



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**

**BUSQUEDA Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *Escherichia coli*  
PRODUCTORAS DE TOXINA Stx (STEC) DE TORTUGAS MANTENIDAS EN  
CAUTIVERIO.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA  
PRESENTA:  
LAKSMI ALEJANDRA SOSA HERNÁNDEZ**

**ASESOR: Dr. Guillermo Valdivia Anda  
Coasesor: MVZ Rodolfo Córdova Ponce**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**

**BUSQUEDA Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *Escherichia coli*  
PRODUCTORAS DE TOXINA Stx (STEC) DE TORTUGAS MANTENIDAS EN  
CAUTIVERIO.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA  
PRESENTA:  
LAKSMI ALEJANDRA SOSA HERNÁNDEZ**

**ASESOR: Dr. Guillermo Valdivia Anda  
Coasesor: MVZ Rodolfo Córdova Ponce**

**Este trabajo fue apoyado por los siguientes proyectos:**

Programa de Apoyo a Proyectos de Innovación Tecnológica (**PAPIIT**) IN216005-3,  
*Efecto sobre el sistema inmune de cepas Enterohemorrágicas de Escherichia coli.*

Programa de Apoyo a Proyectos para el Mejoramiento de la Enseñanza  
(**PAPIME**), *Patología Veterinaria* EN208304.

**Cátedra de Investigación:** Mecanismos de Patogenicidad Microbianos.

Clave (IN 2-14).

## **AGRADECIMIENTOS**

A Nuestro Padre Celestial: Por las grandes bendiciones con las que ha  
llenado mi vida.

A mi amado esposo Saúl: Por darme alas para alcanzar mis sueños.

A mi hermoso hijo Kenneth: Por inspirar mi vida.

A mis padres Reina Lys y Alejandro: Por creer en mi y apoyarme en todo.

A mis hermanos: Por que somos una familia y los amo.

A toda mi familia: Por que siempre nos apoyamos y ayudamos.

A Diana: Por su amistad incondicional desde mi infancia.

A mis amigos David, Jessica, Carlos, Jaime y Salvador: Por todos los  
gratos momentos compartidos y su apoyo a lo largo de la carrera.

A mis compañeros de tesis Patricia, Claudia, Ángeles, Elena y Nestor:  
Por su amistad y ayuda en la realización de este trabajo.

Al Dr. Guillermo Valdivia Anda: Por su tiempo y paciencia en este  
proyecto.

A la UIMSA y todos los profesores que laboran ahí: Por su ayuda e  
instrucción.

Al Dr. Navarro y la MVZ. Reyna: Por instruirme en ramas especializadas  
de este trabajo.

A los MVZ. Rodolfo Córdova Ponce, Blanca R. Moreno Cardenti, Gerardo López Islas, Dr. Marco A. Muñoz Guzmán y M en C. Cynthia González Ruíz: Por el tiempo dedicado a revisar el trabajo y por sus valiosas aportaciones.

A L. Jesús Grajales Tam y el vivario de la FES. Iztacala: Por iniciarme en el gusto por los reptiles.

A todos y cada uno de mis profesores: Que desde mi infancia contribuyeron a mi formación como persona y profesional.

A la Zona Naval 3 del Puerto de Veracruz y todas las personas que me permitieron tomar muestras de sus mascotas.

A la UNAM: Por abrirme las puertas al conocimiento y superación y por permitirme ser parte de ella.

## Índice

1. Introducción.....	1
1. 1. Tortugas.....	3
1. 1. 1. Microbiota de las tortugas.....	3
1. 2. Generalidades de <i>Escherichia coli</i> .....	5
2. Antecedentes.....	10
2. 1. Riesgos de la convivencia con las tortugas.....	10
2. 2. Las tortugas y <i>Escherichia coli</i> STEC.....	12
2. 3. Factores de virulencia de <i>E. coli</i> STEC.....	14
2. 3. 1. Toxinas de “Shiga”.....	15
2. 3. 2. Expresión de los receptores para <i>Stx</i> .....	17
2. 4. Patogénia de las infecciones por ECEH.....	18
2. 5. Cuadro Clínico de las infecciones por ECEH.....	20
2. 6. Diagnóstico Diferencial.....	22
2. 7. Brotes reportados de <i>E. coli</i> ECEH.....	24
3. Justificación.....	26
4. Hipótesis.....	26
5. Objetivo General.....	27
6. Objetivos Específicos.....	27
7. Material y Métodos.....	28

7. 1. Material.....	28
7. 2. Métodos.....	29
7. 2. 1. Obtención y procesamiento de las muestras.....	31
7. 2. 2. PCR multiplex para <i>stx1</i> , <i>stx2</i> y <i>eae</i> .....	32
7. 2. 3. Corrimiento Electroforético.....	33
7. 2. 4. Análisis gráfico del Gel.....	34
7. 2. 5. Detección rápida de <i>Escherichia coli</i> Verotoxigénica en cultivo celular.....	35
7. 2. 6. Determinación de actividad toxigenita en filtrados Celulares.....	36
7. 2. 7. Pruebas Serológicas: Técnica de aglutinación directa.....	36
8. Resultados.....	38
8. 1. Obtención y procesamiento de las muestras.....	38
8. 2. Pruebas Primarias.....	39
8. 3. Pruebas Secundarias.....	40
8. 4. PCR multiplex para <i>stx1</i> , <i>stx2</i> y <i>eae</i> .....	42
8. 5. Detección rápida de <i>Escherichia coli</i> Verotoxigénica en cultivo Celular.....	43
8. 6. Determinación de actividad toxigenita en filtrados celulares.....	44
8. 7. Pruebas Serológicas: Técnica de aglutinación directa.....	44
9. Discusión.....	45
9. 1. Obtención y procesamiento de las muestras.....	45
9. 2. Colonias sugestivas a otros géneros bacterianos.....	45



9. 3. Aislamiento de Enterobacterias.....	46
9. 3. 1. <i>E. coli</i> .....	46
9. 3. 2. <i>Salmonella</i> sp.....	47
9. 4. PCR multiplex para <i>stx1</i> , <i>stx2</i> y <i>eae</i> .....	48
9. 5. Detección rápida de <i>Escherichia coli</i> Verotoxigénica en cultivo celular.....	48
9. 6. Determinación de actividad toxigenita en filtrados celulares.....	49
9. 7. Pruebas Sexológicas.....	49
10. Conclusiones.....	50
11. Bibliografía.....	51
12. Índice semántico.....	57

## Índice de Cuadros

Cuadro I. Principales características bioquímicas de <i>E. coli</i> .....	7
Cuadro II: Serotipos y serogrupos más comunes de <i>Escherichia coli</i> causante de diarrea.....	8
Cuadro III: Características de los grupos de <i>E. coli</i> causantes de diarrea.....	9
Cuadro IV: Causas que producen SUH diferentes a <i>E. coli</i> .....	23
Cuadro V: Resumen de metodología.....	30

Cuadro VI: Ciclos del Termociclador.....	33
Cuadro VII: Secuencias de oligonucleotidos y sondas empleadas en el diagnóstico de <i>E. coli</i> .....	34
Cuadro VIII: Sueros polivalentes utilizados en la técnica de aglutinación directa..	37
Cuadro IX: Patrones de identificación bacteriana.....	40
Cuadro X: Identificación de <i>E. coli</i> .....	41
Cuadro XI: Efecto de las bacterias en células VERO.....	43
Cuadro XII: Resultados PCR, Cultivo celular, Filtrado celular y Serología.....	44

### **Índice de Gráficas**

Gráfica I: Identificación de enterobacterias.....	41
---	----

### **Índice de Imágenes**

Imagen I: Colonias sugestivas de <i>E. coli</i> .....	39
Imagen II: Gel de PCR.....	42
Imagen III: Fotografías del efecto en células Vero.....	43
Imagen IV: Tortugas <i>Kinosternon sp.</i> sin aislamiento de <i>E. coli</i> .....	47

## 1. Introducción

Los reptiles se han hecho populares como mascotas y son de las principales atracciones en los zoológicos donde se les exhibe, además han resultado útiles como animales de investigación en el laboratorio y en el campo. La clase Reptiles comprende tortugas (orden Quelonios), lagartos, serpientes, cocodrilos y caimanes así como la tuatara de Nueva Zelanda. El nombre de la clase se refiere al modo de andarse (Lat. *reptare*, arrastrarse) (Puga, 2003).

Los reptiles cuentan con las siguientes características:

1. Cuerpo cubierto por una piel seca córnea (no mucosa), generalmente con escamas o escudos ectodérmicos; pocas glándulas superficiales.
2. Dos pares de extremidades, ambas típicamente con cinco dedos que terminan en uñas córneas, y adaptadas a correr, arrastrarse o trepar; en las tortugas marinas las extremidades tienen forma de paleta, están reducidas en algunos lagartos y faltan en otros lagartos y en todas las serpientes.
3. Esqueleto completamente osificado; cráneo con un cóndilo occipital.
4. Corazón incompletamente dividido en cuatro cámaras, dos aurículas y un ventrículo parcialmente dividido (los ventrículos están separados en los cocodrilos) ; un par de arcos aórticos; glóbulos rojos nucleados, biconvexos y ovals.
5. Respiración por pulmones; respiración faríngea y cloacal en algunas tortugas acuáticas.
6. Doce pares de nervios craneales.
7. Excreción por riñones metanéfricos; los desechos nitrogenados de los lagartos, serpientes y quelonios terrestres son principalmente ácido úrico.
8. Temperatura del cuerpo variable, Poiquiloterms lo cual significa que mantienen su temperatura absorbiendo el calor del ambiente o emitiéndolo, algo superior a la ambiental (Fowler y col. 2001).

9. Fecundación interna, generalmente por medio de órganos copuladores; huevos grandes con mucho vitelo, dentro de cáscaras coriáceas o calizas; suelen ponerlos, pero en algunos lagartos y serpientes la hembra los retiene durante el desarrollo.
10. Segmentación meroblástica; membranas embrionarias (amnios, corion, saco vitelino y alantoides) presentes durante el desarrollo; los individuos jóvenes, cuando salen del huevo, se parecen a los adultos; sin metamorfosis.

En las Tortugas su cuerpo está encerrado en un caparazón oval formado por una capa de huesos planos como placas, como un modelo definido y unidos estrechamente entre sí, sobre los cuales hay una cubierta de escudos córneos, también dispuestos regularmente. La parte dorsal convexa es el espaldar, y la ventral, más plana, el peto. Las vértebras torácicas y las costillas suelen estar soldadas al espaldar óseo. Las tortugas de caparazón blando tienen el tegumento coriáceo, no dividido en escudos, y el caparazón está poco osificado. La cabeza, la cola y las patas de las tortugas se retraen entre las dos partes del caparazón y en la mayor parte de las especies pueden retraerse del todo entre los bordes del espaldar y el peto para mayor seguridad. Las mandíbulas carecen de dientes, pero poseen un robusto manto cornificado que sirve para cortar, desgarrar y aplastar el alimento. Los dedos terminan en uñas córneas que son útiles para arrastrarse o para cavar. En las tortugas terrestres los pies son rechonchos y en las tortugas marinas las patas tienen forma de paleta, para nadar. El sistema excretor comprende una vejiga, y la orina es líquida y contiene urea y ácido úrico. El macho tiene un pene eréctil en la pared ventral de la cloaca. Conectados con la cloaca de las tortugas acuáticas hay unos sacos vasculares de paredes delgadas que funcionan como “branquias cloacales” cuando el animal está sumergido (Storer y col. 1986).

## 1. 1. Tortugas

No son animales domesticados y adaptados a las costumbres humanas. Además son animales dependientes de su entorno para poder realizar su vida. Por lo cual es importante adaptar su encierro a las condiciones naturales lo más cercanas posibles a las del origen del animal con la posibilidad de poder controlar la luz, temperatura, humedad, radiación, substrato, etc. y proporcionar el espacio suficiente en proporción al tamaño del animal. Esto nos ayudará a disminuir el estrés y lograr una adaptación al cautiverio del ejemplar, de manera general las instalaciones deben cumplir con los requisitos de cada especie (Puga, 2003).

### 1. 1. 1. Microbiota de las tortugas

Las tortugas poseen bacterias en su tracto digestivo que les ayudan a digerir sus alimentos (Grupo Tortuga, 2005). En una tortuga normal, los organismos Gram-negativos superan a los Gram-positivos. La microbiota normal de la cavidad oral incluye especies de *Pseudomonas*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Micrococcus* y *Corynebacterium* (Fowler y col. 2001).

De los microorganismos aerobios, las *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromona hydrophila*, *Providencia rettgeri*, *Morganella morganii*, *Salmonella arizonae* y *Klebsiella oxytoca*, han sido aisladas de animales en cautiverio sanos y enfermos, la invasión se presenta cuando hay algún cambio en su micro ambiente, ya que debemos recordar que los reptiles dependen de la temperatura externa para poder desarrollar cada una de sus funciones vitales y que cada uno de sus sistemas funcione correctamente por lo que un cambio en el ambiente nos provoca una baja o nula respuesta inmunológica. Estos organismos pueden ser parte de una infección secundaria tras una enfermedad primaria de origen viral (Puga, 2003). *Salmonella* tiene especial importancia debido a ser un patógeno potencial para el humano (Fowler y col. 2001).

Han sido identificados en las heces de tortugas enfermas Coccidias, *Cryptosporidium* sp. flagelados como *Tricomonas* sp., ciliados como *Balantidium* sp., sacáridos, *Proatractis* sp., oxiuros y trematodos, sin embargo no es sencillo caracterizar si los organismos son normales o patógenos. En muchas situaciones se tiene que aceptar que en números moderados de la mayoría de los organismos son benéficos para el hospedador. En vida libre cantidades importantes de microorganismos están presentes sin causar problemas graves, sin embargo, las condiciones de cautividad acrecientan el auto-contagio, pudiendo ocurrir cambios patológicos. Una gran variedad de bacterias han sido reportadas como los patógenos primarios y secundarios de las infecciones (Puga, 2003).

En una investigación en el 2000 de la microbiota bacteriana en la materia fecal en tortugas *Testudo* sp. clínicamente sanas se encontró *Aerococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Rhodococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Acinetobacter* sp., *Actinobacillus*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwina*, *Escherichia* sp., *Klebsiella* sp., *Morganella* sp., *Pasteurella* sp., *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp., *Serratia* sp., *Shigella* sp., *Yersinia* sp., y otras especies inidentificables de las heces de tortugas en cautiverio en el Reino Unido. Un estudio anterior en 1965 se intento aislar bacterias de diferentes partes del intestino de tortugas, pero el método utilizado no fue el apropiado para la investigación. Ese mismo año *Bacteroides* sp. fue identificado en el contenido rectal de *Testudo* indicando la habilidad de la microbiota intestinal para actuar simbióticamente en la degradación de la ingesta en especies de herbívoros. Las enzimas secretadas por las bacterias simbióticas intestinales son importantes en la descomposición de plantas originando celulosa. En 1981 se describió *Escherichia coli*, *Proteus* sp., *Aeromonas* sp. y *Pseudomonas* sp. como habitantes normales de la cloaca y sugirieron que la microbiota normal de los reptiles se puede ver alterada por cambios en la temperatura ambiental. Años más reciente en 1998 se investigo la microbiota de tortugas terrestres sanas y enfermas del Reino Unido concluyendo que en los lugares donde las tortugas eran mantenidas en grupos la microbiota oral era generalmente similar. Esto puede sugerir que la

contaminación oro-oral y oro-fecal es potencialmente frecuente y las bacterias y enfermedades pueden transmitirse de estas formas (Fowler y col. 2001).

## **1. 2. Generalidades de *Escherichia coli***

La *Escherichia coli* (*E. coli*) fue aislada por primera vez en 1885 por el pediatra alemán Theodore Escherich, quien la denominó bacteria *Coli Comune* para indicar su aparición universal en el intestino de individuos sanos. En los últimos 100 años la *E. coli* se ha estudiado de manera tal que es actualmente la forma de vida libre más comprendida sobre la tierra (Fernández y col. 2003).

*E. coli* es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*, cuyas principales características bioquímicas se indican en el Cuadro I (Rodríguez, 2002).

Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de microbiota normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos (Rodríguez, 2002). Las enfermedades más comunes causadas por *E. coli* son infecciones del tracto digestivo, del tracto urinario, septicemia, mastitis, síndrome urémico hemolítico (SUH), enfermedad edematosa porcina, enfermedad edematosa bovina y colitis hemorrágica (CH), además de que su importancia también radica en la zoonosis, lo que puede ocasionar SUH, CH y púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) (Cortés, 2003).

Para determinar el grupo bioquímico al que pertenecen Kauffman (Rodríguez, 2002) desarrolló un esquema de serotipificación basado en la demostración de los antígenos existentes en cada variedad de la bacteria, estos son: Ag "O" que se basan en la antigenicidad de los lipopolisacáridos (LPS) de la membrana celular, Ag "H" refiriéndose a las proteínas del flagelo, Ag "K" que son los polisacáridos presentes en la cápsula y se consideran como extensiones superficiales de los antígenos O, estos pueden ser L, A, o B; y Ag "F" que son proteínas de las fimbrias y se han descrito dos en base a su capacidad de

hemoaglutinación F1 y F2 (Cortés, 2003; Pérez, 2002). Este esquema continuamente varía y actualmente tiene 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y 60 capsulares (K). El antígeno "O" es el responsable del serogrupo; la determinación del antígeno somático y flagelar (O:H) indica el serotipo, el cual en ocasiones se asocia con un cuadro clínico en particular. El Cuadro II (Rodríguez, 2002) muestra algunos serotipos más frecuentemente asociados con los grupos patógenos.

Existen seis diferentes grupos de *E. coli* que causan enfermedad intestinal (patotipos): enterotoxigénica (ECET), enterohemorrágica también conocidas como productoras de toxina Vero o toxina semejante a Shiga (ECEH o ECVT o STEC), enteroinvasiva (ECEI), enteropatógena (ECEP), enteroagregativa (ECEA) y adherencia difusa (ECAD). Las principales características de estos grupos se muestran en el cuadro III (Rodríguez, 2002).

Las cepas de *E. coli* pertenecientes al grupo enterohemorrágico (ECEH) producen una o ambas de las toxinas nombradas como Shiga like toxin (SLT) 1 y 2. Mientras que para la SLT1 se han encontrado dos variantes antigénicas o de su receptor sobre las células blanco, para la SLT2 han sido 5 (Valdivia, 2002).

La ECEH aparece en la década del 80 en casos esporádicos y en brotes epidémicos fundamentalmente en países desarrollados. Los serogrupos más comúnmente aislados son: O157 , O26 , O11 y los serotipos H7, H11 y H32 (Fernández y col. 2003). *E. coli* O157:H7 ha sido implicada en casos de síndrome Urémico Hemolítico (SUH) y Colitis Hemorrágica (CH) en diferentes partes del mundo. Cerca de 75, 000 casos de infección en humanos por este serotipo ocurren en los Estados Unidos anualmente. La severidad de la enfermedad, la falta de un tratamiento efectivo y la posibilidad de un brote a gran escala han impulsado los estudios sobre su patogénesis y la detección de la bacteria. En los cerdos se identificó una infección natural por cepas de ECEH, conocida como enfermedad edematosa porcina siendo la otra especie susceptible en la naturaleza a las cepas productoras de *Stx* (Valdivia, 2002).



Cuadro I. Principales características bioquímicas de *E. coli*.

Prueba bioquímica	% de positividad	Prueba bioquímica	% de positividad
Oxidasa	0	Fermentación de salicina	40
Producción de indol	98	Fermentación de adonitol	5
Rojo de metilo	99	Fermentación de inositol	1
Voges-Proskauer	0	Fermentación de L-arabinosa	99
Citrato de Simmons	1	Fermentación de la rafinosa	50
H <sub>2</sub> S (TSI)	1	Fermentación de L-ramnosa	80
Hidrólisis de urea	1	Fermentación de maltosa	95
Utilización de malonato	0	Fermentación de D-xilosa	95
Ácido de glucosa	100	Fermentación de trealosa	98
Gas de glucosa	95	Fermentación de celobiosa	2
Fenilalanina desaminasa	0	Fermentación de α-metil-D glucósido	0
Lisina descarboxilasa	90	Fermentación de eritritol	0
Arginina dihidrolasa	17	Hidrólisis de la esculina	35
Ornitina descarboxilasa	65	Fermentación de melobiosa	75
Movilidad a 36°C	95	Fermentación de D-arabitol	5
Hidrólisis de gelatina a 22°C	0	Fermentación de D-manosa	98
KCN crecimiento en	3	Fermentación de glicerol	75
Fermentación de lactosa	95	Nitrato a nitrito	100
Fermentación de la sacarosa	50	Tartrato de Jordán	95
Fermentación de D-manitol	98	Utilización de Acetato	90
Fermentación de D-sorbitol	94	Lipasa (aceite de maíz)	0
Fermentación de mucato	95	Dnasa a 25°C	0
Fermentación de dulcitol	60	ONPG	95

(Rodríguez, 2002)

Cuadro II: Serotipos y serogrupos más comunes de *Escherichia coli* causante de diarrea.

ECET	ECEI	ECEP	ECEA	STEC
O6:H-	O28ac:H-	O18	O3:H2	O1:MN, O23:H7, O85:H10, O117:H7,
O6:H16	O29:H-	O26:H-	O15:H18	O165:H-, O1:H1, O23:H16, O85:H23
O8:H-	O112ac:H-	O26:H11	O44:H18	H-, O86:H10, O117:H14, O165:H19,
O11:H27	O124:H-	O55:H-	O77:H18	O1:H20, O25:H11, O88:H-, O117:H19,
O15:H11	O124:H7	O55:H6	O86:H- O1:HNT	O26:H-, O91:H-, O118:H16, O166:H15,
O20:H-	O124:H30	O55:H7	O111:H21	O2:H1, O26:H2, O91:H10, O118:H30,
O25:H-	O135:H-	O86:H-	O127:H2	O2:H2:K1, O26:H8, O91:H14, O119:H-,
O27:H-	O143:H-	O86:H34	ONT:H10	O2:H6, O26:H11, O91:H21, O119:H5,
O27:H7	O144:H-	O111:H-		O2:H7, O26:H21 O98:H- O120:H19,
O27:H20	O152:H-	O111ab:H2		O2:H27, O26:H32, O98:H-, O121:H-,
O80	O167:H5	O119:H6		O4:H40, O27:H-, O98:H8, O121:H8,
O85:H7		O125ac:H21		O5:H-, O39:H4, O103:H-, O126:H-,
O114:H21		O126:H-		O5:H16, O39:H8, O103:H2, O126:H2,
O115:H21		O126:H2		O6:H-, O45:H-, O103:H4, O126:H8,
O126:H9		O126:H27		O6:H1, O45:H2, O103:H6, O126:H21,
O128ac:H27		O127:H21		O6:H29, O45:H7, O103:H25, O126:H27,
O139		O128ab:H2		O8:H-, O50:H-, O104:H7, O128:H12,
O148:H28		O128:H12		O8:H14, O55:H-, O109:H2, O137:H41,
O149:H4		O142:H6		O8:H21, O55:H6, O110:H-, O141:H,
O149:H10		O158:H23		O9ab:H-, O55:H7, O110:H19, O144:H,
O153:H45				O11:H49, O55:H10, O111ab:H-, O145:H,
O159:H-				O14:H-, O55:H?, O111:H2, O145:H16,
O159:H4				O15:H-, O60:H-, O111:H7, O145:H25,
O159:H20				O15:H27, O65:H16, O111ab:H8, O145:H28
O166:H27				O16:H-, O70:H11, O111:H34, O146:H,
O167:H5				O16:H6, O73:H34, O111:HNT, O146:H21,
O169:H41				O17:H18, O75:H-, O112:H21, O146:H28,
O173:H-		O18:H-, O75:H5, O113:H2, O150:H10, O18:H?, O76:H19, O113:H4, O153:H2,		
		O20:H7, O79:H7, O113:H53, O153:H25, O21:H5, O80:H-, O114:H4, O154:H,O22H-,		
		O82:H-, O114:H48, O157:H, O22:H1, O82:H8, O115:H18, O157:H7, O22:H8,		
		O83:H1, O116:H19, O161:H, O22:H40, O84:H2, O117:H-, O163:H19, O169:H-,		
		O168:H-, O166:H28, O165:H2, O171:H2, O172:H, OX3:H2, ONT:H21, ONT:H25,		
		ONT:H28, ONT:H47, OR:H, OR:H20, OR:H21, O117:H7:K1, O165:H10, O1:H2,		

(Rodríguez, 2002) ECET *E. coli* enterotoxigénica, ECEI *E. coli* enteroinvasiva, ECEA *E. coli* enteroagregativa, ECEP *E. coli* enteropatógena, STEC *E. coli* productora de toxina shiga, R rugosa, NT no tipificable.

Cuadro III: Características de los grupos de *E. coli* causantes de diarrea.

GRUPO	SINTOMAS CLÍNICOS	EPIDEMIOLOGIA	SEROGRUPOS Y SEROTIPOS MAS COMUNES	FACTORES DE PATOGENICIDAD
ECET	Diarrea aguda acuosa	Niños menores de dos años y diarrea del viajero	O8:H9. O15:H11, O20:H-, O25:H-, O27:H7, O78:H12. O148:H28, O159:H20	ST y LT CFA
ECEH	SUH, CH, diarrea sin Sangre, dolor abdominal, Fiebre, vómito	Niños y adultos que la adquieren por comer carne cruda o mal cocida	O157:H7, O26:H11, O103:H2, O113:H21 O119, O128, O145	STX A/E Intimina Po157
ECEI	Diarrea con moco y sangre o diarrea acuosa, también se presenta cuadro disentérico	Niños menores de seis meses	O28:H, O112ac:H-, O144:H-, O152:H-, 164:H-. O167:H-	Invasividad Plásmido EAF de 50-70MDa
ECEP	Diarrea aguda, dolor abdominal, vómito, fiebre baja	Niños menores de seis meses hasta dos años	O55, O86, O142, O111:H-, O127.	A/E, BFP Plásmido EAF de 50-70MDa
ECEA	Diarrea líquida, verde con moco, sin sangre, diarrea persistente hasta 20 días	Recién nacidos y niños menores de dos años	O44:H18	Fimbria AAFI y II EASTI Proteínas Pet y Pic PME Plásmido de 60 MDa Citotoxina
ECAD	Diarrea acuosa sin sangre	Niños de 1 a 5 años	O126:H27	Fimbria FI 845 OMP

(Rodríguez. A. G. 2002) LT toxina termolábil, ST toxina termo estable, CFA factor de colonización antigénico, BFB Pili con forma rizada, EAF factor de adherencia de EPEC, PME proteína de membrana externa, STX toxina shiga, EAST toxina ST de cepas enteroagregativas.

## 2. Antecedentes

### 2. 1. Riesgos de la convivencia con las tortugas

Los riesgos más comunes de convivir con animales de fauna silvestre son las heridas físicas (principalmente mordeduras y rasguños) y el peligro de adquirir enfermedades zoonóticas (Mullineaux y col. 2003).

Microorganismos asociados a enfermedades de los hombres como *Yersinia enterocolitica*, *Candida albicans*, *Salmonella sp.*, *Vibrio sp.*, y *Criptosporidium sp.*, han sido reportados como parte de la microbiota normal de las tortugas. En un estudio realizado en el año 2000 obtuvieron que 22 géneros de bacterias identificadas en heces de tortugas sanas en cautiverio del Reino Unido eran potencialmente zoonóticas incluyendo *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Serratia*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Yersinia*. Esto intensifica la necesidad de mantener condiciones higiénicas adecuadas al convivir con tortugas y recalca la responsabilidad de que el Médico Veterinario informe acerca de los riesgos involucrados con estos animales (Fowler y col. 2001).

El número de enfermedades que son clasificadas como variedades de zoonosis son aproximadamente 100 de 3000 sin incluir alrededor de 2000 variedades de *Salmonella sp.* Una lista de zoonosis obtenida en 1994 mostró que de 1991 a 1994 existieron 43, 507 casos de Salmonelosis, de 1995 a 1998 se reportaron 44, 259 casos principalmente transmitida por ovejas, ganado y roedores así como aves, reptiles y mamíferos en los Estados Unidos (Conover, 2002).

*Salmonella sp.* ha sido reportada en los reptiles desde 1975 representando un riesgo de infección para los humanos, especialmente para los niños (CDC, 2005). Esta ha sido ampliamente estudiada en diferentes países como Canadá, Estados Unidos, el Reino Unido, Suiza, México, Puerto Rico, etc. (CDC, 1984).

Una alta proporción de los reptiles son portadores asintomáticos de *Salmonella sp.* en las heces fecales el número asciende al 90% (CDC, 1995). En los años 70's en Ohio se estimó que el 14% de los casos reportados de salmonelosis humana eran causados por tortugas. Estas mascotas adquieren fácilmente *Salmonella sp.* en el ambiente antes o poco después de salir del huevo. En una publicación mediante el tratamiento de huevos de tortuga con gentamicina se obtuvieron tortugas libres de *Salmonella sp.* (Giljahn, 1986). Esto es importante debido a que en los últimos años los reptiles se han convertido en una mascota doméstica común y con esto han ido aumentando las infecciones de *Salmonella sp.* a los humanos. En los Estados Unidos *Salmonella sp.* causa un estimado de 1.4 millones de casos de infección y 400 muertes anuales en los humanos (Jong y col. 2005).

El Centro de Enfermedades Infecciosas de los Estados Unidos (CDC) han hecho un seguimiento del

año 1994 al 2002 en 13 estados con personas infectadas con serotipos poco comunes de *Salmonella* sp. los cuales tuvieron contacto directa o indirectamente con reptiles. En la mayoría de los casos el mismo serotipo encontrado en el humano ha sido el del reptil (CDC, 1995). El serotipo más frecuentemente encontrado es *Salmonella enterica* serotipo *enteritidis* seguido de *S. typhimurium* (Jong y col. 2005). De esta forma podemos ver como por décadas los reptiles han sido reconocidos como portadores de salmonelosis (CDC, 2002).

Desafortunadamente los datos de morbilidad y mortalidad en las zoonosis están incompletos. El departamento de los Estados Unidos de la Salud y Centro de Servicios Humanos para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) cuentan con los datos de “Enfermedades de Reporte Obligatorio” de los Estados Unidos, 15 de ellas son zoonosis. Los casos de enfermedades de el resto del mundo son pobres debido a que la mayoría de las personas enfermas no acuden a recibir atención médica, entonces, muchas enfermedades no son reportadas (Fowler y col. 2001).

Además de los patógenos potenciales, uno siempre puede esperar una variedad desconocida de bacteria que este habitando el tracto intestinal de alguna tortuga sana. Cuando un solo tipo de bacteria es encontrado en las heces, es posible que una gran variedad de influencias hayan alterado la microbiota y esto puede afectar la salud de las tortugas (Fowler y col. 2001).

## **2. 2. Las tortugas y *Escherichia coli* STEC**

De los pocos estudios en los que se ha aislado la bacteria *E. coli* como parte de la microbiota de las tortugas en ninguno de ellos ha sido serotificada, así mismo, en ninguno de ellos se ha estudiado la manera en la que *E. coli* puede afectar a las tortugas o a los humanos hablando de enfermedades de tipo zoonótico lo cual es una limitante importante para estudios más especializados en esta especie animal.

Las tortugas comúnmente presentan enfermedades crónicas del tracto gastrointestinal, los signos clínicos incluyen diarrea, deshidratación, anorexia, letargia y detrimento de masa corporal. La anorexia puede ser el resultado de numerosas causas incluyendo infecciones como enteritis bacteriana, enterohepatitis o enfermedades metabólicas, parasitismo crónico u obstrucciones gastrointestinales como la obstrucción por impactación, condiciones ambientales inapropiadas incluyendo baja temperatura, estrés, dieta inapropiada y síndrome de inadaptación al cautiverio. Las enteritis bacterianas incluyendo salmonelosis, puede ser una condición crónica asociada a neumonía y septicemia pudiendo resultar en shock sistémico y muerte. Se observa como una inflamación del tracto digestivo que puede ocasionar animales deshidratados, hipocalemicos, débiles, anoréxicos e inactivos y podría ser causado en las siguientes situaciones:

- Dieta inadecuada.
- Intususcepción.
- Parasitismo.

- Enteritis/colitis.
- Septicemia.
- Toxemia.
- Alteraciones en microbiota.
- Estrés.
- Desbalance metabólico.
- Enfermedades virales y micóticas.

Es común ver la enteritis y colitis en las tortugas. En 1978 se encontró enteritis y/o colitis en el 27% de las necropsias realizadas a tortugas. Estas lesiones son generalmente asociadas a una invasión bacteriana de la microbiota. Organismos encontrados en las lesiones son generalmente parte de la microbiota que han invadido la mucosa debido a una inmunosupresión y desnutrición. La enteritis y colitis son vistas comúnmente en especies que son transportadas a diferentes regiones recientemente así como mascotas mantenidas a bajas temperaturas, hibernación inapropiada y dietas inadecuadas (Fowler y col. 2001).

Se han encontrado diversas lesiones a lo largo del organismo de las tortugas donde se ha visto relacionada *E. coli* (Frye, 1991). *E. coli* ha sido aislada tanto de organismos sanos como enfermos, siendo más común en los sanos habiendo sido reportada en cuatro investigaciones en muestras tomadas a partir de la cloaca. En organismos enfermos fue encontrada en cuatro investigaciones también, de el tracto respiratorio alto en una y del tracto respiratorio bajo en tres (Fowler y col. 2001).

La participación de las bacterias en las enfermedades de las tortugas es tanto importante y complicada. Complicado por que las bacterias son componentes naturales de su microbiota y en algunos casos puede que actúen como agentes secundarios o incluso como patógenos primarios (Fowler, 1986).

Actualmente las tortugas se han convertido en una mascota muy popular dentro de las familias mexicanas y en general del mundo, esto es debido a que estas aparentemente representan la mascota perfecta para la familia, sin embargo, las tortugas tienen bacterias potencialmente peligrosas (CDC, 2005). *E. coli* no es considerada un caso grave de salud pública en las tortugas (Fowler y col. 2001), pero se debe considerar que dentro de los reportes donde ha sido aislada la bacteria a partir de muestras de tortugas sanas o enfermas no se han serotipificado las cepas, por lo que no sabemos a que grupo de *E. coli* pertenecen las cepas que tienen las tortugas, este desconocimiento hacia esta especie animal ya ha traído consecuencias graves como lo muestra un estudio realizado con tortugas *Trachemys scripta elegans* en niños menores de seis años con meningoencefalitis viral grave donde se concluyo que convivir con mascotas aparentemente inocuas puede tener consecuencias graves en grupos a riesgo (De la Torre y col. 2004). Por lo tanto es importante que se tengan estudios especializados dentro de esta especie animal donde se determine su capacidad zoonótica y así poder preservar tanto su salud como la del humano.

## 2. 3. Factores de virulencia de *E. coli* STEC

*E. coli* produce una serie de toxinas bien caracterizadas como las enterotoxinas, las citotoxinas y también otro tipo llamadas Factor Citotóxico Necrotizante (FCN 1, y FCN 2), el cual causa necrosis en la piel del conejo y células multinucleadas, con redondeamiento, en cultivos de tejidos (células HeLa, CHO o de riñón de mono verde del África conocidas como Vero) las cepas productoras de este FCN se han aislado en niños y bovinos enfermos (Pérez, 2002). Existe otro presente en algunas cepas de *E. coli* llamado “cytolethal distending toxin” que también tiene un efecto tóxico en algunas células como las HeLa (McSweeney, 2005).

Las infecciones causadas por el grupo de las *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) están asociadas con cuatro principales factores de virulencia: capacidad para formar las lesiones de adherencia y esfacelación (A/E, en inglés “attaching and effacement”), la expresión de toxinas de “Shiga” (Stx o SLT), presencia del gen cromosomal *eae* y la presencia del plásmido pO157, de 60 megadaltones (MDa) (Fernández y col. 2003). No todos los serotipos contienen todos los factores de virulencia.

La lesión A/E se caracteriza por la disolución del ribete en cepillo intestinal y pérdida de la microvellosidad intestinal (esfaceamiento) en el sitio de unión de la bacteria (adherencia) después de lo cual se vuelve a arreglar la actina intracelular conduciendo a la formación de un pedestal en el sitio de interacción bacteria-célula. La lesión A/E se lleva a cabo en tres fases: unión a la superficie celular en un patrón de adherencia localizada y asociada con las fimbrias formadoras de rizos (bundle-forming pili- BFP), se induce una respuesta compleja de las células epiteliales que conducen a rearrreglos del citoesqueleto y que son inducidas por proteínas secretadas por la bacteria (EspS) y finalmente la unión íntima y estrecha de la bacteria a la célula, mediada por una proteína bacteriana, íntima, y un receptor celular secretado por la misma bacteria (Tir); así mismo, Tir actúa como receptor celular para las cepas ECEH (Valdivia, 2002).

El gen cromosomal *eae* codifica para la proteína de membrana externa (PME) de 94 kilodaltones (kDa), íntima, cuya expresión es regulada por genes plasmídicos; el gen *eae* también se encuentra en cepas EPEC. El plásmido pO157, de 60 megadaltones (MDa) codifica para la enterohemolisina (Fernández y col. 2003).

### 2. 3. 1. Toxinas de “Shiga”

La toxina Shiga es el factor principal de virulencia de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga, esta constituye entre los patógenos bacterianos productores de enfermedad diarreica aguda el agente más comúnmente aislado, provocando alrededor de 40 a 50 % de estas enfermedades (Ramírez y col. 1999).

Las toxinas producidas por las cepas ECEH son conocidas, además de toxinas de “Shiga” (*stx*) como: Verotoxinas (VT) o como Shiga Like Toxin (SLT) debido a que se observó que la citotoxina se neutralizó con antitoxina obtenida a partir de *Shigella dysenteriae* tipo I (Ramírez. M., y col. 1999). Los miembros de la familia de toxinas Shiga (*stx*) tienen parecido con la toxina de Shiga, compartiendo las siguientes propiedades: (Valdivia, 2002).

1. Estructura polipeptídica de 5 subunidades B por una A.
2. Estructura de un operón, con el gen codificante de la subunidad A “corriente arriba” del gen para la subunidad B.
3. Actividad biológica idéntica para la subunidad A.
4. Unión del pentámero B al receptor de tipo esfingolípido sobre las células eucarióticas.
5. Actividades biológicas de enterotoxicidad en conejo, neurotoxicidad en ratón y citotoxicidad para cultivos celulares.

La toxina Shiga actúa inhibiendo la síntesis de proteínas dentro de las células, esta toxina tiene dos subunidades designadas A y B. La subunidad B es un pentámero que tiene especificidad a los glucolípidos de las células del hospedador especialmente al Gb3 (globotriosilcerámico) que es el sitio de unión para las toxinas Shiga Like Toxin (SLT) 1, 2 y 2c y el Gb4 para la toxina SLT2e, existen evidencias de que la composición de ácidos grasos de la molécula de Gb3 tiene un fuerte efecto sobre a unión a la toxina (Valdivia, 2002). La subunidad A se divide en dos partes; A1 la cual actúa en los ribosomas en la síntesis de proteínas. Esta toxina requiere una especificidad muy alta para los receptores en las células del hospedador, por lo tanto especies que tienen la bacteria toxigenita y no tienen los receptores no presentarán efectos (Wikipedia, 2007). Se sugiere que en vista de que la corteza del riñón humano expresa la glicoproteína GB3, este órgano es el más afectado por contar con los receptores adecuados para la unión de las verocitotoxinas, por lo tanto, una vez que se produce el daño celular por la toxina bacteriana, se disparan diferentes mecanismos de daño endotelial “dirigido”. La subunidad B parece tener acción tóxica *per se* independiente de la presencia de la subunidad A (Martín y col. 2007).

En las cepas ECEH aisladas, se han encontrado las variantes *stx1* y *stx2* que son inmunológicamente diferentes y se reconocen siete subtipos, de tal manera que se pueden aislar bacterias que sinteticen alguna de las toxinas o varias. *stx1* es esencialmente idéntica a la toxina de Shiga y es denominada Verotoxina 1. La otra está más lejanamente emparentada con la toxina de Shiga y se denomina Verotoxina 2. La toxina produce inhibición de la síntesis proteica ya que se une a la subunidad 60S de los ribosomas de las células intestinales o renales del hospedero y muerte celular sin invasión del enterocito. Es la primera causa de síndrome hemolítico urémico (SHU) en la niñez, y una de las principales causas de insuficiencia renal aguda (IRA), ((Rodríguez, 2002; Valdivia, 2002; Fernández y col. 2003).

La transcripción de *stx 1* es regulada por la concentración de hierro en el medio y la expresión de *stx2c* se incrementa drásticamente por la presencia de mucina intestinal (Valdivia, 2002).

Los genes que codifican la producción de *stx1* y *stx2* son portados por fagos temperados independientes, sin embargo existen cepas ECEH que no albergan los genes codificadores de verotoxinas, otras producen sólo una de ellas o ambas. Algunas cepas de ECEH producen un tipo de toxina citolítica, la enterohemolisina, ésta se ha demostrado que está estrechamente ligada al serotipo 0157:H7 y codificada por un plásmido de 90 Kb (pO157), y está regulada por fagos temperados. Se ha encontrado una fuerte asociación entre la producción de enterohemolisina y la síntesis de verotoxinas. Dentro de las cepas 0157:H7



el 96% aproximadamente son productoras de *stx* (Ramírez y col. 1999).

### 2. 3. 2. Expresión de los receptores para *Stx*

Las toxinas *Stx* tienen como principal receptor al Gb3, por lo que las células afectadas son aquellas que lo presentan en su superficie, condicionando la especificidad de los efectos en los diferentes órganos afectados durante las infecciones por cepas productoras de toxinas *Stx* (STEC). Las citocinas pro-inflamatorias regulan la expresión del glicolípido Gb3 sobre la membrana, sugiriendo que la respuesta del hospedado puede contribuir a la patogénesis por sobre-expresión del Gb3. Varios autores presentan evidencias de que el receptor Gb3 es regulado y sobrepresado por las células endoteliales en respuesta a diversas condiciones en las que se secretan citocinas (Valdivia, 2002).

### 2. 4. Patogénesis de las infecciones por ECEH

Las cepas ECEH han adquirido gran importancia como causa de enteritis hemorrágica y dentro de esta categoría el serotipo O157:H7 es el enteropatógeno más aislado a escala mundial, sobre todo como causa de brote y epidemias; se declaró recientemente como patógeno emergente (CDC, 2005).

*E. coli* O157:H7 se puede encontrar en bovinos, cabras, borregos y con menos frecuencia en cerdos y pollos, su principal reservorio es el intestino de ganado bovino. También se ha logrado recuperar de frutas y vegetales como lechuga, rábanos, alfalfa; además en productos industrializados como mayonesa y jugos de naranja y manzana no pasteurizados, aun cuando estos alimentos tengan un pH de 3.4, condición en la que puede sobrevivir varios días. La transmisión de *E. coli* O157:H7 puede ser por ingerir carne cruda o mal cocida, leche bronca, agua contaminada; también puede ser por contacto con personas infectadas como por ejemplo los manipuladores de alimentos. Hay estudios que sugieren la importancia de la mosca doméstica como vector en la transmisión de *E. coli* O157:H7 (Fernández y col. 2003).

La bacteria al ser ingerida en cantidades infectantes, lo que puede ser de menos de 100 bacterias, llega al intestino donde sus verotoxinas son liberadas y fijadas a los receptores celulares formados por glicolípidos (Gb3 o Gb4) (Cortés, 2003). Se adhiere a las células endoteliales y produce lesiones de unión estrecha que se encuentran principalmente en el colon. En algunos estudios se reportan lesiones básicamente al nivel de las placas de Peyer y no en toda la extensión de la superficie de la mucosa (Fernández y col. 2003).

La subunidad B de la toxina se une al receptor celular y promueve la entrada por endocitosis de la subunidad A, posterior al rompimiento de ella en las fracciones A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>. De esta forma, la fracción A<sub>1</sub> es transportada por el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico hasta los ribosomas, en donde actúa como

una N-glicosidasa, hidrolizando una adenina de la fracción ribosomal 28S, inhibiendo el factor de elongación y bloqueando la síntesis de proteínas, conduciendo a la muerte celular (Valdivia, 2002). Al llegar a la vasculatura las células endoteliales sintetizan el factor de coagulación VIII por lo que al estar de forma anormal provoca una trombocitopenia, coagulación intravascular local y una acumulación de fibrina en el SNC en tubo digestivo y riñón (Cortés, 2003). De esta forma la toxina alcanza el torrente circulatorio para ser diseminada en todo el organismo (Valdivia, 1995). Además sus fimbrias plasmídicas codificadas por el gen CDV419 unen a las bacterias al intestino y por medio de unas proteínas en su membrana externa llamadas intiminas (codificadas por el gen *eae*) provocan lo que se denomina el A/E, borrando las microvellosidades intestinales (Cortés, 2003).

La diarrea puede considerarse que se produce en dos partes, la primera se realiza con la colonización del intestino que se produce de manera intensiva y la acción del LPS. Se menciona que el Pili de la bacteria juega un papel esencial en la colonización y el fenómeno de A/E en la superficie del epitelio intestinal. Después de la diarrea le sigue una anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia, disfunción renal y en raras ocasiones complicaciones neurológicas, principalmente en los adultos, rara vez se llega a presentar en los niños. Los factores principales en la colonización incluyen la edad, el pH gástrico y la presencia en el intestino de anticuerpos específicos. La microvasculatura renal expresa grandes cantidades de Gb3, por lo que es altamente susceptible a las toxinas de *E. coli*. El daño al endotelio vascular es debido a la circulación de las exotoxinas de la bacteria, las endotoxinas y citocinas que el huésped produce como el factor de necrosis tumoral alfa (FNT-A) e interleucina 1-B (IL-1 B), los cuales juegan un papel importante en la activación de las células endoteliales por medio de las toxinas. Se sabe que estas verotoxinas provocan un decremento de linfocitos especialmente los T, aunque también afectan en menor grado los linfocitos B, en los cuales se estimula el fenómeno de apoptosis, en contraste, cabe mencionar que la toxina *stx* no provoca muerte celular, pero impide el aumento de la actividad metabólica de estos, por lo cuál no hay una respuesta satisfactoria inmunológica debido a la ausencia de IgG anti-*stx*. Se cree que las variedades de *E. coli* que provocan diarrea no causan infecciones en el sistema urinario ni meningitis (Cortés, 2003).

Las diferencias en la gravedad de los signos encontrados pueden estar explicadas en el tipo de toxina (*stx1* o *stx2*), la cantidad de toxina producida (moderadas o altas productoras) y/o la asociación con otros productos de la bacteria (LPS, FCN, etc.) (Valdivia, 1995).

La identificación del grupo ECEH se puede hacer por serotipificación o bien por poner de manifiesto la producción de la toxina *stx* también se puede cuantificar la elevación de anticuerpos dirigidos hacia el lipopolisacárido de *E. coli* O157:H7, así como demostrar la presencia de factores de virulencia como pO157, el fenómeno de A/E o los genes involucrados, además de la fagotipificación (Rodríguez, 2002).

## **2. 5. Cuadro Clínico de las infecciones por ECEH**

*E. coli* O157:H7. Este serotipo no fermenta el D sorbitol ni la ramnosa y no produce B-glucuronidasa; esta bacteria puede producir principalmente SUH y Colitis Hemorrágica (CH) (Fernández y col. 2003), sin embargo, también puede producir diarrea sin sangre, dolor abdominal, fiebre, vómito, etc. (Rodríguez, 2002).

El periodo de incubación de ECEH es de 1 a 8 días; inicialmente produce diarrea sin sangre, con o sin vómito, dolor abdominal, fiebre, y después de 1 a 2 días la diarrea se torna sanguinolenta y se intensifica el dolor abdominal, de una duración de 4 a 10 días, con heces abundantemente sanguinolentas. Se cura o bien llega hasta SUH (Rodríguez, 2002). El cuadro clínico típico es el de una colitis hemorrágica de aparición brusca, con pujos y dolor abdominal intenso y que habitualmente no se acompaña de fiebre. Este cuadro se identificó por primera vez en EU. y Canadá, en 1982. Los sucesivos brotes reportados en EU., Canadá y Japón, han motivado que la infección por este agente se considere por la Organización Mundial de la Salud como una enfermedad emergente de transmisión digestiva (Fernández y col. 2003).

Se ha relacionado a ECEH con brotes caracterizados por dolor abdominal, diarrea acuosa con sangre y poco o nada de fiebre, cuadro al que se le llamó colitis hemorrágica y que era debido a la ingestión de carne cruda o mal cocida. La colitis hemorrágica es un tipo de gastroenteritis en la que cierta variedad de la bacteria *E. coli* infecta el intestino grueso y produce toxinas que causan una diarrea súbita con sangre y a veces otras graves complicaciones. Una de las variedades más frecuentes de *E. coli* que causan colitis hemorrágica es *E. coli* O157:H7. Esta variedad se encuentra en los intestinos de ganado vacuno sano. Los brotes se pueden desencadenar al ingerir carne mal cocinada o por beber leche de vaca no pasteurizada. La enfermedad también puede ser transmitida de persona a persona, sobre todo en niños que usan pañales. La colitis hemorrágica puede ocurrir en personas de todas las edades (Manual Merck, 2007).

El SUH es la causa más frecuente de insuficiencia renal aguda (IRA) en los niños (en la mitad de los casos necesita diálisis). Es un síndrome que incluye IRA, trombocitopenia y hemólisis. Es producido, en la mayoría de los casos, por toxinas producidas por una bacteria: *E. coli* O157:H7. La muerte por síndrome urémico hemolítico disminuyó gracias a la precocidad de los diagnósticos y a los nuevos métodos de control de la insuficiencia renal. Hoy, la tasa de letalidad es del 2 por ciento. Según datos del Comité Nacional de Nefrología, el 70 por ciento de los niños que padecen esta enfermedad se recuperan sin secuelas, sin embargo, es necesario controlarlos regularmente porque, en algunos casos, desarrollan problemas renales o hipertensión como consecuencia tardía del síndrome. La forma más frecuente es la llamada forma típica asociada a diarrea (D+), que aparece con mayor frecuencia en niños menores de 2 años y adopta un carácter epidémico. Esta forma, que predomina especialmente en Argentina, es casi siempre debida a una infección por una *E. coli* enterohemorrágica, aunque puede también estar causada por otros microorganismos enteroinvasivos (*Shigella dysenteriae* serotipo I, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Salmonella*). Existen unas formas atípicas no asociadas a diarrea (D-), menos frecuentes y entre las que cabe destacar la causada por *Streptococcus pneumoniae* y una forma hereditaria, que adopta un carácter familiar o recurrente. La forma más grave, denominada SHU atípico y presente también en adultos, se caracteriza por la recurrencia de la patología, que produce una elevada mortalidad y conduce a la mayoría de los supervivientes hacia insuficiencia renal crónica. En estos enfermos, el porcentaje de recidivas

postransplante es también muy elevado. Un 20-30% de los enfermos de SHU atípico presentan mutaciones en el gen de factor H. Las mutaciones identificadas en enfermos de SHU atípico alteran específicamente la capacidad de factor H para controlar la activación del Complemento sobre superficies celulares. En el Cuadro IV se muestran diferentes causas que producen SUH además de *E. coli*. (Sánchez, 2004).

El cuadro clínico causado por las cepas no-O157 se caracteriza por diarrea acuosa con dolor abdominal y colitis hemorrágica. Las cepas no-O157 son capaces de causar brotes o casos aislados de diarrea y en ocasiones no se logra establecer la fuente de contaminación, aunque se sabe que se pueden aislar de los mismos alimentos que las cepas de serotipo O157:H7 y también de carne de guajolote, ternera, pescado y mariscos (Rodríguez, 2002).

Aunque la mayoría de los brotes y casos esporádicos de colitis hemorrágica han sido provocado por el serotipo O157:H7, esto no quiere decir que la producción de verotoxinas se restrinja a este serotipo. La diferencia en la presentación depende de la virulencia de las cepas, edad, estado inmunológico, dosis del inóculo, estrés ambiental, así como infecciones asociadas (Pérez, 2002).

## 2. 6. Diagnóstico Diferencial

La CH se diferencia de la clásica disentería en que generalmente cursa en ausencia de fiebre y pueden producirse graves complicaciones y aproximadamente el 10% de los pacientes terminan desarrollando el SUH. Las lesiones identificadas en la CH producida en condiciones naturales en el humano y las observadas en los diferentes modelos animales desarrollados se encuentran inicial y predominantemente a nivel del intestino, con destrucción leve de enterocitos, infiltrado mononuclear y polimorfonuclear en la región y, a veces, con fusión de las vellosidades intestinales. Dichas lesiones pueden ser confundidas con las producidas por algunos agentes virales tales como gastroenteritis transmisible del cerdo (GET) o el rotavirus en diversas especies. Este último agente al ser muy frecuente como causa de la infección en animales domésticos y por producir lesiones semejantes, puede causar interferencia en el análisis de la patogenia (Pérez, 2002).

Cuadro IV: Causas que producen SUH diferentes a *E. coli*.

I. Síndrome hemolítico-urémico típico (D+)

*Escherichia coli* O157:H7

*Shigella dysenteriae* tipo 1

(Sánchez, 2004)

II. Síndrome hemolítico-urémico atípico (D-)

Postinfeccioso (*S. pneumoniae*, *Aeromonas hydrophila*)

Postvacunación. Postviral (EB, enterovirus, etc)

Asociado a glomerulonefritis:

Glomeruloesclerosis focal y segmentaria

Glomerulonefritis postestreptocócica

Glomerulopatía membranosa

Nefritis lúpica

Hereditario

Autosómico dominante

Autosómico recesivo

Asociado a hipocomplementemia C3

Inducido por fármacos: anticonceptivos, citostáticos

Tras irradiación

Post-trasplante renal o de médula ósea

Durante la gestación

Intoxicaciones: veneno de la serpiente Habu

Hipertensión maligna

Alteraciones hereditarias del metabolismo de la cobalamina

## 2. 7. Brotes reportados de *E. coli* ECEH

En 1982 fue reconocida por primera vez la infección por ECEH como patógeno humano responsable de dos brotes de diarrea sanguinolenta severa que afectaron a 47 personas en EU. Los brotes fueron asociados epidemiológicamente con hamburguesas contaminadas, consumidas en restaurantes pertenecientes a una cadena de comidas rápidas. A partir de entonces numerosos brotes han sido notificados en distintas partes del mundo. En 1993 se presentó un brote de diarreas en niños en EU. que habían consumido hamburguesas, varios de estos niños murieron, otros niños presentaron SUH, el laboratorio demostró la existencia de ECEH O157:H7 (Cortés, 2003).

En un estudio realizado en Colombia dedicado a determinar la prevalencia y tipo de agentes infecciosos causantes de la Enfermedad Diarreica Aguda en niños menores de 5 años se encontró a *E. coli* como tercer agente causal en menores de 1 año, y en general, en menores de 5 años. (Manrique y col. 2006). En otro realizado en Villa Clara en los niños menores a un año fue aislada *E. coli* enterohemorrágica en el 14,7% de los casos (Molina y col. 2004).

En nuestro país en el brote de diarrea asociado con el desbordamiento del canal de aguas negras en Chalco el 31 de mayo del 2000, el 76.6% de las diarreas fueron debidas a *E. coli*, de los cuales 0.08% fueron de *E. coli* enterohemorrágica O157:H7 (Cortés y col. 2002). En otro estudio realizado en el estado de Veracruz enfocado a determinar los serotipos de *E. coli* en niños veracruzanos con diarrea aguda se obtuvo que de los 533 cultivos obtuvieron 434 cepas: 55.4% de los serotipos con capacidad patógena correspondieron a *E. coli* enterotoxigénica y 3.4% a la variedad verotoxigénica (Betancourt y col. 1999).

En septiembre del 2006 ingresó *E. coli* O157:H7 a partir de vegetales contaminados de EU. a México (Harper, 2006). Aunque en México no se comprobó que la mercancía ingresada estuviera contaminada con la bacteria, en los EU. los vegetales provenientes de estos mismos lugares causaron signos de enfermedad por O157:H7 (Pérez, 2006).

En los datos de incidencia, las proporciones informadas en los países desarrollados son 5-8 casos/100,000 habitantes por año, con variaciones regionales. En los pacientes de países subdesarrollados estos reportes son escasos y no refleja la información real (Pacheco y col. 2002).

No fue encontrado en la bibliografía consultada información a cerca de cuadros infecciosos de ECEH

relacionados con las tortugas en México o el Mundo. A la fecha no ha sido reportado que las tortugas estén relacionadas con el SUH en los humanos.

La flora microbiana que poseen las tortugas a nivel tegumentario y gastrointestinal es muy diferente de las de especies endotermas, tienen microorganismos tales como *Salmonella* sp., que se considera como flora normal en su tracto gastrointestinal. La salmonelosis es la zoonosis más importante en estos animales; sin embargo, hay otros microorganismos como bacterias, virus y parásitos, asociados a otras zoonosis. Algunos son: *Aeromonas* sp., *Campylobacter (jejuni y fetus)*, *Klebsiella* sp., *Staphylococcus* sp., *Proteus* sp., *Clostridium* sp., *Bacteroides* sp., *Pasteurella* sp., *Mucor* sp., *Cryptosporidium* sp., alfavirus, flavivirus, arenavirus, herpesvirus, echovirus, togavirus, entre otros. Todos estos microorganismos han sido documentados en varios estudios, éstos hacen notar que las tortugas pueden afectar a enfermos inmunosuprimidos, como son, con quimioterapia, en tratamiento con esteroides, desnutridos principalmente cuando son niños menores de 10 años (De la Torre y col. 2004). Debido a que generalmente es la población más susceptible la que cuenta con tortugas como mascotas es importante tener información de esta especie en cuanto a ECEH para de esta forma descartar o afirmar una relación entre estos.

### 3. Justificación

- En el tema a investigar no existe información lo cual es una limitante importante para estudios más especializados en esta especie animal.
- La convivencia del hombre con esta especie de fauna silvestre ha aumentado drásticamente en los últimos años y el desconocimiento en general que tenemos hacia las tortugas desde su fisiología hasta su manejo ha propiciado que aumenten los casos de algunas enfermedades de tipo zoonótico debido a que tienen microorganismos en su microbiota normal potencialmente patógenos al humano como lo es *Salmonella* sp. y otros que actualmente se siguen descubriendo. Por lo tanto es importante la serotipificación de *E. coli* en las tortugas debido a que en los estudios donde se ha aislado de su microbiota no han investigado a que grupo pertenecen sus cepas.

### 4. Hipótesis

Las tortugas empleadas como mascotas están colonizadas por cepas de *E. coli* productoras de toxina Shiga (STEC).

### 5. Objetivo General

- Detectar a *Escherichia coli* productora de toxinas de Shiga (STEC) en tortugas mantenidas en cautiverio.

### 6. Objetivos Específicos



- 1.- Aislar e identificar *Escherichia coli* del tracto intestinal de tortugas mantenidas en cautiverio.
- 2.- Evaluar la producción de verotoxina en las cepas aisladas.
- 3.- Detectar la presencia de los genes *stx1*, *stx2* y *eae* en las cepas aisladas.
- 4.- Determinar el grupo serológico al que pertenecen las cepas productoras de toxina de Shiga

## 7. Material y Métodos

### 7. 1. Material.

- Material biológico:

- 48 tortugas mantenidas en cautiverio; 30 de la Marina del Puerto de Veracruz y 18 tortugas mantenidas como mascotas en diferentes hogares, 11 de ellas pertenecían a la zona metropolitana de la ciudad de México y el resto del Puerto de Veracruz, los géneros de estas fueron: 28 *Trachemys scripta elegans*, 17 *Trachemys scripta venusta* y 3 *Kinosternon* sp.

Cepas de referencia *E. coli*:

- Cepa EDL933, la cual es una cepa original silvestre aislada en Canadá donada al Instituto de Biotecnología (933 IBT) y a la Facultad de Medicina (933 MED).
- Cepa K12C600, la cual es una cepa de laboratorio proveniente de una bacteria apatógena perteneciente a la microbiota natural donde se eliminaron los tres genes que codifican la fermentación de la lactosa (no tiene *eae*).
- Cepas EDL933J y EDL933W, obtenidas a partir de la cepa silvestre 933 tras una lisogenización entrando a ciclo lítico para obtener los bacteriófagos que codifican tanto para *stx1* y *stx2*. Estos fagos se integraron al cromosoma de la cepa K12C600 propiciando así una bacteria productora de toxina para *stx1* 933J y *stx2* 933W, esta última es más patógena que *stx1* y se dice que es tan patógena como la original.
- Cepa EDL $\Delta$  Leer, obtenida a partir de la cepa 933 IBT la cual dentro de su genoma contiene la isla de patogenicidad de los cinco genes del *eae* los cuales pueden ser tanto estructurales (codifican proteínas) como de regulación (regulan expresión de los otros genes). El quinto gen de esta isla de patogenicidad es el gen Leer (líder) el cual fue eliminado de una cepa dando lugar a la cepa  $\Delta$  Leer, la cuál es positiva a los genes *eae* pero no expresa la proteína (EAE).

- Material para toma de muestras.

- Material para medios de cultivo EMB, Mc Conkey, TSA.

- Material Tinción de Gram, prueba Catalasa, prueba Oxidasa.

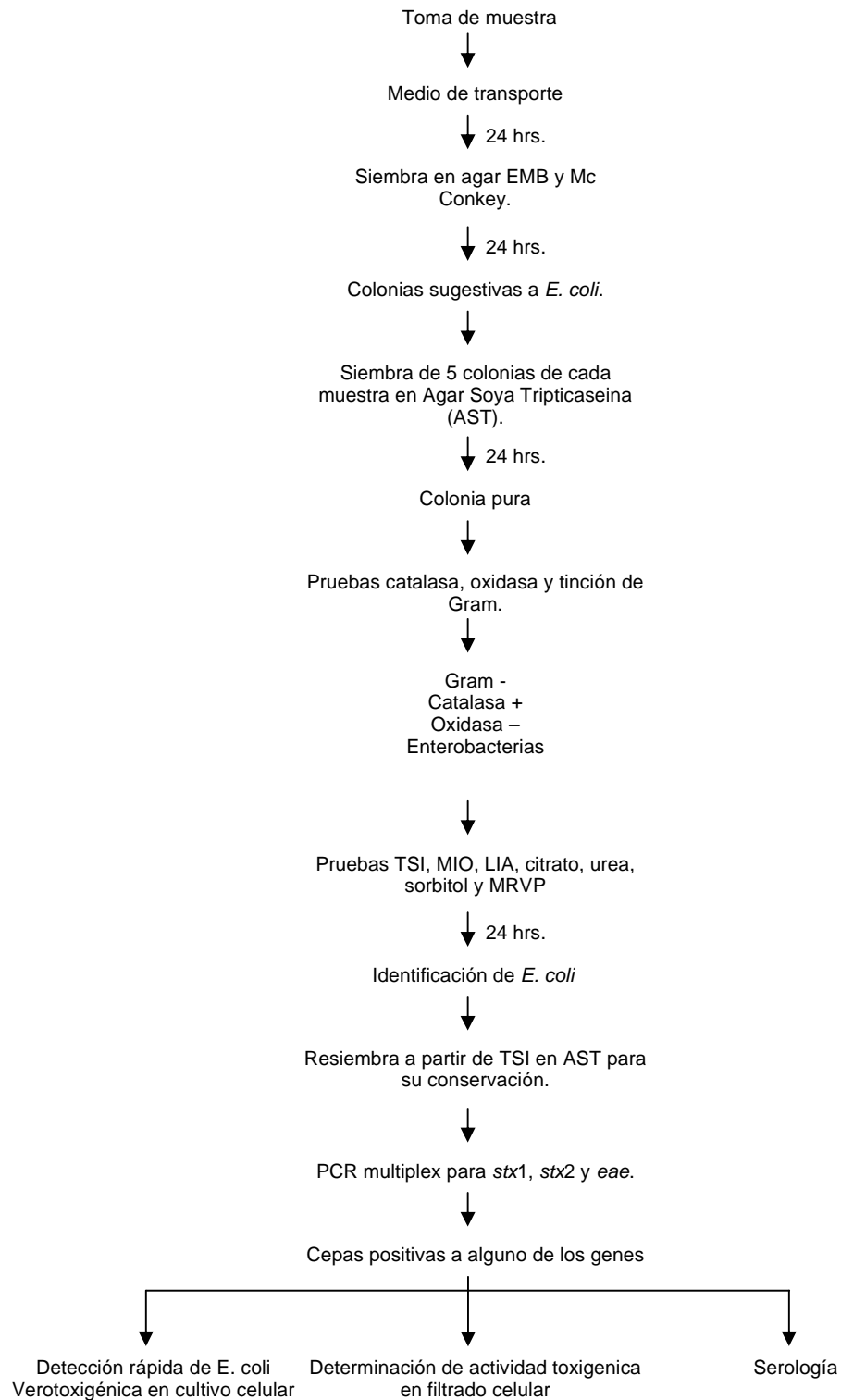
- Material para pruebas secundarias Citrato, Urea, MR-VP, TSI, SIM, LIA y MIO.

- Material para PCR, cultivo celular, filtrado celular y serología.

### 7. 2. Métodos

A continuación se muestra en el Cuadro V un resumen de la metodología que se siguió para llevar a cabo este trabajo.

Cuadro V: Resumen de metodología



### 7. 2. 1. Obtención y procesamiento de las muestras

Se realizó un muestreo de 48 tortugas mantenidas en cautiverio; 30 de la Marina y 18 mantenidas

como mascotas en diferentes hogares (11 de la zona metropolitana de la ciudad de México y el resto de el Puerto de Veracruz), de estas 28 eran *Trachemys scripta elegans*, 17 *Trachemys scripta venusta* y 3 *Kinosternon* sp., las cuales cuentan con las siguientes características:

- 30 tortugas de la Marina (1 a 30) del puerto de Veracruz frente de la Zona Naval 3.
- Las tortugas 31, 47 y 48 de la zona Metropolitana de la ciudad de México en un hogar particular.
- 5 tortugas (32 a 36) de la zona Metropolitana de la ciudad de México en un hogar particular.
- 3 tortugas (37 a 39) de la zona Metropolitana de la ciudad de México en un hogar particular.
- 7 tortugas (40 a 46) de el puerto de Veracruz dentro de un hogar particular.

A los animales se les tomó una muestra de heces a partir de la cloaca con hisopos estériles introduciéndolos en medios de transporte caldo Soya los cuales se llevaron a la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal (UIMSA) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan donde fueron sembradas 24 horas después, sin ningún tratamiento previo, sobre placas con agar EMB y Mc Conkey, fueron incubados a 37°C durante 24 h, posteriormente se revisó y evaluó el crecimiento (Valdivia, 1995).

De cada siembra en EMB se tomaron 5 colonias puras y sugestivas de *E. coli* las cuales son colonias medianas (de 1 a 3mm) de color verde metálico forma circular completa elevada (Ortega y col. 1997) como se muestra en la Imagen I; y se resembraron en agar Soya Trypticaseina donde se tomo una colonia pura y se le realizaron las pruebas: catalasa, oxidasa y tinción de Gram; como procedimiento de selección a enterobacterias. De las bacterias clasificadas como enterobacterias se le realizaron las siguientes pruebas bioquímicas para su identificación: TSI, MIO, LIA, citrato, urea, sorbitol y MRVP, con técnica ya conocida. Se interpretaron pruebas de acuerdo a la bibliografía (Berguey, 1984).

A los aislamientos de *E. coli* se les resembró en dos tubos de agar Soya como parte de un cepario para su conservación.

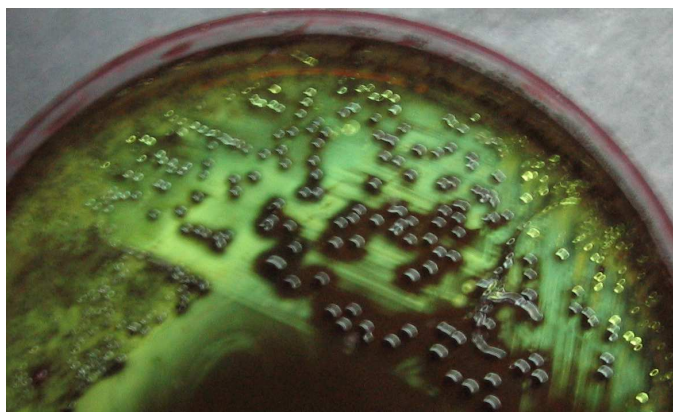


Imagen I: Colonias sugestivas de *E. coli*

### 7. 2. 2. PCR multiplex para *stx1*, *stx2* y *eae*

Se realizó la prueba de detección y caracterización de los factores de adherencia y esfacelamiento, EAE, de *E. coli* usando la prueba PCR Múltiplex para *stx1*, *stx2*, *eae*, que se describe brevemente a continuación:

La cepa se siembra por estría y se incuba durante 24h; a continuación se resuspenden cinco colonias de bacterias en 1ml de agua destilada estéril y se somete a ebullición por 15 minutos para desnaturalizar el ADN. De la suspensión se toma una alícuota para el tubo donde se realiza la PCR (Rodríguez, 2002). Terminado esto se enfriaron en el congelador por aproximadamente 10 minutos, después se tomaron los tubos y se colocaron en la microcentrífuga a 14,000 rpm por 2 min. Posteriormente se prepararon para la reacción en tubos ependorf de 0.5 de la siguiente manera: (Paton y col. 1997).

- Buffer al 10x 2.5 $\mu$ l
- MgCl<sub>2</sub> a concentración de 50mM con 1  $\mu$ l
- DNTP's mix 2  $\mu$ l
- Oligos a 50pM/  $\mu$ l con 3.5  $\mu$ l
- H<sub>2</sub>O para PCR 13.8  $\mu$ l
- Taq polimerasa 0.2  $\mu$ l
- 2  $\mu$ l de ADN de cada muestra

Estas se corrieron en el Termociclador con los ciclos como se muestran en el Cuadro VI! (Paton y col. 1997). En el Cuadro VII se muestran las secuencias de oligonucleotidos y sondas empleadas en el diagnóstico (Rodríguez, 2002).

Cuadro VI: Ciclos del Termociclador

Ciclos	1	2	3	4	5	6
Temperatura	94°	50°	72°	94°	560°	72°
Tiempo	5 min	2 min	0.45 min			10 min
Repeticiones	1	1	35			1

Paton y col. 1997

### 7. 2. 3. Corrimiento Electroforético

Al finalizar la amplificación se tomaron alícuotas y fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa con 0.6 de Agar y 30ml de agua TAE para observar la presencia del producto amplificado (Rodríguez, 2002). Se añadió 5  $\mu$ l en 200ml de agua TAE1x de Bromuro de Etidio, en cada uno de los pozos de el gel se puso 6.5  $\mu$ l de muestra con 1.5  $\mu$ l de buffer de corrimiento junto con los controles positivo y negativo así como el marcador de peso el cual fue de 4  $\mu$ l, de esta forma fue conectado a 89 mili Amper/volts y observado al término (Paton y col. 1997).

Cuadro VII: Secuencias de oligonucleotidos y sondas empleadas en el diagnóstico de *E. coli*.

GRUPO	FACTOR DE VIRULENCIA	SECUENCIAS DE OLIGONUCLEOTIDOS USADOS EN PCR	SECUENCIAS DE OLIGONUCLEOTIDOS USADOS COMO SONDAS
ECEI	STI	TTAATAGCACCCGGTACAAGCAGG CTTGACTCTTCAAAGAGAAAATTAC	GCTGTGAATTGTGTTGTAATCC GCTGTGAACTTTGTGTAATCC
	STall	TTGTCTTTTTCACCTTTCCC ACAAGCAGGATTACAACACA	
	LT	GGCGACAGATTATACCGTGC CCGAATTCTGTTATATATGTC	GCGAGAGGAACACAAACCGG
ECEH	eae	CAGGTCGTCGTGTCTGCTAAA TCAGCGTGGTTGGATCAACCT	ACTGAAAG AAGCGGTGGTG
	Stx1	TTTACGATAGACTTCTCGAC CACATATAAATTATTTGCTC	GATGATCTCAGTTGGGCGTTC
	Stx2	CCCAGTCACGACGTTGTA TATACTATCGTGCTTTCCA	TCTGAAACTGCTCCTGTGTA
ECEI	ial	CAGGGTAAAAGAAAGATGATAA GGAGGCCAACAATTATTTCC	CCATCTATTAGAATACCTGTG
ECEP	EAF	CAGGGTAAAAGAAAGATGATAA TATGGGGACCATGTATTATCA	TATGGGGACCATGTATTATCA
	BFP	AATGGTGCTTGCCTTGCTGC GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	GCTACGGTGTTAATATCTCTGGCG
ECEA	plásmido	CTGGCGAAAGACTGTATCAT CAATGTATAGAAATCGCTGTT	

Rodríguez, 2002. Donde LT toxina termolábil; ST toxina termo estable; BFP pili con forma rizada; STX toxina siga; ial fragmento asociado a invasividad presente en plnv y EAF factor de adherencia de EPEC.

#### 7. 2. 4. Análisis gráfico del Gel

El gel se rastreó mediante un rastreador para computadora y la imagen digitalizada fue analizada sobre el monitor de la computadora para la comparación de los patrones de corrimiento (Valdivia, 1995).

#### 7. 2. 5. Detección rápida de *Escherichia coli* Verotoxigénica en cultivo celular

Para la detección de cepas STEC se utilizaron células Vero cultivadas en Medio Mínimo Esencial

Dulbecco (DMEM), suplementado con suero fetal bovino al 10%, empleando microplacas de 12 pozos en los que se inoculó 1ml de cultivo celular. La incubación de la microplaca se realizó a 37°C en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> por 24 a 48 h hasta la formación de la monocapa celular. A continuación se removió el medio de crecimiento luego se cubrió la monocapa con 2ml de una solución compuesta por DMEM, suero fetal bovino al 10% y agar purificado a 1%. Este paso se realizó a una temperatura de 44-45°C. Una vez solidificada y enfriada la capa de agar a temperatura ambiente, se sembró en cada pozo una colonia de *E. coli* e incubó a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 72 h. Como control positivo se empleó la cepa de referencia EDL933 productoras de *stx* y, como negativo, se usó una cepa *E. coli* K12. Finalizando el período de incubación, se observaron con microscopio invertido para determinar la presencia de lesiones en las células Vero provocadas por las toxinas *stx* de acuerdo a las alteraciones que se caracterizan por un efecto citolítico, las células se redondean con notables y extensivos cambios destructivos de la monocapa que se acentúan progresivamente con el tiempo de incubación, produciendo la muerte celular, así las alteraciones por otras citotoxinas como la toxina termolábil (LT) se caracterizan por un efecto citotónico, las células están aumentadas de tamaño, engrosadas, refráctiles y se pueden observar prolongaciones filamentosas (Zamora y col. 2000).

#### **7. 2. 6. Determinación de actividad toxigenita en filtrados celulares.**

Para la realización del filtrado celular se utilizó un filtrado de las cepas que resultaron positivas a los procedimientos anteriores; esto se hizo cultivando una colonia de cada cepa en 5ml de caldo Soya Tripticaseina incubadas por 18h a 37°C. Como control positivo se empleó la cepa de referencia IBT. Estas se colocaron en la centrifuga a 5000rpm por 15 minutos a 6°C. El sobrenadante se pasó por un filtro de 0.2μ de poro de forma estéril y fue guardado para su uso y conservación a -20°C; a 0.5ml de este sobrenadante se le diluyó decimalmente en 4.5ml de un amortiguador de fosfato (PBS) obteniendo una dilución 10<sup>6</sup>. Se utilizaron células Vero cultivadas en Medio Mínimo Esencial Dulbecco (DMEM), suplementado con suero fetal bovino al 5%, empleando microplacas de 96 pocillos incubadas en atmósfera húmeda con inyección de CO<sub>2</sub> hasta obtener una confluencia de 80%. A continuación se removió el medio de crecimiento y se cubrió la monocapa con 100μl del filtrado, posteriormente se les colocó una gota de DMEM al 3%. Como control negativo, se usó PBS. Las microplacas fueron incubadas a 37°C con inyección de CO<sub>2</sub> al 5% por 96h realizando observaciones diarias al microscopio ante la posible aparición del efecto citotóxico. Fueron interpretadas de la siguiente manera: 10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup> bajas productoras de toxina; 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> medianas productoras de toxina; 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> altas productoras de toxina (Valdivia, 1995).

#### **7. 2. 7. Pruebas Serológicas: Técnica de aglutinación directa**



Se utilizaron sueros anti GRUPO ECEH, GRUPO STEC-ECEP y un antisuero contra el serotipo O157:H7 como se muestran en el Cuadro VIII. Se uso el sobrenadante conservado en la prueba de filtrado celular y a este se le diluyó el antígeno a una solución de  $10^{-1}$  y de ahí se realizaron diluciones simples hasta  $10^{-6}$ . Al final se dejo una muestra testigo, nada más con diluyente. Después a cada unidad se le agregó una cantidad de glóbulos rojos estandarizados y se incubo a  $37^{\circ}\text{C}$ , durante 45 minutos, posteriormente se le yó el título que alcanzó el antígeno. La dilución más alta que provoco una clara aglutinación se consideró como punto final de la reactividad y representó el título de la bacteria (Martínez y col. 1999).

Cuadro VIII: Sueros polivalentes utilizados en la técnica de aglutinación directa

STEC-ECEP	ECEH	
O26	O2	O157:H7
O103	O5	
O111	O26	
O145	O103	
O157	O111	
	O145	
	O157	

Los cuales fueron donados por el Dr. Alejandro Cravioto y el M en C Armando Navarro del Laboratorio de Serología de la Facultad de Medicina de la UNAM. STEC *E. coli* productora de toxina Shiga, ECEP *E. coli* enteropatógena, ECEH *E. coli* enterohemorrágica.

Todas las cepas de *E. coli* que resultaron positivas a alguno de los genes de las *stx* se probaron con los antisueros polivalentes y en caso de salir positivo al grupo ECEH, se les realizó la serología para el tipo O157:H7 (Valdivia, 1995).

## 8. Resultados

### 8. 1. Obtención y procesamiento de las muestras

Dentro de las condiciones de manejo que presentaron las tortugas muestreadas se puede mencionar lo siguiente:

- Tortugas 1 a 30 de la Marina del Puerto de Veracruz contaban con un estanque al aire libre ubicado alrededor de la estatua frente de la Zona Naval 3 donde eran atendidas por los marinos, la limpieza del estanque se realizaba cada semana la cual constaba de un cambio de agua y se alimentaban diariamente con comida para peces; la mayoría de ellas tenían problemas de osteodermatitis, sus edades eran variables y difíciles de calcular ya que todas ellas eran donaciones de la población y debido a esto algunas han tenido retrasos en su crecimiento. Fueron muestreadas 13 machos y 17 hembras
- Las tortugas 31, 47 y 48 ubicadas en la zona Metropolitana de la Ciudad de México contaban con una pecera equipada con filtros, alimentadas con peces.
- Las tortugas 32 a 36 fueron ubicadas en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México en una tina fuera de su hogar, una de ellas se encuentra en una pecera separada.
- Las tortugas 37 a 39 fueron ubicadas en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México en una pecera dentro del hogar equipada con filtros, calentadores y alimentadas con peces vivos y otros complementos alimenticios.
- Las tortugas 40 a 46 fueron ubicadas en el puerto de Veracruz, contaban con un pequeño estanque al aire libre ubicado en el patio de los dueños, su limpieza se realizaba una o dos veces a la semana la cual constaba de un cambio de agua y se alimentaban diariamente con comida para tortugas a granel; una de ellas tenía problemas de osteodermatitis. Fueron muestreados 3 machos, 2 hembras y 2 tortugas que no permitieron la revisión del sexo.

Dentro de la identificación de las tortugas de las 3 *Kinosternon* sp. 2 pertenecían a una misma especie y la otra a una especie diferente de *Kinosternon* sp., muchas de las especies de *Kinosternon* son muy parecidas entre ellas, y la coloración es muy variable en cada ejemplar lo cual dificulta mucho su identificación (Infotortuga, 2005).

Del crecimiento obtenido a partir de EMB se obtuvieron en 34 de las 48 muestras por lo menos 1 colonia pura color verde metálico en el medio de EMB.

### 8. 2. Pruebas Primarias

Como resultado a las identificaciones bacterianas en las pruebas primarias destacan las siguientes:

- 11 bacterias Gram positivas (+), catalasa negativas (-), oxidasa + se toman como posibles pertenecientes a los grupos bacterianos: *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*.
- 4 bacterias Gram +, catalasa +, oxidasa + se toman como posibles pertenecientes a los grupos bacterianos: *Propionibacterium*, *Bacillus*.
- 12 bacterias Gram +, catalasa -, oxidasa - se toman como posibles pertenecientes a los grupos bacterianos: *Aerococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Gemella*, Cocos anaeróbicos, *Erysipelothrix*, etc.
- 12 bacterias Gram +, catalasa +, oxidasa - se toman como posibles pertenecientes a los grupos bacterianos: *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Curtía*, *Corynebacterium*, *Listeria*, *Nocardia*, *Mycobacterium*.
- 4 bacterias Gram -, catalasa -, oxidasa + se toman como posibles pertenecientes a los grupos bacterianos: *Cardiobacterium*, *Eikenella*.
- 12 bacterias Gram -, catalasa -, oxidasa - se toman como posibles pertenecientes a los grupos bacterianos: *Bacteroides*, *Veillonella*, *Haemophilus*.
- 107 bacterias Gram -, catalasa +, oxidasa - se toman como pertenecientes al grupo de las enterobacterias.

Habiendo sido analizadas 217 cepas de las cuales 55 tuvieron que ser eliminadas debido a malas condiciones de manejo y preservación de las muestras quedando así 162 cepas de las cuales 107 pertenecieron al grupo de las enterobacterias.

### 8. 3. Pruebas Secundarias

El resultado de la identificación bacteriana con pruebas secundarias de 107 cepas pertenecientes al grupo de las enterobacterias fue de los grupos bacterianos *Bacteroides* sp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Proteus* sp. y *Salmonella* sp., lo cual fue basado en los siguientes resultados que se muestran en el Cuadro IX: (Berguey, 1984).

Cuadro IX: Patrones de identificación bacteriana

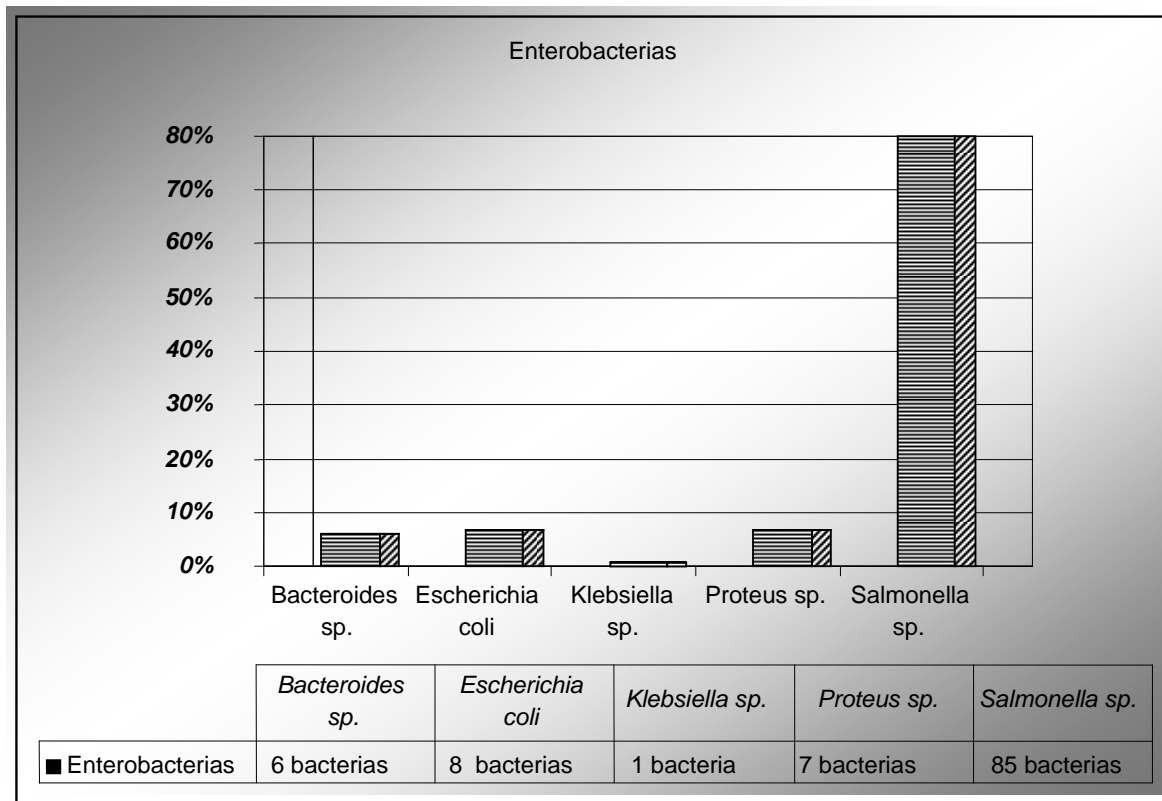
Género Bacteriano	TSI					MIO			LIA			CIT	URE	SOR	MR	VP
	Glu	Lac	Sac	Gas	H <sub>2</sub> S	RM	DO	I	DL	H <sub>2</sub> S	Gas					
<i>Klebsiella</i> sp.	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
<i>Proteus</i> sp.	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-
<i>Salmonella</i> sp.	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
<i>Bacteroides</i> sp.	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-

<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
-------------------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Berguey, 1984. Glu glucosa, Lac lactosa, Sac sacarosa, Gas producción de gas, H<sub>2</sub>S producción de ácido sulfhídrico, RM motilidad, DO descarboxilación de la Ornitina, I indol, DL descarboxilación de la lisina, CIT citrato, URE urea y SOR sorbitol.

El número de bacterias pertenecientes a cada género se muestra en la Gráfica I.

Gráfica I: Identificación de enterobacterias



Se obtuvieron 8 bacterias de *E. coli* de 6 diferentes individuos cuya tabla de identificación se encuentra en el Cuadro X.

Cuadro X: Identificación de *E. coli*.

ORIGEN	Gram	Catalasa	Oxidasa	TSI					MIO			LIA			CIT	URE	SOR	MR	VP
				Glu	Lac	Sac	Gas	H <sub>2</sub> S	RM	DO	I	DL	H <sub>2</sub> S	Gas					
LASH 36-1	B G-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
LASH 40-1	B G-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
LASH 41-3	B G-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-
LASH 42-3	B G-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
LASH 42-Sa	B G-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-
LASH 43-1	B G-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
LASH 43-3	B G-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-

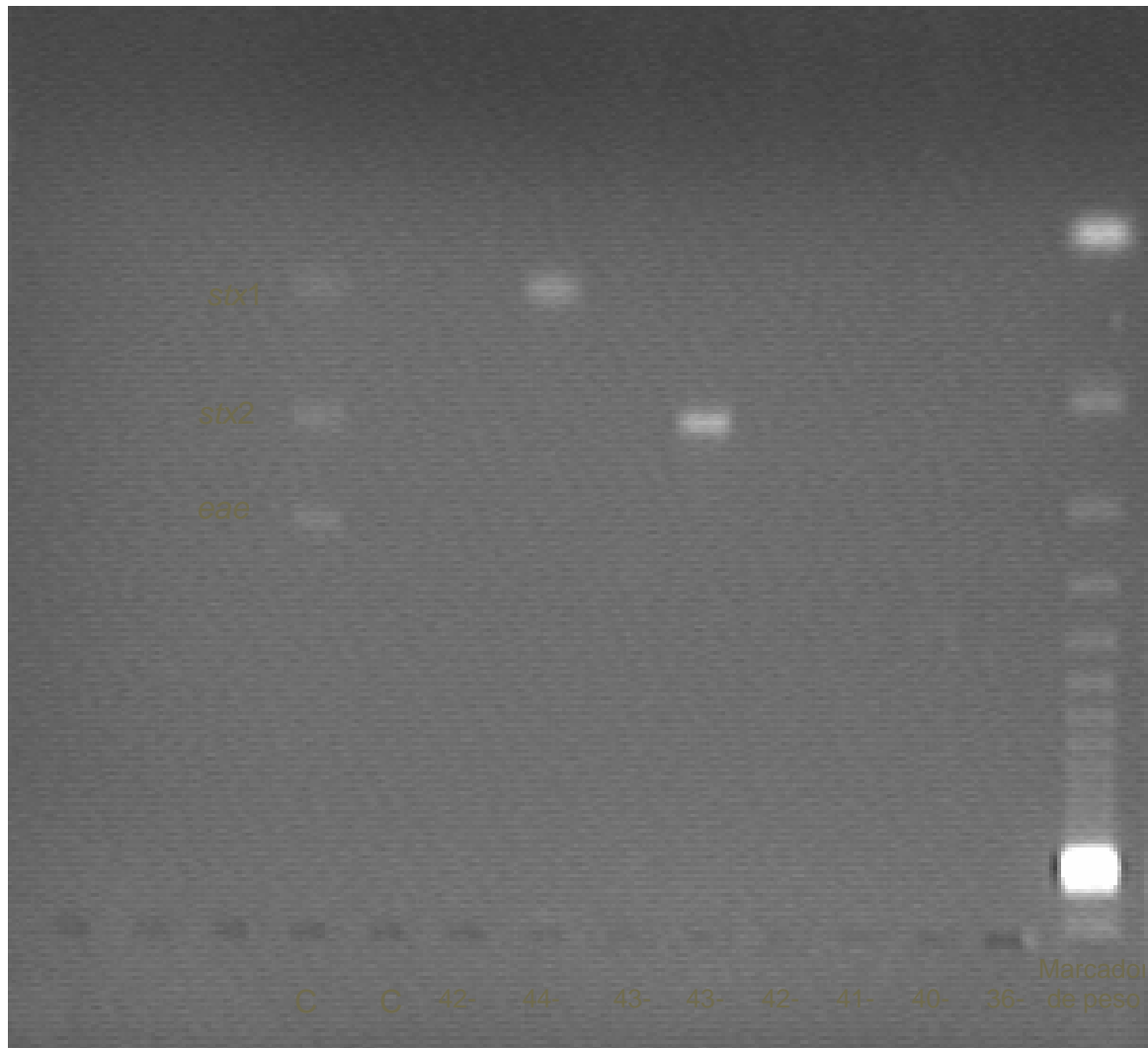
LASH 44-1	B G-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-
-----------	------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

B G- bacterias Gram negativas, Glu glucosa, Lac lactosa, Sac sacarosa, H<sub>2</sub>S producción de ácido sulfhídrico, RM es motilidad, DO descarboxilación de la ornitina, I indol, DL descarboxilación de la lisina, CIT citrato, URE urea y SOR sorbitol.

#### 8. 4. PCR multiplex para *stx1*, *stx2* y *eae*

Los resultados del PCR multiplex para *stx1*, *stx2* y *eae* realizado a las 8 bacterias de *E. coli* se muestra en la Imagen I donde se pueden observar dos bacterias positivas a alguno de los genes cuya identificación es 44-1 (siendo el número de la tortuga y de la colonia) positiva al gen *stx1* y 43-1 positiva al gen *stx2*.

Imagen II: Gel de PCR



C+ control positivo, C- control negativo.

#### 8. 5. Detección rápida de *Escherichia coli* Verotoxigénica en cultivo celular

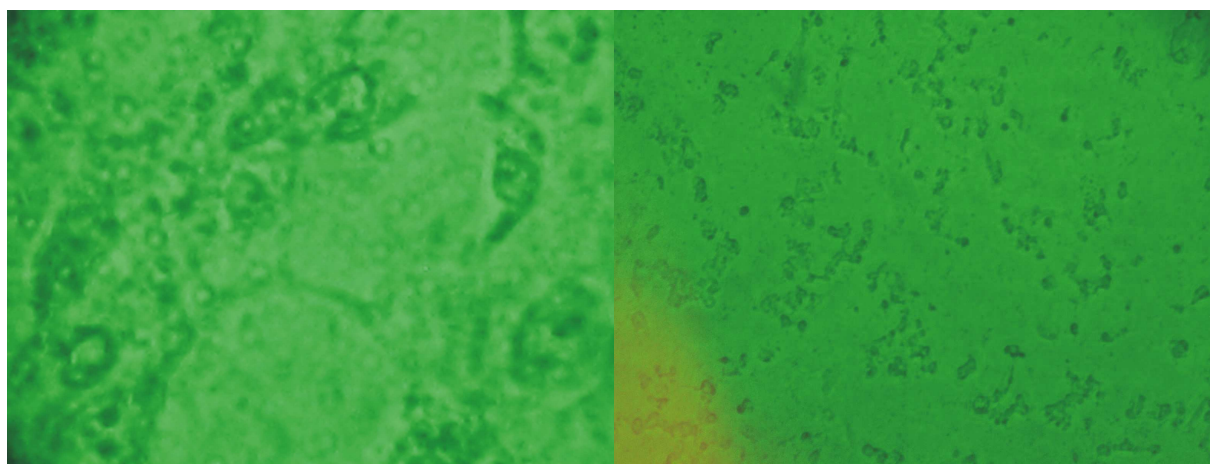
Como resultado de la acción de las bacterias en las células VERO se obtuvieron cuatro bacterias con efecto citolítico y cuatro con efecto citotónico como se muestra en el Cuadro XI:

Cuadro XI: Efecto de las bacterias en células VERO

Identificación	Efecto en células VERO
36-1	Citotónico
40-1	<b>Citolítico</b>
41-3	<b>Citolítico</b>
42-3	<b>Citolítico</b>
42-Sa	Citotóxico
43-1	<b>Citolítico</b>
43-3	Citotónico
44-1	Citotónico

Estas fueron analizadas de acuerdo al siguiente parámetro como se muestra en la Imagen III:

Imagen III: Fotografías del efecto en células Vero



Mostrando a la izquierda un efecto citotónico y a la derecha un efecto citolítico

## 8. 6. Determinación de actividad toxigenita en filtrados celulares.

Como resultado a la lectura de las diluciones de los filtrados se obtuvo una baja productora de toxina con titulación de  $10^2$  la cepa 43-1 y una mediana productora de toxina con  $10^3$  la cepa 42-3.

## 8. 7. Pruebas Serológicas: Técnica de aglutinación directa

Se obtuvo de resultado de la técnica de aglutinación directa la identificación de la cepa 44-1 como positiva al grupo ECEH y negativa al serotipo O157:H7.

En el Cuadro XII se muestran los resultados de las pruebas de PCR , Cultivo Celular en células VERO, Filtrado Celular y Serología realizadas a las ocho cepas de *E. coli*.

Cuadro XII: Resultados PCR, Cultivo celular, Filtrado celular y Serología.

<b>Identificación</b>	<b>Genes*</b>	<b>Células VERO</b>	<b>Filtrado celular</b>	<b>Serología</b>
36-1	Negativo	CT	Negativo	Negativo
40-1	Negativo	<b>CL</b>	Negativo	Negativo
41-3	Negativo	<b>CL</b>	Negativo	Negativo
42-3	Negativo	<b>CL</b>	<b>10<sup>3</sup></b>	Negativo
42-Sa	Negativo	CT	Negativo	Negativo
43-1	<b>stx2</b>	<b>CL</b>	<b>10<sup>2</sup></b>	Negativo
43-3	Negativo	CT	Negativo	Negativo
44-1	<b>stx1</b>	CT	Negativo	<b>ECEH Positivo, O157:H7 Negativo</b>

Donde CT es efecto Citotónico; CL es efecto Citolítico. \* Probados a partir de PCR.

## 9. Discusión

### 9. 1. Obtención y procesamiento de las muestras

En forma general las tortugas utilizadas en este trabajo no han recibido una alimentación adecuada y los cuidados de manejo varían de un sitio a otro sin poder encontrar en alguno el ideal en el cuidado de estos animales; la mayoría de ellas tenían problemas de osteodermatitis, queratoconjuntivitis y retrasos en su crecimiento lo cual se ha atribuido a una dieta desbalanceada ya que ha sido reportado que en los reptiles una de las principales causas de enfermedad por frecuencia e importancia es la alimentación incorrecta o desequilibrada del espécimen (Puga, 2003).

### 9. 2. Colonias sugestivas a otros géneros bacterianos

Como resultado a las identificaciones bacterianas en las pruebas primarias se obtuvieron colonias sugestivas a los siguientes géneros bacterianos: *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Propionibacterium*, *Bacillus*, *Aerococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Gemella*, Cocos anaeróbicos, *Erysipelothrix*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Curtia*, *Corynebacterium*, *Listeria*, *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Cardiobacterium*, *Eikenella*, *Bacteroides*, *Veillonella* y *Haemophilus*. Coincidiendo en su mayoría con los reportados por la bibliografía (Perea, 2001) los cuales son: *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Salmonella*, *Micrococcus*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Acinetobacter*, *Actinobacillus*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwina*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Tricomonas*, Ciliados como *Balantidium*, Sacáridos, *Protractis*, oxiuros y trematodos. Requiriendo de investigaciones posteriores para conocer el género y especie de las bacterias pertenecientes a la microbiota de las tortugas utilizadas en nuestro trabajo, ya que este no era uno de los objetivos del mismo.

### 9. 3. Aislamiento de Enterobacterias

En nuestro trabajo solo 8 de las 107 colonias color verde metálico probadas bioquímicamente correspondieron a *E. coli*, dentro de las demás organismos encontrados tenemos: *Bacteroides* sp., *Klebsiella* sp., *Proteus* sp. y *Salmonella* sp. Los cuales coinciden con la bibliografía (Perea, 2001) al reportar los mismos géneros bacterianos.

#### 9. 3. 1. *E. coli*



Se obtuvieron 8 bacterias de *E. coli* de 6 diferentes tortugas las cuales en su mayoría, salvo una tortuga, compartían un estanque en el puerto de Veracruz ubicado en el patio de un hogar particular como mascotas. La otra tortuga permanecía sola en una pecera en un hogar particular en la zona Metropolitana de la Ciudad de México. En la bibliografía (Puga, 2003) nos menciona que dentro de las tortugas que mantienen convivencia constante es posible aislar los mismos microorganismos dentro de su microbiota, tal como es el caso de estas tortugas. Sin embargo, solo de dos tortugas de este estanque no se aisló *E. coli* ambas eran del mismo género y especie de *Kinosternon* sp., estos datos no fueron encontrados en la bibliografía consultada por lo que no se pueden realizar comparaciones en la especie, sin embargo es importante tomar en cuenta que de otra tortuga del género *Kinosternon* sp. en este estanque con diferente especie si fue posible aislar la bacteria. Por lo tanto sería interesante realizar en investigaciones posteriores un mayor número de aislamientos en tortugas *Kinosternon* sp., en la Imagen IV se muestran las tortugas de donde no fue posible aislar la bacteria.

Imagen IV: Tortugas *Kinosternon* sp. sin aislamiento de *E. coli*



Las ocho cepas de *Escherichia coli* resultaron sorbitol positivo, sin embargo, ya ha sido reportado que hay cuadros de SUH producidos por cepas no-O157:H7 que son sorbitol positivo (Rodríguez, 2002).

Habiendo sido muestreadas 48 tortugas solo de 8 fue posible aislar la bacteria las cuales representan el 17%, para poder encontrar algunas posibles causas de que a partir del colon de estos animales si pudiéramos aislar la bacteria sería necesario realizar una serie de estudios tanto a las tortugas donde fue posible aislar la bacteria como de las que no, situación que a la fecha no ha sido reportada debido a que la frecuencia de *E. coli* en las tortugas ha sido baja por lo que ha sido reportada de forma aislada por no ser considerada un caso grave de salud pública (Fowler y col. 2001).

### 9. 3. 2. *Salmonella* sp.

*Salmonella* sp. fue aislada del 80% de las tortugas muestreadas al haber sido obtenida en 34 de los 48 individuos siendo, de esta forma, la bacteria de mayor frecuencia dentro de este trabajo. Esta situación ha sido ya ampliamente estudiada desde hace varios años y se ha visto que una alta proporción de los reptiles son portadores asintomáticos de *Salmonella* sp. en las heces el número asciende al 90% (CDC, 1995).

#### **9. 4. PCR multiplex para *stx1*, *stx2* y *eae*.**

Los resultados del PCR multiplex para *stx1*, *stx2* y *eae* realizado a las 8 bacterias de *E. coli* fueron dos bacterias positivas a alguno de los genes, la 44-1 positiva al gen *stx1* y 43-1 positiva al gen *stx2*. Ninguna de estas dio positivo al gen *eae*, por lo tanto, no pueden producir un cuadro clínico debido a que es necesario que se presente tanto la citotoxina *stx* como el gen *eae*. Sin embargo, a pesar de que la mayoría de las cepas de *E. coli* ECEH tienen ambos genes existen algunas cepas STEC *eae*-negativas tal como las cepas O91:H21 y O113:H21, las cuales causan colitis hemorrágica y SUH en humanos (Loukiadis, 2006).

#### **9. 5. Detección rápida de *Escherichia coli* Verotoxigénica en cultivo celular**

Como resultado de la acción de las bacterias en las células Vero se obtuvieron cuatro bacterias con efecto citolítico y cuatro con efecto citotónico. La verotoxina, como se ha mencionado, es el factor principal de virulencia de *E. coli* verotoxigénica produciendo un efecto citolítico en células Vero (Ramírez y col. 1999).

En los los cultivos donde se observó un efecto citotónico (como el descrito para la enterotoxina LT) con algunas células con malformaciones, pudiera ser debido al factor FCN previamente descrito, o a la producción de LT (Valdivia, 1995). También pudiera ser al debido al mencionado factor llamado “cytolethal distending toxin” (McSweeney, 2005).

Se obtuvieron dos bacterias con efecto citolítico que no presentaron genes *stx* o *eae* ni concentración en filtrado celular, esto puede ser debido al FCN, el cual causa necrosis en la piel del conejo y células multinucleadas, con redondeamiento, en cultivos de tejidos de células HeLa, CHO o Vero (Pérez, 2002).

#### **9. 6. Determinación de actividad toxigenita en filtrados celulares.**

A la lectura de las diluciones de los filtrados se obtuvo una cepa baja productora de toxina con titulación de  $10^2$  y una mediana productora de toxina con  $10^3$ .

De la cepa mediana productora de toxina no se encontraron los genes de virulencia *stx*, pero en la prueba de cultivo celular esta presento un efecto citolítico; en este caso se debe tomar en cuenta que los primers usados en la prueba de PCR fueron aislados a partir de cepas de humanos, los cuales no abarcan

todas las variantes de la toxina *stx* encontradas en los animales, por lo tanto, es posible que esta cepa pertenezca a otra variante de toxina *stx* que no ha sido probada en este trabajo, para esto, es necesario realizar estudios posteriores donde se prueben diferentes primers en la prueba de PCR.

En la cepa que fue baja productora de toxina se le encontró el gen *stx1* y fue positiva al grupo ECEH en pruebas serológicas.

## 9. 7. Pruebas Serológicas

La cepa 44-1 fue positiva al grupo ECEH y negativa al serotipo O157:H7. El serotipo O157: H7 es el enteropatógeno más aislado a escala mundial (Fernández y col. 2003), sin embargo existen muchos otros serotipos de las ECEH productoras de enfermedad como se muestra en el Cuadro III, por lo tanto, esta cepa puede pertenecer a cualquiera de estos otros grupos, debido a que en nuestro trabajo solo se probaron hacia los serotipos mostrados en el Cuadro VIII, haciendo necesario una nueva investigación donde se determine el serotipo de esta cepa y de esta forma conocer su capacidad patógena. Esto es importante debido a que esta tortuga se localizaba en un hogar particular en el puerto de Veracruz y en dicho lugar vive una familia compuesta por cuatro miembros: un matrimonio entre los 22 y 27 años de edad y dos menores de edad, un niño de 3 años y una bebe de 6 meses.

## 10. Conclusiones

Por medio de métodos de diagnóstico estandarizados para *Escherichia coli* se comprobó la hipótesis, la cual menciona que las tortugas empleadas como mascotas están colonizadas por cepas de *E. coli* productoras de toxina Shiga (STEC).

Las demás bacterias aisladas en este trabajo coincidieron con resultados de publicaciones anteriores como son *Bacteroides* sp., *Klebsiella* sp., *Proteus* sp. y *Salmonella* sp.,

Es necesario realizar un mayor número de aislamientos en la especie *Kinosternon* sp. para poder investigar la razón por la que no fue posible aislar *E. coli* de ellas a pesar de la convivencia que mantenían con tortugas de donde se aisló *E. coli* STEC.

Solo una cepa fue positiva al grupo ECEH pero negativa al tipo O157:H7, esta presentó la toxina *stx1*.

Se necesitan investigaciones posteriores para poder conocer el serotipo al que pertenece esta cepa y de esta forma determinar su capacidad patógena en los humanos.

Los hallazgos pertenecientes a la bacteria *Salmonella* sp. ratifican los múltiples estudios que ya se han realizado en esta especie a lo largo de los años, haciendo evidente su posible importancia como problema de salud pública.

Este trabajo siendo pionero en su tema abre el campo a numerosas investigaciones como puede ser el estudio de las cepas STEC de las tortugas en un modelo animal, etc.

## 11. Bibliografía

1. **Betancourt. S. M., Pérez. M. B.** 1999. Estudio de serotipos de *Escherichia coli* en niños veracruzanos con diarrea aguda. Acta Pediátrica de México Col. 23. Núm. 2.
2. **Berguey. D.** 1984. Manual of sistematic Bacteriology. Edit. Board. Vol 1.
3. **Birchard. S. J., Sherding. R. G.** 2002. Manual clínico de procedimientos en pequeñas especies Vol. II. 2ª edición. Mc Graw-Hill. Madrid.
4. **CDC.** 1984. Pet turtle associated Salmonellosis. Puerto Rico. [www.cdc.gov/ncidod/eid/index/htm](http://www.cdc.gov/ncidod/eid/index/htm).
5. **CDC.** 1995. Reptile associated Salmonellosis. Selected States. 1994-1995. [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov).
6. **CDC.** 2002. Reptile associated Salmonellosis. Selected States 1998-2002. [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov).
7. **CDC.** 2005. Is a turtle the right pet for your family?. [www.cdc.gov/healthypets](http://www.cdc.gov/healthypets).
8. **Conover. M.** 2002. Resolving Human-Wildlife conflicts. The science of Wild Life Damage Management, Lewis Publishers. U.S.A.
9. **Cortés . F. de A. N.** 2003. Identificación de linfocitos afectados durante la infección experimental en el conejo por *Escherichia coli* Enterohemorrágica. Tesis de Licenciatura. UNAM. FESC. México.
10. **Cortés. O. I. A., Rodríguez. A. G., Moreno. E. E. A., Tenorio. L. J. M., Torres. M. B. P., y Montiel. V. E.** 2002. Brote causado por *Escherichia coli* en Chalco, México. Salud pública de México. Vol. 44. N° 4.
11. **Cowan. S. T.** 1981. Manual for the identification of medical bacteria. Second edition. Cambridge University Press. USA.
12. **De la Torre. F. A., Minor. B. H., Castañeda. N. J. L., Quiñónez. G. R. M., Gómez. G. M., y Clement. M. O.** 2004. Cuatro casos de meningitis aséptica ¿Asociada a tortugas de orejas rojas, usadas como mascota?. Rev. Mexicana de Pediatría. Vol. 71. Núm. 3.
13. **Dueso. A.** 1993. Las Tortugas. Editorial De Vecchi. Barcelona.
14. **Wikipedia.** 2007. Enciclopedia gratuita en español. [http://en.wikipedia.org/wiki/AB5\\_toxin](http://en.wikipedia.org/wiki/AB5_toxin).
15. **Fernández. F. R., Rodríguez. P. C., Rodríguez. R. I., y Gómez. M. F.** 2003. *Escherichia coli* como causa de diarrea infantil. Rev. Cubana Pediátrica.
16. **Fowler. M. E., Cubas. S. Z.** 2001. Biology, medicine, and surgery of South American wild animals. First edition. Iowa state university pres/ames.
15. **Fowler. M.** 1986. Zoo and wild Animal Medicine. W.B. Saunders Company. Second edition. Colorado..
16. **Frye. I. L.** 1991. Reptile care and Atlas of diseases And trearments. Volume I. TFH Publications. United States of America.
17. **Garza. V. R., Peniche. Q. E., y Manero. B. S. M.** 1998. Bacterias patógenas de moda. <http://depa.pquim.unam.mx/bacteriologia/pdfs/ART%20CDC-bacteriasdemoda.pdf>.
18. **Giles. R. H. JR., Toschik. L.** 1971. Wildlife Management Techniques. The wildlife society. Third edition. Washington, D. C.
19. **Giljahn. L. K.** 1986. Turtle-Associated Salmonellosis. Ohio Dept of Health. Center for Infectious

Diseases.

20. **Guzmán. M., Saravia. J., Hernández C. A., y Prada. G.** 2003. *S. typhi*. Medicina Interna. Exlibris Editores S.A.
21. **Grupo Tortuga.** 2000. <http://www.grupotortuga.com.mar/tta/dieta.htm>
22. **HHMI.** 2000. Cómo la bacteria *E. coli* lleva a las células intestinales al borde de la muerte. [www.hhmi.org/news/pdf/finlay2-esp.pdf](http://www.hhmi.org/news/pdf/finlay2-esp.pdf).
23. **Herper. M.** 2006. Don't eat your spinach. Department of Health and Human Services. Centers for Disease control and prevention. Section: Out front.
24. **Infotortuga.** 2005. <http://www.infotortuga.com>.
25. **Jong. B., Andersson., y Ekdahl. K.** 2005. Effect of Regulation and Education on Reptile-associated Salmonellosis. Emerging Infectious Diseases. Vol. 11. N°3.
26. **Loukiadis. E., Kerourédan. M., Beutin. L., Oswald. E., y Bruñere. H.** 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. May, 2006, p. 3245-3251, Vol. 72. N°5.
27. **Manrique. G. F., Billón. D., Bello. E. S., Ospina. J. M.** 2006. Agentes causantes de Diarrea en Niños Menores de 5 años en Tunja, Colombia. Rev. Salud Pública.
28. **Manual Merck. 2007.**  
[http://www.msd.com.mx/publicaciones/mmerck\\_hogar/seccion\\_09/seccion\\_09\\_106.html?qp=&qt=SUH](http://www.msd.com.mx/publicaciones/mmerck_hogar/seccion_09/seccion_09_106.html?qp=&qt=SUH).
29. **Martín. F. A., Pistone. C.V., Zotta. E., Ibarra. C.** 2007. Acción citotóxica de la subunidad B de la toxina Shiga de *Escherichia coli* enterohemorrágica en colon de rata. [ibarra@fmed.uba.ar](mailto:ibarra@fmed.uba.ar).
30. **Martínez. R. H. A., Aida. J. A.** 1999. Manual de prácticas de laboratorio de virología veterinaria. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan. UNAM. México.
31. **McSweeney., Dreyfus.** 2005. Carbohydrate-binding specificity of *Escherichia coli* cytolethal distending toxin CdtA-II and CdtC-II subunits. Infect Immun. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
32. **Molina. D. M., Fuentes. A. A. S., Moya M. A., González. S. J., González. L. R. D., Reyes. B. T.** 2004. Estudio clínico epidemiológico de la enfermedad diarreica aguda disentérica en el niño. Medicentro.
33. **Mullineaux. E., Dick. B., Cooper. E. J.** 2003. Manual of Wildlife Casualties. British Small Animal Veterinary Association. England.
34. **Ortega. L. L., García. V. S. E. Cruz. S. T. A.** 1997. Manual de Practicas de Microbiología Veterinaria. UNAM. FESC. México
35. **Pacheco. F.A., Olivera. C. J., Silva. M. C. A y Ugarte. A. M.** 2002. The dangers of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: an emergent pathogen. Rev. Biomed. Vol. 13. N°2.
36. **Paton. A. W., Paton. J. C.** 1997. Detection and Chareacterization of Siga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E. Coli hlyA*, *rfb*<sub>O111</sub>, y *rfb*<sub>O157</sub>. Molecular Microbiology Unit Women's and Children's Hospital North Adelaide. Australia.
37. **Perea. M. L. M., Inzunza. M. A. E., Dávila. M. R., Navarro. A.,y Cravioto. A.** 2006. Caracterización

molecular de cepas de *Escherichia coli* O26:H11 y H- aisladas de fuentes clínicas y animales.

38. **Pérez. O. M. I.** 2002. Efecto sobre la respuesta inmune provocado por *Escherichia coli* (O157:H7) verocitotóxica inoculada en el apéndice cecal del conejo. Tesis de Licenciatura. UNAM FESC. México
39. **Pérez. S.** 2006. Ingresaron a México espinacas con *Escherichia coli* por “buena fe”. Notimex.
40. **Puente. G. J. L.** 2001. Ciencias naturales. [http://www.amc.unam.mx/curricula\\_premios/JoseLuisPuenteGarcia.htm](http://www.amc.unam.mx/curricula_premios/JoseLuisPuenteGarcia.htm).
41. **Puga. F. M.** 2003. Manual Clínico de reptiles; según las enfermedades más comunes presentadas en el laboratorio de herpetología de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Tesis de Licenciatura. UNAM FESC. México
42. **Ramírez. M., Morier. L., Alonso. J., Bravo. L., Cabrera. R., y Fernández. A.** 1999. Determinación de verotoxinas en cepas de *Escherichia coli* O157:H7. Rev. Cubana Med. Trop. 51(3).
43. **Robles. F. M.** 2003. Departamento de Bioquímica. [http://www.facmed.unam.mx/ci/informes/2k5/pdfs/bioquimica/Martha\\_Robles.pdf](http://www.facmed.unam.mx/ci/informes/2k5/pdfs/bioquimica/Martha_Robles.pdf).
44. **Rodríguez. A. G.** 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud pública de México. Vol. 44. N<sup>o</sup>5.
45. **Rusell. D., y Sambrook. J.** 2006. Molecular cloning a laboratory manual. CSHL PRESS. 3a edition. Volume I, II, III.
46. **Sánchez. P., Abarrategui. C. Esparza. J., Rodríguez. S., y López. M.** 2004. Síndrome Urémico Hemolítico. Revista Inmunología. Ergon Creación S. A.
47. **Starker. A. L.** 1990. Fauna Silvestre de México Aves y Mamíferos de Caza. Ed. Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables. México D. F.
48. **Storer. T. I., Usinger. L. R., Stebbins. R. C., Nybakken. J. W.** 1986. Zoología General. Ediciones Omega. Barcelona.
49. **Stutzenbaker. C. D., Scheil. B. J., Swan. M. K., Lee. J. L.** 1999. Wildlife Management Science and Technology. IST Agri Science and Technology Series, Interestate Publishers. Danville, Illinois.
50. **Valdivia. A. G.** 1995. Desarrollo de un modelo animal en el conejo para el estudio de Verotoxinas (VT) de *Escherichia coli*. Tesis de Maestría. UNAM FESC. México.
51. **Valdivia. A. G.** 2002. Evaluación de las alteraciones inducidas en el conejo por *Escherichia coli* O157:H7 inoculada en el apéndice cecal. Tesis de Doctorado. UNAM. FESC. México.
52. **Valdivia A. G., Cervantes R. R., Soriano. B. D., Alba. H. F., Montaraz. C. J. A., y Tórtora. P. J. L.** 2000. Interacción de cepas verocitotóxicas de *Escherichia coli* y rotavirus en un brote de diarrea en becerros. Rev. Veterinaria México 31 (4).
53. **Varela. G., Aguirre. A, y Carrillo. J.** 1998. *Escherichia coli*-Gómez, nueva especie aislada de un caso mortal de diarrea. Boletín Medico del Hospital Infantil de México. Vol. 54 Issue 2.
54. **Zamora. J., Reinhardt. G., Polette. M., Macías. P.** 2000. Detección rápida en el diagnóstico de *Escherichia coli* toxigénica productora de LT y VT. Instituto de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile. Chile.
55. **Zamora. J., Reinhardt. G., Polette. M., y Orellana. M.** 2000. *Escherichia coli* aislada de fecas de

cerditos diarreicos, patrones de adherencia a células Hep-2. Instituto de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile. Chile.



## 12. Índice semántico

Adherencia y esfaceamiento (A/E): Lesión histopatológica producida en las microvellosidades de los enterocitos en los humanos.

Anaerobio facultativo: Microorganismos que pueden vivir con o sin la presencia de oxígeno.

Bacteriófago: Virus que se reproduce en células procariontes.

Células Hep-2: Son células epiteliales provenientes de un cáncer humano, útiles para recuperar el virus respiratorio sincitial, adenovirus y herpes simple.

EaST1: Toxina termoestable 1, su mecanismo de acción es similar al de ST de ECET y los genes implicados residen en un plásmido.

Endocitosis: Proceso [celular](#) que consiste en la [invaginación](#) de la [membrana citoplasmática](#), formando una vesícula cuyo contenido, que puede ser muy diverso, es así transportado del exterior de la célula al interior.

Enterotoxinas: Exotoxinas que actúan sobre el intestino delgado, generalmente produciendo una secreción masiva de líquido hacia el interior del intestino delgado, lo que produce los síntomas de la diarrea.

Factor H: Regula la activación de la vía alternativa del Complemento en el plasma y sobre superficies celulares.

Fenotipo: Manifestación visible del genotipo.

Fimbrias: Estructura filamentosa que permite las primeras interacciones de la bacteria con la célula huésped.

Hemólisis: Destrucción de los glóbulos rojos, lo cual, lleva a una anemia.

Intimina: Proteína, llamada adhesina, que se ancla en la membrana externa de la bacteria.

Plásmido: Pequeñas moléculas de ADN extracromosómico que aparecen en el citoplasma de las bacterias y que determinan ciertos rasgos, que no son vitales, pero que de alguna manera determinan la capacidad del organismo para adaptarse. Estas moléculas de ADN portan solamente unos pocos genes que en cierto modo están ligados al cromosoma bacteriano, de forma que se replican en números fijos, junto con los cromosomas.

Proteína Cinasa C: Es una parte integral de la maquinaria de transducción de señales hormonales acopladas a receptores que inician una cascada de degradación de componentes lipídicos de membrana para controlar importantes procesos biológicos tales como apoptosis, memoria, neurotransmisión, proliferación celular y diferenciación celular.

Loci del cromosoma: Lugar que ocupa un determinado gen en el cromosoma es lo que se denomina *locus*, su plural *loci*.

Microvellosidad: Es un entramado tridimensional de [microtúbulos](#) y [microfilamentos](#) que proveen el soporte interno para las [células](#), anclan las estructuras internas de la misma e intervienen en los fenómenos de

movimiento celular y en su división. Es una estructura dinámica que mantiene la forma de la célula, facilita la movilidad celular, usando estructuras como los [cilios](#) y los [flagelos](#), y desempeña un importante papel tanto en el transporte intracelular, por ejemplo, los movimientos de [vesículas](#) y [orgánulos](#), y también en la [división celular](#).

Mucinasa: Enzima que ejerce su acción catalítica sobre la mucina, el glucolípido que constituye al moco, en ausencia de moco, el microorganismo se adhiere más fácilmente al epitelio estomacal y, además, los iones  $H^+$  difunden libremente hacia el tejido gástrico, en donde llevan a cabo la hidrólisis ácida de las sustancias estructurales de las células epiteliales.

Trombocitopenia: Disminución del número de plaquetas en la sangre.