepas de ambos taxones, lo anterior sugiere procesos activos de Transferencia Horizontal de Genes.
- 3) Se demostró que los bisontes pueden albergar cepas de *E. coli* asociadas a EHEC, EPEC y EIEC, incluyendo patotipos atípicos
- 4) Se logró demostrar que los genes de virulencia pueden estar en combinaciones diversas, no limitadas por patotipos específicos.
- 5) Como en otros trabajos, se demostró que la presencia de un patrón de genes de virulencia no está asociada a un serogrupo o filogrupo en particular.
- 6) Se logró establecer que los filogrupos propuestos por Clermont y colaboradores no son suficientes para analizar las cepas de *E. coli* PGV provenientes de animales silvestres.
- 7) Se logró asociar la presencia de patrones de genes de virulencia con variantes genéticas del factor sigma *rpoD*. Este dato sugeriría que los procesos evolutivos que generan variantes patógenas en *E. coli* podrían estar asociados a fondos genéticos específicos, principalmente en factores sigma.

Agradecimientos

Se agradece a la Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada, durante dos años, para cursar el programa de Maestría en Ciencias de la Salud y Producción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ). Así mismo se agradece a la FMVZ por aceptar el Proyecto, y permitir cursar el programa de Maestría.

Se agradece a la Universidad Nacional Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco (UAM-X) y a al Laboratorio de Microbiología Agropecuaria de la UAM-X, por el financiamiento, las instalaciones y los recursos para desarrollar el tema de investigación

Referencias

- Ades, S.E., Grigorova, I.L. y Gross, C.A., 2003. Regulation of the alternative sigma factor sigma(E) during initiation, adaptation, and shutoff of the extracytoplasmic heat shock response in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 185(8), pp.2512–9.
- Agus, A. et al., 2014. Understanding host-adherent-invasive *Escherichia coli* interaction in Crohn's disease: Opening up new therapeutic strategies. *BioMed Research International*, 2014.
- Ahmed, S.A. et al., 2012. Genomic Comparison of *Escherichia coli* O104:H4 Isolates from 2009 and 2011 Reveals Plasmid, and Prophage Heterogeneity, Including Shiga Toxin Encoding Phage stx2. *PLoS ONE*, 7(11).
- Albalat, R. y Cañestro, C., 2016. Evolution by gene loss. *Nature Reviews Genetics*, 17(7), pp.379–391.
- Altizer, S., Harvell, D. y Friedle, E., 2003. Rapid evolutionary dynamics and disease threats to biodiversity. *Trends in Ecology and Evolution*, 18(11), pp.589–596.
- Andini, N. et al., 2017. Microbial Typing by Machine Learned DNA Melt Signatures. *Scientific Reports*, 7, p.42097.
- Aslani, M.M. y Alikhani, M.Y., 2011. Molecular and phenotypic characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes isolated from children with and without diarrhea. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 44(1), pp.27–32.
- Awadalla, P., 2003. The evolutionary genomics of pathogen recombination. *Nature reviews. Genetics*, 4(1), pp.50–60.
- Baltrus, D.A., 2013. Exploring the costs of horizontal gene transfer. *Trends in Ecology y Evolution*, 28(8), pp.489–495.
- Barrick, J.E. et al., 2009. Genome evolution and adaptation in a long-term experiment with *Escherichia coli*. *Nature*, 461(7268), pp.1243–1247.

- Bashir, S. et al., 2012. Virulence profile of different phylogenetic groups of locally isolated community acquired uropathogenic *E. coli* from Faisalabad region of Pakistan. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 11(1), p.23.
- Baumler, D.J. et al., 2012. Using comparative genomics for inquiry-based learning to dissect virulence of *Escherichia coli* O157:H7 and *Yersinia pestis*. *CBE Life Sciences Education*, 11(1), pp.81–93.
- Beraldo, L.G. et al., 2014. Detection of Shiga toxin-producing (STEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* in dairy buffalo. *Veterinary Microbiology*, 170(1–2), pp.162–166.
- Berger, P. et al., 2016. The primary transcriptome of the *Escherichia coli* O104:H4 pAA plasmid and novel insights into its virulence gene expression and regulation. *Scientific Reports*, 6(1), p.35307.
- Bihannic, M. et al., 2014. Identification and detection of three new F17 fimbrial variants in *Escherichia coli* strains isolated from cattle. *Veterinary Research*, 45(1), p.76.
- Binder, S.C. et al., 2016. Functional modules of sigma factor regulons guarantee adaptability and evolvability. *Scientific Reports*, 6(September 2015), p.22212.
- Blanco, M. et al., 2005. Serotypes, intimin variants and other virulence factors of eae positive *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle in Switzerland. Identification of a new intimin variant gene (eae-eta2). *BMC microbiology*, 5, p.23.
- Blasdel, B.G. et al., 2017. Comparative transcriptomics analyses reveal the conservation of an ancestral infectious strategy in two bacteriophage genera. *The ISME Journal*, pp.1–9.
- Bleibtreu, A. et al., 2014. The rpoS Gene Is Predominantly Inactivated during Laboratory Storage and Undergoes Source-Sink Evolution in *Escherichia coli*. , 196(24), pp.4276–4284.

- Bohlin, J. et al., 2014. An evolutionary analysis of genome expansion and pathogenicity in *Escherichia coli*. , pp.1–13.
- Bouvet, O. et al., 2017. Diversity of the auxotrophic requirements in natural isolates of *Escherichia coli*. *Microbiology (United Kingdom)*, 163(6), pp.891–899.
- Browning, D.F. y Busby, S.J.W., 2016. Local and global regulation of transcription initiation in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 14(10), pp.638–650.
- Brüssow, H. et al., 2004. Phages and the Evolution of Bacterial Pathogens : from Genomic Rearrangements to Lysogenic Conversion Phages and the Evolution of Bacterial Pathogens: from Genomic Rearrangements to Lysogenic Conversion. *Microbiology and molecular biology reviews*, 68(3), pp.560–602.
- Brzuszkiewicz, E. et al., 2011. Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: Entero-Aggregative-Haemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC). *Archives of Microbiology*, 193(12), pp.883–891.
- Bugarel, M. et al., 2011. Virulence gene profiling of enterohemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* strains: a basis for molecular risk assessment of typical and atypical EPEC strains. *BMC microbiology*, 11(1), p.142.
- Campagne, S. et al., 2014. Structural basis for –10 promoter element melting by environmentally induced sigma factors. *Nature Structural y Molecular Biology*, 21(3), pp.269–276.
- Del Canto, F. et al., 2012. Identification of Coli Surface Antigen 23, a novel adhesin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, 80(8), pp.2791–801.
- Carlos, C. et al., 2010. *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. *BMC microbiology*, 10, p.161.
- Cha, W. et al., 2017. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing

- Escherichia coli* in finishing pigs: Implications on public health. *International Journal of Food Microbiology*, 264(April 2017), pp.8–15.
- Chase, J.M. y Myers, J.A., 2011. Disentangling the importance of ecological niches from stochastic processes across scales. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1576), pp.2351–2363.
- Chauhan, R. et al., 2016. Reconstruction and topological characterization of the sigma factor regulatory network of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Communications*, 7(May 2015), p.11062.
- Cho, B. et al., 2014. Genome-scale reconstruction of the sigma factor network in *Escherichia coli*: topology and functional states. *BMC Biology*, 12(1), p.4.
- Cid, D., Sanz, R. y Marin, I., 1999. Characterization of Nonenterotoxigenic *Escherichia coli* Strains Producing F17 Fimbriae Isolated from Diarrheic Lambs and Goat Kids. *Journal of clinical ...*, 37(5), pp.1370–1375.
- Clements, A. et al., 2012. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes*, (April), pp.71–87.
- Clermont, O. et al., 2013. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1), pp.58–65.
- Clermont, O. et al., 2017. Two levels of specialization in bacteraemic *Escherichia coli* strains revealed by their comparison with commensal strains. *Epidemiology and Infection*, 145(5), pp.872–882.
- Clermont, O., Bonacorsi, S. y Bingen, E., 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), pp.4555–4558.
- Clermont, O., Gordon, D. y Denamur, E., 2015. Guide to the various phylogenetic classification schemes for *Escherichia coli* and the correspondence among schemes. *Microbiology (Reading, England)*, 161(2015), pp.980–988.

- Connolly, J.P.R., Brett Finlay, B. y Roe, A.J., 2015. From ingestion to colonization: The influence of the host environment on regulation of the LEE encoded type III secretion system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 6(JUN), pp.1–15.
- Conway, T. y Cohen, P.S., 2015. Commensal and Pathogenic *Escherichia coli* Metabolism in the Gut. *Microbiol Spectr*, 3(3), pp.1–23.
- Cook, H. y Ussery, D.W., 2013. Sigma factors in a thousand *E. coli* genomes. *Environmental Microbiology*, 15(12), pp.3121–3129.
- Croxen, M. a et al., 2013. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, 26(4), pp.822–80.
- Croxen, M. a y Finlay, B.B., 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature reviews. Microbiology*, 8(1), pp.26–38.
- Davis, M.C. et al., 2017. The Essential Activities of the Bacterial Sigma Factor. , 99(November 2016), pp.1–36.
- Delannoy, S. et al., 2017. The mobilome; A major contributor to *Escherichia coli* stx2-Positive O26: H11 strains intra-serotype diversity. *Frontiers in Microbiology*, 8(SEP), pp.1–17.
- Delannoy, S., Beutin, L. y Fach, P., 2013. Towards a Molecular Definition of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC): Detection of Genes Located on O Island 57 as Markers To Distinguish EHEC from Closely Related Enteropathogenic *E. coli*. , 51(4), pp.1083–1088.
- Discovery, G., Required, G. y Production, C., 2017. crossm Genome-Wide Discovery of Genes Required for Capsule Production by. , 8(5), pp.1–16.
- Dobrindt, U., Hacker, J.H. y Svanborg, C., 2015. Pathogenicity, *E. coli* as an All-Rounder: The Thin Line Between Commensalism and. In U. Dobrindt, J. H. Hacker, y C. Svanborg, eds. *Between pathogenicity and commensalism*. Berlin Heidelberg: Springer, pp. 3–32.

- England, W.E. y Whitaker, R.J., 2013. Evolutionary causes and consequences of diversified CRISPR immune profiles in natural populations. *Biochemical Society Transactions*, 41(6), pp.1431–1436.
- Erez, Z. et al., 2017. Communication between viruses guides lysis – lysogeny decisions. *Nature Publishing Group*, 541(7638), pp.488–493.
- Escobar-Paramo, P. et al., 2004. A Specific Genetic Background Is Required for Acquisition and Expression of Virulence Factors in *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol*, 21(6), pp.1085–1094.
- Franzin, Fernanda M., and Marcelo P. Sircili. “Locus of Enterocyte Effacement: A Pathogenicity Island Involved in the Virulence of Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia Coli* Subjected to a Complex Network of Gene Regulation.” *BioMed Research International* 2015 (2015): 534738. *PMC*. Web. 19 June 2018.
- Fratamico, P.M. et al., 2016. Advances in molecular serotyping and subtyping of *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAY), pp.1–8.
- Le Gall, T. et al., 2007. Extraintestinal virulence is a coincidental by-product of commensalism in B2 phylogenetic group *Escherichia coli* strains. *Molecular Biology and Evolution*, 24(11), pp.2373–2384.
- Gal-Mor, O. y Finlay, B.B., 2006. Pathogenicity islands: A molecular toolbox for bacterial virulence. *Cellular Microbiology*, 8(11), pp.1707–1719.
- García-Gutiérrez, E. et al., 2015. CRISPR Content Correlates with the Pathogenic Potential of *Escherichia coli*. *Plos One*, 10(7), p.e0131935.
- Ghorashi, S.A. et al., 2013. Comparison of multiple genes and 16S-23S rRNA intergenic space region for their capacity in high resolution melt curve analysis to differentiate *Mycoplasma gallisepticum* vaccine strain ts-11 from field strains. *Veterinary Microbiology*, 167(3–4), pp.440–447.
- Gonzales, L. et al., 2013. Molecular characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates recovered from children with diarrhea during a 4-year period

- (2007 to 2010) in Bolivia. *Journal of clinical microbiology*, 51(4), pp.1219–25.
- Gordon, D.M. et al., 2017. Fine-Scale Structure Analysis Shows a Cosmopolitan *Escherichia coli* Lineage. *Ecological and Evolutionary Science*, 2(3), pp.1–15.
- Grad, Y.H. et al., 2013. Comparative genomics of recent Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4: short-term evolution of an emerging pathogen. *mBio*, 4(1), pp.1–10.
- Hacker, J. y Carniel, E., 2001. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity: A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO reports*, 2(5), pp.376–381.
- Hakim, A.S. et al., 2017. Serotyping, antibiotic susceptibility, and virulence genes screening of *Escherichia coli* isolates obtained from diarrheic buffalo calves in Egyptian farms. *Veterinary World*, 10(7), pp.769–773.
- Harrison, L.B. y Hanson, N.D., 2017. High-resolution melting analysis for rapid detection of sequence type 131 *Escherichia coli*. , 61(6), pp.1–8.
- Heilmann, S., Sneppen, K. y Krishna, S., 2010. Sustainability of virulence in a phage-bacterial ecosystem. *Journal of virology*, 84(6), pp.3016–3022.
- Huddleston, J.R., 2014. Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: Potential spread of antibiotic resistance genes. *Infection and Drug Resistance*, 7, pp.167–176.
- Iguchi, A. et al., 2015. *Escherichia coli* O-genotyping PCR: A comprehensive and practical platform for molecular O serogrouping. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(8), pp.2427–2432.
- Jones, K.E. et al., 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451(7181), pp.990–3.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P. y Mobley, H.L.T., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), pp.123–140.
- Khot, Prasanna D., and Mark A. Fisher. “Novel Approach for Differentiating

- Shigella Species and Escherichia Coli by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry.” *Journal of Clinical Microbiology* 51.11 (2013): 3711–3716. *PMC*.
- Klein, G. y Raina, S., 2015. Regulated control of the assembly and diversity of Ips by noncoding sRNAs. *BioMed Research International*, 2015.
- Köhler, C.D. y Dobrindt, U., 2011. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? *International Journal of Medical Microbiology*, 301(8), pp.642–647.
- Koli, P. et al., 2011. Conversion of Commensal *Escherichia coli* K-12 to an Invasive Form via Expression of a Mutant Histone-Like Protein. *mBio*, 2(5), pp.1–13.
- Koonin, E. V., 2016. Horizontal gene transfer: essentiality and evolvability in prokaryotes, and roles in evolutionary transitions. *F1000Research*, 5(0), p.1805.
- Kudva, I.T. y Stasko, J. a, 2013. Bison and bovine rectoanal junctions exhibit similar cellular architecture and *Escherichia coli* O157 adherence patterns. *BMC veterinary research*, 9(1), p.266.
- Kurvers, R.H.J.M. et al., 2014. The evolutionary and ecological consequences of animal social networks: emerging issues. *Trends in Ecology y Evolution*, 29(6), pp.326–335.
- Kyle, J.L. et al., 2012. *Escherichia coli* Serotype O55:H7 Diversity Supports Parallel Acquisition of Bacteriophage at Shiga Toxin Phage Insertion Sites during evolution of the O157:H7 lineage. *Journal of Bacteriology*, 194(8), pp.1885–1896.
- Labrie, Simon, Samson, Julie y Moineau, Sylvain. (2010). Bacteriophage Resistance mechanisms. *Nature reviews. Microbiology*. 8. 317-27. 10.1038/nrmicro2315.
- Lane, W.J. y Darst, S.A., 2006. The structural basis for promoter -35 element recognition by the group IV r factors. *PLoS Biology*, 4(9), pp.1491–1500.

- Lee, M.S. et al., 2015. Shiga toxins activate the NLRP3 inflammasome pathway to promote both production of the proinflammatory cytokine interleukin-1 β and apoptotic cell death. *Infection and Immunity*, 84(1), pp.172–186.
- Lee, M.S. et al., 2016. Shiga toxins as multi-functional proteins: Induction of host cellular stress responses, role in pathogenesis and therapeutic applications. *Toxins*, 8(3), pp.1–23.
- Leibman, M. y Hochschild, A., 2007. A sigma-core interaction of the RNA polymerase holoenzyme that enhances promoter escape. *The EMBO journal*, 26(6), pp.1579–1590.
- Leibold, M.A. y Mikelson, G.M., 2002. Coherence, species turnover, and boundary clumping: elements of meta-community structure. – *Oikos* 97: 237–250.
- Lieberman, T.D. et al., 2013. Genetic variation of a bacterial pathogen within individuals with cystic fibrosis provides a record of selective pressures. *Nature Publishing Group*, 46(1), pp.82–87.
- Little, T.J. et al., 2010. The coevolution of virulence: Tolerance in perspective. *PLoS Pathogens*, 6(9).
- Liu, W. et al., 2014. Frequency of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from suckling pigs with diarrhoea in China. *The Veterinary Journal*, 199(2), pp.286–289.
- López-Leal, G., Cevallos, M.A. y Castillo-Ramírez, S., 2016. Evolution of a sigma factor: An All-In-One of Gene Duplication, Horizontal Gene Transfer, Purifying Selection, and Promoter Differentiation. *Frontiers in Microbiology*, 7(APR), pp.1–11.
- Loukiadis, E. et al., 2006. Characterization of Shiga Toxin Gene (*stx*) -Positive and Intimin Gene (*eae*) -Positive *Escherichia coli* Isolates from Wastewater of Slaughterhouses in France. *Applied and environmental microbiology*, 72(5), pp.3245–3251.
- Lu, S. et al., 2016. Insights into the evolution of pathogenicity of *Escherichia coli*

- from genomic analysis of intestinal *E. coli* of *Marmota himalayana* in Qinghai–Tibet plateau of China. *Emerging Microbes and Infections*, 5(12), p.e122.
- Luo, X. et al., 2016. Characterization of virulence genes and antimicrobial resistance of lung pathogenic *Escherichia coli* isolates in forest musk deer (*Moschus berezovskii*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 47(2), pp.540–550.
- Malik, A. et al., 2017. Research in Veterinary Science Pathogenic potential and virulence genotypes of intestinal and faecal isolates of porcine post-weaning enteropathogenic *Escherichia coli*. *Research in Veterinary Science*, 115, pp.102–108.
- Massot, M. et al., 2017. Day-to-day dynamics of commensal *Escherichia coli* in Zimbabwean cows evidence temporal fluctuations within a host-specific population structure.
- Melton-celsa, A.R., 2014. Shiga Toxin (Stx) Classification , Structure , and Function. *Microbiology Spectrum*, pp.1–13.
- Mercat, M. et al., 2016. *Escherichia coli* Population Structure and Antibiotic Resistance at a Buffalo / Cattle Interface in Southern Africa. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(5), pp.1459–1467.
- Messinger, S.M. y Ostling, A., 2009. The consequences of spatial structure for the evolution of pathogen transmission rate and virulence. *The American naturalist*, 174(4), pp.441–454.
- Miskinyte, M. et al., 2013. The Genetic Basis of *Escherichia coli* Pathoadaptation to Macrophages. *PLoS Pathogens*, 9(12), pp.1–15.
- Müller, D. et al., 2006. Rapid identification and differentiation of clinical isolates of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), atypical EPEC, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by a one-step multiplex PCR method. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(7), pp.2626–2629.

- Nowak, M.A., 2004. Evolutionary Dynamics of Biological Games. *Science*, 303(5659), pp.793–799.
- Oh, K.-H. et al., 2016. Comparison of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157 and EHEC non-O157 isolates from diarrheal patients in the Republic of Korea. *Japanese Journal of Infectious Diseases*.
- Ohshima, C. et al., 2017. A novel typing method for *Listeria monocytogenes* using high-resolution melting analysis (HRMA) of tandem repeat regions. *International Journal of Food Microbiology*, 253(August 2016), pp.36–42.
- Olesen, B. et al., 2012. Enteroaggregative *Escherichia coli* O78:H10, the cause of an outbreak of urinary tract infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(11), pp.3703–3711.
- Paget, M.S., 2015. Bacterial sigma factors and anti-sigma factors: Structure, function and distribution. *Biomolecules*, 5(3), pp.1245–1265.
- Petersen, L. et al., 2007. Genes under positive selection in *Escherichia coli*. *Genome Research*, 17(9), pp.1336–1343.
- Pizarro, M.A. et al., 2013. Virulence profiles of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and other potentially diarrheagenic *E.coli* of bovine origin, in Mendoza, Argentina. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(4), pp.1173–1180.
- Polz, M.F., Alm, E.J. y Hanage, W.P., 2013. Horizontal gene transfer and the evolution of bacterial and archaeal population structure. *Trends in Genetics*, 29(3), pp.170–175.
- Poulin, R. et al., 2011. The comparative ecology and biogeography of parasites. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 366(1576), pp.2379–2390.
- Putker, F., Bos, M.P. y Tommassen, J., 2015. Transport of lipopolysaccharide to the Gram-negative bacterial cell surface. *FEMS Microbiology Reviews*, 39(6), pp.985–1002.

- Raskin, D.M. et al., 2006. Bacterial genomics and pathogen evolution. *Cell*, 124(4), pp.703–714.
- Rasko, D.A. et al., 2008. The pangenome structure of *Escherichia coli*: Comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *Journal of Bacteriology*, 190(20), pp.6881–6893.
- Regina, F.M. et al., 2005. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 100(May), pp.359–363.
- Reja, V. et al., 2010. ScreenClust: Advanced statistical software for supervised and unsupervised high resolution melting (HRM) analysis. *Methods*, 50(4), pp.S10–S14.
- Robins-Browne, R.M. et al., 2016. Are *Escherichia coli* Pathotypes Still Relevant in the Era of Whole-Genome Sequencing? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6(November), p.141.
- Sachs, J.L., Essenberg, C.J. y Turcotte, M.M., 2011. New paradigms for the evolution of beneficial infections. *Trends in Ecology and Evolution*, 26(4), pp.202–209.
- Samson, J.E. et al., 2013. Revenge of the phages: defeating bacterial defences. *Nature Reviews Microbiology*, 11(10), pp.675–687.
- Sandner, L. et al., 2001. The elements of the locus of enterocyte effacement in human and wild mammal isolates of *Escherichia coli*: Evolution by assemblage or disruption? *Microbiology*, 147(11), pp.3149–3158.
- Sato, K., Matsuda, H. y Sasaki, A., 1994. Pathogen invasion and host extinction in lattice structured populations. *Journal of mathematical biology*, 32(3), pp.251–268.
- Scaletsky, I.C.A. et al., 2010. Adherence factors in atypical enteropathogenic

- Escherichia coli* strains expressing the localized adherence-like pattern in HEP-2 cells. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(1), pp.302–306.
- Schwab, C. et al., 2011. Diet and environment shape fecal bacterial microbiota composition and enteric pathogen load of grizzly bears. *PloS one*, 6(12), pp.e27905–e27905.
- Servin, A.L., 2005. Pathogenesis of Afa / Dr Diffusely Adhering *Escherichia coli*. *Society*, 18(2), pp.264–292.
- Servin, A.L., 2014. Pathogenesis of Human Diffusely Adhering *Escherichia coli* Expressing Afa / Dr Adhesins (Afa / Dr DAEC): Current Insights and Future Challenges. , 27(4), pp.823–869.
- Šimenc, J. y Potočnik, U., 2011. Rapid differentiation of bacterial species by high resolution melting curve analysis. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 47(3), pp.256–263.
- Skippington, E. y Ragan, M.A., 2012. Phylogeny rather than ecology or lifestyle biases the construction of *Escherichia coli-Shigella* genetic exchange communities. *Open Biology*, 2(9), pp.120112–120112.
- Smith, E.J. et al., 2013. Pathogenesis of adherent-invasive *Escherichia coli*. *Future Microbiology*, 8(10), pp.1289–1300.
- Smith, J.L., Fratamico, P.M. y Gunther, N.W., 2014. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Advances in Applied Microbiology*, 86, pp.145–197.
- De Sordi, L., Khanna, V. y Debarbieux, L., 2017. The Gut Microbiota Facilitates Drifts in the Genetic Diversity and Infectivity of Bacterial Viruses. *Cell Host y Microbe*.
- Soucy, S.M., Huang, J. y Gogarten, J.P., 2015. Horizontal gene transfer : building the web of life. *Nature Publishing Group*, 16(8), pp.472–482.
- Souza, R.A. y Falcão, J.P., 2014. A novel high-resolution melting analysis-based

- method for *Yersinia enterocolitica* genotyping. *Journal of Microbiological Methods*, 106, pp.129–134.
- Souza, V. y Rocha, M., 1999. Genetic Structure of Natural Populations of *Escherichia coli* in Wild Hosts on Different Continents. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8), pp.3373–85.
- Sperandeo, P., Martorana, A.M. y Polissi, A., 2017. Lipopolysaccharide biogenesis and transport at the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1862(11), pp.1451–1460.
- Stanhope, M.J. et al., 2001. Phylogenetic analyses do not support horizontal gene transfers from bacteria to vertebrates. *Nature*, 411(6840), pp.940–944.
- Stavriniades, J., McCann, H.C. y Guttman, D.S., 2008. Host-pathogen interplay and the evolution of bacterial effectors. *Cellular Microbiology*, 10(2), pp.285–292.
- Stephens, P.R. et al., 2016. The macroecology of infectious diseases: a new perspective on global-scale drivers of pathogen distributions and impacts. *Ecology Letters*, 19(9), pp.1159–1171.
- Strober, W., 2017. Adherent-invasive *E. coli* in Crohn disease: bacterial “agent provocateur.” *The Journal of Clinical Investigation*, 10, pp.5–8.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C. y Velasquillo, C., 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2(5), pp.70–78.
- Tenaillon, O. et al., 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 8(3), pp.207–217.
- Tennant, S.M. et al., 2009. Characterisation of atypical enteropathogenic *E. coli* strains of clinical origin. *BMC microbiology*, 9, p.117.
- The, H.C. et al., 2016. The genomic signatures of Shigella evolution, adaptation and geographical spread. *Nature Reviews Microbiology*, 14(4), pp.235–250.

- Toft, C. y Andersson, S.G.E., 2010. Evolutionary microbial genomics: insights into bacterial host adaptation. *Nature Reviews Genetics*, 11(7), pp.465–475.
- Touchon, M. et al., 2009. Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genetics*, 5(1).
- Tourret, J. y Denamur, E., 2016. Population Phylogenomics of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 4(1), pp.1–20.
- Tozzoli, R. et al., 2014. Shiga toxin-converting phages and the emergence of new pathogenic *Escherichia coli*: a world in motion. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4(June), pp.1–8.
- Lipsitch, Marc et al., 2015. The Evolution of Virulence in Pathogens with Vertical and Horizontal Transmission, *Evolution* , 50(5), pp.1729–1741.
- Typas, A., Becker, G. y Hengge, R., 2007. The molecular basis of selective promoter activation by the σ_s subunit of RNA polymerase. *Molecular Microbiology*, 63(5), pp.1296–1306.
- Ud-Din, Abu, and Syeda Wahid. “Relationship among *Shigella* Spp. and Enteroinvasive *Escherichia Coli* (EIEC) and Their Differentiation.” *Brazilian Journal of Microbiology* 45.4 (2014): 1131–1138.
- Vila, J., Sáez-López, E., Johnson, J.R., et al., 2016. *Escherichia coli*: An old friend with new tidings. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(4), pp.437–463.
- Vila, J., Sáez-López, E., Johnson, J.R., et al., 2016. *Escherichia coli*: An old friend with new tidings. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(4), pp.437–463.
- Wang, X. et al., 2013. Serotypes, virulence factors, and antimicrobial susceptibilities of vaginal and fecal isolates of *Escherichia coli* from giant pandas.
- Weinert, L.A. y Welch, J.J., 2017. Why Might Bacterial Pathogens Have Small Genomes? *Trends in Ecology y Evolution*, xx, pp.1–12.
- Wu, G. et al., 2013. Comparative analysis of ESBL-positive *Escherichia coli*

isolates from animals and humans from the UK, The Netherlands and Germany. *PloS one*, 8(9), p.e75392.

Yen, H., Karino, M. y Tobe, T., 2016. Modulation of the Inflammasome Signaling Pathway by Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6(August), pp.1–8.

Yen, H., Sugimoto, N. y Tobe, T., 2015. Enteropathogenic *Escherichia coli* Uses NleA to Inhibit NLRP3 Inflammasome Activation. *PLoS Pathogens*, 11(9), pp.1–23.

Zhang, N. et al., 2016. The bacterial enhancer-dependent RNA polymerase. *Biochemical Journal*, 473(21), pp.3741–3753.

Zuo, Guanghong, Zhao Xu, and Bailin Hao. “*Shigella* Strains Are Not Clones of *Escherichia Coli* but Sister Species in the Genus *Escherichia*.” *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 11.1 (2013): 61–65. *PMC*.