



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN**

**“DETECCIÓN DE *Escherichia coli* PRODUCTORA DE TOXINA DE SHIGA EN REPTILES DEL  
HERPETARIO REPTILIUM DEL ZOOLOGICO DE ZACANGO Y EN EL HERPETARIO DE LA  
UNIVERSIDAD DE PUEBLA”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

**PRESENTA:**

**GABRIELA ESCALANTE MENDOZA**

**ASESOR: DR. GUILLERMO VALDIVIA ANDA**



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

I RESUMEN.....	1
II INTRODUCCIÓN.....	2
II I ANTECEDENTES.....	10
IV JUSTIFICACIÓN.....	10
V OBJETIVOS.....	12
VI MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
VII RESULTADOS.....	17
VIII DISCUSIÓN.....	30
IX CONCLUSIÓN.....	35
X BIBLIOGRAFÍA.....	36

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Propiedades Bioquímicas de <i>Escherichia coli</i> .....	3
Cuadro 2 Características de los diferentes grupos de <i>E. coli</i> .....	4
Cuadro 3 Reactivos empleados para una reacción total de 23 µl.....	14
Cuadro 4 Secuencia de los iniciadores utilizados para la Técnica de PCR.....	14
Cuadro 5 Cepas de <i>Escherichia coli</i> utilizadas como referencia en la técnica de PCR.....	15
Cuadro 6 Parámetros del termociclador para PCR múltiplex.....	15
Cuadro 7 Individuos muestreados en el Herpetario Reptilium y la Universidad de Puebla.....	17
Cuadro 8 Aislamientos de <i>Escherichia coli</i> y estado de salud de los animales muestreados por locación.....	18
Cuadro 9 Bacterias aisladas por individuo en ambas locaciones.....	20
Cuadro 10 Frecuencia de las cepas identificadas mediante pruebas bioquímicas.....	22
Cuadro 11 Frecuencia de biotipos encontrados en cepas de <i>Escherichia coli</i> .....	25
Cuadro 12 Genotipos encontrados mediante la técnica de PCR individual.....	26

Cuadro 13 Frecuencias de los genotipos encontrados mediante la técnica de PCR.....	28
Cuadro 14 Aislamientos de cepas de <i>Escherichia coli</i> obtenidos a partir de heces.....	29

#### ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Theodor Escherich.....	2
Figura 2 Mecanismos de patogénesis de las seis categorías reconocidas de <i>E. coli</i> diarreagénicos.....	5
Figura 3 Mecanismo de transmisión de <i>E. coli</i> .....	6
Figura 4 Electroforesis de los amplificadores por PCR multiplex de las cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas de reptiles.....	25
Figura 5 Electroforesis de los amplificadores por PCR individual correspondientes al gen <i>stx1</i> .....	27
Figura 6 Electroforesis de los amplificadores por PCR individual correspondientes al gen <i>stx2</i> .....	27
Figura 7 Electroforesis de los amplificadores por PCR individual correspondientes al gen <i>eae</i> .....	28

#### ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Resultado de la identificación bioquímica de las cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas.....	23
---	----

## ABREVIATURAS

<b>STEC</b>	<b><i>Escherichia coli</i> productora de toxina de Shiga</b>
<b>EHEC</b>	<b><i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica</b>
<b>SUH</b>	<b>Síndrome Urémico Hemolítico</b>
<b>CH</b>	<b>Colitis hemorrágica</b>
<b>Stx</b>	<b>Toxina de Shiga</b>
<b>stx</b>	<b>Gen toxina de Shiga</b>
<b>eae</b>	<b>Gen codificador de la intimina</b>
<b>TAE 1X</b>	<b>Tris, acetato, EDTA</b>
<b>PCR</b>	<b>Reacción en cadena de la polimerasa</b>
<b>MR</b>	<b>Rojo de Metilo</b>
<b>VP</b>	<b>Vogues-Proskauer</b>
<b>H<sub>2</sub>S</b>	<b>Ácido Sulfídrico</b>

## I. RESUMEN

Actualmente es posible tener acceso a muchas especies “no convencionales” debido a la facilidad para adquirirlas. Se sabe que los reptiles como otras mascotas o animales de compañía pueden ser portadores de múltiples microorganismos. El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de *Escherichia coli* productora de toxina de Shiga en reptiles y establecer su posible papel zoonótico.

Se muestrearon 56 reptiles, ofidios en su mayoría; 38 de ellos en el herpetario del Zoológico de Zacango y 18 más en el herpetario de la Universidad Autónoma de Puebla. Se obtuvieron un total de 248 cepas bacterianas a partir de heces, mediante pruebas bioquímicas 23 de ellas fueron identificadas como *Escherichia coli* lo que represento una frecuencia del 9%. Estas cepas fueron sometidas a la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para determinar la presencia de los genes de virulencia *stx1*, *stx2* y *eae* obteniéndose 16 cepas (69.5%) positivas a alguno de los tres genes.

Se observó también que existen muchas deficiencias en las condiciones en las que se mantiene a estos animales, lo que favorece la presencia o intercambio de agentes patógenos entre los animales y hacia los humanos. En este trabajo se destacó la importancia de realizar una historia clínica completa que permita al médico veterinario conocer las condiciones clínicas en las que se encuentran estos animales.

## II. INTRODUCCIÓN

*Escherichia coli* fue descrita por primera vez en 1885 por Theodore Von Escherich, bacteriólogo alemán, quién la denominó inicialmente como *Bacterium coli commune*, también denominados *Bacillus coli communis*.

**Figura 1** Theodor Escherich



Durante algunos años el término *Bacterium* fue utilizado para describir el amplio grupo de bacilos Gram-negativos que se encuentran en el tracto intestinal del hombre y de los animales, en las plantas y en la tierra y que tienen una existencia saprófita, comensal o patógena. (Bell 1998)

### **Género *Escherichia***

El Género *Escherichia*, un miembro de la familia Enterobacteriaceae está compuesto por diferentes especies: *Escherichia blattae*, *Escherichia fergusinii*, *Escherichia hermannii*, *Escherichia vulneris* y *Escherichia coli*. Esta última es la de mayor importancia clínica, debido no sólo a que forma parte de la flora habitual del intestino sino porque, además, agrupa a diversas cepas que causan padecimientos extraintestinales y a otras que destacan entre los principales agentes etiológicos del síndrome diarreico. Se conoce también que *E. hermannii* y *E. vulneris* ocasionan infecciones de heridas y de que *E. fergusonii* ha empezado a relacionarse con ciertas patologías entéricas. (Songer y col 2005)

## Principales características de *Escherichia coli*

*Escherichia coli* es un microorganismo Gram-negativo anaerobio, generalmente móviles habitualmente dotada de flagelos peritricos y a menudo también de fimbrias. Producen gas a partir de la glucosa, la arabinosa, y habitualmente de la lactosa y otros azúcares. Producen reacción positiva de rojo de metilo, y negativa de Vogues-Proskauer. Son incapaces de crecer en medio con citrato como única fuente de carbono y energía, pero sí en caldo acetato. Son H<sub>2</sub>S y ureasa negativos, son indol positivos y decarboxilan la lisina (cuadro 1). Al fermentar la lactosa dan lugar a colonias de color rosado en el medio de McConkey. Algunas cepas producen colonias con brillo metálico en el medio eosina-azul de metileno, y otras producen hemólisis en agar sangre. (Jawetz y col 1999; PJ Quinn y col 2004; Margall y col 1997)

**Cuadro 1** Propiedades Bioquímicas de *Escherichia coli*

Motilidad	(+)
Citrato	-
MR	+
VP	-
Gas a partir de Glucosa	+
Indol	+
Urea	-
H <sub>2</sub> S	-
Descarboxilación de la lisina	(+)
Sorbitol	-

- Símbolo + cepas positivas 99 a 100%
  - Símbolo – cepas negativas 75 a 89%
  - Símbolo (+) cepas positivas 76 a 89%
- (Bergey, 1984; Jawetz 1999)

## Clasificación de *Escherichia coli*

Existen cepas de *E. coli* capaces de producir un amplio espectro de enfermedades, entre ellas infección urinaria, septicemia, meningitis o enfermedad diarreica. Se han determinado varios tipos de *E. coli* enteropatógenas, basándose en diferentes factores de virulencia: (Songer y col 2005; Jawetz y col 1999; López y col 2002)

- *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC)
- *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC)
- *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC)
- *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC o STEC)
- *Escherichia coli* enteroagregativa (EAaggEC)
- *Escherichia coli* difusamente adherente (DAEC)

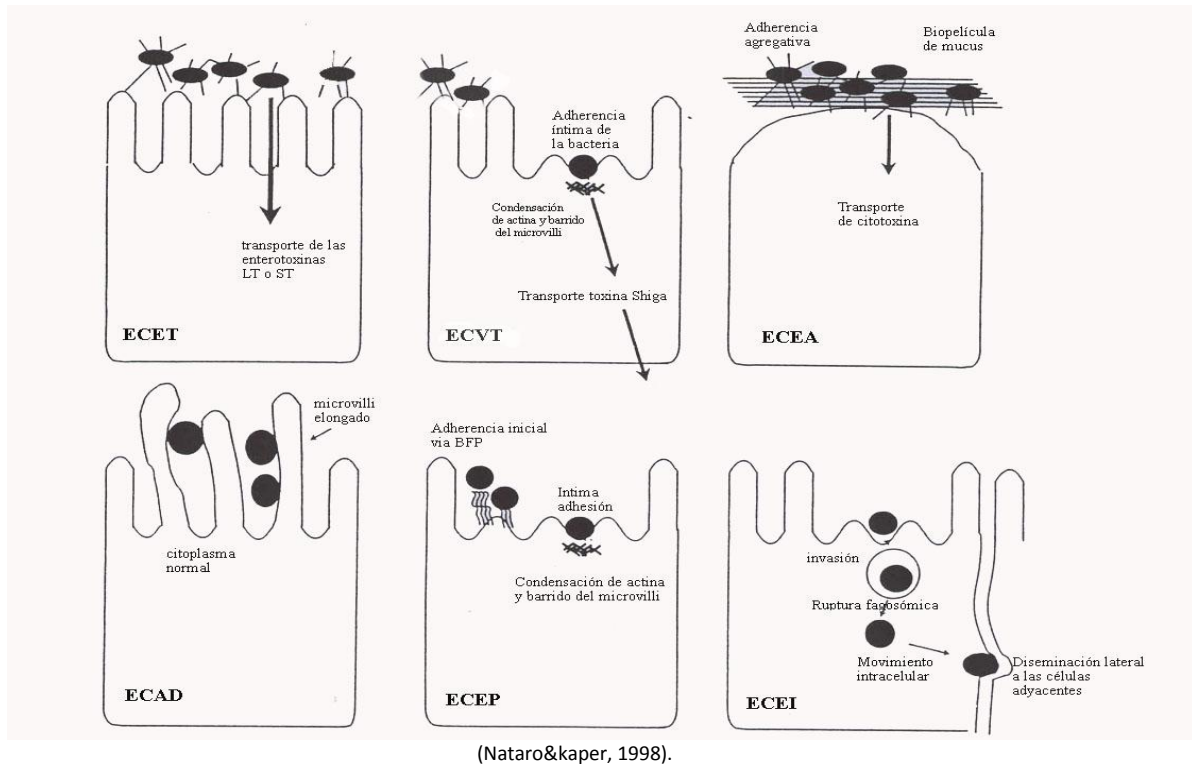


**Cuadro 2** Características de los diferentes grupos de *E. coli*

<b>Grupo de <i>E. coli</i></b>	<b>Mecanismo patogénico</b>	<b>Tipo de diarrea</b>	<b>Epidemiología</b>
<b>Enteropatógena (EPEC)</b>	Desconocido. Asociado a lesiones de borrado de las microvellosidades de los enterocitos.	Diarrea líquida con moco. Vómitos. Fiebre.	Frecuente en países desarrollados. Frecuente en niños menores de 2 años.
<b>Enteroinvasiva (EIEC)</b>	Invasión de la mucosa, como las Shigelas.	Diarrea disenteriforme (moco y sangre). Dolor abdominal. Fiebre.	Frecuente en países subdesarrollados. Generalmente son casos de diarrea “del viajero” o de origen alimentario.
<b>Enterotoxigénica (ETEC)</b>	Producción de enterotoxinas: termolábil (LT) y termoestable (ST).	Diarrea líquida profusa. Náuseas.	Frecuente en países subdesarrollados. Generalmente son casos de diarrea de origen alimentario por alimentos importados.
<b>Enterohemorrágica (EHEC)</b>	Borramiento de las microvellosidades de los enterocitos y producción de verotoxinas (VT).	Diarrea sanguinolenta sin fiebre. Síndrome urémico hemolítico.	Frecuente en países desarrollados.
<b>Difusamente Adherente (DAEC)</b>		Diarrea acuosa Persistente.	
<b>Enteroagregativa (EAaggEC)</b>	Necrosis de las microvellosidades, acortamiento de las vellosidades intestinales. Producción de hemolisina termolábil	Diarrea acuosa.	Causa enfermedad en niños inmunológicamente no desarrollados o malnutridos.

(Tomado y modificado de Margall y col 1997; Mattar y col 2001; Bell 1998; Glen y col 2005; Quinn y col 2004)

**Figura 2** Mecanismos de patogénesis de las seis categorías reconocidas de *E. coli* diarregénicos.



### ***Escherichia coli* STEC o EHEC**

El reconocimiento de ECEH surgió a partir de 2 importantes hallazgos; el primero fue realizado por Riley en 1983, después de llevar a cabo el análisis de 2 brotes epidemiológicos en los que la enfermedad se caracterizaba por severos dolores y calambres abdominales, acompañados por diarrea acuosa y seguidos por evacuaciones muy sanguinolentas y una fiebre ligera o inexistente; el cuadro se clasificó como colitis hemorrágica (HC) y se asoció a la ingestión de hamburguesas mal cocidas. Los coprocultivos practicados a los pacientes resultaron en el aislamiento de una cepa de *E. coli* perteneciente al serotipo O157:H7. En ese mismo año Karmali y cols. reportaron casos esporádicos de síndrome urémico hemolítico (HUS) en los que se detectaba una citotoxina y la presencia de *E. coli* ambas en la materia fecal de los enfermos. El HUS, definido por la aparición de una tríada de signos clínicos: falla renal, trombocitopenia y anemia hemolítica, ya se conocía en esa época, en la que también se sabía que era precedido por una diarrea sanguinolenta indistinguible de colitis hemorrágica. Las cepas pertenecientes al grupo EHEC o STEC producen las verotoxinas VT1 y VT2 así denominadas por su efecto citopatogénico sobre células Vero. Se denominan también *Shiga-like toxins* (SLTs) por su similitud en cuanto a estructura, función y antigenicidad a la toxina Shiga sintetizada por

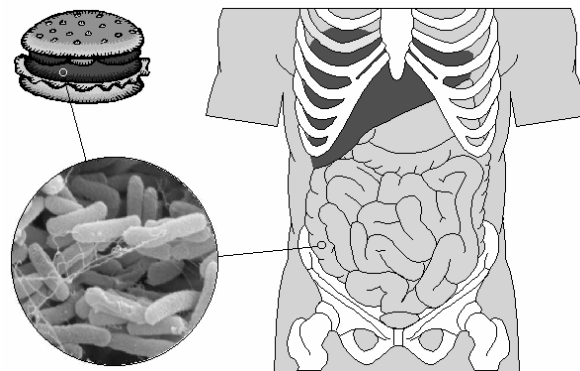
*Shigella dysenteriae* tipo I, también llamadas Shiga toxins (Stx). (Donnenberg 2002; PJ Quinn y col 2004; Mattar y col 2001)

ECEH es la única categoría de *E coli* diarreogénicos que es considerada una zoonosis. Estas cepas tienen la capacidad de producir diarrea acuosa, colitis hemorrágica (CH) y síndrome urémico hemolítico (SUH) en humanos. La virulencia potencial para los humanos se confirma mediante la demostración de la producción de verocitotoxina mediante ensayo en células Vero o por demostración de los genes que codifican la verocitotoxina mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). (Dwight 2004; OIE 2004; Salim 2000)

### **Mecanismo de transmisión de STEC o EHEC**

El contagio al hombre se debe frecuentemente al consumo de alimentos cárneos y lácteos contaminados, deficientemente cocidos o sin pasteurizar, o al contacto directo con los animales o con sus heces, consumo de agua, frutas ó verduras contaminadas y de persona a persona por vía oral-fecal. (Bravo 2007 y col 2007; Bell 1998)

**Figura 3** Mecanismo de transmisión de *E. coli*.



### **Factores de virulencia de STEC o EHEC**

Se conocen varios factores relacionados con la patogenicidad de EHEC entre los que destacan la producción de las toxinas de Shiga.

#### **Toxinas de Shiga**

La Stx constituye el principal factor de patogenicidad y la característica distintiva de ECEH. Estas toxinas son proteínas multiméricas compuestas por dos polipéptidos, un pentámero de adhesión formado por cinco subunidades B y una subunidad A. Una vez fijada a su receptor a través de la subunidad B, las Toxinas de Shiga son internalizadas dentro de las células blanco (endoteliales, epiteliales y hematíes que presentan en su membrana el

grupo glicolipídico P1) por un mecanismo de endocitosis. La subunidad A libera un fragmento A1 cuya actividad catalítica resulta en un bloqueo irreversible de la síntesis proteica. La secuencia de la toxina Stx1 está altamente conservada, mientras que existe variación en las secuencias de Stx2, resultando en numerosas variantes. (Rivero y col 2004)

Estructura y genética.

Las toxinas Stx contiene 2 miembros principales que no cruzan inmunológicamente, denominados Stx1 y Stx2; una misma cepa puede sintetizar uno de ellas o ambas, e inclusive múltiples variantes de Stx2. Las variantes de Stx2 han recibido los nombres de Stx2c, Stx2v, Stx2vhb, Stx2e, etc. (Kaper 1998)

La estructura A-B se encuentra conservada en toda la familia Stx. La subunidad única A puede ser escindida proteolíticamente, produciendo un fragmento A1 de 28 kDa, y otro (A2) de 4 kDa, los cuales previo a la ruptura correspondiente permanecen juntos a través de un puente disulfuro. (Michaels 2002)

Además, el péptido A1 es el que posee la actividad enzimática en tanto que, el A2, es responsable de la unión de la subunidad A al pentámero que integra la subunidad B; dicho pentámero se fija a la célula "blanco", particularmente a su receptor específico, el Gb3, un glicopéptido que se encuentra en la superficie de las células epiteliales. Una vez que la toxina se ha fijado a su receptor, es endocitada y transportada al aparato de Golgi y, posteriormente, hasta el retículo endoplásmico rugoso. Finalmente, la subunidad A pasa al citoplasma de la célula, en donde ejerce su acción sobre la subunidad ribosomal 60S; específicamente, el péptido A1 corresponde a una N glucosidasa que elimina un solo residuo de adenina del RNA 28S de los ribosomas, con lo cual inhibe la síntesis proteica. El bloqueo de la síntesis proteica conduce a la muerte de las células endoteliales del riñón, de las células epiteliales del intestino y, desde luego, de las HeLa, Vero o de cualquiera otra que presente el receptor Gb que corresponda. (Rivero y col 2004)

Además de la producción de Toxinas de Shiga, ECEH presenta otros factores de virulencia. Uno de ellos es el gen *eae* asociado a la adherencia íntima de las bacterias a los enterocitos y destrucción de microvellosidades (fenómeno de "attaching and effacing" A/E). (Michaels 2002)

Gen *eae*

El gen *eae* produce un fenómeno de adherencia al enterocito (attaching and effacing) ó adherencia y borrado, Esta lesión se caracteriza por la destrucción de las microvellosidades de la membrana, la adherencia íntima de la bacteria al epitelio

intestinal. (Giugno y col 2007; Sánchez y col 2006). Este proceso está codificado por un conjunto de genes típicos de EPEC y STEC, contenidos en una región cromosomal denominada LEE o locus de borrado del enterocito. (Rivero y col 2004)

El gen *eae* presenta dos subunidades: la *eaeA* y la *eaeB*. Por lo que respecta a la primera, ésta es necesaria (aunque insuficiente) para producir la lesión A/E en los enterocitos y al parecer, codifica para la intimina - una proteína de membrana externa (OMP) de 97 kDa. En cuanto a la *eaeB*, ésta codifica para la secreción de una proteína de 37 kDa, la cual está implicada en el mecanismo disparador de la transducción y fosforilación de la tirosina en la célula hospedero. (Welinder-Olson y col 2005; Donnenberg y col 1993)

## **PATOGÉNESIS DE LA INFECCIÓN EN HUMANOS**

### **Síndrome Urémico Hemolítico**

El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) es una enfermedad considerada multisistémica se caracteriza por presentar insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica, trombocitopenia grave y manifestaciones de lesión isquémica en otros órganos como sistema nervioso central, retina, miocardio e intestino. (Córdoba y col 2007)

El Síndrome ocurre predominantemente en niños entre los 6 meses y los 5 años de edad (Rivero y col 2004) y es la causa más común de falla renal aguda. (Matar y col 2001). Se estima que aproximadamente el 10 % de las infecciones por *E. coli* productor de verotoxinas, en niños menores de 10 años, evolucionan hacia el SUH. (Jaime y col 2003) Muchos pacientes con SUH presentan un pródromo típico con dolor abdominal diarrea acuosa y/o sanguinolenta y enfermedad de las vías aéreas superiores. Pueden asociarse vómitos y fiebre. (Rivero y col 2004, Córdoba y col 2007).

### **Fisiopatología**

La patogénesis del SUH es compleja, y la enfermedad se atribuye en especial al efecto citotóxico por inhibición de la síntesis proteica que producen toxinas proteicas tipo Shiga (STXs), principales factores de virulencia de las cepas STEC. Estas bacterias proliferan en la luz del colon del huésped y no invaden la mucosa, pero producen exotoxinas que ingresan al medio interno, se ligan a receptores en las células endoteliales, renales o neurales, son incorporadas a las mismas y ejercen su efecto patogénico a nivel del ribosoma eucariota. (Rivas y col 2006)

En los vasos sanguíneos se produce ulceración endotelial, con depósito de fibrina, las plaquetas se activan y adhieren a dicho sitio, generando trombosis y alteración de la función del órgano blanco. Principalmente, se afectan intestino, riñón y SNC. Se observa caída del filtrado glomerular debido a la microtrombosis, llevando a la retención de urea, creatinina, ácido úrico y fosfatos. Debido al consumo de plaquetas se produce trombocitopenia, con aparición de hemorragias espontáneas. La interacción endotelial-plaquetaria y el reclutamiento de leucocitos polimorfonucleares agrava aún más el daño endotelial. Se produce anemia hemolítica debido a la destrucción de los glóbulos rojos en la sangre al circular por los vasos dañados. (Rivero y col 2004; Chamorro 2009)

Las lesiones más llamativas se encuentran en el riñón y afectan fundamentalmente a los capilares glomerulares en forma focal y segmentaria. El endotelio está tumefacto y existe un espacio claro subendotelial. En las áreas de mayor agresión endotelial se comprueba el depósito de fibrina. Estas lesiones pueden acompañarse de necrosis fibrinoide y trombosis de arteriolas y arterias de mediano calibre. En este caso la confluencia de áreas de infarto conduce a la necrosis cortical renal bilateral. Lesiones de microangiopatía con necrosis tisular se encuentran además en la pared del colon, en el encéfalo, miocardio, páncreas, adrenales, piel, pulmones y en menor escala en otros órganos. (Córdoba y col 2007; Rivero y col 2004)

### III. ANTECEDENTES

*Escherichia coli* se ha aislado de heces de muchos animales incluidos ovejas, cabras, cerdos, gatos, perros, pollos y aves silvestres. Se ha ubicado a los bovinos como principal reservorio de las cepas que a su vez infectan a los humanos (OIE 2004) sin embargo también es posible encontrar poblaciones de *E. coli* en vertebrados poiquilotermos. (Souza 2000).

Las enfermedades bacterianas en reptiles son el principal factor de enfermedad o muerte. (Fontanillas y col 1999) Muchos de los microorganismos que conforman la flora gastrointestinal de los reptiles se consideran como patógenos oportunistas entre los cuales se encuentra *Escherichia coli*. Esta bacteria se ha aislado de animales de vida libre y en cautiverio, tanto clínicamente sanos como enfermos. (Mitchel y col 2005; Fowler y col 2001)

La mayoría de los agentes aislados de reptiles enfermos son organismos Gram-negativos, incluidos *Pseudomonas spp.*, *Aeromonas spp.*, *Proteus spp.*, y *Klebsiella spp.* Los sistemas mayormente afectados por estos patógenos son el tracto respiratorio, gastrointestinal, reproductivo y el sistema tegumentario. (Schumacher 2006). Infecciones como estomatitis y enteritis son comunes en reptiles mantenidos en cautiverio *Escherichia coli* se ha aislado de la cavidad oral, estómago y cloaca de individuos afectados por estos padecimientos (Mitchel y col 2005; Jacobson 2007).

Cabe señalar que existe una gran variedad de bacterias que se localizan en la cavidad oral de los reptiles como *Serratia spp.*, *Providencia spp.*, *Citrobacter spp.*, *Campylobacter spp.*, *Proteus spp.*, *Bacteroides spp.* y *Pseudomonas spp.*, las cuales son causa de numerosas infecciones en el hombre. (Carriquiriborde 2010).

### IV. JUSTIFICACIÓN

Debido a las características particulares de las especies “exóticas” o no convencionales, existen algunos factores importantes que aumentan el riesgo potencial de adquisición de enfermedades a partir de ellas, ya que muchos de estos animales aún son capturados de poblaciones en vida libre para su venta. (Yarto y col 2000) La popularidad de los reptiles produjo un incremento considerable en la utilización de éstos como mascotas; las tortugas terrestres y acuáticas son las más comunes, pero las iguanas y ofidios son también criados frecuentemente en los hogares. Los reptiles en cautiverio son más vulnerables a estar colonizados por microorganismos zoonóticos que los que se encuentran en estado silvestre. Los agentes infecciosos involucrados en zoonosis pueden ser transmitidos a través de distintos mecanismos: contacto directo, ingestión, inhalación, arañazos o mordeduras. Algunos de ellos son *Aeromonas spp.*, *Klebsiella spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Clostridium spp.*, *Bacteroides spp.* y *Pasteurella spp.* (Carriquiriborde 2010; Fowler y col 2001).

Cabe señalar que en la bibliografía solo se encontró un trabajo previo que investiga la presencia de *E. coli* STEC en reptiles.



## **V. OBJETIVOS**

### **Objetivo generales**

Detectar la presencia de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) productora de Toxina de Shiga en reptiles del Herpetario del Zoológico de Zacango y en el Herpetario de la Universidad de Puebla.

### **Objetivos particulares.**

- Determinar la presencia de *Escherichia coli* en heces de reptiles mantenidos en cautiverio mediante cultivos bacteriológicos.
- Determinar la presencia de los genes *stx1*, *stx2* y *eae* mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa.
- Establecer la relación entre la presencia de *Escherichia coli* en heces y el estado de salud de los reptiles por medio de la historia clínica.

## **VI. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Obtención de las muestras**

En este estudio se trabajo con 56 reptiles adultos pertenecientes a dos colecciones. Para la obtención de las heces se introdujo un hisopo estéril directamente en la cloaca de los reptiles, posteriormente se transportaron al laboratorio en caldo nutritivo, obteniéndose un total de 56 muestras.

Todas las muestras fueron sembradas mediante la técnica Americana en agar Eosina Azul de Metileno (EMB) y agar MacConkey, se incubaron en estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas, posteriormente se seleccionaron al azar 5 colonias, las cuales se purificaron en agar nutritivo mediante estría continua con las mismas cosntantes de incubación, una vez obtenidas colonias aisladas se realizó la identificación bioquímica.

Las cepas se identificaron para su manejo con las siglas GEM (Gabriela Escalante Mendoza) seguidas de un número que refiere el orden en el que se obtuvieron y trabajaron.

A las cepas obtenidas se les realizaron las siguientes pruebas: (OIE 2004).

- a) Pruebas primarias: Tinción de Gram, Catalasa y Oxidasa
- b) Pruebas secundarias: Urea, Citrato de Simmons, Sorbitol (base caldo rojo de fenol adicionado con 3% de D-sorbitol), Rojo de Metilo y Voges Proskauer (MR-VP).
- c) Pruebas múltiples: Movilidad Indol Ornitina (MIO), Triple Hierro Azúcar (TSI) y Lisina Hierro Agar (LIA).

### **Caracterización de factores auxiliares de virulencia por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Las cepas aisladas e identificadas como *Escherichia coli* se sembraron en agar soya Trypticaseína en caja de Petri mediante estría continua, se incubaron a 37° C durante 24 hrs. Posteriormente se coloco 1 ml de agua estéril en un tubo Eppendorf al cual se le agregó con la ayuda de un asa de inoculación el cultivo obtenido de cada cepa. Los tubos Eppendorf se colocaron en baño María a ebullición por 10 minutos, esto con la finalidad de obtener la lisis celular, seguido de lo cual se colocaron en hielo durante 10 minutos, pasado este tiempo se centrifugaron (BIO-RAD Mod 16K microcentrifuge™) a 14000rpm durante 2 minutos. (OIE 2004).

En un tubo Eppendorf se mezclaron los reactivos mostrados a continuación en el cuadro 3

**Cuadro 3** Reactivos empleados para una reacción total de 23  $\mu$ l.

Reactivo	Concentración	Cantidad
Buffer	10x	2.5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1 $\mu$ l
DNTPS	200 $\mu$ M	0.5 $\mu$ l
Primers	3 genes	5 $\mu$ l
Agua destilada		13.8 $\mu$ l
Taq Polimerasa		0.2 $\mu$ l
DNA		2 $\mu$ l
	Total	23 $\mu$ l

Una vez mezclados los reactivos se agrego el lisado y se homogeneizó, cabe mencionar que la Taq polimerasa se agrego en último lugar debido a que se manejo en frío. En el cuadro 4 se muestra la secuencia de los iniciadores utilizados en la técnica de PCR

**Cuadro 4** Secuencia de los iniciadores utilizados para la Técnica de PCR

Genes	Primers	Bases	Pares de Bases amplificados (pb)
<i>stx1</i>	F:5 CTG GAT TTA ATG TCG CAT AGT G3 R:5 AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC3	22 21	150
<i>stx2</i>	F:5 GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC3 R:5 TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G3	21 22	255
<i>eae</i>	F:5 GAC CCG GCA CAA GCA TAA GC3 R:5 CCA CCT GCA ACA AGA GG3	20 20	384

Las cepas de referencia utilizadas para este estudio se muestran en el cuadro 5. Estos controles se trabajaron en las mismas condiciones que el resto de las cepas problema.

**Cuadro 5** Cepas de *Escherichia coli* utilizadas como referencia en la técnica de PCR

Cepas de Referencia	Factores de Virulencia	Obtención
EDL933med (O157:H7)	Stx1, Stx2 y <i>eae</i>	Facultad de Medicina de la UNAM
EDL933Δ-LER	Stx1, Stx2 y <i>eae</i>	Instituto de Biotecnología de la UNAM
MC-41	Cepa silvestre apatógena	Instituto de Biotecnología de la UNAM

Los tubos preparados se colocaron en el termociclador PTC-100™ (Programmable Thermal Controller MJ Research Inc) con los siguientes parámetros:

**Cuadro 6** Parámetros del termociclador para PCR múltiplex

Ciclos	1	2	3	4	5	6
Temperatura	94°C	50°C	72°C	94°C	50°C	72°C
Tiempo	5min	2min	0.45seg	0.45seg	0.45seg	10min
Repeticiones	Una vez	Una vez	35 veces			Una vez

Una vez obtenidos los amplificadores de ADN se procedió a realizar la técnica de electroforesis. Se tomaron 100ml de TAE 10X y se mezclaron con 100ml de agua destilada estéril para obtener TAE 1X.

En un matraz se colocaron 50ml de TAE 1X al que se le agregó 2g de agarosa al 2%, posteriormente se calentó directamente en la flama de un mechero hasta clarificar y obtener un medio reconstituido. Se dejó enfriar (sin solidificar) y se agregaron 10µl de bromuro de Etidio se homogenizó y se vertió en la cámara de electroforesis, se colocaron

los peines dentro del gel con la finalidad de formar los pozos que contienen a las muestras. Estos peines se retiraron una vez solidificado el gel.

Se montó el sistema en una cámara de electroforesis y se agregó TAE 1X hasta cubrir completamente el gel. Las muestras de ADN se colocaron de la siguiente manera: sobre un papel Parafilm® se colocaron 3µl de Buffer de corrido y 7µl de ADN se homogenizaron con ayuda de una micropipeta y se colocó cada muestra en cada uno de los pozos del gel. Se encendió la cámara de electroforesis con un voltaje de 85 miliamper. El tiempo de corrido fue de aproximadamente 40 minutos. Posterior a esto se procedió a realizar la lectura del gel en el transiluminador ultravioleta.

## VII. RESULTADOS

Se estudiaron 56 reptiles adultos; 38 de ellos pertenecen al Herpetario Reptilium del Zoológico de Zacango entre los que se encuentran 32 serpientes, 3 tortugas, 2 iguanas y 1 camaleón. Los 18 restantes forman parte de la colección del Herpetario de la Universidad Autónoma de Puebla; 13 serpientes, 2 tortugas y 3 iguanas. A continuación en el cuadro 7 se muestra la distribución de los individuos muestreados para este estudio.




**Cuadro 7** Individuos muestreados en el Herpetario Reptilium y la Universidad de Puebla







Número de individuos	Herpetario Reptilium Zoológico de Zacango	Número de individuos	Herpetario de la Universidad de Puebla
2	<i>Agkistrodon bilineatus</i>	2	<i>Boa Constrictor</i>
1	<i>Atropoides mexicanus nummifer</i>	1	<i>Crotalus molossus nigrescens</i>
1	<i>Atropoides olmec</i>	3	<i>Crotalus ravus</i>
1	<i>Boa Constrictor</i>	1	<i>Crotalus scutulatus</i>
2	<i>Bothrops asper</i>	1	<i>Crotalus simus</i>
4	<i>Charina trivirgata ssp</i>	1	<i>Crotalus triseriatus</i>
2	<i>Crotalus molossus nigrescens</i>	4	<i>Pituophis deppei deppei</i>
2	<i>Crotalus Polystictus</i>	1	<i>Ctenosaura pectinata</i>
1	<i>Crotalus simus</i>	2	<i>Iguana iguana</i>
2	<i>Crotalus triseriatus</i>	2	<i>Trachemys scripta elegans</i>
1	<i>Drymarchon corais</i>		
1	<i>Elaphe guttata</i>		
1	<i>Eunectes notaeus</i>		
1	<i>Leioheterodon madagascariensis</i>		
1	<i>Morelia viridis</i>		
1	<i>Naja Kaouthia</i>		
2	<i>Phyton regius</i>		
3	<i>Pituophis deppei deppei</i>		
3	<i>Python molurus bivittatus</i>		
2	<i>Iguana iguana</i>		
1	<i>Chelus fimbriatus</i>		
2	<i>Gopherus berlandieri</i>		
1	<i>Chamaeleo trioceros melleri</i>		
<b>Total</b>	38	<b>Total</b>	18

Las cepas de *Escherichia coli* aisladas se obtuvieron de 9 diferentes individuos de las especies *Phituophis deppei*, *Crotalus molossus*, *Crotalus ravus*, *Elaphe guttata*, *Crotalus simus*, *Leioheterodon madagascariensis*, *Chamaeleo melleri*, *Python molurus*, *Python regius*. Las primeras tres procedentes de la Universidad de Puebla y el resto del Zoológico de Zacango.

En el siguiente cuadro se muestran los aislamientos de *Escherichia coli* en ambos herpetarios así como su estado de salud de acuerdo con la historia clínica.

**Cuadro 8** Aislamientos de *Escherichia coli* y estado de salud de los animales muestreados por locación

Imagen	Nombre	Procedencia	Estado de salud de acuerdo a H.C.	Número de cepas de <i>E. coli</i> aisladas
	<i>Elaphe guttata</i>	Zacango	Sano	1
	<i>Crotalus simus</i>	Zacango	Sano	3
	<i>Leioheterodon madagascariensis</i>	Zacango	Inestabilidad alimentaria	3

	<i>Chamaeleo melleri</i>	Zacango	Deshidratado golpeado	4
	<i>Python molurus</i>	Zacango	sano	3
	<i>Python regius</i>	Zacango	sano	2
	<i>Pituophis deppei</i>	Puebla	S/HC aparentemente sano	4
	<i>Crotalus molossus</i>	Puebla	S/HC aparentemente sano	2
	<i>Crotalus ravus</i>	Puebla	S/HC aparentemente sano	1

S/HC sin historia clínica



En el cuadro 8 se muestran las bacterias aisladas de cada individuo en ambos herpetarios.

**Cuadro 9** Bacterias aisladas por individuo en ambas locaciones

Locación	Género de Reptil	Bacterias aisladas
Herpetario Reptilium Zoológico de Zacango	<i>Agkistrodon bilineatus</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Erwinia spp</i> , <i>Proteus rettgeri</i> , <i>Citrobacter koseri</i> , <i>Salmonella arizonae</i> , <i>Klebsiella ozaenae</i> , <i>Proteus spp</i>
	<i>Atropoides mexicanus nummifer</i>	<i>Erwinia spp.</i>
	<i>Atropoides olmec</i>	<i>Klebsiella ozaenae</i> , <i>Shigella spp</i> , <i>Edwardsiella tarda</i>
	<i>Boa Constrictor</i>	<i>Salmonella spp</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Proteus spp</i> , <i>Klebsiella ozaenae</i> , <i>Proteus stuartii</i>
	<i>Bothrops asper</i>	<i>Edwardsiella tarda</i> , <i>Citrobacter spp</i> , <i>Citrobacter freundii</i> ,
	<i>Charina trivirgata ssp</i>	<i>Yersinia spp</i> , <i>Edwardsiella tarda</i> , <i>Proteus rettgeri</i> , <i>Proteus spp</i> , <i>Kurthia spp</i> , <i>Proteus rettgeri</i> , <i>Klebsiella edwardsii</i> , <i>Salmonella arizonae</i>
	<i>Crotalus molossus nigrescens</i>	<i>Proteus spp</i> , <i>Klebsiella ozaenae</i> , <i>Proteus rettgeri</i> , <i>Yersinia spp</i> , <i>Klebsiella ozaenae</i>
	<i>Crotalus Polystictus</i>	<i>Erwinia spp</i> , <i>Klebsiella ozaenae</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Salmonella arizonae</i>
	<i>Crotalus simus</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Edwardsiella tarda</i>
	<i>Crotalus triseriatus</i>	<i>Klebsiella ozaenae</i> , <i>Yersinia spp</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Erwinia spp</i>
	<i>Drymarchon corais</i>	<i>Klebsiella ozaenae</i>
	<i>Elaphe guttata</i>	<i>Yersinia spp</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i>
	<i>Eunectes notaeus</i>	<i>Citrobacter koseri</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Citobacter spp</i>
	<i>Leioheterodon madagascariensis</i>	<i>Citrobacter koseri</i> , <i>Edwardsiella tarda</i> , <i>Escherichia coli</i>
	<i>Morelia viridis</i>	<i>Citrobacter spp</i> , <i>Proteus stuartii</i>
	<i>Naja Kaouthia</i>	<i>Edwardsiella tarda</i> , <i>Citrobacter spp</i>
	<i>Phyton regius</i>	<i>Citrobacter koseri</i> , <i>Erwinia spp</i> , <i>Proteus stuartii</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella arizonae</i> , <i>Edwardsiella tarda</i>
<i>Pituophis deppei deppei</i>	<i>Edwardsiella tarda</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Erwinia spp</i> , <i>Citrobacter koseri</i> , <i>Klebsiella</i>	

		<i>ozaenae, Klebsiella aerogenes</i>
	<i>Python molurus bivittatus</i>	<i>Edwardsiella tarda, Klebsiella ozaenae, Klebsiella aerogenes, Proteus spp, Citrobacter freundii, Erwinia spp, Escherichia coli,</i>
	<i>Iguana iguana</i>	<i>Klebsiella edwardsii, Yersinia spp,</i>
	<i>Chelus fimbriatus</i>	<i>Edwardsiella tarda, Proteus spp, Citrobacter freundii, Erwinia spp, Escherichia coli</i>
	<i>Gopherus berlandieri</i>	<i>Shigella spp, Morganella morganii, Yersinia enterocolitica, Yersinia enterocolitica</i>
	<i>Chamaeleo trioceros melleri</i>	<i>Escherichia coli, Edwardsiella tarda</i>
<b>Herpetario de la Universidad de Puebla</b>	<i>Boa Constrictor</i>	<i>Citrobacter freundii, Klebsiella ozaenae,</i>
	<i>Crotalus molossus nigrescens</i>	<i>Edwardsiella tarda, Escherichia coli, Citrobacter freundii</i>
	<i>Crotalus ravus</i>	<i>Yersinia spp, Proteus rettgeri, Serratia rubidaea, Proteus inconstans, Escherichia coli, Edwardsiella tarda, Klebsiella ozaenae</i>
	<i>Crotalus scutulatus</i>	<i>Citrobacter freundii, Klebsiella ozaenae, Edwardsiella tarda</i>
	<i>Crotalus simus</i>	<i>Salmonella arizonae, Salmonella spp,</i>
	<i>Crotalus triseriatus</i>	<i>Erwinia spp, Citobacter koseri, Citrobacter freundii</i>
	<i>Pituophis deppei deppei</i>	<i>Escherichia coli, Edwardsiella tarda, Salmonella houtenae, Citrobacter freundii, Morganella morganii, Klebsiella ozaenae, Klebsiella aerogenes, Erwinia spp, Proteus spp, Proteus stuartii</i>
	<i>Ctenosaura pectinata</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
	<i>Iguana iguana</i>	<i>Yersinia enterocolitica, Proteus rettgeri, Citrobacter freundii, Morganella morganii, Proteus stuartii, Proteus mirabilis</i>
	<i>Trachemys scripta elegans</i>	<i>Shigella sonnei, Edwardsiella tarda, Citrobacter koseri, Proteus rettgeri, Citrobacter freundii, Citobacter koseri, Yersinia spp, Klebsiella ozaenae</i>

De los 56 animales muestreados se obtuvieron un total de 248 cepas correspondientes a 12 géneros bacterianos; 243 (97.9%) corresponden a bacterias Gram-negativas y 5 (2.1%) a bacterias Gram-positivas. Al realizar la identificación bioquímica 23 (9.35%) cepas se identificaron como

*Escherichia coli*, las 225 (90.65%) cepas restantes pertenecen a otros géneros bacterianos, como se indica a continuación en el cuadro 9.

**Cuadro 10** Frecuencia de las cepas identificadas mediante pruebas bioquímicas

Resultado de la identificación bioquímica de las cepas	Número de cepas obtenidas	Porcentaje de cepas obtenidas	Total de cepas por género bacteriano	Porcentaje de cepas por género bacteriano
<i>Escherichia coli</i>	23	9.2%	23	9.2%
<i>Citrobacter freundii</i>	41	16.5%	57	22.9%
<i>Citrobacter Koseri</i>	11	4.4%		
<i>Citrobacter spp</i>	5	2.0%		
<i>Proteus spp</i>	13	5.2%	35	14.1%
<i>Proteus stuartii</i>	12	4.8%		
<i>Proteus rettgeri</i>	8	3.2%		
<i>Proteus inconstans</i>	1	0.4%		
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0.4%		
<i>Klebsiella ozaenae</i>	25	10.0%	29	11.6%
<i>Klebsiella aerogenes</i>	2	0.8%		
<i>Klebsiella edwardsi</i>	2	0.4%		
<i>Edwardsiella tarda</i>	26	10.4%	26	10.4%
<i>Yersinia spp</i>	15	6.0%	21	8.4%
<i>Yersinia enterocolitica</i>	6	2.4%		
<i>Erwinia spp.</i>	20	8.0%	20	8.0%
<i>Salmonella arizonae</i>	11	4.4%	17	6.8%
<i>Salmonella houtenae</i>	2	0.8%		
<i>Salmonella spp</i>	2	0.8%		
<i>Salmonella typhi</i>	2	0.8%		
<i>Shigella spp</i>	5	2.0%	7	2.8%
<i>Shigella sonei</i>	2	0.8%		
<i>Serratia rubidaea</i>	4	1.6%	5	2.0%
<i>Serratia liquefaciens</i>	1	0.4%		
<i>Morganella morganii</i>	3	1.2%	3	1.2%

La proporción de las bacterias Gram-positivas fue significativamente menor en relación con las Gram-negativas. Se aislaron solo 5 cepas correspondientes a microorganismos Gram-positivos todas identificadas como *Kurthia spp.*

A continuación en la tabla 1 se muestra el resultado de la identificación bioquímica de las cepas de *Escherichia coli* aisladas de reptiles.

**TABLA 1** Resultado de la identificación bioquímica de las cepas de *Escherichia coli* aisladas

Código	GRAM	CAT	OXI	CIT	UR	MR	VP	SOR	Fermentación de la glucosa, sacarosa, lactosa y gas	Producción de ácido sulfhídrico	Descarboxilación de la lisina	Desaminación de la lisina	Movilidad	Producción de indol	Descarboxilación de la ornitina	*Identificación
GEM 03 D	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
GEM 05 A	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
GEM 05 B	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
GEM 05 D	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
GEM 21 C	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
GEM 21 D	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
GEM 21 E	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
GEM 27 A	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
GEM 27 B	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
GEM 27 C	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
GEM 27 D	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
GEM 35 C	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
GEM 35 D	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>
GEM 38 B	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
GEM 46 A	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>
GEM 46 B	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>

CAT-Catalasa OXI-Oxidasa CIT-Citrato UR-Urea MR-Rojo de Metilo VP-Vogues Proskauer SOR- sorbitol  
 + Positivo - Negativo

**TABLA 1** Resultado de la identificación bioquímica de las cepas de *Escherichia coli* aisladas

Código	GRAM	CAT	OXI	CIT	UR	MR	VP	SOR	Fermentación de la glucosa, sacarosa, lactosa y gas	Producción de ácido sulfhídrico	Descarboxilación de la lisina	Desaminación de la lisina	Movilidad	Producción de indol	Descarboxilación de la ornitina	*Identificación
GEM 46 C	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>
GEM 46 E	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>
GEM 48 A	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	<i>Escherichia coli</i>
GEM 48 C	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>
GEM 48 E	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>
GEM 51 A	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
GEM 51 B	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>

CAT-Catalasa OXI-Oxidasa CIT-Citrato UR-Urea MR-Rojo de Metilo VP-Vogues Proskauer SOR- sorbitol  
 + Positivo - Negativo

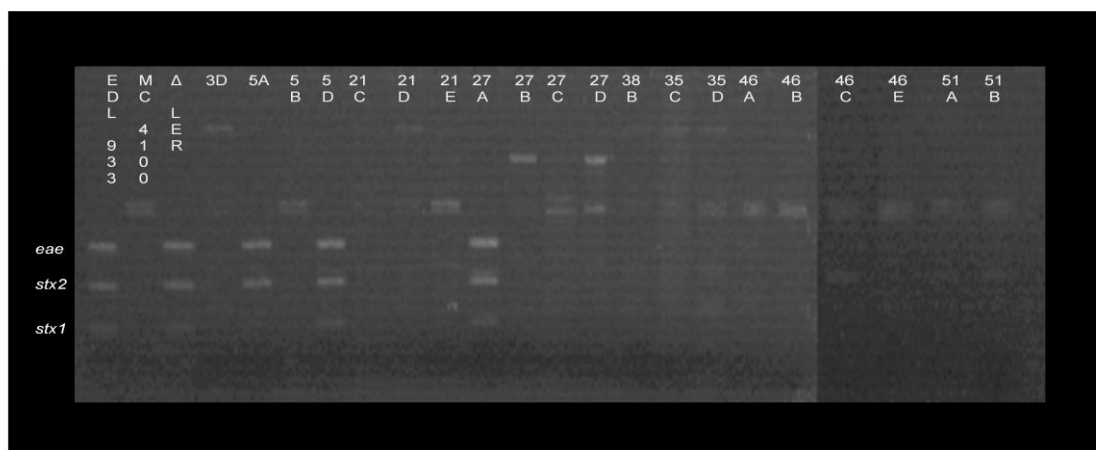
Las cepas identificadas como *Escherichia coli* se agruparon en 3 diferentes biotipos, el más frecuente de estos fue sorbitol positivo con movilidad positiva representando el 52% de todos los biotipos encontrados como se muestra a continuación en el cuadro 8.

**Cuadro 11** Frecuencia de biotipos encontrados en cepas de *Escherichia coli*

Sorbitol	Movilidad	Total (cepas)	Total (%)
+	+	12	52.2%
+	-	1	4.3%
-	+	10	43.5%
	<b>Total</b>	23	100%

A las 23 cepas de *Escherichia coli* se les realizó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) multiplex, con la finalidad de detectar la presencia de los genes *stx1*, *stx2* y *eae*.

**Figura 4** Electroforesis de los amplificados por PCR multiplex de las cepas de *Escherichiacolia* aisladas de reptiles.



Se observó que tres cepas presentaban bandas que coincidían con los controles positivos para los tres genes *stx1*, *stx2* y *eae* dos de las cuales identificadas como GEM 5A y GEM 5D pertenecen al mismo individuo, (Fig. 4) un *Crotalus simus* proveniente del herpetario del Zoológico de Zacango. Otra cepa se aisló de un *Phituophis deppei* identificado como GEM 27A proveniente del herpetario de la Universidad Autónoma de de Puebla. Ambos individuos se encontraron en buen estado de salud.

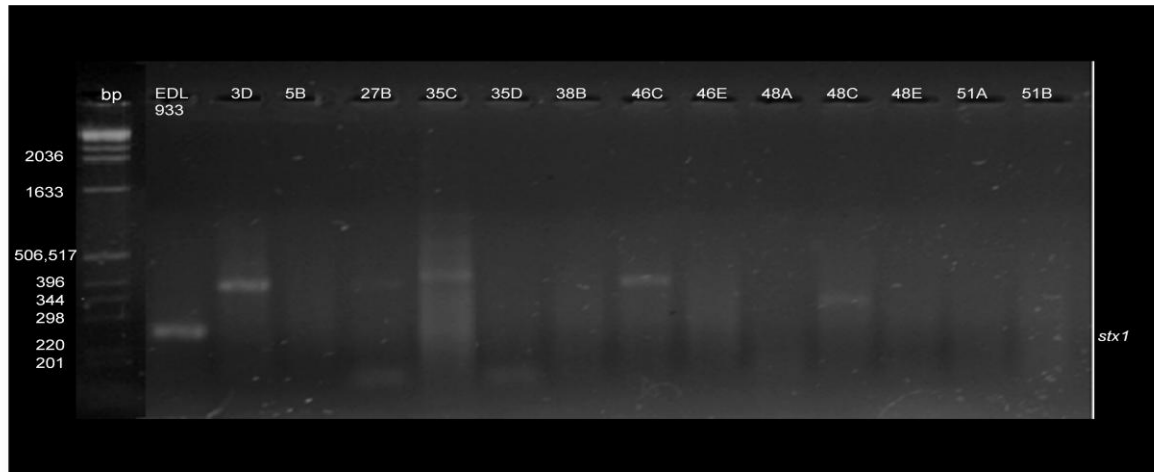
El resto de las cepas también presentaron bandas por lo que posteriormente se realizó a todas las muestras la técnica de PCR de manera individual para cada uno de los genes (*stx1*, *stx2* y *eae*). Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

**Cuadro 12** Genotipos encontrados mediante la técnica de PCR individual

<b>Cepa</b>	<b><i>stx1</i></b>	<b><i>stx2</i></b>	<b><i>eae</i></b>
GEM 5 A	+	+	+
GEM 5 D	+	+	+
GEM 27 C	+	+	+
GEM 35 C	+	+	+
GEM 48 C	+	+	+
GEM 3 D	+	-	+
GEM 27 B	+	-	+
GEM 46 C	+	-	+
GEM 35 D	-	+	+
GEM 38 B	-	+	+
GEM 51 A	-	+	+
GEM 51 B	-	+	+
GEM 5 B	-	-	+
GEM 46 A	-	-	+
GEM 46 E	-	-	+
GEM 48 A	-	-	+
GEM 46 B	-	-	-
GEM 21 C	-	-	-
GEM 21 D	-	-	-
GEM 21 E	-	-	-
GEM 27 A	-	-	-
GEM 27 D	-	-	-
GEM 48 E	-	-	-

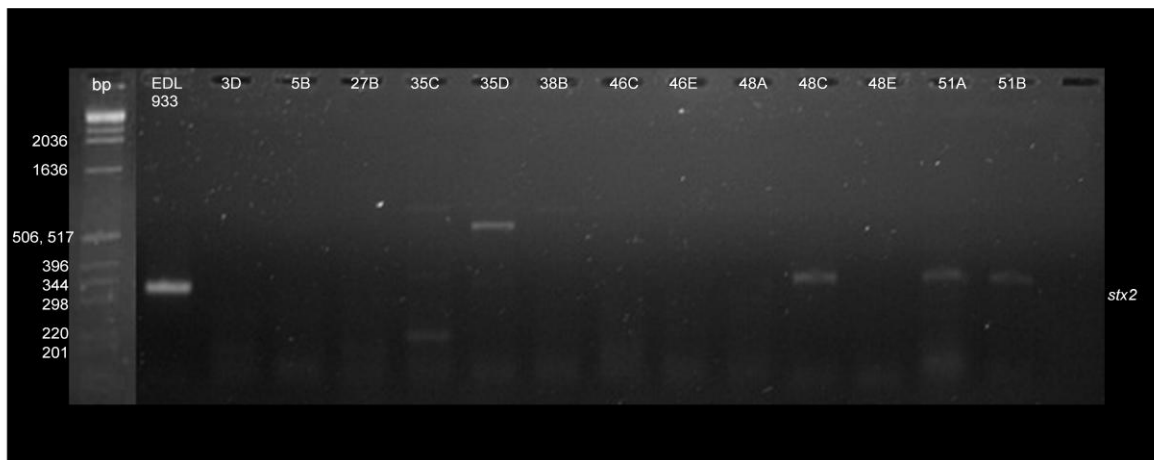
A continuación se muestran los amplificadores obtenidos mediante PCR individual correspondiente al gen *stx1* (Fig 5) en donde se puede observar que las cepas obtenidas de reptil tenían un mayor peso molecular en comparación con la cepa control EDL 933 que es de origen humano.

**Figura 5** Electroforesis de los amplificados por PCR individual correspondientes al gen *stx1*.



En el caso de los amplificados obtenidos para el gen *stx2* se observó que la cepa identificada como 35C presentó un peso molecular menor que el de la cepa control, mientras que la cepa 35D fue de mayor peso. Cepas como la 48C, 51A y 51B presentaron ligeras variaciones en el tamaño pero fueron casi inaparentes (Fig 6).

**Figura 6** Electroforesis de los amplificados por PCR individual correspondientes al gen *stx2*.

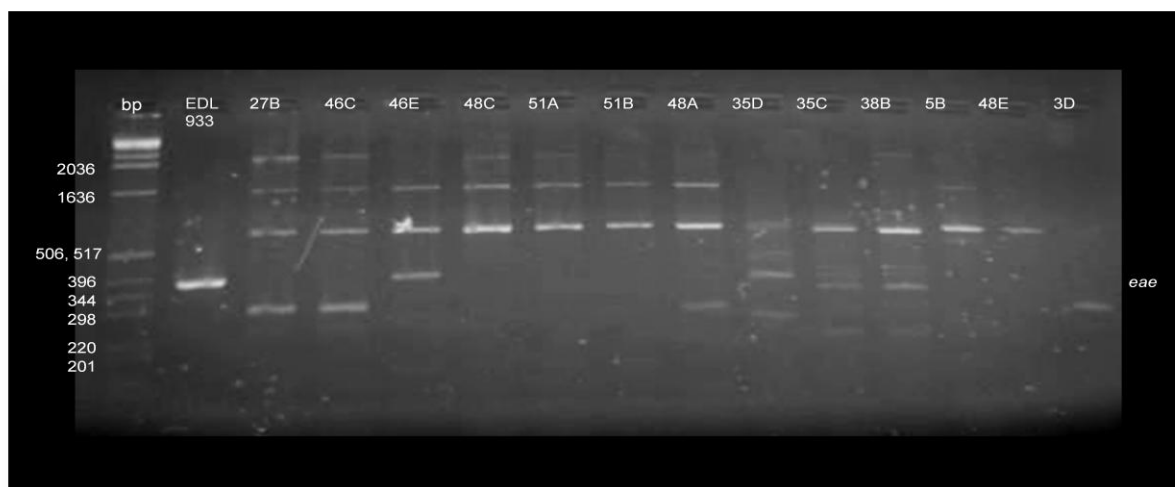


Se encontró que el gen *eae* obtenido de cepas de reptil fue el que presentó mayor variación en el tamaño y número de bandas. Se observó que las cepas trabajadas presentaron 3 o más bandas de diferente tamaño a la cepa control EDL 933, solo dos de



ellas presentaron una banda, una de ellas de menor peso molecular identificada como 3D y otra de mayor peso identificada como 48E. En la figura 7 se pueden observar los amplificados del gen *eae*, las cepas fueron acomodadas en orden ascendente de acuerdo al número de bandas encontradas.

**Figura 7** Electroforesis de los amplificados por PCR individual correspondientes al gen *eae*.



A continuación se muestra la frecuencia de los genotipos encontrados mediante la técnica de PCR, en donde la frecuencia más alta corresponde a cepas que no contienen ninguno de los genes, por otra parte las cepas que contienen los genes *stx1* y *eae* representan el porcentaje más bajo, se observó también que las cepas que presentan el gen *eae* y las que contienen los genes *stx2* y *eae* presentan porcentajes iguales. De igual forma se encontraron cepas que contienen los tres genes.

**Cuadro 13** Frecuencias de los genotipos encontrados mediante la técnica de PCR

Genes ( <i>stx1, stx2, eae</i> )	Número de cepas de <i>Escherichia coli</i>	Porcentaje de <i>Escherichia coli</i> (%)
<i>stx1, stx2, eae</i>	5	21.7 %
<i>stx2, eae</i>	4	17.4 %
<i>eae</i>	4	17.4%

<i>stx1, eae</i>	3	13.1%
Negativas	7	30.4%
Total	23	100%

En el siguiente cuadro se muestran los aislamientos de *Escherichiacoli* obtenidos a partir de heces en ambos herpetarios.

**Cuadro 14** Aislamientos de cepas de *Escherichia coli* obtenidos a partir de heces

ID	Procedencia	Nombre científico	Número de cepas de <i>E. coli</i> aisladas	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>
GEM 3	Zacango	<i>Elaphe guttata</i>	1	+	-	+
GEM 5	Zacango	<i>Crotalus simus</i>	3	+	+	+
GEM 21	Zacango	<i>Leioheterodon madagascariensis</i>	3	-	-	-
GEM 46	Zacango	<i>Chamaeleo melleri</i>	4	+	-	+
GEM 48	Zacango	<i>Python molurus</i>	3	+	+	+
GEM 51	Zacango	<i>Python regius</i>	2	-	+	+
GEM 27	Puebla	<i>Phituophis deppei</i>	4	+	+	+
GEM 35	Puebla	<i>Crotalus molossus</i>	2	+	+	+
GEM 38	Puebla	<i>Crotalus ravus</i>	1	-	+	+

## VIII DISCUSIÓN

Para este estudio se utilizaron muestras fecales de 56 individuos pertenecientes a dos colecciones de 33 diferentes géneros de reptiles; 23 de ellos procedentes del Zoológico de Zacango y 10 del Herpetario de la Universidad de Puebla. La distribución de los reptiles en ambas locaciones no fue la misma, Géneros como *Atropoides spp.*, *Bothrops spp.*, *Charinasp spp.*, *Drymarchon spp.*, *Elaphe spp.*, *Eunectes spp.*, *Leioheterodon spp.*, *Morelia spp.*, *Naja spp.*, *Phyton spp.*, *Gopherus spp.* y *Chamaeleo spp.* se muestrearon solo del Zoológico de Zacango, mientras que *Ctenosaura spp.* y *Trachemys spp.* se obtuvieron de la universidad de Puebla. Individuos como *Boa Constrictor*, *Crotalus molossus nigrescens*, *Pituophis deppei deppei* e *Iguana iguana* se encontraron en ambos herpetarios.

De acuerdo con los datos obtenidos, una gran parte de los animales encontrados en el Zoológico de Zacango provienen de decomisos, mientras que en el Zoológico de Puebla se obtuvieron a partir de donaciones. De los 38 animales procedentes del Zoológico de Zacango 18 se encontraron sanos, 16 presentaron inestabilidad alimenticia, mientras que 4 más mostraron otros problemas como estomatitis, diarrea, enfermedades vesiculares, deshidratación y en consecuencia disminución de peso. Los reptiles procedentes de la Universidad Autónoma de Puebla no presentaban signos que sugirieran enfermedad, por lo que se consideraron como clínicamente sanos. En ninguno de los dos herpetarios se maneja la historia clínica de manera eficiente, por lo que los datos obtenidos solo nos permitieron conocer las condiciones clínicas de los reptiles de manera superficial. Se debe recalcar la importancia de realizar de manera correcta la historia clínica, el médico veterinario debe llevar a cabo la historia de manera que se obtenga información objetiva y subjetiva. Los datos objetivos consisten en la reseña, el ambiente, la dieta y la historia médica previa. Los datos subjetivos nos brindan un panorama histórico de la salud general del paciente. Es importante también obtener datos acerca del origen geográfico del paciente y cualquier registro de traslado reciente (Birdchard 2000), ya que existen algunos factores importantes que aumentan el riesgo potencial de adquisición de enfermedades a partir de estos animales, muchos de ellos aún son capturados de poblaciones en vida libre para su venta, además de que las condiciones en las que se mantienen pueden favorecer la presencia o intercambio de agentes patógenos (Yarto y col 2000). Deben ser incluidos también los datos de enfermedades y tratamientos previos, exámenes de laboratorio así como intervenciones quirúrgicas (Birdchard 2000). Algunos puntos importantes en cuanto a la información de la dieta son: Tipo de dieta, nombre comercial del alimento (en caso de utilizarlo) y método de alimentación.

Es importante que cada herpetario cuente con un área destinada a la cuarentena para asegurarse de mantener una colección libre de enfermedades. Esta área debe

mantenerse incomunicada del resto de la colección. Los terrarios deben contar con buena ventilación, si existen sospechas de enfermedades altamente infecciosas los recintos deberán ser semi-ventilados para evitar el contagio por vía aérea a terrarios adyacentes. Los reptiles recientemente adquiridos deben estar en cuarentena por, al menos, 3 meses. Usualmente, pero no siempre, si existe algún tipo de enfermedad, será evidenciada durante dicho período (Cometta 2003).

Las 56 muestras obtenidas se sembraron sobre los medios de cultivo diferenciales EMB y MacConkey, posteriormente se tomaron 5 colonias al azar y se resembraron para poder ser identificadas mediante pruebas bioquímicas, no todas las muestras presentaron crecimiento en los medios de cultivo, por lo que solo se obtuvieron un total de 248 cepas de las cuales se aislaron 12 géneros bacterianos, 11 corresponden a microorganismos Gram-negativos entre los que se encuentran *Escherichia*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Edwardsiella*, *Yersinia*, *Erwinia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Serratia* y *Morganella*. La bibliografía refiere (Fowler y col 2001) que géneros como *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Serratia*, *Salmonella* y *Yersinia* han sido aislados de reptiles en cautiverio tanto clínicamente sanos como enfermos. Estas bacterias se consideran potencialmente zoonóticas. Todas forman parte del grupo de las Enterobacterias, las cuales tienen como hábitat natural el intestino de humanos y animales, se desarrollan en condiciones tanto aerobias como anaerobias y crecen bien en medios selectivos (Jawetz y col 1999; P.J Quinn y col 2004). Los géneros *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia* son considerados como patógenos primarios, de gran importancia en salud humana (Dwight y col 2004; Jawetz y col 1999). Las infecciones producidas por estas bacterias abarcan diferentes sistemas principalmente digestivo, urinario y respiratorio. Otros géneros que también se aislaron en este estudio se consideran patógenos oportunistas, entre los más importantes se encuentran *Proteus*, *Klebsiella*, *Edwardsiella*, *Morganella* y *Serratia*. (Murray y col 2006).

Bacterias Gram-positivas como *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Staphylococcus* también se han aislado del tracto gastrointestinal de reptiles (Mitchel y col. 2005). Sin embargo en este estudio se encontró solo un género que corresponde a *Kurthia spp.* Sosa en 2008 logró aislar el mismo microorganismo de tortugas mantenidas en cautiverio. Se ha mencionado que los reptiles en cautiverio son más vulnerables a estar colonizados por microorganismos zoonóticos que los que se encuentran en estado libre (Carriquiriborde 2010).

No existió diferencia entre la distribución de las bacterias aisladas en ambas locaciones, tanto en Zacango como en la Universidad de Puebla se encontraron los 11 géneros Gram-negativos que se obtuvieron a partir de las muestras fecales. El género *Kurthia spp.* se aisló

de dos individuos procedentes del Zoológico de Zacango; el primero una Boa Rosy (*Charinatrivirgata ssp*) y el segundo una “terciopelo” (*Bothrops asper*).

La mayoría de los aislamientos de *E. coli* se encontraron en ofidios, solamente se aisló *E. coli* de un camaleón de Meller (*Chamaeleo melleri*) del Zoológico de Zacango. Esta distribución en el aislamiento de *E. coli* se debe principalmente a que el número de muestras obtenidas fue mayor en Zacango y a que la mayoría de los individuos muestreados fueron precisamente ofidios, además de que la bibliografía (Puga 2003) menciona que dentro de los individuos con convivencia constante, es posible aislar los mismos microorganismos dentro de su microbiota. El hacinamiento y el tipo de manejo que reciben los animales mantenidos en cautiverio favorecen este tipo de condiciones.

Se obtuvieron un total de 248 cepas, 23 de ellas identificadas como *E. coli* la frecuencia de aislamiento fue del 9%, Sosa en 2008 realizó el aislamiento de esta misma bacteria en tortugas mantenidas en cautiverio y reporto una frecuencia del 18.6%. La frecuencia obtenida en el presente trabajo representa un porcentaje bajo debido a que la bibliografía refiere que *Escherichia coli* constituye cerca del 80% de la flora aeróbica intestinal. Otras Enterobacterias con una presencia numerosa significativa son *Proteus* y *Klebsiella*, mientras que otras como *Citrobacter* y *Enterobacter* están presentes de manera irregular (Montiel de Morales y col 2005). Estos datos no coinciden del todo con los resultados obtenidos en este estudio, ya que la especie con mayor frecuencia fue *Citrobacter* seguida de *Proteus* y *Klebsiella* situación que puede deberse a los diferentes tipos de dieta empleados en los animales. La frecuencia de aislamiento de *Escherichia coli* en otras especies es mayor, se reporta que el principal reservorio de la bacteria son los bovinos, su frecuencia de aislamiento es variable, Aranguré en 2007 reporto un aislamiento del 68%, mientras que estudios realizados en Chile reportaron una frecuencia del 67.5% (Fry Bravo 2004). En un estudio realizado en 2003 se aislaron cepas de *E. coli* Enterohemorrágica de conejos, la frecuencia de aislamiento reportada fue del 25% en conejos pigmentados y del 15% en conejos blancos de la raza Nueva Zelanda (García y col 2003). En 2008 en el estado de Sinaloa (México) se realizo un estudio en humanos para determinar la presencia de *E.coli* diarreogénica en pacientes de una clínica, encontrándose una frecuencia del 21% (González-Nuñez y col 2008).

Las 23 cepas de *Escherichia coli* se caracterizaron por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que junto con otras técnicas de biología molecular representan una herramienta muy útil en el diagnostico de enfermedades infecciosas (Mattár 2000). De las 23 cepas de *Escherichia coli* solo 16 fueron positivas a alguno de los genes de virulencia probados, representando el 69.6%, de esta forma se obtuvieron cepas positivas a los tres genes lo que representó el 21.7% del total de las cepas, se obtuvieron también cepas positivas a los genes *stx2* y *eae* así como cepas positivas solo al gen *eae* ambos grupos tienen la misma frecuencia de 17.4% con 4 cepas cada uno. La frecuencia más baja la obtuvo el grupo de cepas positivas a los genes *stx1* y *eae* con el 13.1%. Como se muestra en la figura 5 los amplificadores del gen *stx1* obtenidos a partir de muestras de

reptil se observaron con un peso molecular mayor al de la cepa control (EDL933 med O157:H7). En 2009 Flores encontró que existía una diferencia en el tamaño del peso molecular del gen *stx1* entre cepas de origen animal aisladas de cerdos y cepas de origen humano, en donde las primeras tenían un menor peso molecular. Por el contrario en el presente estudio se demostró que los genes *stx1* de cepas aisladas de reptil presentaron un peso molecular mayor que la cepa control aislada de humano. Esto puede deberse a que probablemente exista una diferencia estructural en el gen perteneciente a las cepas de origen animal en comparación con el mismo gen presente en las cepas de origen humano (Flores 2009).

Las toxinas de Shiga son codificadas por los genes *stx1* y *stx2*. Se han descrito diferentes variantes para ambas toxinas (Chamorro 2009). Estudios epidemiológicos han demostrado que *Stx2* es el más importante factor de patogenicidad asociado con enfermedad humana severa. En este estudio se encontraron 6 cepas con presencia del gen *stx2*, los amplificadas muestran un mayor tamaño en el peso molecular de las cepas de reptil en comparación con la cepa control de origen humano, lo cual puede deberse a que según la bibliografía la *Stx2* tiene diversas variantes, se conocen al menos 22 de ellas, de acuerdo a su variabilidad antigénica, diferencias en su toxicidad en tejidos celulares y animales así como diferencias en las secuencias aminoacídicas o nucleotídicas (Hannaoui y col 2009).

De las 23 cepas aisladas de *Escherichia coli* solo 16 presentaron el gen *eae*, al igual que en el caso de *stx1* y *stx2*, en este estudio se encontraron variaciones en el tamaño del gen y también en número de bandas de cada cepa. Este gen se ha asociado claramente con la virulencia, detectándose en la mayoría (>90%) de las cepas causantes de Síndrome Urémico Hemolítico (HUS). Trabajos previos han podido identificar al menos 27 variedades de genes *eae* mediante la técnica de PCR, lo que podría explicar las variaciones en el tamaño y número de bandas encontradas en este trabajo. También se ha determinado la secuencia nucleotídica completa de los genes *eae* que codifican para 12 nuevos tipos y subtipos de intiminas codificadas en distintas variedades del gen *eae* (Blanco y col 2004).

Se encontró que 7 cepas (30.4%) de *Escherichia coli* no fueron positivas a ninguno de los tres genes de virulencia estudiados, lo que sugiere que se trato de bacterias saprofitas, todas aisladas de animales sanos. El resto de las cepas que presentaron genes correspondieron a reptiles que tampoco presentaron signos de enfermedad, la bibliografía refiere que desde la perspectiva de la patogénesis de una enfermedad, la interacción patógeno-hospedero se reduce a dos resultados: aquel que deriva en un daño al hospedero y aquel que no lo produce, la enfermedad ocurre cuando el hospedero sufre suficiente daño como para perturbar su homeostasis incluyendo el daño celular, de tejidos

y órganos. Existen muchas variables que afectan la relación patógeno-hospedero. Así la virulencia es una propiedad del patógeno, modulada por la susceptibilidad y resistencia del hospedero. (Martínez y col 2004). Como se menciona en párrafos anteriores no se cuenta con una historia clínica que nos permita clasificar a los reptiles contenidos en estas colecciones como reservorios o portadores sanos de *Escherichia coli*, sin embargo hay que destacar la presencia de los tres genes de virulencia en estas cepas y su importancia en salud humana.

De las 23 cepas de *E. coli* identificadas 13 resultaron sorbitol positivo, la literatura (Margall y col 1997) sugiere que el serotipo O157:H7 es sorbitol negativo, sin embargo se han aislado algunas cepas de *E. coli* que podrían fermentar sorbitol. (Máttar y col 2001) Han sido reportados cuadros de enfermedad en humanos producidos por cepas no-O157:H7 que son sorbitol positivo (Rodríguez 2002). Aislamientos de *Escherichia coli* obtenidos en Perú entre 1999 y 2001 también presentaron una respuesta variable a la prueba de fermentación del sorbitol (Huguet y col 2002).

## **IX CONCLUSIÓN**

En este estudio se logro el aislamiento de 23 cepas de *Escherichia coli* obtenidas a partir de muestras fecales de reptiles pertenecientes a los herpetarios del Zoológico de Zacango y de la Universidad Autónoma de Puebla, por lo que se deben considerar como portadores de esta bacteria. Mediante la realización de PCR se determino que los genes *stx1*, *stx2* y *eae* estuvieron presentes en 16 de las 23 cepas aisladas, por medio de la historia clínica se determino que los individuos a partir de los cuales se obtuvo la bacteria estaban sanos x lo que la presencia de *E. coli* no está 100 por ciento relacionada enfermedad en estos individuos. Sin embargo deberán realizarse tipificaciones más completas para determinar si las bacterias aisladas son saprofitas o potencialmente patógenas para el humano.



## X BIBLIOGRAFÍA

1. **Bell C., Kyriakides A.** *E. coli* Una aproximación práctica al microorganismo y su control e los alimentos. España: Acribia, 1998.
2. **Glenn songer J., W. Post k.** Veterinary Microbiology Bacterial and Fungal Agent of Animal Disease. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders Publishing, 2005.
3. **Jawetz, Melnick, Adelberg.** Microbiología Médica. México: Manual Moderno, 1999
4. **López Acuña W., Guevara Duncan JM.** Infección por *Escherichia coli*. Revista de la Facultad de Medicina de la Universidad Ricardo Palma, 2002; 3 (1): 38-41.
5. **Quinn PJ., Markey BK., Carter ME., Donnelly WJ., Leonard FC.** Microbiología y Enfermedades Infecciosas Veterinarias. Zaragoza, España: Acribia S. A., 2004.
6. **Margall N., Domínguez A., Prats G., Salleras L.** *Escherichia coli* Enterohemorrágica. Rev. Esp. Salud Pública, 1997; 71: 437-443.
7. **Bergey D.** Manual of Sistematic Bacteriology. Ed Board, 1984.
8. **Máttar S., Visbal SJ., Arrieta G.** *E. coli* O157:H7 Enterohemorrágico: Un Agente Etiológico de Diarrea y Zoonosis en Colombia Subestimado. Revista MVZ Córdoba, 2001; 6: (1) 15-23.
9. **Donnenberg M.** *Escherichia coli* Virulence Mechanisms of a Versatile Pathogen. EU: Academic Press, 2002.
10. **Hirsh DC., MacLachlan NJ., Walker RL.** Veterinary Microbiology. 2<sup>nd</sup> ed. EUA, 2004.
11. **Manual de la OIE Sobre Animales Terrestres.** *Escherichia coli* Verotoxigénica. OIE, 2004.
12. **Mattar SV.** Utilidad de la Biología Molecular en el estudio de las Zoonosis. Revista MVZ Córdoba, 2000; 5: (1) 46-50.
13. **Rivero MA., Padora NL., Etcheverria AI., Parma AE.** *Escherichia coli* Enterohemorrágica y síndrome Urémico en Argentina. Medicina, 2004; 64: 352-356.
14. **Kaper JB.** Enterohemoorrhagic *Escherichia coli*. Current Opinion in Microbiology, 1998; 1: 103-108.
15. **Naylor SW., Gally DL., Low JC.** Enterohaemorrhagic *E. coli* in veterinary medicine. International Journal of Medical Microbiology, 2005; 295: 419-441.
16. **Chávez BE., Martínez Gómez LE., Cedillo Ramírez ML., Gil Juárez C., Avelino Flores F., Castañeda Roldán EI.** Identificación de Cepas de *Escherichia coli* Enterotoxigénicas en Diferentes Ambientes. Enf. Inf. Microbiology, 2007; 27(3): 70-74.
17. **Giugno SM., Bibiloni N., Rahman R., Miliwebsky E., Chinen I., Rivas M.** Asociación del síndrome Urémico Hemolítico con la Infección por *Escherichia coli* productor de toxina de Shiga. Acta Bioquímica Clínica Latinoamérica, 2007; 41 (1).

18. **Sánchez S., Romecín P., Guachalla LM., Iñiguez V.** Caracterización geno-fenotípica de aislados de *Escherichia coli* AEEC de pacientes pediátricos con procesos diarreicos infecciosos en la ciudad de La Paz: implicancias para el diagnóstico y epidemiología de las enfermedades diarreicas agudas. *Rev Soc Bol Ped*, 2004; 43 (3): 132-43.
19. **Welinder-olsson C., Kaijser B.** Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 2005; 37: 405-416.
20. **Donnenberg MS., Tzipori S., McKee ML., O'Brien AD., Alroy J., Kapert JB.** The Role of the *eae* Gene of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Intimate Attachment In Vitro and in a Porcine Model. *The Journal of Clinical Investigation, Inc.*, 1993; 92: 1418-1424.
21. **Córdoba CB., Blanco AR., Malawka Henain JS., Del Carmen Ojeda V.** Síndrome Urémico Hemolítico: revisión. *Revista de Posgrado de la VI Cátedra de Medicina*, 2007.
22. **Jaime Fagundo JC., Delgado Giniebra Y., Castillo González D., Pavón Morán V., Gámez Pérez A., Sánchez Mallo LA.** Síndrome Hemolítico Urémico. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*, 2003; 19: 2-3
23. Rivas M., Miliwebsky E., Chinen I., Deza N., Leotta GA. Epidemiología del Síndrome Urémico Hemolítico en Argentina. *Medicina Buenos Aires* 2006; 66 (3): 27-32.
24. diagnostico del agente etiológico, reservorios y vias de transmision
25. **Chamorro Noceda LA.** Síndrome Urémico-Hemolítico por *E. Coli* Entero-Hemorrágica 0157:H7 Stx2: Primer Caso Descrito en Paraguay. *Cátedra de Pediatría. Universidad del Norte*, 2009: 36 (2)
26. **Souza V., Rocha M., Sander L., Eguiarte LE.** Historia natural, ecología y evolución de la patogenicidad en *Escherichia coli*. Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F., México.
27. **Fontanillas JC., Garcia G., De Gaspar I.** "Los reptiles" Biología, Comportamiento y Patología. España: Mundiprensa, 1999.
28. **Mitchell MA., Díaz-Figueroa O.** Clinical Reptile Gastroenterology. *Veterinary Clinics Exotic Animal Practice*, 2005; 8: 277-298.
29. **Fowler ME., Cubas SZ.** Biology, Medicine and Surgery of South American Wilds Animals. USA: Iowa State University, 2001.
30. **Schumacher J.** Selected Infectious Diseases of Wild Reptiles and Amphibians. *Journal of Exotics Pet Medicine*, 2006; 15(1): 18-24.
31. **Jacobson ER.** Bacterial Disease of Reptiles. EUA: CRC Press Taylor & Francis Group, 2007.

32. **Mader DR.** Reptile Medicine and Surgery. 2<sup>nd</sup> ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders Publishing, 2006.
33. **Carrquiriborde M.** Enfermedades Zoonóticas Asociadas a Reptiles. Veterinaria Argentina, 2010; 27 (267).
34. **Cometta ML.** Protocolo de Cuarentena en los Reptiles.
35. **Sosa Hernández LA.** Aislamiento en México de *Escherichia coli* Productoras de Toxinas de Shiga (Stx) y de Salmonella entérica a Partir de Tortugas (*Trachemis scripta*) Mantenido en Cautiverio. RECVET, 2008; 8 (3).
36. **Aranguré PR.** Caracterización de cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina de Shiga aisladas de bovinos en la zona norte del valle de México. Cuautitlan (Edo. De Méx.) UNAM, 2007..
37. **Fry Bravo MP.** Aislamiento de *Escherichia coli* y *Enterococcus spp* desde el contenido rectal de los bovinos. Universidad Austral de Chile, 2004.
38. **González E., Velázquez J., León N., Adrián Canizalez.** Identificación y Caracterización de las Categorías de *Escherichia coli* Diarreogénicas en Muestras Clínicas (heces) de Personas que Presentaban un Cuadro Clínico Diarreico en el Estado de Sinaloa. Unidad de Investigación de la Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Sinaloa. México, 2008.
39. **Birchard SJ.** Manual Clínico de Procedimientos en Pequeñas Especies. 2<sup>nd</sup> ed. España: McGraw-Hill interamericana, 2002
40. **Yarto Jaramillo E., Brousset hj DM.** Zoonosis de animales exóticos y de zoológico. UNAM, 2010
41. **Murray PR.** Microbiología Médica. 5<sup>a</sup> ed. España: Elsevier España, 2006.
42. **Montiel de Morales M., Zambrano JL., Castejon O.** Indicadores Bacterianos de Contaminación Fecal y Colifagos en el Agua de la Laguna de Sinamaica, Estado de Zulia Venezuela. Ciencia online, 2005; 13(3): 292-301.
43. **Huguet J., Huapaya B., Salazar E.** Determinación de Factores de Virulencia Asociados a *Escherichia coli* Enterohemorrágica en Cepas Peruanas Aisladas Entre 1999-2001. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, 2002; 19 (2): 63-67.
44. **Hannaoui Rodríguez EJ., Villalobos LB., Martínez RE.** *Escherichia coli* shigatoxigénica: Patogénesis, diagnóstico y tratamiento. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 2009; 29: 13-20.
45. **Blanco M., Padola NL., Krüger A., Sanz ME., Blanco JE., González EA.** Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. International Microbiology, 2004; 7:269-276.

46. **Rodríguez AG.** Principales Características y Diagnóstico de los Grupos Patógenos de *Escherichia coli*, 2002; Salud Pública de México 44 (5): 464-475.
47. **Martínez Y., Torres AG., Rocha R., Arenas M., Lozano P., Villavicencio L., Palma H.** Mecanismos de Patogenicidad e Interacción Parásito-Hospedero. Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, México, 2004

