



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal

DETECCIÓN DE *Salmonella* spp, *Campylobacter jejuni* Y *Escherichia coli* EN POBLACIONES DE AJOLOTES DE XOCHIMILCO (*Ambystoma mexicanum*) EN CONDICIONES CONTROLADAS.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Zitlaly Nathlleli Ibarra Lara

Tutor: Dr. Carlos González-Rebeles Islas.
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM

Comité Tutorial: Dr. Antonio Verdugo Rodríguez
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM
Dr. Ignacio Carlos Rangel Rodríguez.
Fes-Cuautitlan UNAM

México, D.F.

Agosto 2013



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.

ÍNDICE

1.	RESUMEN / ABSTRACT.	3
2.	INTRODUCCIÓN.	4
3.	JUSTIFICACIÓN.	32
4.	HIPÓTESIS.	33
5.	OBJETIVO.	33
6.	METODOLOGÍA.	33
7.	RESULTADOS.	42
8.	DISCUSIÓN.	50
9.	CONCLUSIONES.	54
10.	BIBLIOGRAFÍA.	56

LISTA DE CUADROS.

Cuadro 1. Taxonomía del ajolote de Xochimilco.	6
Cuadro 2. Medios de Transporte y medios de cultivo utilizados para el estudio microbiológico de los microorganismos.	37
Cuadro 3. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a las colonias sugerentes a <i>Salmonella</i> spp, <i>E. coli</i> y <i>Campylobacter jejuni</i> .	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. El ajolote de Xochimilco (<i>Ambystoma mexicanum</i>).	7
Figura 2. Distribución del ajolote de Xochimilco (<i>Ambystoma mexicanum</i>).	8
Figura 3. Sistema de Secreción tipo III de <i>S. Typhimurium</i> .	20
Figura 4. Representación esquemática del complejo de aguja de <i>S. Typhimurium</i> .	22
Figura 5. Monómero y trímero de OmpC de <i>S. Typhi</i> .	22
Figura 6. EPEC E2348/69.	26
Figura 7. Diagrama de trabajo para el procesamiento de muestras en el laboratorio	41
Figura 8. Gráfica de barras comparativa de los resultados positivos a PCR en las diferentes condiciones de agua.	45
Figura 9. Fotografía del gel de agarosa al 1% en TAE del fragmento del gen <i>InvA</i> de <i>Salmonella</i> sp.	47
Figura 10. Fotografía del segundo gel de agarosa al 1% en TAE del fragmento del gen <i>InvA</i> de <i>Salmonella</i> sp.	48
Figura 11. Fotografía del gel de agarosa al 1.5% en TAE del gen <i>eaeA</i> y <i>bfp</i> de <i>Escherichia coli</i> .	49

1. RESUMEN

Los anfibios están gravemente amenazados por la pérdida de hábitat, el cambio climático, enfermedades y la introducción de especies exóticas; aunado al uso que se les da a estas especies para la fabricación de medicinas, como alimento y como animales de compañía. Los anfibios tienen funciones muy importantes en los ecosistemas ya que forman parte de la cadena alimenticia, contribuyen como depredadores y presas, además de participar en el control de plagas de insectos lo cual resulta benéfico para los humanos. El ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*) es un animal endémico de la zona lacustre del Valle de México, cuya conservación es fundamental para el hábitat que ocupa, por lo que es de vital importancia conocer el estado de salud en el que se encuentran los ejemplares y sus poblaciones; iniciando por estudiar su microbiota normal. Sin embargo, existen pocas publicaciones que reporten estudios relacionados con enfermedades del ajolote o sus agentes. Un estudio sobre la microbiota en estas especies brinda datos de referencia importantes para su conservación; de igual manera, para el control de zoonosis como lo son las ocasionadas por los géneros *Salmonella*, *Campylobacter jejuni* y *Escherichia coli* enteropatógenas, relacionadas con su consumo como alimento o como animal de compañía. Aquí se reportan los resultados de un estudio microbiológico y molecular que se realizó para detectar la presencia de bacterias de importancia epidemiológica como *Salmonella* spp, *C. jejuni* y *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), en ajolotes mantenidos en cautiverio. Se realizó el estudio microbiológico de muestras cloacales de 69 ejemplares y se les realizó la PCR por medio de la cual se obtuvieron 10 positivos a *Salmonella* spp y 2 a EPEC. De acuerdo a la investigación realizada en este trabajo se puede concluir que los ajolotes de Xochimilco puede ser portadores de bacterias como *Salmonella* spp y *Escherichia coli*.

ABSTRACT

Amphibians are severely threatened by habitat loss, climate change, disease and the introduction of exotic species, coupled with the use given to these species for the manufacture of medicines, as food and as pets. Amphibians have very important functions in ecosystems as they are part of the food chain, contributing as predators and prey, as well as participate in the control of insect pests which is beneficial to humans. The Xochimilco axolotl (*Ambystoma mexicanum*) is an animal endemic to the lake of the Valley of Mexico, whose conservation is critical to the habitat it occupies, so it is vital to know the state of health in which the specimens are and their populations, starting by studying their normal microbiota. However, there are few publications that report studies related to diseases of the axolotl or its agents. A study on the microbiota in these species provides important baseline data for conservation, the same way, for the control of zoonoses such as those caused by géneros *Salmonella*, *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* enteropathogenic related to their use as food or as pet. Here we report the results of a microbiological and molecular study was performed to detect the presence of epidemiologically important bacteria such as *Salmonella* spp, *C. jejuni* and *Escherichia coli* (EPEC), in axolotls kept in captivity. Microbiological study was conducted cloacal samples of 69 specimens and PCR was performed through 10 which were positive for *Salmonella* spp and 2 to EPEC. According to research carried out in this work one can conclude that the salamanders of Xochimilco can be carriers of bacteria such as *Escherichia coli* and *Salmonella* spp.

2. INTRODUCCIÓN

Las poblaciones de anfibios están disminuyendo rápidamente; géneros, especies e incluso familias están en vías de extinción a tasas sin precedentes. En las últimas décadas, más de 120 especies de todos los anfibios del planeta han desaparecido y entre el 30% y el 50% están gravemente amenazados por la pérdida de hábitat, el cambio climático, el aumento de la radiación UVB, la precipitación ácida, la presencia de enfermedades emergentes, la contaminación, los pesticidas, y la introducción de especies exóticas. La sobreexplotación que se presenta en los anfibios en diferentes partes del mundo, como materia prima para la fabricación de medicinas tradicionales, como alimento y como animal de compañía (mascota) o de colección de acuarios, afecta sus poblaciones (Amphibian Ark 2007, Daszak *et al.* 1999). La pérdida del hábitat es considerada como la principal amenaza asociada con la disminución en el número de especies. Los anfibios tienen funciones importantes sobre el ecosistema: forman parte de la red alimenticia, contribuyen como depredador y como presa, así mismo, participan en el control de plagas de insectos; lo cual resulta benéfico para la humanidad porque reduce la propagación de enfermedades como el dengue y la fiebre amarilla (Amphibian Ark 2007, Daszak *et al.* 1999). Al ser las primeras especies afectadas por situaciones de cambios ambientales, funcionan como un indicador de advertencia para el ser humano sobre el estado de salud de los ecosistemas (Amphibian Ark 2007, Daszak *et al.* 1999).

Su piel altamente permeable, facilita el intercambio de gases entre el organismo y el medio ambiente, por lo que es fácil que los anfibios reflejen la salud de un hábitat (Aguillón *et al.*, 2007). Hay estudios que muestran que existe una correlación entre la disminución de la población de anfibios y el cambio climático (Zippel y Mendelson 2008, Blaustein *et al.* 2003, Pounds *et al.* 2006, Thomas *et al.* 2004).

Las enfermedades emergentes se han reportado en aumento como causas de muerte en

vida libre; su estudio representa un conocimiento importante por la pérdida de las poblaciones que se han reportado como las de la rana dorada (*Bufo periglenes*) en Costa Rica. Sin embargo, la pérdida de una especie de anfibio va mucho más allá de la especie en sí; causa efectos permanentes en el ecosistema y una disminución significativa de la biomasa (Daszak *et al.* 1999).

En los últimos años a nivel mundial se ha observado un incremento en los casos de quitridiomycosis (Rajakanura 2008, Frías-Álvarez 2008, Tyler 2007) y ranavirus (Jancovich 2003). La quitridiomycosis es una enfermedad emergente causada por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*, que infecta la piel de los anfibios generando hiperplasia de la epidermis y altera la termorregulación, en consecuencia presentan problemas para la respirar y en la termorregulación. Se reporta que afecta a más de 90 especies de anfibios en los cinco continentes. (Fisher y Garner 2007). El ranavirus es una enfermedad que afecta a los anfibios causándoles necrosis, eritema generalizado, edema, hemorragias e hígado friable. Al igual que la quitridiomycosis causa mortalidad masiva y ha sido reportada en Asia, Europa, Australia Norte y Sur América tanto en poblaciones silvestres como de cautiverio (Gray *et al.* 2009). Sin embargo, no se sabe con claridad si estos microorganismos forman parte de la microbiota y son oportunistas o si son patógenos para todas las especies (Amphibian Ark 2007).

Los cambios de origen humano en los ecosistemas naturales, el desarrollo de la agricultura, ganadería, el calentamiento global, el aumento de la población y el estrecho contacto entre los humanos, animales silvestres y domésticos son las principales causas de aparición de enfermedades. Como consecuencia de estos cambios, algunos microorganismos encuentran nuevos vectores, reservorios y hospedadores para multiplicarse, transmitirse y causar enfermedades en animales silvestres lo que constituye una nueva y severa amenaza para muchas especies, incluso para el ser humano, dado que muchas de estas enfermedades son consideradas zoonosis (Saggi 2007).

➤ **El ajolote de Xochimilco o Mexicano (*Ambystoma mexicanum*)**

Los ajolotes de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*), forman parte de la familia Ambystomatidae. Existen 30 especies de *Ambystoma* exclusivas de Norteamérica; en México se distribuyen 17, de las cuales 16 son endémicas. El *A. mexicanum* es una especie endémica del valle de México (GIAX 2007, CONABIO 2008, IUCN 2009) (**Cuadro 1**).

Cuadro 1. TAXONOMÍA DEL AJOLOTE DE XOCHIMILCO.

Phylum: Chordata

Subphylum: Vertebrata

Clase: Amphibia

Orden: Urodela (antes Caudata)

Familia: Ambystomatidae

Género: *Ambystoma*

Especie: *mexicanum*

Ambystoma mexicanum (LUW 2008).

Por su forma se asemejan a las lagartijas, sin embargo, su piel es lisa, glándular y húmeda. Tienen cuatro dedos en las patas anteriores, cinco en las posteriores y no presentan uñas. Pueden ser de color café, negro, verde, manchados, amarillos y a veces rosados (albinos). Su cuerpo es robusto, con surcos costales sobre los lados del mismo y con cabeza ancha, la cola es aplanada lateralmente; y tienen parpados móviles. Su reproducción es por fertilización interna, requieren cuerpos de agua profundos con abundante vegetación para depositar sus huevos. Las crías salen del huevo como larvas que obtienen oxígeno del agua usando branquias y se alimentan de plantas y animales pequeños. Las hembras pueden poner hasta 1000 huevos cada 3–6 meses. Los adultos alcanzan 30 cm de longitud y viven hasta 12 años. Es una especie pedomórfica, es decir, que vive permanentemente

en el agua y no presenta un metamorfosis completa, por lo que los adultos siguen presentando branquias. A este proceso mediante el cual las larvas maduran hasta adultos con capacidad de reproducirse, pero no realizan una metamorfosis completa, manteniendo sus branquias y algunas características de etapas juveniles es conocido también como *neotenia* (Casas *et al* 2004, Zambrano *et al.* 2004) (**Figura 1**).



Figura 1. Ajolote de Xochimilco o Ajolote mexicano (*Ambystoma mexicanum*).

Esta especie se encuentra únicamente distribuida en el Valle de México, específicamente en los canales de Xochimilco. No presenta una distribución homogénea, y suelen congregarse en lugares particulares. Originalmente se encontraban en los Lagos de Xochimilco y Chalco, pero actualmente están desapareciendo (**Figura 2**) (Zambrano *et al.* 2004).

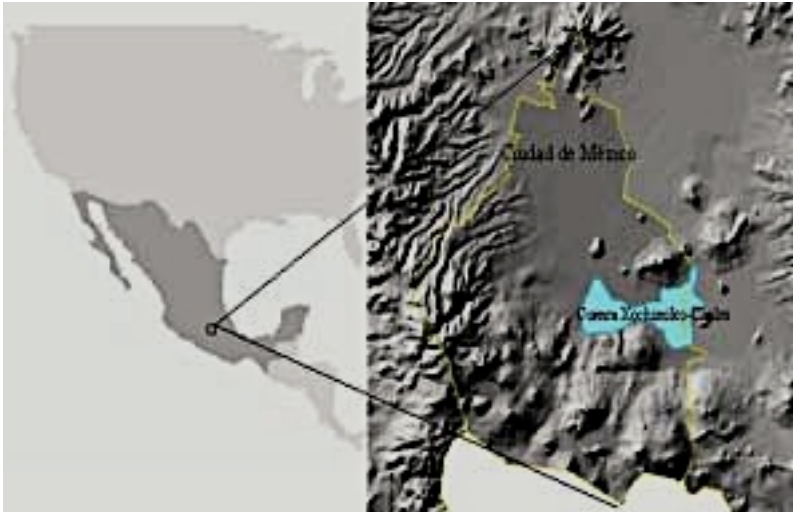


Figura 2. Distribución del ajolote de Xochimilco (CONABIO 2008).

Una característica muy importante de su biología es la de regeneración. Regenera una nueva extremidad o cola cuando ésta se pierde por un accidente o por ataque de un depredador, también puede regenerar células de cerebro y corazón (Casas *et al* 2004). Desde principios del 2009, el Departamento de Defensa de Estados Unidos se financió con 6.25 millones de dólares a un grupo de científicos especializados en regeneración celular de miembros. Los trabajos se desarrollaron en la universidad de Tulane, de Nueva Orleans, con el objeto de estudiar la capacidad de regenerar sus extremidades, cola, mandíbula, piel, órganos, e incluso partes de su cerebro que tiene el ajolote de Xochimilco (CONABIO 2011). Esta capacidad de regeneración lo han hecho el foco de una considerable cantidad de investigaciones con aplicaciones a largo plazo, dirigidas a beneficiar a los seres humanos.

El ajolote es un animal endémico de suma importancia; desde hace tiempo se ha utilizado para preparar jarabes contra la tos y se vende como comida exótica y se usa como animal de compañía (mascota). Por lo que es de vital importancia conocer su microbiota normal y el estado de salud en el que se encuentran los ajolotes, ya que el contacto con este tipo de animales ha ido en aumento en los últimos años (CONABIO 2008).

Por otro lado, su restringido hábitat ha sido impactado severamente. Desde los primeros asentamientos humanos, el lago de Xochimilco fue alterado al crearse las chinampas en la zona lacustre. Así como por la construcción de complejos hidráulicos durante la época prehispánica (entre el lago de Texcoco y el lago de Zumpango). En la época de la colonia, se inició el excesivo aprovechamiento de los recursos pesqueros del lago y entre ellos, el ajolote. A principios del siglo XX la necesidad de obtener agua para la creciente Ciudad de México, hizo que se comenzaran a explotar manantiales de Xochimilco, a la par de actividades pesqueras y turísticas que continuaban en la región (CONABIO 2008). Actualmente, este cuerpo de agua se ha reducido y fragmentado considerablemente; alrededor del 85% de la zona lacustre fue drenada y rellenada para urbanismo. Se conserva aún un 15% de su extensión, pero ésta se encuentra bajo intenso uso turístico, que genera graves problemas de contaminación y una alteración notoria de los hábitat de las especies acuáticas y ribereñas. Además el impacto por contaminación es severo y tiene diversos orígenes, por ejemplo, por la afluencia de visitantes y las actividades que éstos realizan en los canales, la urbanización de la zona (miles de casas vierten diariamente sus drenajes al lago sin ningún tratamiento) y la acumulación de fertilizantes utilizados en las actividades agrícolas en las chinampas (CONABIO 2008).

La introducción de especies exóticas es una amenaza potencial para el Ajolote de Xochimilco (Amphibian Ark 2007). La mayoría de los peces que están presentes en los canales de Xochimilco son especies introducidas. Las especies exóticas que más afectan el ecosistema son la carpa (*Cyprinus carpio*) y la tilapia (*Oreochromis niloticus*). Ambas han generado grandes cambios en la red trófica en todos los sitios donde han sido introducidas en México (Negrete y Romero 1999). Sobre todo las tilapias, ya que son omnívoras y consumen los huevos y larvas de los ajolotes, lo cual no permite que la población se recupere (Uribe 2002). Las especies exóticas pueden generar un impacto negativo y severo sobre las especies nativas y los ecosistemas naturales, lo que finalmente puede resultar en

pérdidas para la diversidad biológica (Álvarez *et al.* 2008).

Otro problema, es que los niveles de agua no son conservados de manera natural, su nivel se mantiene por descargas de aguas tratadas provenientes del Cerro de la Estrella (CONABIO 2008). El sistema presenta una pobre calidad del agua debido al deterioro de las condiciones fisicoquímicas; la reducción de oxígeno disuelto y la turbidez del ambiente acuático. Un estudio realizado en Xochimilco mostró altos niveles de contaminación de coliformes en el agua, tanto en épocas de secas como en época de lluvias (Solís *et al.* 2006). Esto, representa un factor de riesgo potencialmente importante con relación a la presencia de enfermedades en los ajolotes (González 2006).

Uno de los aspectos clave para poder determinar el estado de salud de las poblaciones de ajolotes, es conocer primero su microbiota. El contar con estas referencias es importante para el monitoreo de poblaciones silvestres en cualquier estrategia de conservación y en apoyo a las actividades de medicina preventiva dentro de programas de recuperación y crianza en cautiverio de la especie. La identificación de la microbiota de esta especie contribuye a detectar de manera temprana agentes patógenos potenciales que pudiesen de manera oportunista diezmar poblaciones en caso de convertirse en enfermedades emergentes. Así mismo, dado su uso tradicional, es fundamental para prevenir problemas sanitarios potenciales por el consumo humano, en particular para detectar la presencia de microorganismos de importancia en salud pública como *Salmonella* spp, *Campylobacter jejuni* y *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC). Es indispensable la elaboración de protocolos de bioseguridad en el manejo y la investigación de estos anfibios, tanto en vida libre como en cautiverio (Robertson 2008).

No se cuenta con un gran número de publicaciones que reporten estudios relacionados con enfermedades del ajolote; Servin 2011 en su tesis de licenciatura menciona que la bacteria mas reportada en anfibios es la *Aeromona hydrophila* que es agente principal del

síndrome de la pierna roja. En un estudio realizado en la FES Iztacala realizado con anfibios y reptiles del vivario de la UNAM se lograron aislar diferentes bacterias de Ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*): *Aeromona hydrophila* en un 46.3%, *Citrobacter braakii* en un 11.5%, *Citrobacter freundii* en un 7.7%, *Escherichia coli* en un 19.2%, *Hafnia alvei* en un 3.8%, *Morganella morganii* en un 7.7% y *Providencia rettgeri* en un 3.8% (Aldana 2003).

La mayor parte de la investigación desarrollada con estas especies se ha enfocado en términos generales a su biología y ciclo de vida, su reproducción, regeneración, metamorfosis, anatomía y nutrición (González 2006, Casas *et al.* 2004). Existen también algunos estudios que desde un enfoque genético abordan el fenómeno biológico de neotenia que presenta la especie y en particular para estudiar su inusual capacidad de regeneración (CONABIO 2011).

La contaminación de su hábitat, los niveles de agua, las enfermedades y la introducción de especies exóticas han promovido acciones de conservación de los ajolotes, en particular con enfoque en su reproducción en cautiverio, para reforzar las poblaciones silvestres. Existen criaderos y programas encaminados a evitar la extinción de esta especie como el Acuexcomatl ubicado en Xochimilco y el del Centro de Investigaciones Acuicolas de Xochimilco (CIBAC), en los cuales se trabaja con colonias de ajolotes de Xochimilco y donde uno de sus problemas principales es la mortalidad debido a enfermedades infecciosas (Com. Per. Biólogo Artuto Vergara Iglesias, 2011). Cuando un brote es severo puede destruir en pocas semanas una colonia, y cuando existe un brote moderado puede impedir su reproducción (Negrete y Romero 1999, Duhon 1989).

En México existen algunos trabajos donde se menciona a los reptiles como reservorio de *Salmonella* spp. Estos pueden llegar a ser una posible fuente de infección para los humanos, en particular considerando el consumo que existe de medicamentos hechos

específicamente a base de órganos de serpientes y anfibios (Kraus *et al.* 1991, Márquez *et al.* 1991, Constantino 2009).

Un estudio en el CIBAC demostró la presencia de abscesos en 10 ajolotes, se les realizó la necropsia y se tomaron muestras para su análisis bacteriológico, a partir del cual se obtuvieron aislamientos de *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, y *Citrobacter freundii* (Negrete y Romero 1999).

Un estudio sobre la microbiota presente en estas especies, brindaría datos de referencia importantes para la conservación y reproducción de esta especie endémica del Valle de México. Asimismo, para el control de zoonosis como lo son *Salmonella* spp, *Campylobacter jejuni* y EPEC.

Hasta el momento, *Salmonella* spp, *Campylobacter jejuni* y EPEC son microorganismos que no han sido reportados en ajolotes. Los microorganismos del grupo *Salmonella* se han aislado de iguanas, serpientes, lagartos, tortugas y ranas (Chambers y Hulse 2006). *Campylobacter* spp fue aislada de ranas (Gosling *et al.* 1982) y *Campylobacter fetus* fue aislada de una tortuga (Harvey y Greenwood 1985). *E. coli* ha sido aislada en ranas (Gray *et al.* 2007), se ha reportado en tortugas (Santoro *et al.* 2006) y en una iguana verde (Ruckdeschel *et al.* 1971); asimismo fue aislada *Salmonella* en tortugas que eran mantenidas como mascotas (Constantino 2009). Estos mismos animales también son utilizados como alimentos (ancas de rana, iguanas, huevos de tortuga), con fines medicinales (serpientes) y como mascotas. No obstante, no se ha determinado con certeza si estas bacterias se comportan como saprófitas, microbiota o agentes infecciosos de estas especies.

- **Conservación del ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*)**

La cría en cautiverio de especies amenazadas y su posterior reintroducción es una estrategia de conservación de aplicación cada vez más frecuente. El deterioro del hábitat por causas humanas y la urgencia de evitar la extinción de poblaciones pequeñas o incluso de los ajolotes e Xochimilco, son razones suficientes para llevar a cabo este tipo de prácticas (Ecotimes 2008). Un estado de salud apropiado de las poblaciones en cautiverio es un aspecto primordial para estos enfoques de conservación (Uribe 2002).

La población silvestre del ajolote de Xochimilco está actualmente disminuida en extremo. Estudios recientes que cubren casi por completo su rango de distribución han logrado obtener menos de 100 ejemplares durante 2002-2003. Se calculó una disminución en su densidad poblacional de 0.006-org/ m² a 0.001-org/ m² (Zambrano 2006). Como resultado del Taller de Evaluación de Anfibios Mexicanos organizado recientemente por el “Captive Breeding Specialist Group”, se determinó que las salamandras y los ajolotes requieren de una mayor atención por parte de los zoológicos para su conservación.

El ajolote de Xochimilco se encuentra catalogada como “críticamente en peligro” en el libro rojo de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN 2009). Esta especie, como ya se ha mencionado, es utilizada para diversos estudios, por lo que es considerado un animal de laboratorio a nivel internacional. En cuanto a la regulación del comercio internacional, se encuentra clasificada dentro del Apéndice II de la Convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestres (CITES 2009).

En México, La Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001, clasifica a la especie de Ajolote de Xochimilco (*A. mexicanum*), como una especie bajo protección especial (Pr). Su aprovechamiento y protección están regulados por la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, SEMARNAT (SEMARNAT 2009). No obstante, se ha comentado en diferentes foros, la posibilidad de transferirlo a la categoría de especie “En Peligro de

Extinción” (P), lo cual le brindaría mayor protección. Actualmente, es una de las especies consideradas prioritarias para la SEMARNAT; asimismo cuenta con un Programa Institucional de Conservación por Especie (PICE) impulsado por el gobierno del Distrito Federal, en donde se determina la realización de diversas actividades y proyectos de investigación, tanto en cautiverio como en vida libre, todas estas encaminadas a la conservación integral de la especie (Semarnat, 3er informe de gobierno de la Secretaria de Medio Ambiente 2009).

El aprovechamiento y manejo de las especies y poblaciones en riesgo se debe llevar a cabo de acuerdo a lo establecido en la Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente y la Ley General de Vida Silvestre. En la actualidad el Grupo de Investigación del ajolote de Xochimilco (GIAX 2007), reconoce que la reintroducción de individuos nacidos en cautiverio al medio natural, podría ser la única opción para salvar a la especie de la extinción. Esto significa que dentro del programa de conservación en cautiverio, se deben llevar a cabo prácticas de manejo y proyectos de investigación encaminados a conocer mejor a la especie, además de establecer valores de referencia médicos y fisiológicos, que contribuyan a la toma de decisiones para los manejadores de vida silvestre.

En México existen las UMA (Unidad de manejo para la conservación de la vida silvestre), que pueden ser de producción o exhibición donde se permite el aprovechamiento de los ejemplares, productos y subproductos de los recursos de la vida silvestre como la del CIBAC (Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuemanco) perteneciente a la UAM Xochimilco. La Ley General de Vida Silvestre establece que solo a través de las UMA y PIMVS que son lugares que manejan vida silvestre de manera confinada con el objetivo de conservar y aprovechar sustentablemente la vida silvestre nativa y su hábitat, se permite el aprovechamiento de los ajolotes de Xochimilco.

Hasta hace algunos años, la mayoría de las enfermedades en poblaciones silvestres de anfibios, se documentaban de forma casual, teniendo pocos datos útiles y por lo general demasiado tarde. Esto limitaba en gran medida a los manejadores de vida silvestre, para guiar las actividades epidemiológicas de manera apropiada (Santos *et al.* 2004). En la actualidad esto ha ido cambiando recientemente por la preocupación generada a partir de la aparición de las enfermedades emergentes (Institute of Medicine. Emerging infections 1992). Su reciente atención y estudio, ha generado información esencial y temprana que advierte de posibles daños en el ambiente. (Aguirre y Tabor 2004).

A través de la historia, la fauna silvestre ha sido una fuente importante de transmisión de enfermedades a los humanos, las zoonosis que tienen animales de fauna silvestre como reservorios han constituido un problema de salud importante, afectando todos los continentes. Los animales silvestres pueden transmitir enfermedades entre animales y a los humanos (Kruse *et al.* 2004).

Los cambios microbianos y sus adaptaciones tales como mutaciones, activación y silenciamiento de genes, recombinaciones genéticas, conjugación, transformación, y la transducción de bacterias influyen en la epidemiología de las zoonosis transmitidas por la fauna silvestre. La selección natural y la evolución también juegan un papel importante. La transmisión de microorganismos genéticamente adaptados de vida silvestre para los seres humanos o animales domésticos, ya sea directamente o indirectamente puede producirse de muchas maneras (Kruse *et al.* 2004).

- **Salmonella spp.**

Las bacterias del género *Salmonella* son bacilos Gram negativos anaerobios facultativos. Existen dos especies *S. entérica* y *S. bongori* y seis subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *indica* y *houtenae* (Clarke y Gyles 1993, Pui *et al.* 2011).

Actualmente se conocen mas de 2463 serotipos de *Salmonella* (Gutiérrez *et al.* 2008, Pui *et al.* 2011), aproximadamente el 60%, pertenecen a la subespecie *enterica*. Se considera que cepas de los serotipos A, B, C1 y C2, D y E, de acuerdo al antígeno O (somático) que conforman a la subespecie *enterica*, causan el 99% de las infecciones en el humano, animales domésticos y reptiles. Los serotipos pertenecientes a las subespecies *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *indica* y *houtenae* y *S. bongori*, son aislados de animales ectotermos o del medio ambiente y muy rara vez de humanos (Gyles 2004). Existen reportes de salmonelosis en humanos adquirida del contacto con reptiles y anfibios (Altman *et al* 1972, Sanyal *et al* 1997). En un estudio realizado en Australia con animales de vida libre incluyendo sapos marinos (*Bufo marinus*) aparentemente sanos se encontraron 11 serotipos de *Salmonella* incluyendo Virchow que afecta con mayor frecuencia a los humanos en el norte de Queensland, Australia. En reptiles se encontraron 11 serotipos diferentes de *Salmonella* y específicamente en cocodrilos de agua salada (*Crocodylus porosus*) se encontraron 38 diferentes serotipos de *Salmonella* incluyendo a Virchow (Thomas *et al.* 2001).

Este microorganismo presenta un impacto económico, principalmente en la producción avícola. Su presencia es estacional en humanos; en el Reino Unido se ha observado que por lo general, el número de casos en humanos, aumenta a partir del mes de mayo, con pico máximo en julio y agosto y una declinación a partir de septiembre (Gutiérrez *et al.*, 2008). En la actualidad, la salmonelosis es una de las zoonosis de mayor prevalencia en países desarrollados, debido a la contaminación de alimentos de origen animal. En general la propagación de *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis y *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium va en aumento (Gutiérrez *et al.* 2008).

En México los serotipos más frecuentemente aislados entre 1972 y 1999, fueron *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Derby, *Salmonella* Agona y

Salmonella Anatum (Gutiérrez *et al* 2008). La transmisión de la salmonelosis es por vía oral-fecal, las principales fuentes de infección son el agua y alimentos contaminados. Una forma de diseminación de la enfermedad es a través del contacto con personas y animales portadores asintomáticos. Los individuos con mayor susceptibilidad de contraer la enfermedad son niños, personas inmunocomprometidas y ancianos (Libby *et al.* 2004). *Salmonella* spp. también puede transmitirse de los animales silvestres a los seres humanos de diferentes maneras. La salmonelosis asociada a los reptiles es un fenómeno bien descrito, sobre todo entre los niños. La creciente popularidad del mantenimiento de reptiles y otros animales exóticos como mascotas presenta un problema de salud pública, ya que estos animales suelen ser portadores de *Salmonella* y por lo tanto puede infectar a los seres humanos, directa o indirectamente. En Noruega, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovariedad Typhimurium (*S. typhimurium*) se presenta endémicamente en los erizos y aves paseriformes silvestres, causando casos esporádicos y pequeños brotes en humanos. En 1987, un brote nacional de las infecciones por *S. Typhimurium* fue localizado en las barras de chocolate que habían sido contaminados por las aves silvestres en la fábrica. En 1999, un brote de transmisión hídrica de las infecciones por *S. Typhimurium* se vinculó a una gaviota muerta que había dentro de una fuente de agua, misma que era utilizada sin tratarse previamente (Kruse *et al* 2004).

- **Patogenia de la Salmonelosis**

Para el establecimiento de una infección se requiere que el microorganismo se encuentre en un ambiente favorable en el cual pueda multiplicarse y expresar sus factores de virulencia, lo cual permite a los microorganismos patógenos: adherirse, invadir, multiplicarse en los tejidos o evadir la respuesta inmune y de esa forma, causar daño en el hospedador (Hirsch 2004). Por otro lado, cuando la bacteria es eliminada por las heces, se transmite de un animal infectado a otro susceptible (Gyles 2004).

- **Factores de virulencia de *Salmonella***

En la patogenia de la salmonelosis intervienen diversos factores de virulencia de *Salmonella* que constituyen y permiten la acción de todos los mecanismos de patogenicidad por los cuales la bacteria puede invadir e infectar a su hospedero.

Entre los factores de virulencia se encuentran: el lipopolisacarido (LPS), adhesinas, la cápsula, plásmidos que contienen genes que codifican para la expresión de proteínas que permiten la resistencia o evasión a mecanismos de defensa por parte del huésped.

Asimismo, algunos de los factores de virulencia también están codificados en diversos genes que en ocasiones forman bloques que se conocen como “islas genómicas” (Hirsch 2004), mismas que se encuentran en genomas de bacterias patógenas (Libby *et al.* 2004). Por ejemplo, en la isla de patogenicidad uno, se encuentra un grupo de aproximadamente 31 genes conocido como *inv-spa* (Galán 2001) el cual tiene un tamaño de 35-40 kb y codifica tanto para proteínas que forman una estructura en forma de aguja conocido como sistema de secreción tipo III (SSTIII) (**Figura 3**) y para proteínas efectoras secretadas por este aparato. Lo que le proporcionan a la bacteria la capacidad de invadir tanto células fagocíticas como no fagocíticas (Ginocchio y Galán 1995, Figueroa y Verdugo 2005).

La invasión se inicia por un estímulo contacto-dependiente con la célula eucariota. Las proteínas efectoras, tales como SopE, SopE2 y SopB inducen un cambio en la conformación del citoesqueleto por activación de la actina en la célula huésped (**Figura 3**). La expresión de estas proteínas efectoras se ve favorecida a una temperatura de 37°C, pH neutro y en la fase tardía de crecimiento logarítmico de *Salmonella* (Finlay y Falkow 1989). La secuencia de aminoácidos de las proteínas que componen el SSTIII está altamente conservado entre las enterobacterias patógenas Gram negativas, pero las proteínas efectoras secretadas difieren completamente generando efectos diferentes. En el SSTIII, las proteínas efectoras no presentan una secuencia señal amino-terminal para ser

secretadas, por lo que se conoce como una vía sec-independiente (Galán 2001).

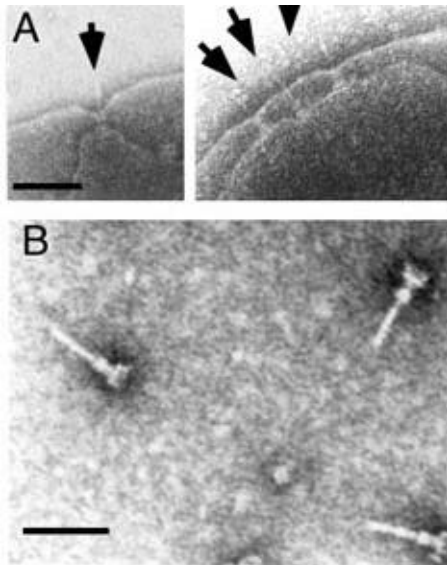


Figura 3. Sistema de Secreción tipo III de *S. Typhimurium*. (A) Micrografía electrónica de *S. Typhimurium* con el complejo de aguja en la envoltura bacteriana (flechas). (B) Micrografía electrónica del injectisoma purificado. Tomado de Galán JE. and C. Collmer (1999).

La proteína InvA forma parte de la base del aparato de secreción tipo III (**Figura 4**), tiene un peso molecular de 75,974 kDa, es una proteína integral de la membrana interna de la bacteria, la cual es homóloga a proteínas pertenecientes a otros géneros de enterobacterias (Ginocchio y Galán 1995). La presencia del operón *invABC* es necesaria, para la invasión de las células. *S. arizonae* es la única cepa no invasiva en cultivo celular, lo cual sugiere que este operón no es funcional.

Las proteínas de membrana externa (PME) son triméricas y forman poros o canales inespecíficos que permiten el paso rápido de pequeñas moléculas hidrofílicas por difusión pasiva, y excluyen sustancias dañinas, como antibióticos y sales biliares (Nikaido 1994), a través de la membrana externa, lo que la hace una barrera semipermeable. Los genes que codifican para las proteínas de membrana externa (PME) se hayan altamente conservados

y estas proteínas representan un 2% del total de proteínas de la célula (Nikaido 1996). El gen *ompC* codifica para una proteína de la membrana externa de *Salmonella* llamada OmpC (**Figura 5**), correspondiente a una porina, que tiene un peso molecular de 37,083 kDa en *S. Typhimurium* (Nikaido 1996). Esta porina tiene una conformación de 16 plegamientos transmembranales. El canal de OmpC es de un diámetro reducido y solo permite el paso de moléculas hidrofílicas. La proteína se expresa bajo condiciones de alta osmolaridad, temperaturas de 37 °C y es más abundante en anaerobiosis y a un pH de 5.2, además tiene afinidad por moléculas cargadas positivamente (Nikaido 1996).

OmpC es regulada por el sistema de dos componentes OmpR y EnvZ y está fuertemente ligada a la adherencia de macrófagos humanos y a las células epiteliales del intestino lo que ayuda a la bacteria en la colonización causando así la enfermedad. Esta proteína se encuentra altamente conservada en 11 diferentes serotipos de *Salmonella* spp con la excepción de *S. arizonae* (Puente *et al.* 1995).

Ambos genes *invA* y *ompC* al ser específicos y conservados dentro del genoma de *Salmonella* spp son blancos ideales para la detección de *Salmonella* spp en muestras clínicas de cualquier procedencia (Herrera *et al.* 2005).

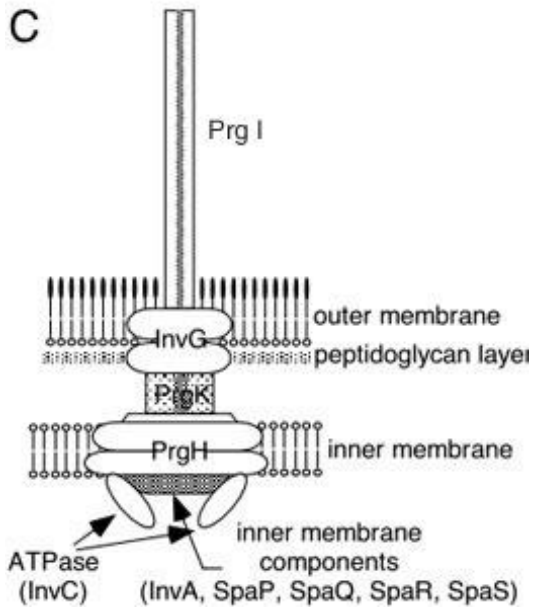


Figura 4. Representación esquemática del complejo de aguja de *S. Typhimurium*. Escala 100 nm. (Kubori T et al. 1998).

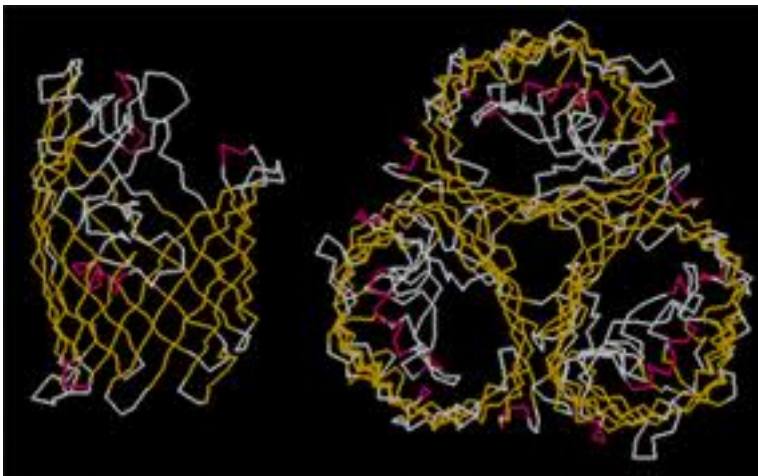


Figura 5. Monómero y trímero de OmpC de *S. Typhi*. Imagen tomada de biotechmku.org

- **Salmonelosis en México**

En México los casos de salmonelosis registrados en las estadísticas de Salud Pública, ocurren en su mayor parte, por la transmisión fecal-oral (Gutiérrez *et al.* 2000). Los casos de salmonelosis en humanos reportados por el sector salud de nuestro país hasta la semana 15 del 2012, fueron de 13,638 casos de fiebre tifoidea y 32,763 casos de fiebre paratifoidea y otras salmonelosis (Boletín epidemiológico 2012). En un estudio realizado en centros de salud pública en México de 1972 a 1999 por Gutiérrez *et al.* 2000, las notificaciones de casos por salmonelosis en humanos registraron un incremento, de 100 a 342 casos en 1994 y a 215,155 en 1998. Los serotipos aislados con mayor frecuencia tanto en humanos como en animales domésticos fueron: *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Derby*, *S. Agona* y *S. Anatum*. En humanos la mayor incidencia se presentó en el grupo de 25 a 44 años y las infecciones se asociaron al consumo de alimentos contaminados, al contacto con persona infectadas o al contacto con heces de animales domésticos infectados con *Salmonella* spp (Gutiérrez *et al.* 2000). Estos datos difieren de estudios hechos en EUA donde se reporta que las personas más susceptibles y afectadas son los niños, ancianos y las personas inmunocomprometidas (Woodward *et al.* 1997).

En un estudio realizado en un parque ecológico de Nuevo León en México, se observó que en una muestra de 54 animales, en 24 de los ejemplares se aisló *Salmonella* spp. De los cuales 5 fueron serpientes y 11 fueron lagartijas (Aguillón *et al.* 2007). En el 2001 Briones y su grupo de trabajo realizaron un estudio en España con heces de reptiles y anfibios, las cuales examinaron en busca de *Salmonella* y encontraron *Salmonela entérica entérica*, *diarizonae*, *salamae* y *arizonae* en reptiles mientras que los anfibios fueron negativos.

- ***Escherichia coli***

Es un báculo anaerobio facultativo Gram negativo, móvil, capaz de crecer en agar MacConkey y en medios simples con o sin agregado de NaCl, fermentadores y oxidativos

en medios con glucosa u otros carbohidratos, catalasa positivos, oxidasa negativos, reductores de nitratos a nitritos y contienen un porcentaje de G-C del 39% a 59% en su DNA. Se trata de bacterias de rápido crecimiento y amplia distribución en el suelo, agua, vegetales y gran variedad de animales. Forma parte de la familia *Enterobacteriaceae*. Se clasifican en más de 170 serogrupos O según las características antigénicas de su LPS y en serotipos por la combinación de antígenos O y H (Rodríguez-Angeles 2002).

Forman parte de la microbiota intestinal y sintetizan algunas vitaminas. Coloniza el tracto gastrointestinal a las pocas horas de vida del recién nacido y establece con el huésped una relación estable de mutuo beneficio (Drasar y Hill 1974). Se le considera un germen indicador de contaminación fecal cuando está presente en el ambiente, agua y alimentos, junto con otros microorganismos similares agrupados bajo la denominación de "bacterias coliformes". Son gérmenes de gran ubicuidad y capacidad de proliferación y a la vez de fácil cultivo e identificación, no son enteropatógenos como grupo, por lo tanto su presencia en alimentos, ambiente o pacientes no certifica la etiología de una infección intestinal o un brote de enfermedades transmitidas por alimentos.

Escherichia coli es una de las especies bacterianas más minuciosamente estudiadas, no solamente por sus capacidades patogénicas, sino también como cepa de laboratorio (Neidhardt 1999). En conjunto, la importancia de las enterobacterias en patología humana puede cuantificarse constatando que constituyen aproximadamente el 50% de todos los aislamientos clínicamente significativos en los laboratorios microbiológicos y hasta el 80% de todos los bacilos Gram negativos identificados. Las infecciones entéricas provocadas por esta bacteria no son causadas por las cepas que habitan normalmente el intestino, sino por diferentes patotipos (Nataro y Kaper 1998), que se transmiten por vía fecal-oral de persona a persona o a través del agua y alimentos. A nivel epidemiológico se involucra en problemas gastrointestinales, infecciones urinarias y septicemia. Existen 6 patotipos de *E. coli*: ETEC, EHEC, EIEC, EAEC, DAEC Y EPEC.

En este estudio se trabajó con **EPEC** (*E. coli* enteropatógenas por sus siglas en inglés)

- ***E. coli* enteropatógenas**

En estudios realizados en países en vías de desarrollo se ha demostrado que EPEC presenta elevadas tasas de morbilidad y mortalidad (20%-50%). EPEC fue el primer grupo que se identificó serológicamente y se asoció con casos de diarrea en infantes, siendo la adherencia su principal factor de patogenicidad (Vidal *et al.* 2007).

- **Patogenia de EPEC**

La primera etapa en la patogenia es la formación de microcolonias sobre la superficie de los enterocitos, proceso conocido como adherencia localizada (LA) (Vidal *et al.* 2007).

- **Factores de virulencia de EPEC**

El fenómeno de LA está mediado por el BFP, fimbria tipo IV que es similar en cuanto a estructura y secuencia aminoacídica a los pili TCP de *Vibrio cholerae* (Vidal *et al.* 2007).

En el intestino proximal producen lesiones de tipo "attaching and effacing" (EAE, adherencia y esfacelamiento) (**Figura 6**), caracterizadas por contacto íntimo con los enterocitos, alteración secundaria de su citoesqueleto, esfacelamiento de sus microvellosidades superficiales con formación de pedestales y modificación de sus flujos en iones y agua. Genes cromosómicos y plasmídicos codifican los productos que ocasionan estas lesiones (Donnenberg 2000).

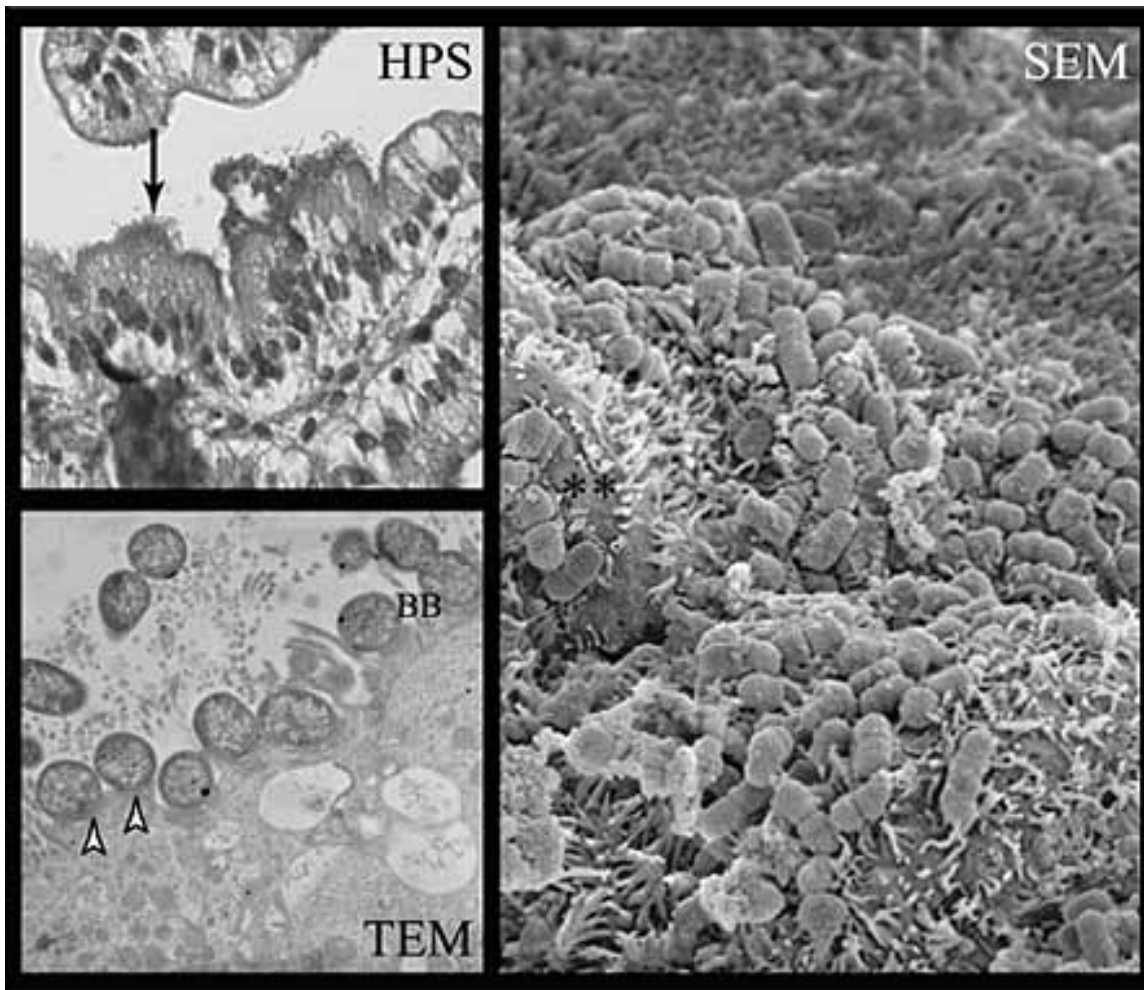


Figura 6. EPEC E2348/69 adherida a células epiteliales del intestino delgado induciendo lesiones típicas EAE en íleon porcino. (Girard *et al.* 2005).

La adherencia es un proceso fundamental en la patogénesis, que presenta dos fases; la primera implica la adherencia inicial entre las mismas bacterias, mientras que la segunda supone la adherencia de las bacterias a la célula huésped. La biogénesis del gen *bfp* requiere de 14 genes localizados en un plásmido de alto peso molecular (50-60MDa) denominado EPEC adherence-factor (EAF). La expresión del BFP se induce por factores fisicoquímicos como la temperatura, el calcio y los iones amonio (Vidal *et al.* 2007). El BFP permite que las bacterias interactúen entre ellas y se dispongan en forma de microcolonias a nivel intestinal, promoviendo con esto la adherencia inicial sobre la superficie de la célula. Una vez que la bacteria está adherida al enterocito induce una serie

de señales intracelulares que son promovidas por un grupo de proteínas secretadas mediante el aparato de secreción tipo III, codificado por los genes *esc* y *sep* y trasladadas al enterocito (Vidal 2003).

Los genes necesarios para la formación de lesiones de tipo EAE por EPEC están contenidos dentro de una "isla de patogenicidad" cromosómica de 35-kb llamada locus of enterocyte effacement (LEE). En EPEC, LEE incluye los genes *esp*, *esc*, *sep*, *ea*e, *tir* que codifican las proteínas bacterianas EspA, EspB, EspD, la regulación de su producción y los sistemas de secreción o translocación de las mismas. La expresión máxima de estas proteínas se realiza a una temperatura de 37°C y en condiciones similares a las encontradas en el tubo digestivo, lo que sugiere que están vinculadas a la virulencia de estas cepas (Hueck 1998, Hartland *et al.* 2000).

Las proteínas trasladadas promueven un contacto íntimo entre la bacteria y la célula huésped. La intimina, una proteína de membrana externa de 94-kDa., codificada para el gen *ea*e, se une a una proteína de 90 kDa. localizada en la membrana de la célula eucariota. Este receptor es en realidad de origen bacteriano y se denomina Tir ("Translocated intimin receptor"). Tir es translocada a partir de la bacteria a la membrana de la célula huésped, donde es fosforilada en uno o más residuos de tirosina y funciona como receptor para la intimina. La intimina purificada también se une a β /1 integrinas, lo que sugiere que puede fijarse a más de un receptor sobre la célula epitelial. Aunque las integrinas no están presentes en la superficie apical de los enterocitos, sí se encuentran en la superficie apical de las células M que recubren las placas de Peyer.

De esta asociación EPEC-células epiteliales y en especial Tir-intimina resulta una serie de cambios; el más fuerte ocurre en la estructura celular con la formación de los pedestales de actina que sostienen las bacterias adheridas y ligadas al citoesqueleto (Daniell *et al.* 2001, Gruenheid *et al.* 2001, DeVinney *et al.* 2001). Secundariamente se producen

alteraciones de los niveles intracelulares de inositol-fosfato, con alteración de los canales iónicos y modificación de los niveles de calcio, que también parecen jugar un papel en la patogenia de la enteritis por EPEC (Varela *et al.* 2001).

Las cepas EPEC se consideran típicas cuando tienen los genes *eae* para la proteína intimina, que participa en EAE, y el plásmido EAF que codifica para el BFP que permite la interacción de las bacterias para formar colonias. Se dice que son atípicas cuando sólo presentan los genes *eae* pero no el plásmido EAF (Vidal *et al.* 2007). Las EPEC típicas no se han encontrado en animales, sugiriendo que los humanos son el único reservorio para estos organismos. En contraste las EPEC atípicas se han encontrado en animales de diferentes especies. La asociación del serotipo O26:H11 con las cabras es bien conocida. Cepas Stx negativas han sido aisladas del ganado; estas cepas son consideradas como atípicas. Un caso similar existe en el serotipo O111 reportada por Ewing *et al.* en 1963 la cual fue aislada de monos. El serotipo O128:H2 es frecuente en conejos y perros y al igual que la cepa aislada de humanos en Brasil es EAF negativa. Se necesitan realizar mas estudios a cerca de este tema; sin embargo, estos datos sugieren que diferentes especies de animales son reservorio de las EPEC atípicas. (Trabulsi *et al.* 2002)

- **EPEC en México**

En 2009 del 17 al 19% de los casos de diarrea infantil en diversas regiones del país fueron causados por *E. coli* enteropatógena, lo que indica que en México uno de cada cinco niños que enferman de diarrea puede estar infectado de EPEC (Vidal *et al.* 2007)

El estudio molecular de nuestras cepas locales EPEC ha mostrado que la casi totalidad de los cultivos O55, O119 y O111 son *eae* y *bfp* positivos en PCR. Es importante mencionar que en la última década, muchos de estos cultivos han revelado ser resistentes a múltiples antimicrobianos como ampicilina, sulfametoxazol/trimetoprim, ciprofloxacina, tetraciclina y

estreptomycin, tanto en cepas de origen clínico, animal y ambiental. (Varela *et al.* 2001, Romeu Álvarez *et al.* 2012). En un estudio realizado en la Fes Iztacala en el 2003 se encontró *Escherichia coli* en el *Ambystoma mexicanum* (Aldana 2003) sin embargo, no existe información acerca de *E. coli* enteropatógena en reptiles y anfibios.

- ***Campylobacter jejuni***

Es un vibrio Gram negativo, microaerófilico, móvil. La colonia puede ser detectada entre 24-72 horas después de su incubación. Es comensal de aves, bovino, ovino, perros y gato (Olarte y Pérez 1983).

Es considerado como la primer causa bacteriana de enteritis en humanos en Estados Unidos superando a *Salmonella* y se calcula que es la enfermedad entérica bacteriana más común en los países desarrollados. Es la principal causa de diarrea a nivel mundial y la segunda causa más común en los Estados Unidos; donde infecta entre dos y cuatro millones de personas cada año y es responsable del 99% de las infecciones. Se ha confirmado que en particular, *Campylobacter jejuni* ha sido la causa más frecuente de diarreas infecciosas agudas, que supera incluso a las infecciones causadas por *Salmonella* spp y *Shigella* spp. Durante el verano se observa un mayor número de casos, siendo importante para la Salud Pública (Ruiz-Palacios 2007).

Infecta el tracto gastrointestinal transmitiéndose generalmente a través de alimentos y agua contaminada. Sin embargo, también puede ocurrir por el contacto directo con la materia fecal de una persona infectada. En general, los niños menores de un año, los adolescentes y los adultos jóvenes son los más afectados (Olarte y Pérez 1983).

Patogenia de *Campylobacter jejuni*

Esta bacteria no posee fimbria, pero se ha demostrado que su flagelo actúa como adhesina, lo cual le permite la adherencia a las células epiteliales y a la mucosa intestinal; después invade las células epiteliales con ayuda de la cápsula y el LPS, provocando infiltrados inflamatorios de la lámina propia y abscesos en las criptas utilizando el flagelo para la colonización (Rebollo 2007).

- **Factores de virulencia de *Campylobacter jejuni***

El LPS juega un papel importante en la adherencia e invasión a las células intestinales. Por otro lado, la cápsula es de vital importancia en la resistencia, la adherencia y la invasión de células epiteliales; además juega un papel clave en la evasión de la respuesta inmune por la composición de algunas cepas de *Campylobacter jejuni*, como la 11168 y la RM1221, que poseen azúcares, ácido teicoico o ácido hialurónico que usualmente no son detectados en el polisacárido bacteriano. Además esta extensa variación de la estructura de la cápsula le atribuye a la bacteria el mecanismo de variación de fase (Young *et al.* 2007).

Su motilidad es por medio del flagelo, la quimiotaxis es un factor importante en *C. jejuni* (Young *et al.* 2007). El flagelo de *C. jejuni*, está constituido por dos proteínas; FlaA que tiene como papel fundamental la motilidad, adherencia y colonización de la bacteria, además de presentar una homología en la secuencia de aminoácidos del 77% con FlaB que es la segunda proteína que constituye al flagelo (Fischer y Nachamkin 1991). El gen *flaA* tiene un rol importante en la patogénesis de *Campylobacter* spp (Rizal *et al.* 2010).

Campylobacter jejuni secreta una proteína llamada ClaB, la cual es requerida también para la invasión a células epiteliales; se secreta por medio de un aparato de exportación flagelar. También exporta otras proteínas como FlaC, la cual se requiere para la invasión. Además produce una toxina citoletal (CDT), que produce arresto de G1/S o G2/M del ciclo de la célula, modulación del sistema inmune y de colonización persistente. Esta toxina

consiste de 3 subunidades: CdtB la cual actúa como Dnasa; CdtA y CdtC los cuales median la unión de la bacteria a la célula huésped (Young *et al.* 2007).

- ***Campylobacter jejuni* en México**

En un estudio realizado en una granja avícola en México, se muestrearon 30 aves donde en nueve de ellas se aisló *Campylobacter jejuni* y en dos *Campylobacter coli*. De acuerdo con estos resultados preliminares, es probable que vivan como comensales en el tracto intestinal del pollo de engorda en las parvadas comerciales en México y probablemente también de aves silvestres. En México deben ser frecuentes las campilobacteriosis en humanos, derivadas del consumo de alimentos de origen aviar, por ello resultan prioritarios los estudios epidemiológicos al respecto (Gutiérrez *et al.* 2008).

En México Olarte y Pérez en 1983, reportaron que los niños menores de 4 años fueron los más afectados en los meses de verano. Por otro lado Calva *et al.* en 1988, realizó un estudio con 179 niños menores a 5 años en donde reportó que al menos el 66% tuvo una infección por *Campylobacter*. No existe información de la presencia de *Campylobacter jejuni* en anfibios y reptiles.

Las zoonosis representan un serio problema en salud pública, animal y ambiental, dado el surgimiento de nuevas enfermedades infecciosas y el resurgimiento de otras previamente controladas, especialmente en fauna silvestre. La medicina de la conservación representa un nuevo enfoque de integración y transdisciplinariedad, a fin de permitir un mayor entendimiento de la ecología de las enfermedades, para su detección, prevención, control y manejo (Arrivillaga y Caraballo 2009). Este concepto intenta demostrar como la salud del ecosistema, la salud animal y la humana se afectan e influyen entre sí, confluyendo en un área común representada por la salud ecológica. De ahí la importancia del monitoreo del estado de salud de las poblaciones de animales silvestres con el objeto de vigilar la

presencia de enfermedades que puedan afectar al ser humano y alterar la salud del ecosistema.

En el siguiente trabajo se reportan los resultados de un estudio microbiológico y molecular que se realizó en ajolotes de Xochimilco mantenidos en cautiverio para detectar la presencia de *Salmonella* spp, *Campylobacter jejuni* y EPEC.

4. JUSTIFICACIÓN

El ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*) es una especie de gran importancia biológica para el país, es endémica del Valle de México, además cuenta con valor como recurso local y actualmente se encuentra en peligro de extinción. El presente estudio contribuye con datos sobre su microbiota, que podrán ser utilizados en la prevención y/o tratamiento de enfermedades infecciosas durante su crianza en cautiverio y otras actividades para monitorear y fomentar su conservación. Ayudando así a estabilizar a la especie y trabajar por su recuperación y reintroducción. Asimismo, ayudará en el control de zoonosis como lo son *Salmonella* spp, *Campylobacter jejuni* y EPEC.

Conocer la microbiota normal y diferenciarla de la microbiota potencialmente patógena puede contribuir a prevenir enfermedades emergentes en esta especie en grave peligro de extinción.

5. HIPÓTESIS

Los ajolotes de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*) son portadores de *Salmonella* spp, *Campylobacter jejuni* y EPEC.

6. OBJETIVO

Determinar la presencia de *Salmonella* spp, *Campylobacter jejuni* y EPEC en poblaciones de ajolotes de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*) en el Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuernavaca (CIBAC) y en el Canal de la UNAM en Cuernavaca, tomando muestras con hisopos cloacales y analizándolas por medio de cultivo bacteriológico y PCR, con la finalidad de saber si los ajolotes son portadores de estas bacterias

7. METODOLOGÍA

Para la realización de este estudio se utilizaron 69 ajolotes de Xochimilco mantenidos en diferentes condiciones de cautiverio en el Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), el Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuernavaca (CIBAC) y en los canales de Xochimilco.

En el Instituto de Biología de la UNAM se muestrearon 8 ejemplares adultos, los cuales se encontraban en cautiverio en acuarios equipados con filtros, vegetación artificial, aireación con bomba y termómetro para monitorear la temperatura. El agua se preparaba con anticloro previo a la introducción de los animales y se le realizaban recambios parciales constantemente para evitar problemas de bacterias y hongos por contaminación. Los ejemplares se alimentaban con pulga de agua (*Daphnia magna*), charales (*Chirostoma humboldtianum*) y tubifex (*Tubifex tubifex*) previamente tratados para evitar enfermedades parasitarias. Estos mismos ejemplares fueron trasladados a un canal de Xochimilco previamente adaptado para su introducción. Se eliminaron carpas (*Cyprinus carpio*) y tilapias (*Oreochromis niloticus*) para evitar la depredación y se sembraron con charal para su alimentación. Los ejemplares se mantuvieron en el canal durante tres meses para dejar que se adaptaran al cambio de hábitat y alimentación. Posteriormente se capturaron para muestrearlos de nuevo; en este canal solo fue posible recapturar 2 ajolotes.

Del mismo Instituto se tomaron muestras de otros 8 ejemplares adultos. Éstos, al igual que los anteriores, también se encontraban mantenidos en cautiverio bajo las mismas condiciones controladas. Asimismo, fueron trasladados a otro canal de Xochimilco, previamente adaptado. El canal pertenece a la UNAM y está ubicado en Cuemanco. Los ejemplares fueron posteriormente capturados para ser muestreados. En este canal solo se logró la captura de 1 ajolote.

En el CIBAC se realizaron varios muestreos. En el primero se tomaron muestras de 5 ajolotes adulto. Éstos se encontraban en acuarios, con filtros, y aereación por bomba, contaban también con vegetación artificial para facilitar las puestas de los huevos y un termómetro para monitorear la temperatura. Esto último es importante, ya que si la temperatura es muy alta hay una propensión a problemas por hongos. Los acuarios donde se encontraban estos ejemplares, se mantenían con una mezcla de 50% de agua potable y 50% de agua proveniente de los canales de Xochimilco y se les realizaban recambios de agua 2 veces por semana manteniendo dicha proporción. Su alimentación era a base de pulga de agua, charales y tubiflex previamente tratados para evitar enfermedades parasitarias.

Para el segundo muestreo dentro del CIBAC se tomaron 5 ejemplares adultos, 2 de los cuales presentaron protuberancias en la cloaca sin otros signos clínicos. En este caso los ajolotes se mantenían en acuarios con agua que provenía del canal en un 100% a los cuales también se les realizaban recambios parciales del agua y manteniendo el mismo protocolo de alimentación.

Para el tercer muestreo realizado en el CIBAC, se trabajó con 10 ejemplares adultos confinados con acuarios con agua de canal al 100%, y los mismos protocolos tanto de limpieza como de alimentación ya citados.

En el cuarto muestreo, se tomaron 10 ejemplares adultos. Estos ejemplares formaban parte de los reproductores del criadero y se encontraban en acuarios con agua de canal al 100% y el mismo protocolo de manejo citado para los casos anteriores.

En el quinto muestreo se trabajó con 10 ejemplares adultos, mantenidos en agua de canal con el mismo protocolo antes mencionado.

Finalmente, durante el sexto muestreo se tomaron 10 ajolotes adultos. Todos los ejemplares fueron machos sin identificación y en este caso también se observó que 7 de ellos presentaban protuberancias alrededor de la cloaca sin más signos clínicos. A diferencia de los anteriores, éstos se mantenían en acuarios con agua potable previamente preparada con anticloro, se le realizaban recambios parciales de agua cada 2 días y su alimentación se mantenía bajo el mismo protocolo.

Con las muestras obtenidas se realizó un estudio microbiológico y molecular para detectar la presencia de *Salmonella* spp, *C. jejuni* y EPEC.

- **Estudio microbiológico**

El hisopo se introdujo en la mucosa cloacal de cada individuo realizando movimientos giratorios suaves y procurando que se deslizara por las paredes. Se utilizó un hisopo para el análisis de cada bacteria en estudio, por lo consiguiente a cada ejemplar se le muestreó con 3 hisopos. Las muestras se llevaron posteriormente al laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la UNAM, cada una inmersa en un medio de transporte específico para cada bacteria del estudio.

E. coli: se utilizó el medio de transporte Stuart; en el laboratorio se sembró el contenido de cada muestra con el asa bacteriológica en agar MacConkey y agar verde brillante. El cultivo se mantuvo en incubación a 37°C por 24 h para observar el crecimiento de las bacterias.

Salmonella spp: los hisopos fueron inoculados en tubos con agua peptonada como medio de transporte y pre-enriquecimiento. En el laboratorio se incubaron por 24 h a 37°C, se transfirieron a caldo selenito y caldo Rappaport-Vassidialis como medios de enriquecimiento, en el cual se dejaron incubando otras 24 h a 37°C. Se aplicó este procedimiento con medios selectivos con el objeto de lograr una mayor probabilidad de que el crecimiento bacteriano fuera de *Salmonella* y no de otras bacterias Gram negativas. A partir del crecimiento en el caldo selenito se colocó 1ml de cultivo en un microtubo eppendorf para centrifugarlo y decantar el sobrenadante. El *pellet* obtenido se sembró en agar verde brillante y agar MacConkey, dejándolo incubar por 24 h a 20°C. Posteriormente los medios de cultivo se mantuvieron a temperatura ambiente por 24 h, pretendiendo simular las condiciones de temperatura en las que estas bacterias crecen dentro del ajolote cuando éste se encuentra en su propio hábitat.

Campylobacter jejuni: las muestras se transportaron en Cary-Blair. Para su cultivo se utilizó un medio de carbón modificado con suplemento Preston, así como agar base *Campylobacter* con sangre de bovino y antibióticos para inhibir el crecimiento de otras bacterias. Se utilizó un método de sembrado diferente de aquel utilizado con las otras bacterias. La primer estría sobre el medio de cultivo, se realizó con el mismo hisopo con el cual se tomó la muestra, y las siguientes estrías se sembraron con el asa bacteriológica estéril. Con este método se esperaba lograr una mayor eficacia en el crecimiento bacteriano. (En el **cuadro 2** se resumen los medios de transporte y de cultivo utilizados en este estudio).

Cuadro 2. Medios de transporte y medios de cultivo utilizados para el estudio microbiológico de los microorganismos.

Bacteria	Medio de Transporte	Medios de Cultivo
<i>Escherichia coli</i>	Stuart	Agar MacConkey y agar verde brillante
<i>Salmonella</i> spp	Agua peptonada	Caldo Selenito, caldo Rappaport- Vassidialis,

<i>Campylobacter jejuni</i>	Cary-Blair	agar MacConkey y agar verde brillante Medio de carbón modificado, agar <i>Campylobacter</i> con sangre de bovino y suplemento Preston
-----------------------------	------------	---

Después de observar el crecimiento bacteriano en los agares, se tomaron bacterias con el asa bacteriológica para su resiembra. En el caso de *Salmonella* y *E.coli*, se sembraron en agar TSA o en agar para métodos estándar y se dejaron incubando 24h a 37°C para obtener colonias puras. En el caso de *Campylobacter jejuni* no se realizó este paso ya que los agares utilizados para esta bacteria ya se encontraban preparados con antibiótico para inhibir el crecimiento de otros microorganismos. Posteriormente se realizaron pruebas bioquímicas como TSI, SIM, urea y citrato. Una vez identificadas se procedió a realizar la extracción de ADN mediante la técnica de tiocianato y guanidina

- **Extracción de ADN con la técnica de tiocianato y guanidina.**

Se sembró; *Escherichia coli* en caldo LB, *Salmonella* en caldo selenito y *Campylobacter jejuni* en caldo tioglicolato en microanaerobiosis. Y en cada caso, se siguieron sistemáticamente los pasos que se enlistan a continuación:

- De cada uno de los tubos de caldo, se obtuvieron 2 ml del líquido con una pipeta y se transfirió a un tubo eppendorf.
- Se centrifugó 5 min a 10,000 rpm.
- Se decantó.
- Se le agregaron 300 µl de solución de lisis.
- Se agitó con vortex por 15 segundos.
- Se agregaron 150 µl de acetato de amonio y se dejó reposar en hielo durante 10 min.
- Se agregaron 250 µl de fenol:cloroformo en una proporción 1:1 y se puso en el vortex para mezclarlo y se centrifugó 5 min a 12,000 rpm.

- Se realizó un segundo lavado con 250µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico preparado en una proporción 25:24:1
- Se centrifugó y se pasó el sobrenadante a otro tubo eppendorf.
- El ADN obtenido se precipitó agregándole 400µl de isopropanol y se dejó reposar en el hielo por 20 min.
- Se centrifugó 10 min a 13,000 rpm.
- Para obtener el ADN, el sobrenadante se extrajo con una pipeta para evitar despegarlo del tubo.
- El ADN que quedó en el tubo se lavó con 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó 10 min a 13,000 rpm.
- El etanol se decantó y el tubo se dejó secar por 30-60 min
- El ADN se suspendió en 15-20 µl de agua milliQ estéril
- El tubo se introdujo en baño maría a una temperatura de 65°C por 30 min para permitir que el ADN se expanda.
- Posteriormente el ADN extraído se cuantificó para ser posteriormente utilizado en las reacciones de PCR.

La técnica de PCR, es una herramienta diagnóstica tanto en la clínica como en investigaciones epidemiológicas. Una de sus ventajas es que los resultados se obtienen en un menor tiempo que en un diagnóstico bacteriológico, el cual tarda de 24-48 h (Constantino 2009).

Para la realización de la PCR de este proyecto, se utilizaron iniciadores ya reportados en artículos, específicos para cada bacteria, como se enlistan a continuación:

- *Salmonella*: *invA* (Rahn *et al.* 1992) y *ompC* (Kwang *et al.* 1996).
- *Campylobacter jejuni* : *flaA* (Oyofe *et al.* 1992).

En ambos casos el proceso se encontraba ya estandarizado y se contó con la experiencia del laboratorio de Microbiología Molecular de la FMVZ de la UNAM:

- *Escherichia coli*: *eaeA* (Blanco *et al.* 2001) y *bfpA* (Nataro *et al.* 1998). Se estandarizó con una cepa de EPEC típica. En el laboratorio de Medicina de la UNAM del Dr. Carlos Eslava.

Una vez que todos los iniciadores estuvieron estandarizados, se pudo realizar la PCR con las muestras obtenidas de los ajolotes que tuvieron resultados de crecimiento bacteriano y pruebas bioquímicas positivas para las bacterias que se buscaban. En la **Figura 7** se resume el proceso completo que se le dió a la muestra desde su toma hasta la realización de la PCR.

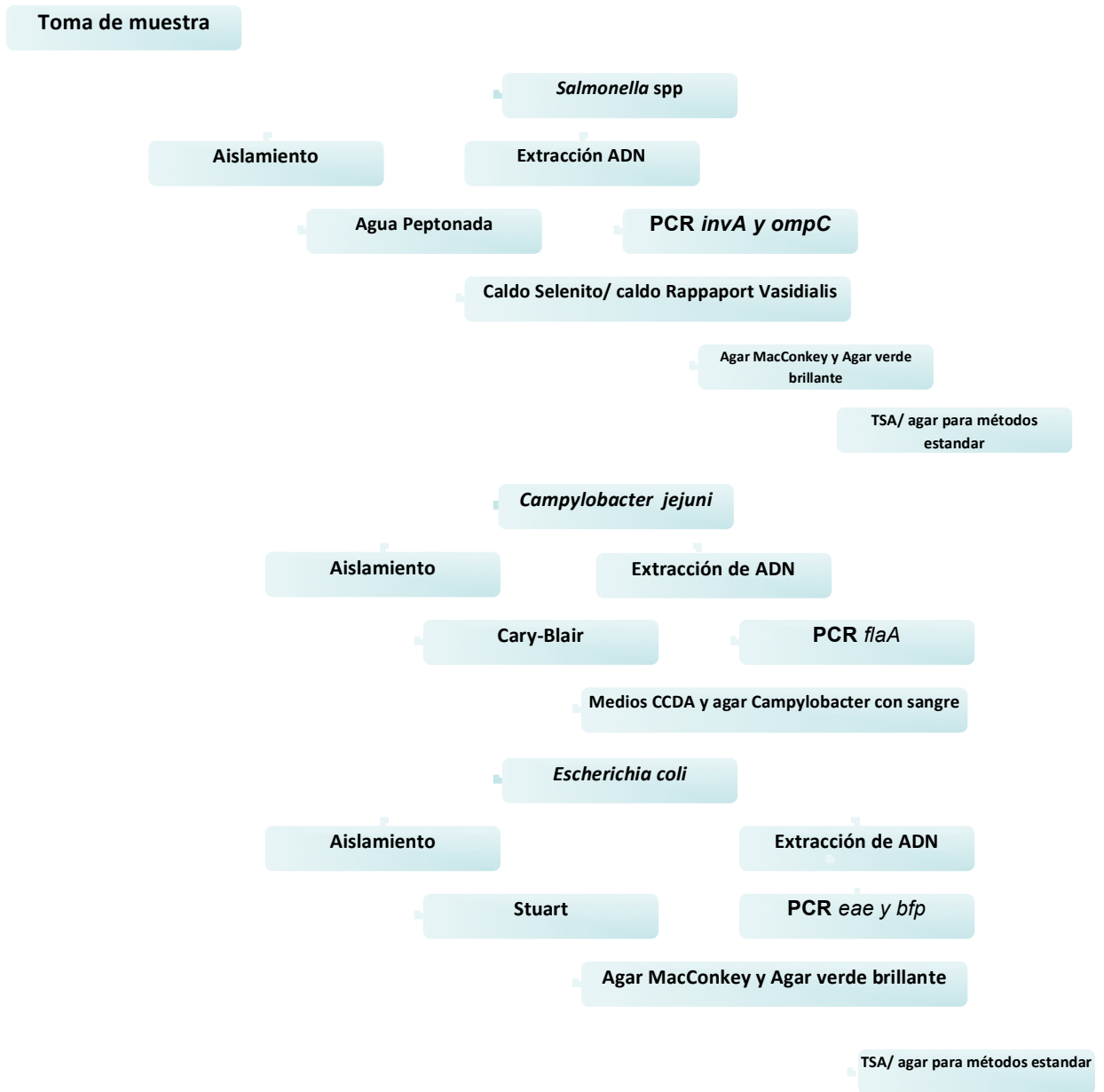


Figura 7. Diagrama de trabajo para el procesamiento de la muestra en el laboratorio desde la toma hasta que se realizó la PCR.

8. RESULTADOS

En el cuadro 3, se pueden observar los diferentes resultados obtenidos con las 69 muestras para cada bacteria, sometidas a diferentes medios de cultivo:

Cuadro 3. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a las colonias sugerentes a *Salmonella* spp, *E. coli* y *Campylobacter jejuni*.

Muestra	Tinción de Gram	Lactosa	Oxidasa	TSI	Urea	Citrato	SIM	ONPG	Identificación	PCR	Tipo de agua
1-1	-	+	-	3	-	-	+/+/+	+	<i>E. coli</i>	-	potable
3-1	-	+	-	2	-	-	+/+/+	+	<i>E. coli</i>	-	potable
4-1	-	+	-	2	-	-	+/+/+	+	<i>E. coli</i>	-	canal
5-1	-	-	-	3	-	+	+/-/-	-	<i>Salmonella</i>	-	potable
7-1	-	-	-	3	-	+	+/-/+	-	<i>Salmonella</i>	+	potable
8-1	-	+	-	3	-	+	+/-/+	-	<i>Salmonella</i>	-	potable
6-1	-		+	1	-	-	-/-/-		<i>C. jejuni</i>	-	potable
3-2	-	+	-	3	-	+	+/+/+	+	<i>E. coli</i>	-	Potable- canal 50%
2-2	-	+	-	3	-	-	+/+/+	+	<i>E.coli</i>	+	canal
4-2	-		+	1	-	-	+/+/-		<i>C. jenuni</i>	-	potable
1-2	-	+	-	4	-	-	+/-/+	-	<i>Salmonella</i>	+	potable
2-2	-	-	-	3	-	+	+/-/+	-	<i>Salmonella</i>	+	canal
5-2	-	-	-	3	+	-	+/-/+	-	<i>Salmonella</i>	+	canal

1-3	-		+	1	-	+	-/-/-		<i>C. jejuni</i>	-	canal
-----	---	--	---	---	---	---	-------	--	------------------	---	-------

Continuación del cuadro 3.

Muestra	Tinción de Gram	Lactosa	Oxidasa	TSI	Urea	Citrato	SIM	ONPG	Identificación	PCR	Tipo de agua
3-3	-	-	-	2	-	-	+/-/+	-	<i>Salmonella</i>	+	Potable-canal 50%
4-3	-	+	-	4	-	+	+/-/+	+	<i>E. coli</i>	-	Canal
5-3	-	+	-	2	-	-	+/+/+	+	<i>E. coli</i>	-	Potable
1-4	-	+	-	2	-	-	+/+/+	+	<i>E. coli</i>	-	Potable
2-4	-		+	2	+	-	-/-/-		<i>C. jejuni</i>	-	Potable-canal 50%
6-4	-	lenta	-	2	+	+	+/-/+	-	<i>Salmonella</i>	+	canal
7-4	-	+	-	3	-	+	+/+/+	-	<i>Salmonella</i>	+	canal
2-5	-	+	-	3	-	+	+/-/+	+	<i>E. coli</i>	+	canal
3-5	-		+	2	+	-	+/+/-		<i>C. jejuni</i>	-	canal
4-5	-	+	-	3	-	-	+/+/+	+	<i>E. coli</i>	-	potable
8-5	-	+	-	4	+	+	+/-/+	-	<i>Salmonella</i>	-	canal
1-6	-	+	-	2	-	+	+/+/+	+	<i>E. coli</i>	-	Potable-canal 50%
5-6	-	+	-	4	-	-	+/-/+	+	<i>E. coli</i>	-	potable
6-6	-	+	-	2	+	+	+/-/+	-	<i>Salmonella</i>	+	canal
7-6	-		+	1	-	-	-/+/-		<i>C. jejuni</i>	-	canal
8-6	-		+	1	-	-	-/+/-		<i>C. jejuni</i>	-	potable
9-6	-	-	-	3	+	+	+/+/+	-	<i>Salmonella</i>	-	potable
1-7	-	+	-	3	-	+	+/-/+	-	<i>Salmonella</i>	-	canal

Continuación del cuadro 3.

Muestra	Tinción de Gram	Lactosa	Oxidasa	TSI	Urea	Citrato	SIM	ONPG	Identificación	PCR	Tipo de agua
5-7	-	-	-	3	-	+	+/-/+	-	<i>Salmonella</i>	-	Potable-canal 50%
7-7	-	-	-	2	-	+	+/-/+	-	<i>Salmonella</i>	+	potable
8-7	-		+	1	-	-	-/+/-		<i>C. jejuni</i>	-	canal
9-7	-	-	-	4	-	+	-/+/+	+	<i>E. coli</i>	-	canal
2-8	-	+	-	2	+	-	+/+/+	-	<i>Salmonella</i>	-	canal
5-8	-	-	-	3	-	+	+/-/+	-	<i>Salmonella</i>	+	potable

Abreviaciones: TSI triple azúcar hierro; ONPG ortonitrophenil beta galactosidasa; SIM producción de H₂S, indol y motilidad.

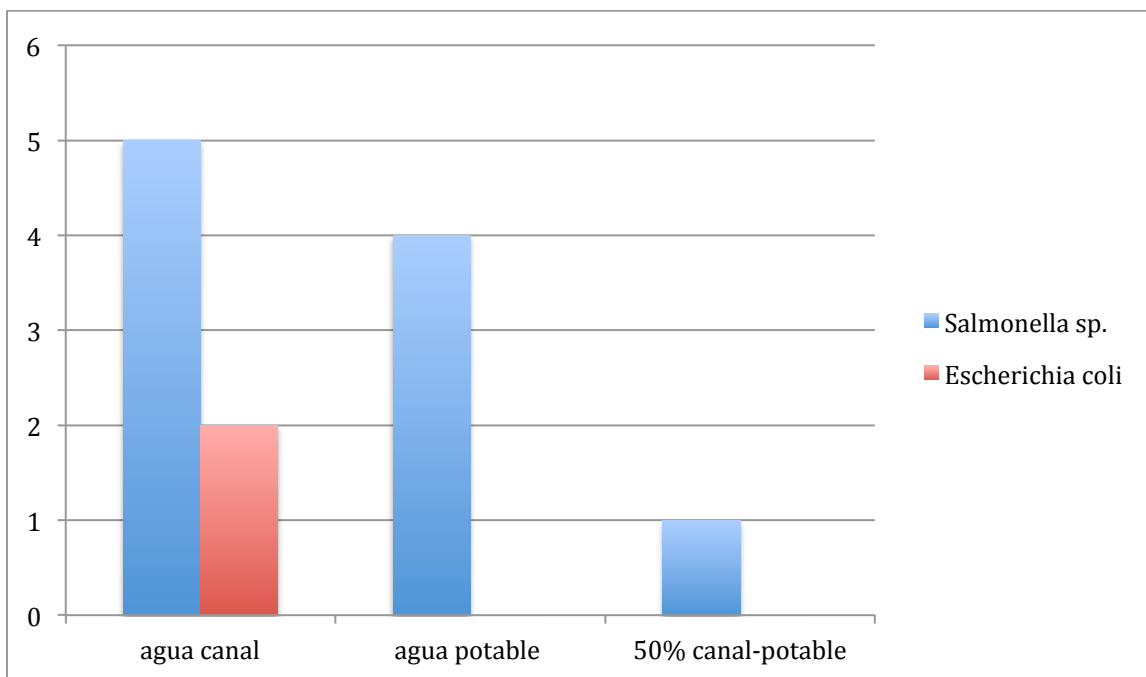


Figura 8. Gráfica de barras comparativa de los resultados positivos a PCR en las diferentes condiciones de agua.

Salmonella spp.

De las 138 cajas de agar que fueron sembradas se obtuvieron 47 colonias de bacterias lactosa negativas. Con estas colonias se realizaron pruebas de bioquímica TSI, SIM, urea y citrato, de las cuales 17 arrojaron resultados positivos a *Salmonella* spp. Posteriormente se efectuó la extracción de ADN de los caldos de cultivo y se realizaron las reacciones de PCR para amplificar *invA*; de las cuales se obtuvieron 10 resultados positivos (**Figuras 9 y 10**).

Al realizar la PCR del gen *ompC* de *Salmonella* las reacciones se corrieron en un mismo gel de agarosa con dos peines diferentes y no se observó ninguna muestra positiva.

Campylobacter jejuni.

De las 138 cajas de agar que fueron sembradas se obtuvieron 29 colonias de bacterias. Se les realizó la extracción de ADN a todas las cajas en las cuales hubo crecimiento bacteriano para poder hacer las PCR. Sin embargo, no se obtuvo ningún resultado positivo de las muestras.

Escherichia coli

De las 138 cajas de agar que fueron sembradas se observaron 75 cajas con crecimiento bacteriano lactosa positivas. A estas colonias, se le realizaron las pruebas de la bioquímica TSI, SIM, urea y citrato, obteniendo 13 de las mismas, con un resultado positivo a *E. coli*. A éstas se les extrajo el ADN y se realizaron las PCR y solo se obtuvieron resultados positivos en 2 casos. Un positivo al fragmento del gen *eaeA* y el otro positivo al fragmento del gen *bfpA* (Figura 11).

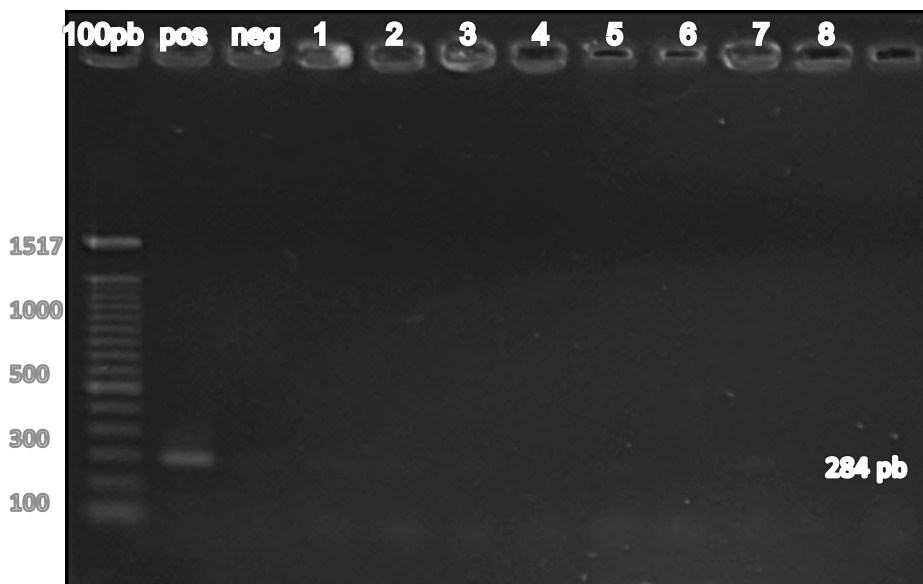


Figura 9. Fotografía del gel de agarosa al 1% en TAE donde se ven las bandas de 284pb positivas al fragmento del gen *invA* de *Salmonella* spp.

Nota: Se obtuvieron 10 muestras positivas al fragmento del gen *invA* de *Salmonella* con 284pb; las cuales se corrieron en dos geles diferentes con los reactivos de PCR realizados con el DNA extraído de las muestras de los ajolotes y en el cual se encuentran de izquierda a derecha en el primer carril el marcador de 100pb, segundo carril un control positivo en el cual se aprecia la banda de 284pb, del tercer carril un control negativo apartir del carril 4 al 11 se cargaron las muestras de los ejemplares muestreados donde se obtuvieron positivos en el carril 1, 2, 3, 5 y 7.

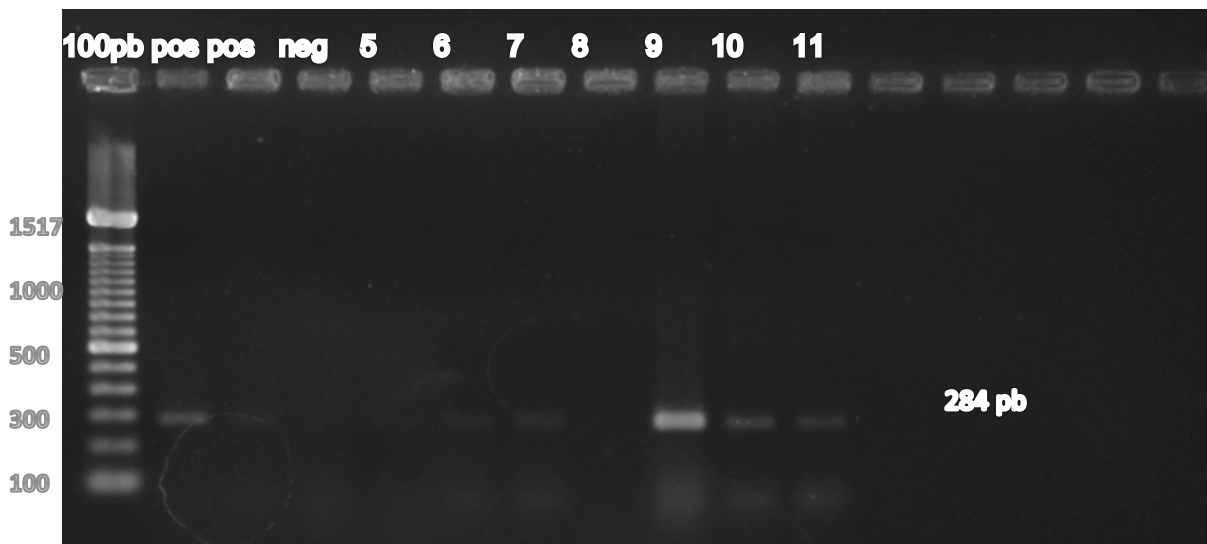


Figura 10. Fotografía del segundo gel de agarosa al 1% en TAE donde se ven las bandas de 284pb positivas al fragmento del gen *invA* de *Salmonella* spp.

Nota: Para el segundo gel del gen *invA* de *Salmonella* se encuentran de izquierda a derecha en el primer carril el marcador de 100pb, en el segundo carril un control positivo en el cual se aprecia la banda de 284pb, en el

tercer carril un segundo control positivo, en el cuarto carril control negativo, y del carril 5 al 12 las muestras tomadas de los ejemplares; los positivos se pueden encontrar en los carriles 6, 7, 9, 10 y 11.

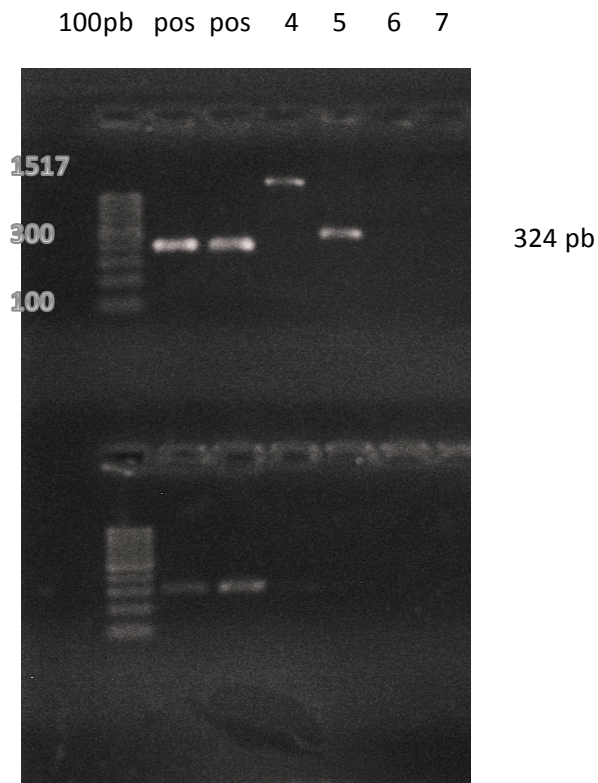


Figura 11. Fotografía del gel de agarosa al 1.5% en TAE del gen *eaeA* y *bfp* de *Escherichia coli*.

Nota: Encontramos en el gel de agarosa en el primer peine, las bandas correspondientes al fragmento del gen *eaeA* en el cual en el carril 1 se observa el marcador de 100 pb, carril 2 control positivo con una banda correspondiente a 324pb, carril 3 control positivo, carril 4 negativo con un bandeo inespecífico, y en el carril 5 el único resultado positivo obtenido; sin embargo las muestras se corrieron del carril 4 al 12. En el segundo peine del gel las bandas correspondientes al fragmento del gen *bfp* en el cual en el carril 1 se observa el

marcador de 100 pb, carril 2 control positivo correspondiente a 324pb, y en el carril 3 el resultado positivo y del carril 4 al 12 las muestras tuvieron resultados negativos.

9. DISCUSIÓN

Con los resultados obtenidos mediante el uso de PCR se demostró la presencia de *Salmonella* spp en 10 muestras; el gen *invA* es altamente específico y conservado dentro del genoma de *Salmonella* (Rahn *et al.* 1992), con lo cual no existe duda de que el producto amplificado en las muestras de *Ambystoma mexicanum* pertenece al género *Salmonella*. Se realizó también la PCR para *Salmonella* spp con el fragmento del gen *ompC*; en este caso todos los resultados de *ompC* fueron negativos. Kraus *et al.* 1991, señalan que *arizonae* es una serovariedad comúnmente encontrada en reptiles. Cabe recordar que en *arizonae*, el gen *ompC* no se encuentra presente (Kwang *et al.* 1996), por lo cual se puede sugerir que la salmonela encontrada en el *Ambystoma mexicanum* puede pertenecer a la serovariedad *Salmonella arizonae*.

La presencia de bacterias como *Salmonella* spp, *Escherichia coli* y *Campylobacter jejuni*, en el ajolote de Xochimilco es un tema muy poco estudiado. Chambers y Hulse en el 2006, realizaron un estudio de *Salmonella* spp en Pennsylvania, donde muestrearon tanto reptiles como anfibios de vida libre, obteniendo como resultado que el 95% de los reptiles fueron positivos a *Salmonella* spp, y solo el 39% de los anfibios, entre los que se encontraron salamandras y ranas. *Salmonella* spp es un patógeno en el humano que usualmente es adquirido por aves de corral o ganado, sin embargo en los animales ectotermos como los reptiles y anfibios también se encuentra presente. Crawshaw en 2003

menciona que mas del 50% de los anuros portan *Salmonella* spp, pero encontrar un anfibio con la enfermedad es raro. Los anfibios pueden tener mas de una serovariedad de salmonelas y por lo regular son resistentes a múltiples antibióticos, la eliminan por vía fecal por lo se ha propuesto que un ambiente acuático facilita la contaminación y su transmisión, aunque el microorganismo puede no reconocerse en los anfibios por la ausencia de signos clínicos (Alworth y Harvey 2007, Wrigth y Whitaker 2001). En India y Estambul se han encontrado a ranas silvestres como portadoras de *Salmonella* Virchow; mientras que *Salmonella* Worthington fue encontrada en renacuajos (Wrigth y Whitaker 2001)

En este mismo sentido, no existe ningún estudio sobre la presencia de *Salmonella* en ajolotes de Xochimilco, ni tampoco hay estudios acerca de *E. coli* y *Campylobacter jejuni* en esta especie. Existen algunos reportes de otro tipo de bacterias en ajolotes de Xochimilco como: *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas cepacia*, *Vibrio fluvialis*, y *Vibrio hollisa*, aislados a partir de abscesos, en riñon y sangre de Ajolotes (Negrete y Romero 1999).

Estas bacterias relacionadas con la calidad del agua se consideran oportunistas, y pueden llegar a ser agentes etiológicos de enfermedades de esta especie (Negrete y Romero 1999). Es de suma importancia mencionar que, aún cuando los ejemplares de este estudio se encontraban en condiciones de sanidad con filtros y recambios de agua constantes, las bacterias estuvieron presentes. Con estos antecedentes, los resultados parecen indicar que las bacterias encontradas en los ajolotes provienen del ejemplar y no del agua en la que se encuentran. Las bacterias que se aislaron de los animales, al parecer no les están causando enfermedad, aún cuando algunos presentaban protuberancias en la cloaca no mostraban ningún otro signo clínico de enfermedad ni cambios en el comportamiento. Sin embargo, si el animal se encuentra en alguna situación de estrés o inmunodepresión donde se reduce la eficacia del sistema inmunológico, las bacterias tienen una mayor

posibilidad de invasión y replicación, aumentando su número pueden ser microorganismos patógenos y causar enfermedades (Negrete y Romero 1999). La presencia de estas bacterias en los ajolotes pueden jugar un papel muy importante desde el punto de vista zoonótico debido al aumento de esta especie como mascota y la importancia epidemiológica que esto conlleva por el manejo que se le da en casa.

Al confirmar la presencia de *E. coli* en esta especie animal es de vital importancia mencionar que Bfp contribuye a la patogenia de EPEC y *eae* es uno de sus factores de virulencia. Lo anterior permite asociar nuevamente a esta especie a un potencial riesgo zoonosario si se le da un manejo inadecuado. Aún cuando las EPEC atípicas son bacterias que se han encontrado solo en mamíferos (Trabulsi *et al.* 2002), en nuestro estudio se obtuvieron 2 resultados positivos de EPEC atípicas, uno por cada gen que se buscó. Estos resultados sugieren que la contaminación del hábitat del ajolote, con el cual los mamíferos llegan a tener contacto, puede ser el origen de esta transmisión hacia los anfibios. En relación a las EPEC típicas, éstas son bacterias que se encuentran sólo en los humanos, por lo tanto, puede entenderse porque no fueron encontradas en este estudio. Estos resultados, aunque limitados, son un indicador de que la alta contaminación del agua puede llegar a afectar la salud de los ajolotes y de cualquier otra especie que se encuentre en contacto con este hábitat incluyendo a los humanos (Trabulsi *et al.* 2002).

Actualmente *Campylobacter jejuni* es una bacteria de gran importancia epidemiológica debido a que es una de las zoonosis de mayor prevalencia en países desarrollados, por la contaminación de alimentos de origen animal (Gutiérrez *et al.* 2008). En Estados Unidos la enfermedad entérica más común es causada por *Campylobacter* seguida de salmonelosis, shigelosis e infecciones por *Escherichia coli* (Altekruse *et al.* 1999). Olarte y Pérez han reportado a *Campylobacter jejuni* como comensal en bovinos, ovinos, perros, gatos y aves silvestres. Todas las especies animales antes mencionadas se encuentran en Xochimilco

como animales de producción, mascotas o en vida libre, por lo que la probabilidad de contaminación del agua en la que vive en ajolote podría llegar a ser alta.

Campylobacter jejuni es una bacteria exigente y a pesar de que dentro del Laboratorio se le proporcionaron todos los ambientadores necesarios para su crecimiento óptimo no se obtuvo ningún resultado positivo.

Se puede asociar un peligro epidemiológico a la transmisión de estos géneros bacterianos al humano (Gutiérrez *et al.* 2000, Vidal *et al.* 2007, Olarte y Pérez 1983), por el manejo que se le da al ajolote de Xochimilco. En un estudio realizado en Chiapas, México se observó que la transmisión de enfermedades entéricas en niños menores de 6 años, se ven influenciadas por la relación madre-hijo por factores como alimentos contaminados, agua potable contaminada y contacto con animales (Riley *et al.* 1990)

Aunque uno de los aspectos clave para poder determinar el estado de salud de las poblaciones de ajolotes es conocer su microbiota, existen muy pocos estudios relacionados con el tema. La mayor parte de las investigaciones en esta especie se enfocan en su biología, reproducción, regeneración, metamorfosis, anatomía y nutrición (González 2006, Casas *et al.* 2004). El poder contar con información sobre los microorganismos que lo podrían llegar a afectar en términos de infecciones bacterianas, es vital para su conservación no solo de las poblaciones silvestres, sino también para los ejemplares en cautiverio como apoyo a las actividades de medicina preventiva dentro de programas de recuperación y crianza en cautiverio. Es por ello indispensable la elaboración de protocolos de bioseguridad en el manejo y la investigación de estos anfibios y sus enfermedades (Robertson 2008).

Por otro lado, es importante mencionar que deben hacerse estudios relacionados a la microbiología del ajolote de Xochimilco, ya que aún no se ha descrito la microbiota de esta especie. Considerando las técnicas moleculares con las que se cuenta hoy en día, el presente estudio constituye un antecedente de que bacterias como *Salmonella* spp. y *E. coli* enteropatógenas se aíslan de los ajolotes de Xochimilco, clínicamente sanos, por lo cual no se conoce con precisión su potencial o papel en infecciones como microbiota o como microbiota transitoria.

10. CONCLUSIONES

I. Los Ajolotes de Xochimilco pueden ser portadores de bacterias como *Salmonella* spp y *Escherichia coli* enteropatógena.

II. El ajolote de Xochimilco, al ser mantenido como mascota, puede ser un factor de riesgo potencial en la transmisión de enfermedades entéricas como la salmonelosis e infecciones por *E. coli* a los humanos, ya que por lo general, no presentan signos de la enfermedad.

III. Las EPEC típicas son bacterias específicas de los humanos y no fueron encontradas en los ejemplares de este estudio.

IV. Las EPEC atípicas son bacterias que solo se había encontrado en mamíferos; sin embargo, en este estudio se detectó una muestra positiva por cada gen estudiado.

- **PROSPECTIVA**

La contaminación ambiental que esta especie de anfibio mexicano enfrenta en su hábitat puede ser un factor de riesgo para su salud; asimismo, el haber aislado bacterias como *Salmonella* spp y EPEC en este estudio, hace necesario que se tome esto como indicador de riesgo a considerar para el aprovechamiento, crianza y actividades de conservación en general del ajolote de Xochimilco.

Se sugieren estudios encaminados en la misma línea ya que es de vital importancia conocer la microbiota potencialmente patógena de las especies de fauna en peligro de extinción, para evitar la emergencia de enfermedades y con ello su extinción.

Con el presente estudio se obtuvo una prevalencia en la presencia de *Salmonella* y *E. coli* en los ajolotes de Xochimilco, con la cual se puede partir para manejar un tamaño de muestra específico para estudios posteriores.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Aguillón Gutiérrez DR, Lazcano Villareal D, Ramírez Romero R, Aguirre Ramos A, Zárate Ramos JJ, Wong González A. Bacterias cloacales y evaluación física de la herpetofauna del Parque Ecológico Chipinque, Ciencia UANL. 2007; 10(2): 168-174.
2. Aguirre AA y Tabor GM. Introduction: Marine vertebrates as sentinels of marine ecosystem health. EcoHealth. 2004; 1(3): 236-238.
3. Aldana González LA. Aislamiento e identificación de bacterias asociadas a procesos patológicos de anfibios y reptiles del laboratorio de herpetología, vivario de la UNAM, México DF. FES Iztacala UNAM, Tesis de Licenciatura, 2003.
4. Altekruze SF, Stern NJ, Fields PI, Swerdlow DL. *Campylobacter jejuni* - An emerging Foodborne Pathogen. Emerging Infectious Diseases. 1999; 5 (1): 28-35.
5. Altman R, Gorman JC, Bernhardt LC. Turtle-associated salmonellosis, the relationship of pet turtles to salmonellosis en children in New Jersey. American Journal Epidemiology. 1972; 95 (6): 518.
6. Alvarez-Romero JG, Medellín RA, Oliveras de Ita A, Gómez de Silva H y Sánchez O. Animales exóticos en México: una amenaza para la biodiversidad. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Instituto de Ecología, UNAM, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2008; 518.
7. Alworth LC y Harvey SB. IACUC Issues Asociated with amphibian research. ILAR J 2007; 48 (3): 278-289. Disponible en: <http://ilarjournal.oxfordjournals.org> Consultado el 10 de abril del 2013.
8. Amphibian ark. agosto 2007.
9. Arrivillaga J, Caraballo V, Medicina de la conservación, Rev Biomed 2009; 20: 55-67. Disponible en www.medigraphic.org.mx. Consultado el 25 de febrero 2012.
10. Blanco J, Blanco M, Blance JE, Mora A, Alonso MP; González EA, Brenárdez Mi. Epidemiology or verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) in ruminants. En: Duffy G, Garvey P, McDowell D (eds), Trumbull, USA. Food & Nutrition Press Inc. 2001; 113-148.
11. Blaustein AR, Romansic JM, Kiesecker JM, and Hatch AC. Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. Divers. Dist. 2003; 9:123–140.
12. Boletín Epidemiológico, disponible en: <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2012/sem15/pdf/cua4.pdf>, consultado el 26 de abril del 2012, publicado el 22 abril del 2012.
13. Briones V, Téllez S, Goyache J, Ballesteros C, Del Pilar Lanzarot M, Domínguez L. and Fernández-Garayzábal JF. *Salmonella* diversity associated with wild reptiles and amphibians in Spain. Environmental Microbiology, 2004; 6: 868–871.
14. Calva JJ, Ruiz-Palacios GM, Lopèz-Vidal AB, Ramos A, Bojalil R. Cohort study of intestinal infection with campylobacter in Mexican children. Lancet. Mar 1988; 5:1(8584): 503-506.

15. Casas Andreu G, Cruz Aviña R, Aguilar Miguel X. Un regalo poco conocido de México al mundo: El Ajolote o Axolotl (*Ambystoma*: Caudata: Amphibia) con algunas notas sobre la crítica situación de sus poblaciones, *Ciencia Ergo Sum*. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México. 2004; 10 (3): 304-308.
16. Chambers DL, y Hulse AC, *Salmonella* Serovars in the Herpetofauna of Indiana County, Pennsylvania, *Appl. Envir. Microbiol.* Mayo 2006; 72: 3771 – 3773.
17. Clarke RC and Gyles CL, *Salmonella*. En Gyles, CL and Thoen Co, editores. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals 2nd ed.* Iowa State University Press. AMES: 1993; 133-153.
18. CONABIO. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 2008, Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/>. Consultado el 17 marzo 2008.
19. CONABIO. Fichas de especies prioritarias. Ajolote Mexicano (*Ambystoma mexicanum*) Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas y Comisión Nacional par el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, DF. 2011
20. Constantino G, Identificación de *Salmonella* spp. En muestras cloacales de quelonios (Tortugas) mantenidas como animales de compañía (Tesis de Licenciatura). México DF: FMVZ-UNAM, 2009.
21. CONVENCIÓN SOBRE EL COMERCIO INTERNACIONAL DE ESPECIES AMENAZADAS DE FAUNA Y FLORA SILVESTRES (CITES), UNEP, 22 MAYO 2009.
22. Crawshaw G. Anurans. En: *Zoo and wild animal medicine*. Fowler y Miller editors. 2003; 782.
23. Daniell SJ, Delahay RM, Shaw RK, Hartland EL, Pallen MJ, Booy F, Ebel F, Knutton S, Frankel G. Coiled-coil domain of enteropathogenic *E.coli* Type III secreted protein EspD is involved in EspA filament-mediated cell attachment and hemolysis. *Infect. Immun.* 2001; 69: 4055-4064.
24. Daszak P, Berger L, Cunningham AA., Hyatt AD., Green D: Earl., Speare Rick. Emerging Infectious Diseases and amphibian population declines, *Emerging Infectious Diseases*. Nov-Dec 1999; 5(6).
25. DeVinney R, Puente JL, Gauthier A, Goosney D, Finlay BB. Enterohaemorrhagic and enteropathogenic *E. coli* use a different Tir-based mechanism for pedestal formation. *Mol. Microbiol.* 2001; 41: 1445-1458.
26. Donnenberg MS. Pathogenic strategies of enteric bacteria. *Nature*. 2000; 406: 768-774.
27. Drasar BS, Hill MJ. Human intestinal flora. London, UK. Academic Press. 1974.
28. Duhon ST. Diseases of Axolots. *Developmental Biology of the Axolotl*. New York, Oxford University Press. 1989.
29. Ecotimes la revista de Ambientum. Reintroducción de especies un sistema cuestionado, junio 2008. Disponible en: <http://www.ambientum.com/revista/2008/mayo/EspeciesIntroducidas.asp>, consultado el 29 octubre 2009.

30. Epstein PR. Biodiversity, Climate change and emerging infectious diseases. En: Conservation Medicine Ecological Health in Practice. Aguirre AA, Ostfeld RS, Tabor GM, House C, Pearl MC editores, 2002; 27-39.
31. Ewing WH, Davis BR, Montagne TS. Studies on the occurrence of *Escherichia coli* serotypes associated with diarrheal disease. Center for disease control. Atlanta GA, 1963.
32. Figueroa Ochoa IM, Verdugo Rodríguez A, Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp, Enero-Marzo 2005; 47(1): 25 – 42.
33. Finlay B y Falkow S. Salmonella as an intracellular parasite. Mol Microbiology. 1989; 3:1833-1841.
34. Fischer SH, and Nachamkin I. Common and variable domains of the flagelin gene flaA, in *Campylobacter jejuni*. Mol. Microbiol. 1991; 5:1151-1158.
35. Fisher MC, Garner TWJ, The relationship between the emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the international trade in amphibians and introduced amphibian species. Fungal Biology Reviews. 2007; 21: 2-9.
36. Frías-Alvarez P, Vredenburg V, Familiar-López M, Longcore J, González-Bernal E, Santos-Barrera G *et al.* Chytridiomycosis survey in wild and captive mexican amphibians, EcoHealth, March 2008; 5 (1).
37. Galán JE. Salmonella interactions with host cells: type III secretion at work. Annu Rev Cell Dev Biol. 2001; 17:53–86.
38. Ginocchio CC, Galán JE. Functional conservation among members of the Salmonella typhimurium InvA family of proteins. Infect Immun. 1995; 63:729-732.
39. Girard F, Batisson I, Frankel GM, Harel J and Fairbrother JM. Interaction of enteropathogenic and Shiga-Toxin producing *Escherichia coli* with porcine intestinal mucosa: role of Intimin and Tir in adherence. Infection and Immunity. 2005; 73: 6011.
40. González Rendón ES, Evaluación in situ del efecto biológico de los metales pesados en el ajolote (*Ambystoma mexicanum*), (Tesis Licenciatura Biología), Facultad de Ciencias- UNAM; 2006.
41. Gossling J, Loesche WJ, Nace GW. Large intestine bacterial flora of nonhibernating and hibernating leopard frogs (*Rana pipiens*). Appl Environ Microbiol. Jul 1982; 44(1): 59-66
42. Gray MJ, Miller DL Hoverman JT. Ecology and pathology of amphibian ranaviruses. Diseases of Aquatic Organisms. 2009; 87 (3): 243–266.
43. Gruenheid S, DeVinney R, Bladt F, Goosney D, Gelkop S, Gish GD, Pawson T, Finlay BB. Enteropathogenic *E. coli* Tir binds Nck to initiate actin pedestal formation in host cells. Nat. Cell Biol. 2001; 3: 856-859.
44. Grupo de Investigación del Ajolote de Xochimilco GIAX, 2007. Disponible en: <http://ajolote.ibiologia.unam.mx/index.htm> Consultado el 19 Enero 2008.

45. Gutiérrez Castillo AC, Paasch Martínez LH, Calderón Apodaca NL. Salmonelosis y campilobacteriosis, las zoonosis emergentes de mayor expansión en el mundo, Vet. Méx. 2008; 39 (1).
46. Gutiérrez-Cogco L, Montiel-Vázquez E, Aguilera-Pérez P, González-Andrade MC. Serotipos de Salmonella identificados en los servicios de salud de México. Salud Pública Méx. 2000; 42(6): 490-495.
47. Gyles CL, Prescott JF. Themes in bacterial pathogenic mechanisms. En: Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO, editors. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 3rd ed. USA:Blackwell Publishing. 2004:3-12.
48. Hartland EL, Daniell SJ, Delahay RM, Neves BC, Wallis T, Shaw RK *et al.* The type III protein translocation system of enteropathogenic *Escherichia coli* involves EspA-EspB protein interactions. Mol. Microbiol. 2000; 35: 1483- 1492.
49. Harvey S, Greenwood JR. Isolation of *Campylobacter fetus* from a pet turtle J Clin Microbiol. Feb 1985; 21(2):260-1.
50. Herrera LS, Saco M, Martínez SA, Silveira L, Echeita A, Usera MA. Molecular characterization of a new serovar of Salmonella bongori 13, 22: z39: isolated from a lizard. Research Microbiol. 2005; 156: 597-602.
51. Hirsh DC. Enterobacteriaceae: Salmonella. In: Hirsh DC, MacLachlan NJ, Walker RC, editors. Veterinary Microbiology. USA: Blackwell Publishing. 2004; 69-74. Disponible en: http://www.biodiversidad.gob.mx/especies/especies_priori/fichas/pdf/ajoloteMexicano.pdf. Consultado el 14 de Agosto de 2012.
52. Hueck CJ. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animal and plants. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998; 62: 379-433.
53. Institute of Medicine. Emerging infections: microbial threats to health in the United States. Washington, DC: National Academy Press, 1992.
54. IUCN 2009. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2009.1. <www.iucnredlist.org>. Consultado el 23 Octubre 2009.
55. Jancovich JK, Jinghe M, Gregory V, Wyatt C, Steven TC, Sudhir K *et al.* Genomic sequence of a ranavirus (family Iridoviridae) associated with salamander mortalities in North America. Virology. November 2003; 316 (1).
56. Kraus A, Guerra BG, Alarcón SD. *Salmonella arizonae* arthritis and septicemia associated with rattlesnake ingestion by patients with connective tissue diseases. A dangerous complication of folk medicine. J Rheumatol. 1991; 18: 1328-1331.
57. Kruse H, Kirkemo AM, Handleland K. Wildlife as source or zoonotic infections. Emerging infectious diseases. Dec 2004; 10 (12): 2067-2072.

58. Kubori T, Matsushima Y, Nakamura D, Uralil J, Lara-Tejero M, Sukhan A, Galán JE, y Aizawa S. Supramolecular Structure of the Salmonella typhimurium Type III Protein Secretion System. Science 1998; 280 (5363), 602-605.
59. Kwang J, Littledike E, and Keen J. Use of the polymerase chain reaction for Salmonella detection. Letters in Applied Microbiology. 1996; 22: 46–51.
60. Libby SJ, Halsey TA, Altier C, Potter J, Gyles CL. Salmonella. En: Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO, editors. Pathogenesis of bacterial infections in animals. USA: Blackwell Publishing. 2004; 143-168.
61. LUW. Living Under World. Introduction to the amphibian order Caudata (or Urodela), salamanders. 2008. Disponible en: <http://www.livingunderworld.org/caudata/> Consultado el 15 Julio 2008.
62. Márquez DG, Martínez BC, Suárez RI. Desiccated rattlesnake capsules: a potential source of gram-negative bacterial infection. Rev Invest Clin. 1991; 43:315-317.
63. Nataro JP and Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*, Clin. Microbiol. Rev. Jan 1998; 11: 142 – 201.
64. Negrete Redondo P. y Romero Jarero JM. Aislamiento de bacterias con infecciones en el cultivo de Ajolote: *Ambystoma mexicanus*. Hidrobiológica. 1999; 9 (1): 9-14.
65. Neidhardt FC. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular Biology. 2nd edition. ASM Press, Washington, 1999.
66. Nikaido H. Outer membrane. En: Neidhardt FC, editor in chief. *E. coli* and *Salmonella* cellular and molecular biology. 2nd edition. USA: ASM Press. 1996; 1:29-47.
67. Nikaido H. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. J. Biol. Chem. 1994; 269:3905-3908.
68. Olarte J, Perez GI. *Campylobacter jejuni* in children with diarrhea in Mexico City, *Pediatr Infect Dis*. Jan-Feb 1983; 2(1): 18-20.
69. Oyofa BA, Thornton SA, Burr DH, Trust TJ, Pavlovsky OR, Guerry P. Specific detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using polimerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 1992; 30: 2613-2619.
70. Pounds JA, Consuegra MP, Fogden PN, Foster KL, Masters R, Puschendorf SR *et al*. Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. Nature. 2006; 439:161–167.
71. Puente JL, Juárez D, Bobadilla M, Arias CF, Calva E. Salmonella ompC gene: structure and use as a carrier for heterologous sequences. Gene. Apr 14 1995; 156(1): 1-9.
72. Pui CF, Wong WC, Chai LC, Tunung R, Jeyaletchumi P, Noor HMS *et al*. Review article *Salmonella*: A foodborne pathogen. International Food Research Journal 2011; 18: 465-473

73. Rahn K, De Grandis SA, Clarke RC, McEwen SA, Galán JE, Ginocchio E *et al.* Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of Salmonella. *Mol Cell Probes.* 1992; 6: 271-279.
74. Rajakaruna RS; Piyatissa PMJR, Jayawardena UA, Navaratne An, Amerasinghe PH. Trematode infection induced malformations in the common hourglass treefrogs. *Journal of Zoology.* May 2008; 275(1).
75. Rebollo Carratto FR. Determinación de la presencia de *Campylobacter jejuni* por PCR en pollos parrilleros en granjas avícolas de Puerto Rico (Maestría en Ciencias). Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario. 2007.
76. Riley LW, Castro Muñoz E, Zárata RJ, Sibbey B, Keller J, Zárata LG, Millán Velasco F, Schoolnik GK. Factores de riesgo de diarrea infantil aguda en una comunidad rural de Chiapas, México. Una Estrategia de intervención. *Bull Pan Am Health Organ.* 1990; 24 (2): 210-216.
77. Rizal A, Kumar A, Sharan Vidyarthi A. Prevalence of pathogenic in *Campylobacter jejuni* Isolated from Poultry and Human. *Internet Journal of Food Safety.* 2010; 12: 29-34.
78. Robertson H, Eden P, Gaikhorst G, Matson P, Salttery T, Vitali S. An automatic waste-water disinfection system for an amphibian captive-breeding and research facility. *Int. Zoo Yearbook.* April 2008; 42 (1).
79. Rodríguez-Angeles G, Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud pública de México.* 2002; 44 (5): 464-475.
80. Romeu Álvarez B, Salazar Jiménez P, Lugo Moya D, Rojas Hernández NM, Eslava Campos CA. Susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos de *Escherichia coli* procedentes de ecosistemas dulceacuícolas. *Rev Cubana Med Trop [revista en la Internet].* Ago 2012; 64(2): 132-141. [citado 2012 Nov 01].
81. Ruckdeschel G, Heuschmann-Brunner G. *E. coli* serotype 078:K80 (B):H--in a green iguana (*Iguana iguana L.*), *Zentralbl Veterinarmed B.* 1971 Jun;18(4):270-3.
82. Ruiz-Palacios GM. The Health Burden of *Campylobacter* Infection and the Impact of Antimicrobial Resistance: Playing Chicken. *Clin Infect Dis.* 2007; 44(5): 701-703.
83. Saggese MD, Medicina de la conservación, enfermedades y aves rapaces, Hornero 2007; 22(2):117-130.
84. Santoro M, Hernández G, Caballero M. Aerobic bacterial flora of nesting green turtles (*Chelonia mydas*) from Tortuguero National Park, Costa Rica. *J Zoo Wildl Med.* Dic 2006;37(4):549-52.
85. Santos Barrera G, Pacheco J, Ceballos G. Áreas prioritarias para la conservación de los reptiles y anfibios en México. *Boletín Bimestral de la Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. Biodiversitas.* Noviembre de 2004; 57.
86. Sanyal D, Douglas T, Roberts R. Salmonella infection acquired from reptilian pets. *Arch. Dis. Child.* 1997; 77(4): 345-346.

87. Semarnat, 3er informe de trabajo de la secretaria de Medio Ambiente, Octubre 2009. Disponible en: <http://www.sma.df.gob.mx/sma/index.php?opcion=26&id=616> Consultado el 22 octubre 2009.
88. Servin Zamora Erika. Manual de mantenimiento en cautiverio y medicina veterinaria aplicada al ajolote de Xochimilco, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM, Tesis de Licenciatura, 2011.
89. Solis AJ, Sandoval BH, Perez-Vega CM, Mazari-Hiriart. Irrigation water quality in southern Mexico City based on bacterial and heavy metal analyses. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B. 2006.
90. Thomas AD, Forbes-Faulkner JC, Speare R and Murray C. Salmonellosis in wildlife from Queensland. Journal of Wildlife Diseases. 2001; 37(2):229-235.
91. Thomas CD, Cameron A, Green RE, Bakkenes M, Beaumont IM, Collingham C *et al.* Extinction risk from climate change. Nature. 2004; 427:145–148.
92. Trabulsi LR, Keller R, Tardelli Gomes TA. Emerging Infectious Diseases. May 2002; 8(5): 508-513.
93. Tyler MJ, Wassersug R, Smith B. How frogs and humans interact: Influences beyond habitat destruction, epidemics and global warming. Applied Herpetology. 2007; 4(1): 11.
94. Uribe García A. Aislamiento y caracterización de bacterias patógenas en el Ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*), Instituto de Biología, FES- Iztacala, UNAM, 2002.
95. Varela G, Vignoli R, Ingold E, Gadea P, Calvelo E, Grotiuz G *et al.* Beta-lactamasa de espectro expandido (BLEE) tipo PER- 2 encontrada en cepas de *Escherichia coli* enteropatógeno (EPEC) involucradas en un brote intrahospitalario de diarrea infantil. Presentado en el 5° Encuentro Nacional de Microbiólogos. Sociedad Uruguaya de Microbiología. Montevideo Libro de resúmenes, 30 de Noviembre de 2001.
96. Vidal JE. *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC): Una causa frecuente de diarrea infantil. Salud en Tabasco. Abril 2003; 9(1).
97. Vidal JE, Canizález-Román A, Gutiérrez-Jiménez J, Navarro-García F. Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. Salud Publica Mex. 2007; 49:376-386.
98. Woodward D, Khakhria R, Johnson W. Human salmonellosis associated with exotic pets. J Clin Microbiol. 1997; 35: 2786-2790.
99. Wright y Whitaker. Amphibian medicina and captive husbandry. Editor Krieger Publishig Company. 2001; 170-171.
100. Young KT, Davis LM, Dirita VJ. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. Nature Reviews Microbiology. September 2007; 5, 665-679.

101. Zambrano L, Mosig P, McKay J, Griffiths R, Shaffer B, Flores-Villela O *et al.* *Ambystoma mexicanum*, 2006. En: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.2. Disponible en: <www.iucnredlist.org>. Consultado el 14 Julio 2010
102. Zambrano L, Reynoso VH y Herrera G. Abundancia y estructura poblacional del axolotl (*Ambystoma mexicanum*) en los sistemas dulceacuicolas de Xochimilco y Chalco. Unpublished report, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Base de datos SNIB-Conabio, proyecto AS004 Ciudad de México, 2004.
103. Zippel KC, Mendelson III JR. The amphibian extinction crisis: A call to action. *Herpetological Review*. 2008; 39 (1), 23-29.