



**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y
BIOLÓGICAS**

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**“Determinación de grupos filogenéticos de cepas de
Escherichia coli aisladas de monos en semicautiverio de las
reservas de Media Luna, Loreto y Tarangue, San Martín”**

Tesis para optar el título profesional de:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Presentado por:
Mario Villalobos Catpo

Lima - Perú
2017

Acta de Sustentación de Tesis

Siendo las 17:00 horas del 23 de Julio de 2018, en el aula M - 202 del Campus Villa II, bajo la presencia del jurado examinador nombrado por **Resolución Directoral Académica de Carrera N° 018-DACMVZ-DAFCVB-U. CIENTÍFICA-2017**, presidido por el Mg. Gianmarco Rojas Moreno, M.V. Rosario Ramírez Marina, M.V.Z. Dante Meza Ruíz y el Mg. Siever Morales Cauti como Director - Observador. Se procedió en acto público a la sustentación de la tesis **"DETERMINACIÓN DE GRUPOS FILOGENÉTICOS DE CEPAS DE *Escherichia coli* AISLADAS DE MONOS EN SEMICAUTIVERIO DE LAS RESERVAS DE MEDIA LUNA, LORETO Y TARANGUE, SAN MARTÍN"**.

El presidente concedió el uso de la palabra al Bachiller en Medicina Veterinaria y Zootecnia **Villalobos Catpo Mario**, para la sustentación de su tesis. Luego de la exposición, el bachiller absolvió las preguntas del Jurado y del público asistente.

El Jurado acordó otorgarle la nota de:

..... *DECI SEIS* (16)

El presidente del Jurado dio por culminado el acto de sustentación y levantó la sesión a las: 18:00hrs.



Mg. Gianmarco Rojas Moreno
Presidente



M.V.Z. Dante Meza Ruíz
Miembro



M.V. Rosario Ramirez Marina
Miembro



Mg. Siever Morales Cauti
Director - Observador

012-2018

T. / (51) 610 6400
no. 00012
www.cientifica.edu.pe

Campus
Pinaricamarca Sur
s/n. 19 - Lima 12

INDICE

	Pág
RESUMEN.....	06
ABSTRACT.....	07
ABREVIATURAS.....	08
I. INTRODUCCIÓN.....	09
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1 Generalidades de los primates.....	11
2.1.1 <i>Ateles belzebuth</i>	11
2.1.2 <i>Ateles chamek</i>	12
2.1.3 <i>Callicebus oenanthe</i>	13
2.1.4 <i>Lagothrix cana</i>	14
2.1.5 <i>Lagothrix lagotricha</i>	15
2.2 Principales enfermedades de los primates de estudio.....	16
2.2.1 Enfermedades bacterianas de Importancia.....	16
2.2.2 Colibacilosis.....	17
2.3 Evolución de <i>E. Coli</i> a un organismo patógeno.....	18
2.3.1 Patógenos Profesionales o Expertos.....	20
2.3.2 Patógenos accidentales.....	21
2.3.3 Patógenos oportunistas.....	23
2.4 Grupos Filogenéticos de <i>E. Coli</i>	24
2.4.1 Genotipificación molecular – Patotipos.....	26
2.4.1.1 <i>E. coli</i> enterotoxigénica ETEC.....	26
2.4.1.2 <i>E. coli</i> enterohemorrágica EHEC.....	26
2.4.1.3 <i>E. coli</i> enteroinvasiva EIEC.....	27
2.4.1.4 <i>E. coli</i> enteropatógena EPEC.....	28
2.4.1.5 <i>E. coli</i> enteroagregativa EAEC.....	28
2.4.1.6 <i>E. coli</i> de adherencia difusa DAEC.....	29
III. MATERIALES Y MÉTODO	
3.1 Localización y Ambiente.....	29
3.2 Población y Muestra.....	30
3.3 Toma de muestras.....	30
3.3.1 Sujeción de los monos.....	30

3.3.2 Toma de muestras por hisopado rectal.....	30
3.3 Aislamiento y Cultivo Bacteriano.....	31
3.3.1 Enriquecimiento no selectivo.....	31
3.3.2 Siembra en agar.....	31
3.3.3 Preparación del frotis.....	31
3.3.4 Identificación Bioquímica.....	31
3.4 Extracción de ADN.....	32
3.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	32
IV. RESULTADOS.....	34
V. DISCUSION.....	35
VI. CONCLUSIONES.....	37
VII. RECOMENDACIONES.....	38
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	38

AGRADECIMIENTO

A Dios porque si no fuera por él, yo no estaría cumpliendo mis objetivos,

A mis padres por confiar en mí, mi familia, mis amigos por sus ánimos para apoyarme y así poder seguir cumpliendo mis metas.

A mi universidad y en especial a mi director de tesis Mg. Siever Morales Cauti por la dirección de la tesis y su constante apoyo para superar todas las dificultades de este proceso.

DEDICATORIA

A mis padres Mario Villalobos Ruiz y Celia Catpo López, por el esfuerzo que hicieron conmigo; a pesar de estar separados por muchos años nunca dejaron de apoyarme, por sus consejos, porque me enseñaron a ser perseverante.

A mi Teresa, por estar conmigo siempre, apoyándome incondicionalmente, por darme ánimos cuando lo necesitaba.

RESUMEN

La crianza de animales silvestres constituye una preocupación de salud pública, y esto es porque presentan agentes patógenos potenciales, dentro de ellos encontramos a la *Escherichia coli*, bacteria de la microbiota de humanos y animales. El objetivo del presente estudio es identificar a que grupo filogenético (A, B1, B2, D) pertenecen los aislados de *E. coli* de monos en semicautiverio de las reservas de Media Luna (Loreto) y Tarangüé (San Martín); para cuya realización se tomó las muestras a través de hisopados rectales, y se almacenaron en medios de transporte bacteriano, agar stuart (MERCK®). La identificación se llevó a cabo por medio de pruebas bioquímicas (*E. coli*). Se utilizó PCR triplex para identificar los grupos filogenéticos descrito por Clermont, empleando los cebadores para los genes *ChuA*, *YjaA.r* y *TspE4C2*. Obteniendo como resultado 119 cepas bacterianas, el 37.82 % (45/119) resultaron positivas a *Escherichia coli*; determinándose el grupo filogenético a 32 cepas. Las agrupaciones filogenéticas A y B1 fueron encontrados con mayor frecuencia con 34.37% (11/32) y 31.25% (10/32), respectivamente; seguido por los grupos filogenéticos D con 31.25% (10/32) y B2 con 3,12% (1/32). Los grupos B2, y D de *E. coli* de carácter altamente patógeno se encuentran en las muestras evaluadas.

Palabras Claves: *Escherichia coli*; Monos; Grupos filogenéticos; Semicautiverio

ABSTRACT

The raising of wild animals is a public health problem, because they have potential pathogens, within them we find *Escherichia coli*, bacteria from the microbiota of humans and animals. The objective of the present study is to identify which phylogenetic group (A, B1, B2, and D) belong to the strains of *E. coli* isolated from monkeys in the semi-captivity of the reserves of Media Luna (Loreto) and Tarangué (San Martín) ; for which the samples were taken through rectal swabs, and stored in bacterial transport media, stuart agar (MERCK®). The identification was carried out by means of biochemical tests (*E. coli*). Triplex PCR was used to identify the phylogenetic groups described by Clermont, using the primers for the *ChuA*, *YjaA.r* and *TspE4C2* genes. Obtaining as result 119 bacterial strains, 37.82% (45/119) were positive to *Escherichia coli*; the phylogenetic group was determined to 32 strains. Phylogenetic groups A and B1 were found more frequently with 34.37% (11/32) and 31.25% (10/32), respectively; followed by phylogenetic groups D with 31.25% (10/32) and B2 with 3.12% (1/32). Groups B2 and D of *E. coli* of a highly pathogenic nature are found in the samples evaluated.

Keywords: *Escherichia coli*; Monkeys Phylogenetic groups; Semi Captivity.

ABREVIATURAS

EHEC:	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EPEC:	<i>E. coli</i> enteropatógena
ETEC:	<i>E. coli</i> enterotoxigénica
EIEC:	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
EAEC:	<i>E. coli</i> enteroagregativa
DAEC:	<i>E. coli</i> de adherencia difusa
STEC:	<i>E. coli</i> productora de toxina Shiga
Stx:	Toxina Shiga
ELISA:	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.
PCR:	Reacción en cadena de la Polimerasa.

I. INTRODUCCION

La denominación de "primates" fue empleada en primer lugar por el científico Linneo (1758), descrito en el orden taxonómico de animales; relativo a "primeros" del latín. Se introdujo en el orden de Primates a los humanos, monos del Viejo Mundo y del Nuevo Mundo, esto permitió a la humanidad diferenciándolos de los demás mamíferos. Con ello, el científico Lineo, demostró que los monos son más relacionados a los humanos, todos juntos son los organismos "primeros" en la escala zoológica o los más completamente evolucionados del mismo reino, en un panorama antropocéntrico.

Los primates son una agrupación de mamíferos más variado del planeta, donde se describen 390 especies, además de 259 subespecies, donde una tercera parte vive en el neotrópico del continente americano. Los primates neotropicales, se organizan en el infra orden *Platyrrhini* (griego *platy* = plana y *rhinos* = nariz), en referencia a una nariz muy ancha o plana, por posición de los orificios nasales externos, los cuales se orientan hacia cada lado, en contraste a los *Catarrhini* (griego *katarr* = dirigido hacia abajo y *rhinos* = nariz), que tienen una nariz con orificios uno cerca al otro y direccionados hacia abajo. Estas dos categorías evidencian muchas diferencias evolutivas, debido a que evolucionaron por separado desde el Oligoceno, por más de 35 millones de años (Defler, 2004)

Por sus rutinas arborícolas y su alimentación folívoro-frugívora son muy vulnerables a la destrucción, fragmentación y degradación de su hábitat. En varios lugares son amenazados por la caza furtiva y la venta ilegal. Por la considerable función que realizan en la recuperación de los ecosistemas, los primates han sido consideradas especies fundamentales para la preservación.

Considerando que los primates a través de las épocas han sido utilizados como mascotas, y comestible lo que ha llevado a su caza y depredación, hasta convertir a algunos animales en riesgo de desaparición, esto ha provocado que existan hábitats de semicautiverio. Los primates en semicautiverio no tienen contacto seguido con personas pues se encuentran en rehabilitación para evitar “la humanización” de estos, debido a que siguen ciertas estrategias para su conservación que incluye la reintroducción a su hábitat natural. Estos primates por ende en este tipo de crianza no pueden estar sometidos a constante estrés de manejo y captura.

Los primates también se ven afectados de una serie de enfermedades entre ellas las producidas por el *Escherichia coli*, lo que ha originado la realización de la presente investigación, debido a la necesidad de generar conocimiento que permita un mejor entendimiento de las enfermedades y riesgos que estos representan para la salud animal y salud pública.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Generalidades de los primates.

En los últimos 35 años han aumentado las investigaciones primatológicas y simultáneamente los trabajos de campo, los primates no pueden definirse fácilmente porque comparten rasgos generalizados muy complejos que pueden encontrarse en otros grupos de mamíferos diferentes. Con manos y pies, pentadáctilos, usualmente palmigrados; pulgar oponible dotado con garras cortas, tosca o degenerada; dedos de la mano con disposición de divergencia, convergencia y flexionamiento. (Pacheco *et al.*, 2011).

2.1.1 *Ateles belzebuth*:

Pertenece a la familia Atalidae, de nombre común mono araña de vientre amarillo. Comprende las subespecies: *Ateles belzebuth belzebuth* (*A. Paniscus marginatus*), *A.b chamek* (*A. Paniscus chamek*), y *A. b marginatus* (*A. paniscus marginatus*) (Defler, 2010). *Ateles*, ubicado desde las áreas de Tamaulipas (Nor-este de México), atraviesa Centroamérica y Sudamérica hasta el sur de Brasil.

La longitud del animal cambia entre 481 y 675 mm en machos, y 520 mm en hembras; otras áreas como la cola varía entre 545 y 655 mm con una media de 583mm en machos y 609 mm en hembras. Los machos son más enormes y obtienen pesos que varían entre 4,5 kg y 9,8 kg; por otro lado, las hembras logran entre 3,1 kg y 7,6 kg de peso. Son mayormente negros, si bien tienen en su espalda, costados y hombros un pelaje de color marrón claro o rubio.

La alimentación de esta especie, se puede encontrar los frutos maduros, hojas, flores e insectos, entre otros característicos del medio donde se desarrollan (Van Roosmalen y Klein, 1988; Dew, 2001; Russo *et al.*, 2005); Otros reportes, describen que su alimentación en base a un

87% de frutos, 9% de hojas, 1% de flores, 1% de presas y el resto de otras alternativas en el entorno. *Russo et al. 2005* compararon preferencias alimentarias de tres especies de *Ateles* (*A. belzebuth*, *A. paniscus* y *A. geoffroy*) en bosques (Panamá, Surinam, Colombia y Ecuador), hallando que son frugívoros en todos. *A. belzebuth* comió entre 71 y 238 especies de frutos; 74 y 87% de frutos, 7.7 y 12% de hojas, 1 y 5% flores, y 3.7 y 12% de otras alternativas.

2.1.2 *Ateles chamek*:

Pertenece a la familia *Atelidae* distribuyéndose geográficamente en las tierras bajas del norte y el centro de Bolivia, oeste de Brasil y el noreste de Perú. Se extiende al sur del Río Amazonas-Solimões, al oeste de los ríos Tapajós, en el río Ucayali en Perú (reemplazado por *Ateles belzebuth* en la margen izquierda del bajo Ucayali) (Aquino y Encarnación, 1994). Atraviesa el sur Ucayali medio del río Cushabatay (afluente de la margen izquierda del Ucayali), se extiende en el interfluvio de los ríos Ucayali y Huallaga. A partir de ahí, se extiende hacia el sur a lo largo de la Cordillera oriental en Bolivia, cerca de 17° S, desde allí se extiende al noreste a través del Parque nacional Noel Kempf Mercado, en el estado de Mato Grosso, Brasil; a la orilla izquierda del Río Teles Pires y Río Tapajós. Esto ocurre a través de una gran parte del estado de Rondônia en Brasil, donde hay bosque adecuado (Iwanaga y Ferrari, 2002).

Las formas *Hybridus chamek* y *marginatus* están listados como especies distintas (Froehlich *et al.*, 1991; Medeiros, 1994; Rylands *et al.*, 2000), argumentaron que *A. paniscus* es una forma distinta con ninguna subespecie. De Boer y Bruijn (1990), indicaron que los *chamek* deben ser considerados una especie completa, y del mismo modo Sampaio *et al.* (1993), sostuvieron que las formas *paniscus* y *chamek* deben considerarse especies distintas en función de la distancia genética entre ellos. *Ateles chamek* resultó ser más cerca de *Belzebuth* que a *paniscus*.

También es conocido como macaco aranha, maquisapa, marimono, mono araña. Su hábitad tiene lugar en la selva tropical de tierras bajas primaria, en Bolivia, en el Parque Nacional Noel Kempff Mercado (Wallace *et al.*, 1998). Su alimentación se basa en frutos maduros, hojas, flores e insectos (Van Roosmalen y Klein, 1988; Russo *et al.*, 2005). Asimismo comen invertebrados, hongos y corteza de árboles (Symington 1987; Di Fiore *et al.* 2008) en Cocha Cashu, se evidenció el consumo de un 74.7% de frutos, 15.5% de hojas, 4.5% de flores, entre otros; y no consumen vertebrados pequeños e insectos. Wallace (2005), reporta que su alimentación es en base a 81.4% de frutas maduras, 4.7% de semillas, 10.7% de hojas y 2.9% de flores.

Felton *et al.* (2008), reportan un 82% de alimentación en consumir frutos, 13% de hojas y 4.7% en flores; el consumo minoritario de raíces aéreas, tallos y cortezas; aunque existe un consumo de invertebrados en pequeños volúmenes, siendo la familia *Moraceae* la más consumida (61.2% del tiempo invertido en alimentarse), con especies como *Ficus trigona*, *Myrciaria sp.*, *F. boliviana*, *Pseudolmedia laevis*, entre otros (Pacheco y Cornejo, 2011).

2.1.3 *Callicebus oenanthe*:

De la familia *Pitheciidae*, también conocidos como monos Titi, son monógamos y viven en pequeños grupos familiares; estos poseen varios nombres comunes: en el Río Mayo (Titi Monkey), en el Río Mayo (Titi), en San Martín (Titi Monkey), en Andean Titi Monkey y Mono Tocón en español. Reconocida como una especie válida (Hershkovitz 1990; Kobayashi y Langguth 1999; Van Roosmalen *et al.*, 2002), ellos reconocen cinco grupos de especies: *Callicebus cupreus*, *Callicebus donacophilus*, *Callicebus moloch*, *Callicebus personatus* y *Callicebus torquatus*.

Esta especie, está vinculado a bosques ribereños, aunque posiblemente, puede habitar bosques secundarios (Mark, 2003; De Luycker, 2006; Bóveda-Penalba *et al.*; 2009); sin embargo, Bóveda-

Penalba *et al.* (2009) identifica su desarrollo en bosques de altura y concluye que no es específica a un ecosistema en particular.

2.1.4 *Lagothrix cana*:

Conocido como mono choro de Geoffroy, pertenece a la familia *Atelidae*, en nuestro país se encuentra vinculada a los ríos Pachitea y Ucayali, y al sur del Río Inuya, Río Madre de Dios y de la cuenca del río Tambopata hasta el Río Inambari (Aquino y Encarnación, 1994); esta especie es de contextura robusta, de color gris, con la cabeza y línea dorsal de color marrón negruzco característico. Presenta una cola prensil, con su característico callo desnudo en la parte terminal ventral, a nivel del vientre presenta un pelaje largo (Wallace y Rumiz, 2010; Pacheco y Cornejo, 2011).

En 1963, Fooden revisó la corrección del género *Lagothrix* reconociendo dos únicas especies, como *Lagothrix flavicauda* “mono choro coliamarillo” (monotípica), y *Lagothrix lagotricha* “mono choro común” incluyendo 4 subespecies: *L. l. Lagothricha*, *L. l. Lugens*, *L. l. Cana* y *L. l. Poepigii*. Basado en esta revisión Groves, 2000 realiza la última revisión del género, elevando las subespecies de *L. Lagothricha* a nivel de especies y a *L. Flavicauda* a nivel de género.

Este primate se encuentra generalmente en bosque nublado en una altitud de 1.000 y 2.500 msnm, aunque la población boliviana los ha encontrado a unos 700 metros, el mono choro de Geoffroy prefiere zonas no inundadas donde hay una abundancia de musgos, helechos, bromelias y orquídeas (Arkive, 2014).

Esta especie tiene una dieta característica en base a frutos (80.7%), hojas frescas (14.4%), flores, y néctar (3.1%), principalmente. En general su dieta es en base a por lo menos 225 especies vegetales, entre árboles (177), lianas (36), hemiepífitas (7), epífitas (3), y estranguladoras (2), principalmente (Pérez, 1994). El consumo de los diversos vegetales, presenta una variación estacional marcada debido a

la mayor disponibilidad de estos. En la época seca, su alimentación puede disminuir en relación a los frutos llegando a representar el 2%, priorizándose en base a follaje, semillas, y exudados, por lo que es característicos de semillas (Pacheco y Cornejo, 2011).

2.1.5 *Lagothrix lagotricha*:

El bosque primario de tierras bajas es el hábitat preferido del mono choro común; sin embargo, también se puede encontrar en el bosque de nubes, hasta alturas de 3.000 metros, y ocasionalmente en áreas perturbadas o fragmentadas de bosque. En ciertas épocas del año puede entrar en los bosques inundados, para alimentarse de la gran cantidad de frutas que se encuentran allí (Arkive, 2014).

Esta especie es conocida comúnmente como “macaco” barrigudo, y el otras áreas mono barrigudo, mono caparro, y/o mono lanudo común. Su taxonomía de *Lagothrix* se basa en (Fooden, 1963), pero sigue Groves (2005) en el reconocimiento de *Cana*, como especie completa en vez de subespecies de *lagotricha*.

Respecto al hábitat y alimentación estos son diurnos y arbóreos, su dieta es en base a frutas maduras, hojas, semillas, entre otros como los insectos. Cada una de estas, son más importantes en base a la temporada de lluvias por su mayor disponibilidad. En cautiverio, se ha observado que las hembras modifican su alimentación (Emmons y Feer, 1990; Eisenberg y Redford, 1999; Nowak, 1999). Geográficamente, se desarrollan en bosques riparios y al borde de lagunas, a nivel del estrato medio y alto del bosque (Tirira, 2007).

2.2 Principales enfermedades de los primates de estudio.

2.2.1 Enfermedades bacterianas de Importancia.

La etiología de estas enfermedades respiratorias se debe a la presencia de bacterias presentes en la microbiota normal; siendo estas como *Pasteurella sp.*, *Klebsiella sp.*, *Bordetella sp.*, *Streptococcus sp.*,

entre otros; mostrándose como signos clínicos comunes del tracto respiratorio como descarga nasal, faringitis, neumonía, disnea, letargia, anorexia, fiebre, septicemia, y potencialmente la muerte del individuo; este complejo puede diagnosticarse a través de técnicas de laboratorio como hemocultivo, cultivo de mucosa del tracto respiratorio.

Por otro lado, las etiologías como *Salmonella spp*, *Shigella spp*, y *Escherichia coli*, *Yersinia pseudotuberculosis* y *Y. enterocolitica*, muestran como signos de anorexia, deshidratación progresiva, letargia, diarrea, disentería y muerte súbita por septicemia. Estas son diagnosticadas a través de coprocultivo, hemocultivo, aislamiento y el tratamiento comprende antibioterapia específica. Hay que tener en cuenta que algunas enfermedades de este complejo son zoonóticas.

La tuberculosis, es hoy en día una de las enfermedades producidas por micobacterias y siguen siendo de gran importancia en primates, se reconocen tres tipos de micobacterias que afectan a la especie, como el *M. tuberculosis*, *M bovis* y *M. avium* que son causantes de tuberculosis los cuales pueden infectar a animales salvajes. Se reconoce a estas especies como resistentes al *Mycobacterium avium*, siendo la incidencia mayor en los primates del Viejo Mundo.

Los signos clínicos son notorios solo cuando la enfermedad se encuentra diseminada en el animal, mostrando una modificación conductual, depresión, letargia, debilidad, posición encorvada y anorexia (Varela, 2007).

2.2.2 Colibacilosis:

La *E.coli* es una bacteria descubierta por el bacteriólogo alemán Theodor von Escherich, denominándolo como *Bacterium coli*; luego denominándolo como *Escherichia coli*, en honor al descubridor. Bacilo gramnegativo no esporulado, móvil con flagelos peritricos, anaerobios facultativos con un tamaño de 2 μm de largo y 0,7 μm de ancho, reconociéndolo como una mesofila, cuya temperatura óptima de

crecimiento 37°C (Kaper *et al.*, 2004). Estas bacterias son de rápido crecimiento, miembro importante de microbiota del intestino de los seres humanos y otros mamíferos; presenta una distribución en suelo, agua, vegetales y animales; también ha sido ampliamente estudiados como hospederos útiles para la clonación utilizando técnicas de ADN recombinante (Kaper *et al.*, 2004).

E. coli es una de las bacterias más estudiadas en el laboratorio y habitante universal del intestinal; siendo considerado un microorganismo muy versátil, productor de diferentes patologías, causando diversas enfermedades intestinales y extraintestinales, a través de la expresión de sus factores de virulencia (Clermont *et al.*, 2000; Rodríguez, 2002).

Se han identificado seis grupos o patotipos de *E. coli* ocasionan diarrea en sujetos sanos: *E. coli* enteroagregativa (EAEC), enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), enterohemorrágica (EHEC), adherente difusa (DAEC) y enteropatógena (EPEC) (Rodríguez, 2002; Lopez *et al.*, 2003; Vidal *et al.*, 2007).

Estudios genéticos, como los filogenéticos permiten identificar aislados de *E. coli* y los dividen en 04 grandes grupos filogenéticos (A, B1, B2, y D), reconociéndose a cepas extra-intestinales virulentas dentro del grupo B2, en el grupo D; y donde un gran porcentaje de cepas denominadas comensales pertenecen al grupo A. Estos estudios también nos han dado una mejor comprensión de las características de virulencia (Clermont *et al.*, 2000; Rodríguez, 2002; Lopez *et al.*, 2003).

2.3 Evolución de *E. coli* a un organismo patógeno

Es probable que algunas cepas de *E. coli* carezcan de rasgos específicos o simplemente su combinación les permite causar infección en los seres humanos, es decir mantenerse a sí mismos el tiempo suficiente protegidos e inducir daño al huésped, las cuales pueden ser definidas como cepas “no patógenas”. Estas cepas se limitan a la

colonización de seres vivos sanos, a partir de las perspectivas de la evolución los linajes originales de la especie de *E. coli* no patógena dan lugar a diferentes patotipos (Chattopadhyay *et al.*, 2012).

En primer lugar, estas cepas “no patógenas” son organismos que pertenecen en gran parte a la naturaleza. En segundo lugar, la diversidad clonal de *E. coli* no patógena es significativamente mayor que cualquier tipo de aislado clínico (Kohler y Dobrindt, 2011), lo que implica que este último expande subconjuntos derivados (evolucionados). En tercer lugar, muchos de los rasgos que se pueden definir como factores de virulencia de patógenos (bien adaptados o pre adaptados) son adquiridos recientemente de cepas evolucionadas. Las cepas patógenas han transferido horizontalmente genes en plásmidos, profagos, o islas cromosómicas que no están presentes en la mayoría de las cepas no clínicas (Chattopadhyay *et al.*, 2012).

Aunque teóricamente los “no patógenos” podrían haber perdido la mayoría de factores de virulencia, el análisis filogenético de su distribución argumenta en contra (Chattopadhyay *et al.*, 2012). Entonces, la naturaleza derivada de los patógenos evidencia el hecho de que estas cepas (como *Shigella*) tienden a perder o inactivar ciertos genes centrales que son evolutivamente originales a la especie (Maurelli, 2007). Un buen ejemplo de la evolución de “no patógeno” a “patógeno” es *Shigella*, ésta se agrupa inicialmente en cuatro especies separadas (*S. boydii*, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. sonnei*), pero más tarde se determinó que *E. coli* y *Shigella* deben considerarse como una sola especie (Jin *et al.*, 2002). Los genomas *Shigella*/ECEI son colineales a *E. coli* con más de 90% de genes homólogos (Jin *et al.*, 2002).

Los estudios genéticos revelaron que se trata de la transferencia horizontal de genes de virulencia agrupados con bajo contenido de G + C en comparación con el resto del plásmido, lo que ocurrió varias veces, cada una de las cuales dio a luz a un nuevo clon *Shigella* (Pupo *et al.*, 2000). Un análisis de la región comprendida *cadA*, (gen contra la

virulencia), a partir de cuatro especies de *Shigella* demostró reordenamientos genéticos distintos en cada una de las regiones, lo que indica de nuevo origen independiente de diferentes linajes de *Shigella* (Day *et al.*, 2001).

Sin embargo, los linajes de *Shigella* surgieron sólo dentro de un gran grupo filogenético de *E. coli*, lo que sugiere que las adquisiciones de los genes de virulencia podrían haber ocurrido preferentemente en las cepas de un fondo genómico similar. *E. coli* patógena es capaz de colonizar asintóticamente los seres humanos o anfitriones no humanos. Por definición, sin embargo, todos los *E. coli* patógena puede entrar a ambientes adecuados y causar infección clínica. La diferencia clave entre los diferentes agentes patógenos es lo mucho que depende de las condiciones asintomáticas de hábitats humanos para mantenerse a sí mismos en la naturaleza. Teniendo en cuenta los hábitats duales de *E. coli* patógena, desde las perspectivas ecológicas y evolutivas de los patotipos, estas podrían subdividirse en tres categorías generales: *patógenos profesionales, accidentales y oportunistas*. (Day *et al.*, 2001).

2.3.1 Patógenos Profesionales o Expertos:

Para estas cepas de *E. coli* es esencial la capacidad de causar la enfermedad garantizando así su circulación continua en la naturaleza, siendo grandes ejemplos de patotipos *Shigella* y *E. coli* enteroinvasiva (EIEC). Mientras que pueden colonizar los seres humanos de forma asintomática, los portadores asintomáticos son en su mayoría personas que se recuperaron de la infección sintomática por la misma cepa (Zdziarski *et al.*, 2010). Estos patógenos expertos o profesionales también se pueden transmitir de manera efectiva durante la infección activa para formar nuevas infecciones, es decir, a partir de un paciente a otro (Stewart *et al.*, 2003). Así, los factores de virulencia de *Shigella* y EIEC se mantienen a causa de la infección o se transmiten como patógeno, adaptándose de esa manera a la naturaleza. Esto se refiere tanto a los mecanismos de virulencia evolucionados, la transferencia horizontal de genes y mutaciones pato adaptivas. Entre las mutaciones

pato adaptivas el papel principal se juega por las mutaciones de pérdida de función, un ejemplo clásico de supresión de *cadA* y *ompT* genes anti virulencia que interfieren con la función o la secreción de la enterotoxina (Day *et al.*, 2001). Además, entre los diferentes patotipos de *E. coli*, *Shigella* / EIEC estos llevan la mayor cantidad de punto de cambios mutacionales (variaciones) en los genes del núcleo, siendo la mayor parte de ellos pato adaptivos en la naturaleza (Chattopadhyay *et al.*, 2009). Otros patotipos de *E. coli* que podrían representar patógenos profesionales son ETEC y EPEC, donde la diarrea puede ser un requisito previo para el establecimiento de la colonización intestinal asintomática en nuevos huéspedes humanos. Estos nuevos anfitriones son principalmente personas que no han tenido roce con el patógeno antes (Von Sonnenburg *et al.*, 2000), ya sea niños o los recién llegados a la comunidad ('viajeros'). Sin embargo, ETEC y EPEC parecen circular como un comensal dentro de la comunidad que tiene inmunidad acumulada en contra de ellos. También es posible que los animales domesticados sean reservorios primarios para algunos de estos patotipos, por lo tanto, los datos epidemiológicos que apoyan el papel esencial de la virulencia en la circulación de ETEC y EPEC no son tan fuertes como para la *Shigella* / EIEC.

2.3.2 Patógenos accidentales:

En estos patotipos de *E. coli*, el hábitat de virulencia es un accidente ecológico y sin salida evolutiva. El causante de la infección clínica en humanos no suele promover su transmisión a otra persona o en el medio ambiente del hospedero original. El patotipo EHEC es un buen ejemplo de un patógeno accidental por ser zoonótico (Caprioli *et al.*, 2005). Tras la ingestión de alimentos contaminados, este patotipo causa diarrea, a veces acompañado por un síndrome hemolítico-urémico característico y devastador (Levine *et al.*, 1987). El linaje más notorio de EHEC se compone de cepas con el serotipo O157:H7, aunque últimamente varios otros serotipos se han convertido en infecciosos. Los individuos pueden arrojar ECEH durante 30 días o más después de la infección y la transmisión de niño a niño en centros,

debido a que podrían contribuir a los brotes (Swerdlow y Griffin, 1997). Sin embargo, este tipo de brotes mueren con rapidez a pesar del potencial de transmisión de persona a persona y la dosis infecciosa baja. Al mismo tiempo los patotipos EHEC son común y continuamente aislados de animales domesticados (vacas), que aparentemente colonizan de manera asintomática (Caprioli *et al.*, 2005). Porque hay una separación ecológica suficiente entre los seres humanos y los animales domesticados no hay transmisión significativa del primero con el segundo, incluso si las bacterias están siendo derramadas en números considerables durante la infección clínica, aunque, debido a la baja dosis infecciosa, que se propagan de persona a persona con frecuencia estos brotes no se sostienen por períodos prolongados (Bell *et al.*, 1994). Entonces, los linajes de EHEC no podían evolucionar específicamente para causar infección en los seres humanos, y el resultado es simplemente accidental, tanto para las bacterias y el huésped humano. Debido a la naturaleza accidental del patógeno, la mayoría de los factores de virulencia EHEC deben ser considerados como de la naturaleza pre adaptado, es decir, no evolucionan para la virulencia *per se*, al menos no en los seres humanos. Siendo un factor de virulencia representativo de EHEC es reconocida como toxina Shiga-like codificada por un prófago (Sandvig, 2001).

La toxina es aparentemente expresada y secretada incluso sin la activación del fago y tiene toxicidad potente contra las células humanas (Bielaszewska *et al.*, 2006). Sin embargo, es probable que se haya desarrollado como un arma contra los depredadores protozoarios de bacterias en lugar de inducir daño tisular al ser humano (Steinberg y Levin, 2007). Se ha propuesto que la toxina Shiga en EHEC es sobre expresado o liberado en una cantidad excesivamente grande durante la infección humana debido a la activación del profago (Mellmann *et al.*, 2009). Este último podría ser el resultado del stress en las bacterias en el intestino humano, ya que trata de establecer la colonización allí. La naturaleza de este stress está claro pero parece estar ausente durante la colonización del intestino del bovino. ECEH representa un ejemplo

clásico de la virulencia, siendo el resultado la incapacidad para establecer relaciones comensales con el anfitrión. Dado que las bacterias están siendo lisadas durante la activación del fago, entonces la expresión de la toxina evolucionaría probablemente como un rasgo adaptado para las bacterias por lo tanto, se puede considerar como un factor de virulencia. Ejemplos de mutaciones pato adaptivas en EHEC podrían ser mutaciones que inactivan las fimbrias tipo 1 (Shaikh *et al.*, 2007). Estas mutaciones se encuentran tanto en la proteína adhesina FimH y en el switch de la expresión fimbrial, lo que sugiere que ocurre repetidas veces y, por lo tanto, baja la acción de la selección positiva (Leopold *et al.*, 2009). Sin embargo, estas mutaciones se encuentran tanto en los aislados clínicos y no clínicos del serotipo O157, en consonancia con la naturaleza pre adaptada del segundo. El papel de la pérdida fimbrial ya sea en la infección humana o la colonización bovina no está claro todavía.

2.3.3 Patógenos oportunistas:

Este tipo de patógeno representa los más diversos y, desde las perspectivas de evolución, a un grupo ambiguo de *E. coli*. A diferencia de los agentes patógenos profesionales o expertos, estas *E. coli* parecen ser capaces de circular continuamente sólo como colonizadores asintomáticos humanos (comensales). Ocasionalmente causan solo infecciones clínicas, sobre todo en los individuos con un sistema inmune un tanto comprometidas o levemente comprometidas. A diferencia de los agentes patógenos accidentales, sin embargo, las bacterias pueden ser fácilmente capaces de volver a su entorno original (intestino humano), mientras que se disemina durante la infección, a veces en gran número. Por lo tanto, el proceso infeccioso no impone un escenario sin salida evolutiva para el patógeno. Ejemplos de tales *E. coli* son principalmente el patotipo ExPEC que, en los países desarrollados, es responsable de la gran mayoría de infecciones de *E. coli* (Johnson y Russo, 2002). Sólo las infecciones del tracto urinario por sí solos (cistitis), donde *E. coli* es el principal patógeno, afecta a más de 7 millones de mujeres cada año en los EE. UU (Foxman, 2002). Siendo

más comunes las infecciones del tracto urinario, que afectan principalmente a las mujeres y, en términos de frecuencia y de la carga bacteriana, son minutos en comparación con la colonización intestinal por *E. coli*, tanto en hombres como en mujeres. Esto es cierto incluso para los linajes clonales de *E. coli* que causan principalmente las infecciones urinarias en su mayoría del grupo filogenético B2 (Moreno *et al.*, 2008).

Entonces es poco probable que la colonización primaria, intestinal de ExPEC dependa de la capacidad de causar la infección oportunista, de hecho, transfiriendo horizontalmente factores de virulencia de *E. coli* uropatógenos tales como fimbrias P digalactosa específicos demostraron ser importante para la colonización intestinal de *E. coli* en humanos con ciertos tipos de sangre (Herias *et al.*, 1995). Por la misma razón, se ha demostrado que, en el curso de las infecciones del tracto urinario, las bacterias pueden adaptarse allí mediante la mutación de adhesina FimH, LPS, flagelos (Weissman *et al.*, 2003). Así, al menos algunos de los rasgos de virulencia se seleccionan para el hábitat y la virulencia, por lo tanto, son producto de la adaptación. De hecho, algunos de los ejemplos más claros de las mutaciones adaptativas *pathos* en el curso de la infección proviene de la UPEC. La naturaleza dual de los factores de virulencia en los patógenos oportunistas (es decir, ser tanto pre-adaptados y adaptado) hace esta categoría compleja desde perspectivas de modelos evolutivos.

2.4 Grupos Filogenéticos de *E. coli*

El análisis filogenético de *E. coli* ha permitido aislar cinco grupos principales para ser identificados, los cuales son, A, B1, B2, D y E. En los humanos encontramos a los grupos B2 y D que están a menudo como noxa de infecciones de tipo extraintestinales; mientras que ciertos grupos como el A y el grupo B1, son relacionados frecuentemente con microbiota. Típicamente, los aislados de los grupos B2 y D son los que presentan factores de virulencia y disminución de las tasas de resistencia a los antimicrobianos de los grupos A o B1, aunque estudios

más recientes indican que algunos clones particulares de grupo filogenético B2 (ST131) o D (ST405) expresan un fenotipo multirresistente. Estos se reconocen inicialmente por electroforesis de enzimas multilocus, un enfoque bastante complejo y requiere mucho tiempo. En el 2000, Clermont *et al.* describieron una técnica más simple basado en un triplex PCR para detectar genes amplificados de *Chua* y *yjaA*, además de la expresión del fragmento TSPE4.C2 de ADN. Este método asigna el grupo filogenético en aproximadamente el 80% de los casos.

En diversos reportes, en seres humanos provenientes de países desarrollados (Australia, Estados Unidos y Europa), la cepa B1 es poco frecuente el hallazgos a otros grupos filogenéticos. Sin embargo, cepas A y B1 se reportan predominantes en seres humanos en países subdesarrollados (Gordon y Cowling, 2003; Li *et al.*, 2010; Tenaillon *et al.*, 2010).

El 2000 Clermont *et al.* Propone una estrategia mediante PCR *triplex* para identificación rápida de aislados de *E. coli* por filogrupo. A través del gen *chuA* (función de sideróforo), en *yjaA* (involucrada en la respuesta al estrés de *E. coli* al peróxido de hidrogeno, cadmio y acido; así como el desarrollo de biofilm, y un fragmento anónimo TSPE4.C2 (estereasa lipasa).

2.4.1 Genotipificación molecular – Patotipos

2.4.1.1 *E. coli* enterotoxigénica (ETEC)

Estas cepas presentan diversos mecanismos de colonización del tejido blanco (intestino delgado) a través del pili o fimbria correspondiente, denominadas CFA (colonization factor antigens), además hacen uso de entero toxinas como la termolábil (LT) y la toxina termoestable (ST), cuya información se encuentra en un plásmido, algunos genes de ST han sido identificados en transposones. El mecanismo utilizado, está relacionado al uso de toxinas LT y ST, quienes afectan la concentración intracelular de mediadores como el cAMP y cGMP, respectivamente; actuando sobre la membrana de las

células epiteliales del intestino, lo cual trae como consecuencia la diarrea debido a la salida de agua e iones.

La contaminación suele ser fecal de agua y alimentos, siendo la principal fuente de infección, con una dosis infectiva de 10^8 unidades formadoras de colonias (UFC). El cuadro clínico es caracterizado por presentar diarrea aguda, generalmente sin sangre, moco, ni pus, y ocasionalmente presentan fiebre y vómito. La diarrea producida puede ser leve, breve y/o auto limitada, aunque ocasionalmente puede tener presentación grave (Rodríguez-Angeles, 2002).

2.4.1.2 *E. coli* enterohemorrágica (EHEC).

Se ha descrito a este patotipo en manifestaciones como dolor abdominal, diarrea, presencia de sangre y fiebre esporádica, el cuadro generado se le denomina colitis hemorrágica, la cual estaba relacionada por el consumo de carne sin cocer o mal cocida (Riley *et al.*, 1983). Siendo el serotipo relacionado el O157:H7.

Karmali (1983), asocio estos aislados con casos del síndrome urémico hemolítico (SUH), cuya característica es la lesión colitis hemorrágica, insuficiencia renal aguda, trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática, encabezada por diarrea con sangre; esta cepa de *E. coli* produce una citotoxina con acción en células Vero, denominándola verotoxina (VT), y a las cepas *E. coli* verotoxigénicas (VTEC).

Asimismo, se analizó que dicha citotoxina se denominó también “shiga-like toxin” o toxina similar a shiga (SLT) o “shiga toxin” (STX), y a las *E. coli* que pueden crearla se les denomina STEC (Rodríguez-Ángeles 2002).

2.4.1.3 *E. coli* enteroinvasiva (EIEC).

Estás cepas están relacionadas bioquímica, genética y a nivel patogénico, relacionados con *Shigella spp.* Numerosos estudios reportan que la *Shigella* y *E. coli* son indistinguibles taxonómicamente. Las cepas

de EIEC son reconocidas como noxa de la colitis inflamatoria invasiva o disentería, pero en la mayoría de los casos, provoca diarrea acuosa.

Estas cepas de EIEC se distinguen de *Shigella*, a partir de pruebas bioquímicas, mecanismos moleculares; sin embargo también comparten factores de virulencia esenciales. Incluso en esta infección por ambas cepas tienen en común algunos mecanismos de la patogenia bacteriana, como la adherencia a los enterocitos, generación de la vacuola endocítica, multiplicación bacteriana a nivel intracelular, y la movilidad (Kaper, 2004).

2.4.1.4 *E. coli* enteropatógena EPEC:

Es el grupo más estudiado microbiológicamente, relacionados a eventos de diarrea en infantes, teniendo a los mecanismos de adherencia como factor de patogenicidad, el factor de virulencia es el Bfp (bundle-forming pilus), siendo codificada a partir del plásmido de 70MDa identificado como EAF (EPEC factor de adherencia). Para este paso, se sintetiza una proteína de membrana externa, cuya información es codificada en el gene “eae” de tipo cromosomal; el cual va afectando la estructura de las vellosidades a nivel del epitelio (Rodríguez, 2002).

2.4.1.5 *E. Coli* enteroagregativa EAEC:

Las EAEC son comúnmente reconocida como una noxa de cuadros de diarrea endémica y/o epidémica en todo el mundo; sin embargo son consideradas como patógenos emergentes, son consideradas como una de las más importantes causas de diarrea del viajero reportados en los diferentes países del mundo. La diarrea causada por EAEC es a normalmente de tipo acuosa, ocasionalmente es acompañada de moco o sangre. Su colonización en epitelio, puede ocurrir en la mucosa de ambos intestinos: delgado y grueso, que pueden conducir a la inflamación leve en el colon.

El fenotipo característico de EAEC es la adhesión por agregación en epitelio, normalmente se observa la formación de un patrón de ladrillo apilado de células HEp-2, organización determinada por los genes que se encuentran en una familia de plásmidos de virulencia identificados

como plásmidos pAA. Estos plásmidos de 100 kb codifican los genes relacionados a la biogénesis de las fimbrias de agregación (AAFS). AAF y la adhesión mediada por flagelina induce una respuesta IL-8, que conduce a la trans migración de neutrófilos. Se han identificado cuatro variantes de AAFs (AAF / I, AAF / II, AAF / III y HDA). Los receptores para AAFs son desconocidas, pero los datos recientes muestran que los AAF / II puede unirse fibronectina (Croxen y Finlay, 2010).

2.4.1.6 *E. coli* de adherencia difusa DAEC:

Este patotipo (DAEC), ha sido implicado como causa de eventos de diarrea por diversos autores, en menores de edad de diferentes regiones geográficas. Estas bacterias poseen un patrón característico de adhesión difusa a monocapas de cultivo celular (células HEp-2).

La mayoría de estas cepas, poseen una adhesina llamado F1845 fimbrial o una adhesina relacionada; esta F1845 pertenece a la familia de adhesinas, compuesta por DAF, un glicosilfosfatidilinositol (Kaper, 2004).

III. MATERIALES Y MÉTODO

3.1 Localización y Ambiente:

La totalidad de muestras a estudiar fueron tomadas de diferentes especies de monos de dos centros de rescate las cuales se encuentran ubicadas en la región selva: la reserva natural Media Luna, ubicada en el departamento de Loreto siendo las coordenadas (Longitud oeste: 75° 10' 29" y 77° 48' 41", Latitud sur: 0° 2' 37"), y la reserva natural Tarangú ubicada en el departamento de San Martín siendo las coordenadas (Latitud: - 7, Longitud - 76.8333); estos centros son destinados principalmente para el rescate de primates de la región.

3.2 Población y Muestra:

Se trabajó con 56 individuos de las especies *Callicebus oenanthe*, *Lagothrix lagotrich*, *Lagothrix cana*, *Ateles belzebuth* de las reservas en estudio, los cuales representan el total de la población que se encuentran en la actualidad por lo que no es necesario determinar un tamaño de muestra.

3.3 Toma de Muestras

3.3.1 Sujeción de los monos:

Se anestesió a cada primate, previo ayuno, utilizando ketamina y diazepam, vía intramuscular mediante el uso de cerbatana. El sexo y la edad aproximada fueron registrados de cada animal de estudio (primate), además registro de datos de temperatura rectal, la frecuencia cardíaca y la frecuencia respiratoria para su monitorización durante el proceso anestésico.

A cada animal se le hizo hisopado rectal para obtener las muestras. Los animales que fueron muestreados durante este estudio fueron muy bien manejados, evaluados y regresados a su ambiente

controlando sus constantes fisiológicas hasta que terminó el proceso anestésico.

3.3.2 Toma de muestras por hisopado rectal:

Se tomaron 56 muestras, para lo cual se introdujo en el recto un hisopo de algodón estéril y humedecido en solución salina, haciendo movimientos rotatorios; una vez tomada la muestra, se depositó el hisopo en un tubo de tapa rosca conteniendo un medio de transporte bacteriano agar Stuart (MERCK®), se cortó la parte saliente del hisopo, se cerró firmemente el tubo y fue rotulado. Se almacenaron las muestras en conservadoras de poliestireno expandido (Telgopor®) con refrigerantes con el fin de mantener una temperatura entre 4 y 8° C. Las muestras fueron remitidas hasta el Laboratorio de Microscopia de la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la UCSUR para su procesamiento.

3.3 Aislamiento y Cultivo Bacteriano

3.3.1 Enriquecimiento no selectivo:

Se tomó el hisopo con la muestra, introduciéndola en un tubo con caldo de enriquecimiento general, caldo Trypticasa Soya (TSB) y se rotó presionando firmemente sobre la pared del tubo, llevándolo así a la incubadora durante 24 horas a 37° C.

3.3.2 Siembra en agar:

Las muestras (MC), a partir de los tubos con caldo TSB, se sembraron por agotamiento con un asa en aro en las placas previamente preparadas de agar general sangre y con agar Mac conkey, incubándolas por un tiempo de 24 hrs a 37° C. Después de la incubación, se observó y selecciono las colonias que se formaron en las placas para realizar la tinción Gram.

3.3.3 Preparación del frotis:

Se derramó una pequeña gota de agua sobre una lámina portaobjetos limpia y se procedió con técnica de la coloración Gram (ICMSF, 2000).

3.3.4 Identificación Bioquímica:

Después de seleccionar las colonias a procesar, se procedió a enfrentarlas frente a las pruebas de identificación bacterianas:

- Hierro tres azúcares (TSI).
- Lisina hierro (LIA).
- Catalasa.
- Oxidasa.
- Citrato de Simmons.
- Sulfuro de hidrógeno – indól – motilidad (SIM).
- Ureasa.
- Rm-VP.
- Gluconato.
- Ornitina.

3.4 Extracción de ADN

Se inicia por la extracción de la muestra (ADN), el inóculo en agar TSA incubándose a 37°C x 24 hrs en 1 ml de H₂O libre de ADN puesto en un eppendorff se inculó la bacteria y se procedió a homogenizar nuevamente. Este se calentó a 100°C por 10 minutos y se pasó rápidamente a hielo escarchado por un periodo de 5 minutos, luego se volvió a resuspender sobre la microplaca y nuevamente se homogenizó para después ponerlo en hielo y centrifugarlo a 13000 rpm por 10 minutos. Se colocó 100µl de sobrenadante con cuidado a otro tubo eppendorff nuevo para refrigerarlo conservándolo así para un uso inmediato.

3.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa

Se realizó la PCR con un protocolo estándar, donde cada reacción presenta un volumen de 20µl de reacción, y que contiene: 2µl de 10x

tampón (suministrado con la polimerasa Taq), 20 pmol para cada cebador, contiene para cada desoxinucleósido trifosfato 2 mM de concentración; 2,5 U de Taq polimerasa (ATGC Biotechnologie, Francia), y 200 ng de DNA genómico. La reacción de PCR se realizará con el termociclador Perkin - Elmer GeneAmp 9600 con tubos MicroAm bajo las siguientes condiciones:

Las reacciones constan de un evento de desnaturalización por un tiempo de 5 min a 94° C, posterior de 30 ciclos de 30s a 94° C , 30 s a 55°C , y finalmente 30 s a 72°C , y una extensión final de la reacción por 7 min a 72° C. Los pares de primer o cebadores usados fueron:

- YjaA.1 (5'-TGAAGTGTCAGGAGACGCTG-3').
- YjaA.2 (5'-ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC-3').
- TspE4C2.1 (5'-GAGTAATGTCGGGGCATTCA-3').
- TspE4C2.2 (5'-CGCGCCAACAAAGTATTACG-3').
- ChuA.1 (5'-GACGAACCAACGGTCAGGAT-3').
- ChuA.2 (5'TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3').

(Clermont *et al.*, 2000)

Los cuales generaron 279, 211, y 152 pb respectivamente. En un protocolo simplificado, se evaluó una reacción de la polimerasa tríplex de dos etapas basado en los métodos descritos anteriormente. Los componentes de la mezcla de reacción eran los mismos que aquellos en el protocolo estándar, excepto que el ADN fue directamente proporcionado por 3µl de lisado bacteriano o un trozo de una colonia, los seis cebadores anteriormente mencionados se mezclaron, y los pasos de la PCR fueron los siguientes:

Durante 4 minutos a 94 °C, seguido de 30 ciclos de 5 segundos a 94 °C y 10 segundos a 59 °C, y una extensión final de la reacción por 5 minutos a 72 °C. La interpretación de las bandas producto de PCR para

la identificación de los grupos filogenéticos están en base al tamaño de fragmento de los genes analizados ChuA, YjaA y TspE4C2; de 279 pb, de 211pb y 152 pb respectivamente, que permite identificar los diferentes grupos filogenéticos.

IV. RESULTADOS

Se aisló 119 cepas de las 56 muestras recolectadas en la reserva de Media Luna (Loreto) y la reserva de Tarangue (San Martín) de las cuales 37.82 % (45/119) resultaron positivas a *Escherichia coli*.

Además, se logró aislar e identificar mediante pruebas bioquímicas, diferentes géneros, principalmente: *Serratia sp* en un 24.36 (29/ 119), *Pseudomonas* 10.94 (13/119), *Citrobacter sp* 9.24 (11/119) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Porcentaje de cepas bacterianas aisladas a partir de hisopados rectales de monos de las reservas de Media Luna y Tarangue (n=119).

Identificación	Numero	Porcentaje	± IC 95%
<i>Escherichia coli</i>	45	37.82	8.71
<i>Serratia sp</i>	29	24.36	7.71
<i>Pseudomonas sp</i>	13	10.94	5.61
<i>Citrobacter sp</i>	11	9.24	5.20
<i>Enterobacter sp</i>	7	5.88	4.23
<i>Salmonella sp</i>	4	3.36	3.24
<i>Edwarsiella sp</i>	3	2.52	2.82
<i>Providencia sp</i>	3	2.52	2.82
<i>Shigella sp</i>	2	1.68	2.31

<i>Hafnia sp</i>	1	0.84	1.64
<i>Proteus sp</i>	1	0.84	1.64
TOTAL	119	100.00	-----

Para la identificación de marcadores genéticos se logro conservar (32/45) 71.11 % de las cepas aisladas e identificadas como *E. coli* en monos estudiados, dicho estudio se realizó por medio de la prueba molecular PCR multiplex donde la amplificación de los genes *chuA*, *yjaA*, y el fragmento *TspE4C2* permitieron el diagnostico de los grupos filogenéticos (Cuadro 2).

Estos marcadores filogénicos cuentan con amplificaciones o pares de bases específicos que permiten su identificación en la prueba de PCR Mutiplex teniendo *chuA*, 279 pares de bases; *yjaA*, 211 pares de bases; y *TspE4C2*, 152 pares de bases.

Cuadro 2. Determinación de grupos filogenéticos de aislados de *Escherichia coli* según genes *chuA*, *yjaA* y fragmento *TspE4C2* (n=32).

Clave			Grupo Filogenético	Total	Porcentaje	IC 95%
<i>ChuA</i>	<i>yjaA</i>	<i>TspE4.C2</i>				
-	-	-	A	0	34.375	16.46
-	+	-	A	11		
-	-	+	B1	10	31.25	16.06
-	+	+	B1	0		
+	+	-	B2	1	3.125	6.03
+	+	+	B2	0		
+	-	-	D	2	31.25	16.06
+	-	+	D	8		

En el cuadro 2, se aprecia los 4 grupos filogenéticos reconocidos para *E. coli*; el grupo A con 34.375% (11/32) con el mayor índice en las muestras que presentaron resultados positivos en marcadores filogénicos de acuerdo a lo descrito por Clermont *et al.* (2000).

V. DISCUSIÓN

El presente estudio, reporta 119 cepas a partir de 56 muestras de hisopados rectales de primates no humanos, recolectadas en las dos reservas; de las cuales 37.82 % (45/119) resultaron positivas a *E. coli*; así mismo se identificaron cepas de diferentes especies bacterianas, principalmente de la Familia *Enterobacteriaceae* (cuadro 1). Otro estudios, reportan prevalencias de *E. coli* en seres humanos de hasta el 90%, en otras especies de mamíferos salvajes con 23%, y en general en aves y reptiles con 10% (Gordon y Cowling, 2003; Power et al., 2005; Li et al., 2010); en primates existen reportes de este tipo de reportes; sin embargo, se presentan diferencias potencialmente por lo variable de los ambientes en los que se desarrollan diferencias de alimentación, e insumos alimenticios particulares, por ejemplo los descritos por Pacheco, 2011, Wallace, 2005 y Felton 2008, describen el tipo de alimentación de los primates, basada primordialmente en el consumo de frutos, hojas, flores, semillas, y en casos más raros por pequeños invertebrados.

En el análisis de los genes Chua A, YjaA y TspE4C2, permitió identificar los 4 grupos filogenéticos, a partir de 32/45 (71.11%) muestras positivas a *E. coli*. Por tanto, los 4 grupos filogenéticos reconocidos han sido el grupo filogenético A con 34.375% (11/32) con el mayor índice en las muestras que presentaron resultados positivos en marcadores filogénicos, seguido de los grupos B1 con 31.25% (10/32), D con 31.25% (10/32) y B2 con 3.125% (1/32); donde los grupos B2 y D, corresponden a cepas patógenas extra intestinales y el grupo A y B1 corresponden a cepas comensales. Representando estos resultados riesgo potencial y permanente para la salud animal y salud pública.

Existen reportes en otras especies, como en crías de alpacas donde las cepas aisladas, fueron reconocidas dentro de las cepas del grupo B1

predominantemente (65.55%), grupos D (19.33%), grupos A (13.45%) y grupos filogenéticos B2 (1.68%) de 119 muestras reportados por Sicha (2016). Se menciona también estudios en animales en las que predominan las cepas pertenecientes grupo filogenético B1 (41%), grupo A (22%), grupo B2 (21%) y en menor frecuencia el grupo D (16%) (Ochman y Selander, 1984); mostrando una diversidad importante, característica de patógenos facultativos como la *E. coli*, donde dentro de la función de miembros de la microbiota intestinal, desarrollan diversos mecanismos y relaciones con el resto de la microbiota y el hospedero específico; estas relaciones también los reportan otros estudios como el de Llamosas (2016).

Estudios en humanos, reportan al grupo filogenético A como los más reportados (40.5%), luego el grupo B2 (25.5 %), seguido de las menos reportadas, las cepas del grupo B1 y D son menos comunes (17%, para ambos) (Escobar-Paramo *et al.*, 2004; Nowrouzian *et al.*, 2009). Por lo que, se observa al grupo filogenético D, como el mayoritario en los animales, constituyéndose como las más virulenta, mientras que el grupo filogenético A se presenta mayormente en humanos. Esto, evidencia la potencialidad de transmisión zoonótica de estas bacterias reconocidas como patógenas oportunistas, y cuyo factor de expresión de su patogenicidad es más complejo aun.

El presente estudio reporta, al grupo filogenético D con 31.25% y B2, con 3.125%. Estos grupos B2 y D, pertenecen a cepas patógenas reportadas en diferentes estudios (Boyd y Hartl, 1998; Bigen *et al.*, 1998; Johnson y Stell, 2000; Gordon, 2004). Sin embargo, estos dos son menos reportados en el ambiente (Walk *et al.*, 2007), por otro lado, los grupos A y B1 que han sido reportados en diferentes especies animales (Gordon y Cowling, 2003).

Diferentes reportes muestran rangos de prevalencia de los grupos filogenéticos en las poblaciones animales y humanas, a nivel de áreas geográficas de estudio, estos en países de Europa (Francia y Croacia), en África (Malí y Benín), en Asia (Pakistán) y en Sudamérica (Perú, Guayana Francesa, Colombia y Bolivia); estos reportes principalmente pertenecen al

grupo A (55%), y al grupo B1 (21%); por otro lado, están las cepas del grupo filogenético D (14%) y grupo B2(10%) quienes se encontraron en menor índice (Duriez et al., 2001; Zhang et al., 2002; Escobar Paramo *et al.*, 2004; Gordon et al., 2005; Pallecchi *et al.*, 2007; Nowrouzian *et al.*, 2009). Esto reafirma la diversidad encontrada en las diferentes condiciones epidemiológicas para la bacteria en estudio, y muestra su potencial de transmisión y patogenicidad; además de que esta distribución, está influenciada por diversos factores externos al propio desarrollo de las poblaciones bacterianas.

VI. CONCLUSIONES

Se determino que el grupo filogenético predominantes corresponden a los grupos A, B1 y D.

VII. RECOMENDACIONES

Promover la investigación de *E. coli*, a nivel molecular en animales en estado de conservación como necesidad para la conservación de la salud animal y salud pública.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Acha P. y Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. EUA. Organización Panamericana de la Salud. 2003.1 (3): 76 - 85
- Arthur G, Noakes D, Pearson H, Parkinson T. Veterinary Reproduction and Obstetrics, 7th ed. London: WB Saunders Company Limited, 1996: 864p.
- Biodiversidad. Prioridades para la conservación de primates en México. UICN. Primate Specialist Group. 2008. Citado 22 Agosto 2017: 7. Disponible en: <<http://www.primatesg.org/diversity.htm>>
- Chattopadhyay S, Paul S, Kisiela D, Linardopoulou E, Sokurenko E. Convergent molecular evolution of genomic cores in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 2012. 194(18): 5002 - 5011
- Chinchilla C, Guerrero B, Gutiérrez E, Sánchez P, Rodríguez O. Parásitos intestinales en monos congo (*Alouatta palliata* Primates: Cebidae de Costa Rica. Rev. Biol. trop Costa Rica 2005.53(1): 3-4.
- Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. Applied and Environmental Microbiology. 2000. 66(10): 4555- 4558p.

- Croxen M, Finlay B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol.* 2013. 8(1): 26-38.
- Dick E, Hubbard G, Martin L, y Leland, M. Revisión de los registros de babuinos con endometriosis histológicamente confirmado en una gran colonia establecida. *Diario de la primatología médica*; 2003: 247p.
- Del Castillo B, Ruiz A. Ocampo S, and Luis Martínez. Detection of phylogenetic group B1 *Escherichia coli* by multiplex PCR: description of a new amplification pattern. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 2011. 29(1): 785-786.
- Defler, T. R. *Historia Natural de los Primates Colombianos.* Conservación Internacional. Bogotá DC., Colombia. 2004. 2(1): 306-371
- Duriez P, Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E, Chaventré A, Elion J, et al. Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology* 2001.147(6): 1671-1676.
- Escobar P, Clermont O, Blanck A, Bui H, Le Bouguéneq y Denamur E. A specific Genetic Background Is Required for Acquisition and Expression of Virulence Factors in *Escherichia coli*. *US National Library of Medicine.* 2004.21 (6):1085-1094.
- Estrada A, y S. Mandujano. Investigaciones con *Alouatta* y *Ateles* en México. *Neotropical Primates.* 2003.11 (3) Nov:145-151
- Godoy, A. Tuberculosis en monos araña (*Ateles geoffroyi*) del centro de rescate de fauna silvestre (ARCAS): Determinación de presencia y comparación de dos métodos diagnósticos. Tesis doctoral. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala; 2008.

- Gordon D, Cowling A. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology* 2003.149(12): 3575-3586
- Gordon D, Stern S, Collignon P. Influence of the age and sex of human hosts on the distribution of *Escherichia coli* ECOR groups and virulence traits. *Microbiology* 2005.151(1): 15 - 23
- Guerrero M, Serrano M., Tantaleán V, Quispe H, Casas V. Identificación de parásitos gastrointestinales en primates no humanos del zoológico Parque Natural de Pucallpa, Perú. *Rev. Inv. Vet. Perú* 2014. 23(4): 469-476
- Jin Q, Yuan Z, Xu J, Wang Y, Shen, Y, Lu W, Zhang, X. Genome sequence of *Shigella flexneri* 2a: insights into pathogenicity through comparison with genomes of *Escherichia coli* K12 and O157. *Nucleic Acids Research*. 2002. 30(20):4432 - 4441
- Kaper, J, James P. and Harry, M. Pathogenic *Echerichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. 2004. 2(2): 123-140
- Köhler, C. and Ulrich D. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* USA. *International Journal of Medical Microbiology*. 2011. 301(8): 642-647p.
- Maurelli A. Black holes, antivirulence genes, and gene inactivation in the evolution of bacterial pathogens. *FEMS microbiology letters*. 2007.267(1):1-8p.
- Méndez B, Martínez R, Saucedo G, y Ramírez L. Toxoplasmosis en una colonia de monos ardilla (*Saimiri sciureus*) en cautiverio en Cuernavaca, Morelos, México. *Vet*. 2011.42(2):115-123

- Mesa-Cruz J. Patologías relacionadas con el tracto reproductivo en herbívoros, carnívoros y primates. En Memorias de la Conferencia Interna en Medicina y Aprovechamiento de Fauna Silvestre, Exótica y no Convencional; Bogotá. 2010.2(2)
- Moore C, Hubbard G, Leland, Dunn B, and Best R. Spontaneous ovarian tumors in twelve baboons: a review of ovarian neoplasms in non-human primates. Journal of medical primatology. 2003.1 (6):48-56p.
- Morales A. Stud book Colombiano para los monos araña. Bogotá, Ateles edit. 2005.1 (2) 44.
- Morales S, Paredes D, Pezo D. Asociación de rotavirus y *Escherichia coli* fimbriada como agentes causales de infecciones entéricas en alpacas neonatas. Perú. Rev Inv Vet 2007.18 (2): 150-153p.
- Navarrete M. Evaluación de la tuberculosis en primates no humanos criados en semicautiverio en la selva peruana. Theorema - UNMSM 2014. 1(1): 75-78
- Nowrouzian F, Ostblom A, Wold A y Adlerberth I. Phylogenetic group B2 *Escherichia coli* strains from the bowel microbiota of Pakistani infants carry few virulence genes and lack the capacity for long-term persistence. Clin Microbiol Infect. 2009.1(2): 466-472.
- Outwater, E., Evan S. and Vivianna V. Adenomyosis: current concepts and imaging considerations. AJR. Philadelphia. American journal of roentgenology, 1998.170(2): 437-441.
- Pacheco V, Cornejo F, Sánchez A, Güisa M, y Serrano, J. Estudio de especies CITES de Primates Peruanos. Perú: Ministerio del Ambiente, 2011.1 (1):77-219p.

- Pacheco V., R. Cadenillas & E. Salas, C. Tello & H. Zeballos. Diversidad y endemismo de los mamíferos del Perú. *Revista Peruana de Biología*. 2009.6 (1):5-32.
- Pallecchi L, Lucchetti C, Bartoloni A, Bartalesi F, Mantella A, Gamboa H, et al. Population structure and resistance genes in antibiotic-resistant bacteria from a remote community with minimal antibiotic exposure. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007.51(4):1179-1184.
- Power M, Littlefield J, Gordon D, Veal D, Slade M. Phenotypic and genotypic characterization of encapsulated *Escherichia coli* isolated from blooms in two Australian lakes. *Environ Microbiol* 2005. 7(5):631- 640.
- Pupo GM., Karaolis DK., Lan R., and Reeves, PR. Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and mdh sequence studies. *Infection and Immunity*; 1997. 65(7): 2685-2692.
- Pupo, G.M., Lan, R., Reeves, P.R. Multiple independent origins of Shigella clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 2000.97 (19):10567-10572.
- Rodríguez A. G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud pública México*.2002.44(5):1-12
- Roig C, Rojas A, Guillén Y, Aria L, L Mendonza, Acosta ME, et al. Estudio de Fiebre Amarilla en primates área de brote de los departamentos de San Pedro y Central de Paraguay. *Mem Inst Investig Cienc Salud*; 2009.7(1): 40-45.
- Sokurenko, E., Feldgarden, and M., Trintchina, E. Selection footprint in the FimH adhesin shows pathoadaptive niche differentiation in *Escherichia coli*. *Mol. Biol. Evol.*; 2004.21 (7): 1373-1383.

- Llamosas M. Serotipificación de cepas de *Escherichia coli* aisladas de neonatos de alpacas (*Vicugna pacos*) con diarrea en Cerro de Pasco. Peru 2016.
- Varela, N. La toxoplasmosis en los primates del Nuevo Mundo. Boletín Geas; 2001.2 (4).
- Varela, N. Consideraciones Clínicas sobre Fiebre Amarilla en los Primates Neotropicales. Boletín GEAS; 2004.6 (4):17.
- Varela, N. Bases para el Manejo, Atención Médico Veterinaria, y Rehabilitación de Pequeños Primates Neotropicales. Asociación de Veterinarios de Vida Silvestre; 2009.1 (1)
- Vasconcelos P. Fiebre amarilla. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2003.36 (2): 293p.
- Vidal E, Canizález A, Gutiérrez J, Navarro F. Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. Salud pública Méx [Internet]. 2007.49 (5): 376-386
- Wood C, Borgerink H, Register T, Scott L, and Cline, J. Cervical and vaginal epithelial neoplasms in cynomolgus monkeys. Veterinary Pathology Online; 2004.41(2): 108-115.
- Zhang L, Foxman B, Marrs C. Both urinary and rectal *Escherichia coli* isolates are dominated by strains of phylogenetic group B2. J Clin Microbiol 2002.4(11): 3951-3955.