



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
CAMPUS V



**Factores de riesgo en la prevalencia de *Escherichia coli* secretora
de toxina shiga en iguana verde en cautiverio.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA
TROPICAL**

**PRESENTA:
IVER ANTONIO CHACÓN FARRERA PS2088**

**DIRECTOR DE TESIS
DR. GERARDO URIEL BAUTISTA TRUJILLO**

**CODIRECTORA
DRA. MARÍA ADELINA SCHLIE GUZMÁN**

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, agosto 21 del 2023



Villaflores, Chiapas
18 de agosto de 2023
Oficio N° FCACV/D/0842/23

C. IVER ANTONIO CHACÓN FARRERA
MAESTRANTE EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA TROPICAL
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS *CAMPUS V*
P R E S E N T E.

En atención a que usted ha presentado los votos aprobatorios del Honorable Jurado designado para su evaluación de posgrado, de la tesis titulada: **“Factores de riesgo en la prevalencia de *Escherichia coli* secretora de toxina shiga en iguana verde en cautiverio”**, por este conducto le comunico que se le autoriza la impresión del documento, de acuerdo a los lineamientos vigentes de la Universidad.

Sin otro particular, le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR LA CONCIENCIA DE LA NECESIDAD DE SERVIR”

FACULTAD DE
CIENCIAS AGRONOMICAS

M. C. CARLOS ALBERTO VELA QUEZ SANABRIA
DIRECTOR



C. c. p. Archivo

CAVS*marh.



Código: FO-113-05-

Revisión: 0

CARTA DE AUTORIZACIÓN PARA LA PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA DE LA TESIS DE TÍTULO Y/O GRADO.

El (la) suscrito (a) Iver Antonio Chacón Farrera

, Autor (a) de la tesis bajo el título de “Factores de riesgo en la prevalencia de Escherichia coli secretora de toxina shiga en iguana verde en cautiverio.” presentada y aprobada en el año 2023 como requisito para obtener el título o grado de Maestría en Ciencias en Producción Agropecuaria Tropical autorizo a la Dirección del Sistema de Bibliotecas Universidad Autónoma de Chiapas (SIBI-UNACH), para que realice la difusión de la creación intelectual mencionada, con fines académicos para su consulta, reproducción parcial y/o total, citando la fuente, que contribuya a la divulgación del conocimiento humanístico, científico, tecnológico y de innovación que se produce en la Universidad, mediante la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- Consulta del trabajo de título o de grado a través de la Biblioteca Digital de Tesis (BIDITE) del Sistema de Bibliotecas de la Universidad Autónoma de Chiapas (SIBI- UNACH) que incluye tesis de pregrado de todos los programas educativos de la Universidad, así como de los posgrados no registrados ni reconocidos en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad del CONACYT.
- En el caso de tratarse de tesis de maestría y/o doctorado de programas educativos que sí se encuentren registrados y reconocidos en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional del Ciencia y Tecnología (CONACYT), podrán consultarse en el Repositorio Institucional de la Universidad Autónoma de Chiapas (RIUNACH).

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas; a los 29 días del mes de agosto del año 2023.

Iver Antonio Chacon Farrera

Nombre y firma del Tesisista o Tesisistas

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi padre por nunca dudar de mí, por darme su apoyo incondicional, por sus consejos, regaños y cariño, porque con esa sabiduría me ha guiado para convertirme en alguien de éxito.

A mi madre por todo su amor y cariño, por siempre estar ahí para mí, por siempre tener una sonrisa y sobre todo por ser mi pilar en la vida.

A mi hermano por ser mi mejor soporte, por ser un gran ejemplo y por confiar en mí, darme aliento para siempre mejorar y seguir adelante.

Al Dr. Gerardo Uriel Bautista Trujillo por darme la oportunidad de trabajar con él y ser tan paciente en su enseñanza, y permitirme lograr un paso más en mi vida profesional.

A mi comité tutorial conformado por la Dra. María Adelina Schlie Guzmán, Dr. Javier Gutiérrez Jiménez, Dr. Carlos Tejeda Cruz y MC. Carlos Ibarra Martínez; gracias por su asesoría, motivación, amabilidad y amistad.

A mi novia Valeria por darme su apoyo, y sobre todo demostrarme su amor en las buenas y en las malas.

A mis amigos Rene, Fredy, y Diego, por todo lo que pasamos, buenas y malas experiencias, pero siempre divertidas, por sus consejos y apoyo, y sobre todo tu amistad.

DEDICATORIA

Primeramente, a dios por darme la oportunidad de llegar hasta este punto, y lograr una de mis metas en la vida.

De igual forma le dedico esta tesis a mi familia, a mi padre, madre y hermano, porque sin ustedes jamás lo hubiera logrado, por ser la base de mi vida y darme ese empuje para seguir adelante, porque siempre hubo balance entre amor, cariño, rigor, y alegrías, nunca dejaron de confiar en mí, y siempre creyeron en que podría llegar lejos en la vida, siempre serán mi más grande orgullo.

A mis abuelitos ángel y goyita, que son mis guías desde el cielo, siempre los recordare con cariño y me duele no poder tenerlos conmigo en este momento.

Iver Antonio Chacón farrera

TABLA DE CONTENIDO

Lista de figuras.....	2
Lista de cuadros.....	3
Resumen. –	4
I.- Introducción	1
Objetivo general.....	3
Objetivos específicos.	3
II.- Revisión bibliográfica.....	4
2.2.- Rasgos físicos.....	4
2.4.- Reproducción.....	5
2.5.- Relevancia de la especie	5
2.6.- conservación.....	6
2.7.- Enterobacterias.....	6
2.8.- Características de <i>Escherichia coli</i>	7
2.8.2.- Patogenicidad de <i>E. coli</i>	7
2.8.2.- serotipo O157:H7	8
2.8.3.- Características bioquímicas <i>E. coli</i> O157:H7	9
III.- Material Y Métodos	11
1.- Área de estudio y población muestral	11
3.1.2 Metodología operativa	12
3.2.- Toma de muestras	13
3.3.- Cultivo bacteriológico	14
3.4.- Análisis bacteriológico de agua.	14
3.5.-Análisis bacteriológico de alimento.....	15
3.6.- Determinación molecular de <i>Escherichia coli</i> secretora de toxina shiga.	16
3.7.- Análisis estadístico.	17
IV.- Resultados.	18
V.- Discusión de resultados.	27

VI.-Conclusión.....	31
VII.- Bibliografía	32

Lista de figuras.

Figura 1 mapa de los municipios donde se ubican las UMAS.....	11
Figura 2 UMA LA HUELLA.....	12
Figura 3 UMA BIOSFERA DEL PEDREGAL.....	12
Figura 4 UMA LA CABAÑA	12
Figura 5 Proceso de las muestras.....	13
Figura 6 Toma de las muestras.....	14
Figura 7 Imagen de los productos de PCR en un gel de agarosa al 2.3%: A; amplificación del marcador molecular stx1 (185 pb) en cepas de <i>E. coli</i> aisladas en iguana verde, B; amplificación del marcador molecular stx2 (165 pb) en cepas de <i>E. coli</i> aisladas en iguana en iguana verde, B; amplificación del marcador molecular stx2 (165 pb) en cepas de <i>E. coli</i> aisladas en iguana verde, B; amplificación del marcador molecular stx2 (165 pb) en cepas de <i>E. coli</i> aisladas en iguana verde, C; amplificación del marcador molecular O157 (265 pb) en cepas de <i>E. coli</i> aisladas en iguana verde. Marcador molecular de 100 pb (Invitrogen).	19

Lista de cuadros.

Cuadro 1 Primers usados empleados en el estudio.	16
Cuadro 2 Frecuencia de Cepas de ECTS aislados en heces de Iguana iguana en Chiapas, México, según el ciclo de producción.....	18
Cuadro 3 Frecuencia de Cepas de ECTS aislados en heces de Iguana iguana en Chiapas, México, según el sexo.....	20
Cuadro 4. Frecuencia de Cepas de ECTS aislados en heces de Iguana iguana en Chiapas, México, según la región.	¡Error! Marcador no definido.
Cuadro 5.Frecuencia de Cepas de <i>E. coli</i> aislados en heces de Iguana iguana en Chiapas, México, según la edad.	22
Cuadro 6.Frecuencia de Cepas de ECTS (N=10) aislados en heces de Iguana iguana en Chiapas, México, según la edad.....	22
Cuadro 7. Frecuencia de Cepas de ECTS O157 (N=5) aislados en heces de Iguana iguana en Chiapas, México, según la edad.....	23
Cuadro 8. Frecuencia de cepas ECTS aislado en agua para iguana verde en cautiverio en Chiapas, México, en función del ciclo.	24
Cuadro 9. Frecuencia de cepas ECTS aislado en alimento fresco para iguana verde en cautiverio en Chiapas, México, en función del ciclo.	25
Cuadro 10. Frecuencia de cepas ECTS aislado en alimento rezagado para iguana verde en cautiverio en Chiapas, México, en función del ciclo.	26

Resumen. –

En los últimos años se ha ido mostrando un incremento en la presencia de reptiles como animales de compañía, de 2001 a 2016, la cantidad de hogares con reptiles, como tortugas, serpientes, lagartijas entre otras, como mascotas aumentó de 1,7 a aproximadamente 4,7 millones; En el caso de las iguanas verdes no es diferente ya que cada vez es más común verlas como mascotas, pero este mismo acercamiento podría suponer un problema de salud pública, ya que las iguanas se han asociado como reservorios de muchas bacterias consideradas de riesgo.

En un estudio previo en iguanas verdes sobre la presencia de *Escherichia coli* diarreogénica, se identificaron cepas ECTS (40,3%) seguida de ECEA (27,4%) y ECET (27,4%). Por lo anterior, y sabiendo que la iguana verde puede ser portadora de estos patotipos de riesgo infeccioso para humanos, el objetivo del presente trabajo fue determinar qué condiciones, tanto internas (propias de la especie) como externas, (medio ambientales), pueden fungir como factores de riesgo en la presencia de ECTS en iguana verde en cautiverio.

Los resultados arrojados fueron consistentes en el sentido de que en ningún caso se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$), a pesar de existir ciertas tendencias.

Si bien los resultados aquí presentados son un aporte al conocimiento de los factores que influyen en la frecuencia de ECTS en la población de iguana verde en cautiverio, se sugieren más estudios considerando variables propias de la bioseguridad a través de modelos que requieren un incremento del tamaño muestral y así obtener resultados de mayor robustez.

Summary

The green iguana is a common species in wildlife conservation units, but there are many questions about its potential as a pathogen carrier and the environmental, physical, or biological conditions that favor its capacity as a pathogen carrier. The green iguana has been associated with carrying many bacteria considered risk for the health of humans and animals, such as Shiga toxin-secreting *Escherichia coli* (STEC). Therefore, the aim of this study was to determine which internal (species specific) and external (environmental) conditions can act as risk factors in the presence of STEC in captive green iguanas. Stool samples were collected from 89 captive iguanas in wildlife conservation management units (UMAs) in Chiapas. Iguanas in reproductive and oviposition stages were considered. Additionally, samples of food and water were collected. Bacteriological cultures were conducted, followed by molecular marker amplification to identify STEC. A frequency of STEC was found primarily with the *stx1* gene, as well as STEC O157, regardless of the stage of the green iguana's reproductive cycle. Gender, region, age, as well as administered water and food, were not statistically associated with the frequency of STEC or STEC O157. The results presented contribute to the understanding of factors influencing the frequency of STEC in the captive population of green iguanas, further studies are recommended considering biosecurity variables through models that require a larger sample size to obtain more robust results.

I.- Introducción

Escherichia coli diarreogénica (ECD) como agentes causales de toxiinfecciones es cada vez más recurrente; en general existen seis patotipos de *E. coli* diarreogénica (ECD) según su patogenicidad y manifestaciones clínicas, sin embargo, destaca el patotipo de *E. coli* secretora de toxina shiga (ECTS) por contener toxinas shiga (*stx1*, *stx2* o ambas) como principales factores de virulencia que le confieren patogenicidad en humanos y animales. Uno de los serotipos de mayor importancia en este grupo es ECTS O157, por su riesgo considerable para la salud humana. (Rhades., et al., 2015). Si bien *Escherichia coli* secretora de toxina shiga (ECTS) O157:H7 es una bacteria zoonótica que se ha reportado en los bovinos, ovinos y cerdos, así como animales clínicamente sanos como gatos, perros y conejos (prevalencias variables entre: 3,2%, y 12,3%) (Bentancor, A. et al., 2008), su presencia en reptiles y los factores externos que favorecen su frecuencia han sido poco investigadas.

Varios países han mostrado un aumento en los reptiles como animales de compañía a lo largo de los años. De 2001 a 2016, la cantidad de hogares con reptiles, como tortugas, serpientes y lagartijas, como mascotas aumentó de 1,7 a aproximadamente 4,7 millones. Hoy en día, casi el 4 % de los hogares estadounidenses tienen reptiles como mascotas, esta misma tendencia también se puede ver en los países europeos, con una población creciente de reptiles domésticos. (Carolina., et al, 2019). En México la popularidad de la iguana verde (*Iguana iguana*) como mascota ha ido en aumento año con año, estos forman parte de la cultura de las personas que conviven con esta especie y se ha transformado en una fuente de alimento para ellos. Como consecuencia de la caza ilegal para su consumo y alteración del hábitat, el número de la Iguana verde en vida libre se vio afectado, por lo que se categorizó como especie en peligro de extinción, por lo cual se implementaron estrategias para su rescate, entre la que destaca la implementación de unidades de mantenimiento para la conservación de la vida silvestre o UMAS, lo cual redujo la brecha en el contacto entre esta especie y las personas con las que conviven. (Carroz, 2006)

El estrecho contacto entre reptiles y humanos puede significar un problema de salud pública, ya que las iguanas se han asociado como reservorios de muchas bacterias, de entre las que destacan, *Campylobacter* spp., *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Klebsiella* spp y *Salmonella* spp. *Salmonella* y *E. coli* destacan por producir enfermedades como la Salmonelosis y Síndrome Urémico Hemolítico, respectivamente, en humanos. La *E. coli* es una bacteria reportada con alta frecuencia (40 a 90%) en los laboratorios clínicos en los casos de gastroenteritis en humanos, en donde normalmente los síntomas se resuelven antes de buscar atención y son raros los casos recomendados para diagnóstico clínico y prescripción médica, sin embargo, cuando los serotipos pertenecen a la categoría de ECST, (*Stx1*, *Stx2* o ambas) como principales factores de virulencia (como lo es el patotipo O157:H7), pueden significar un riesgo considerable para la salud humana. (Roldan, 2016).

En un estudio previo cuyo objetivo fue investigar la prevalencia de *Escherichia coli* diarreogénica (ECD) en el intestino de 240 iguanas verdes cautivas, sus grupos filogenéticos y su perfil de susceptibilidad antibiótica, aislaron 100 cepas de *E. coli* de muestras fecales recolectadas de las iguanas. Se identificaron cepas ECD en el 25,9% de la población analizada. Entre las cepas ECD, la ECTS (40,3%) fue la categoría más prevalente seguida de ECEA (27,4%) y ECET (27,4%). Las cepas ECEP tuvieron la prevalencia más baja, (4,9%) Bautista Trujillo *et al.* (2020). A pesar de los reportes previos, de la creciente popularidad de la iguana verde como mascota y de las estrategias de manejo en las UMAs, se sabe poco sobre las condiciones ambientales que favorecen la presencia de bacterias ECTS O157 en las heces de la iguana verde en cautiverio en las Unidades de manejo ambiental como las *Escherichia coli*, por lo que la información generada contribuye en la comprensión de la diseminación de este tipo de bacterias, con la finalidad de disminuir su frecuencia en la iguana verde en cautiverio.

Objetivo general

Determinar si las condiciones medio ambientales, etapa de reproducción y ovoposición, así como factores externos que influyen en el hábitat de la *Iguana iguana*, se relacionan con la frecuencia de *Escherichia coli* secretora de toxina shiga.

Objetivos específicos.

- Aislar e Identificar *Escherichia coli* en las heces de iguana verde en cautiverio que se encuentran en etapa de reproducción y ovoposición, así como el alimento y agua administrado durante esta fase.
- Identificar si las cepas de *E. coli* aisladas en las heces de las iguanas corresponden a *Escherichia coli* secretora de toxina shiga, a través de la amplificación de los marcadores moleculares *stx1* y *stx2*.
- Identificar si las cepas de *Escherichia coli* secretora de toxina shiga identificadas en las heces de las iguanas muestreadas, así como en los alimentos corresponden al serotipo de *E. coli* 0157, a través de la amplificación del marcador molecular O157.
- Determinar si existe alguna asociación entre las condiciones medio ambientales, etapa de reproducción y ovoposición, así como factores externos que influyen en el hábitat de la Iguana *iguana* con la frecuencia de *Escherichia coli* secretora de toxina shiga.

II.- Revisión bibliográfica

2.1.- taxonomía de la Iguana verde

La iguana verde pertenece al reino Metazoa, Subreino: Eumetazoa, Rama: Bilateria
Grado: Coelomata, Serie: Deuterostomia, Phylum: Chordata
Subphylum: Gnathostomata Superclase: Tetrapoda, Clase: Reptilia,
Subclase: Lepidosauria, Orden: Squamata, Suborden: Iguania Familia: Iguanidae
Subfamilia: Iguaninae, Género: *Iguana*, Especie: *iguana*. (Calderón Mandujano, 2002)

2.2.- Rasgos físicos

De un semblante firme y macizo, y de miembros alargados y fuertes, (lo que le permiten trepar). posee una cola larga (su longitud de ésta suele ocupar dos tercios de la medida total del animal), delgada en la punta, que se va ensanchando conforme más proximal al cuerpo se encuentre.

Su cuerpo se encuentra totalmente cubierto de unas escamas robustas y como un rasgo característico poseen una cresta dorsal. Bajo el maxilar inferior han desarrollado una papada que cuando la extienden les ayuda a calentar su cuerpo al sol. Como muchos reptiles la iguana presenta un pronunciado dimorfismo. El macho es por lo general más grande que la hembra y la cresta dorsal y la papada son más exageradas. (Marycruz Martínez, et al., 2015)

Unos datos curiosos de esta especie es que su tamaño está relacionado con la humedad de su entorno, ah mayor humedad mayor es su tamaño, y que el color de su cuerpo depende de varios factores.

2.3.- Comportamiento

Es una especie diurna de rutinas arbóreas, terrestre y en ocasiones se les puede ver en el agua, esto normalmente en caso de sentirse amenazada, y escapar nadando velozmente. Suele ser una especie dócil, aunque los ejemplares grandes tienden a morder cuando son acorralados.

2.4.- Reproducción

El apareamiento ocurre “supuestamente” durante el invierno, entre los meses de octubre a diciembre, ya que se han observado a hembras grávidas en los meses de enero, febrero y marzo. La anidación suele ocurrir en los meses de febrero a mayo.

El tamaño de la nidada suele variar entre 15 y 60 huevos o incluso más, esto en relación al tamaño y edad de la hembra. El nacimiento de los neonatos acontece aproximadamente a los 90 días posteriores a la puesta, que normalmente inicia en el mes de junio.

A diferencia de la mayoría de las especies de lagartos de las zonas tropicales la iguana se reproduce solo una vez por año. (Calderón Mandujano, 2002)

2.5.- Relevancia de la especie

Es una especie que, al ser herbívora, favorece a la dispersión de semillas y frutos de los árboles de los cuales se alimenta, y, a su vez, sirve en la cadena alimenticia como presa de carnívoros mayores, entre estos el hombre. En algunas comunidades costeras del México, se practica la ingesta de la especie como una fuente alternativa de alimento, ya sea por su sabor, o por creencias como la de que su sangre y huevos ayudan a prevenir ciertas enfermedades.

Además, suelen utilizar la piel de esta especie y en muchas partes lo suelen disecar para vender como decoración. (Calderón Mandujano, 2002)

2.6.- conservación.

Una alternativa para incrementar la población de algunas especies en peligro, es la reintroducción al medio de ejemplares criados en Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre conocidas como UMAs, que promueven la variación de actividades productivas en el sector rural mediante el uso planificado y metódico de los recursos naturales.

La Ley General de Vida Silvestre establece que, sólo a través de las UMAs se lograra el beneficio de ejemplares, partes y derivados de los recursos de vida silvestre. Una UMA de iguanas puede operar bajo varias formas que puede ser en cautiverio, semicautiverio y/o vida libre; las iguanas producidas de esta manera pueden utilizarse para el aprovechamiento de los productos y subproductos, así como para su venta como mascotas a zoológicos y herpetarios. Esto permite, mantener un sustentable equilibrio ecológico. (Marycruz Martínez, et al., 2015)

Las actividades en las UMAs implican un mayor manejo de especies silvestres, y, con ello, la aparición de patógenos que pueden suponer un riesgo de transmisión de enfermedades que podrían afectar a los animales domésticos, o incluso infectar al hombre, pudiendo llegar a constituir un problema de salud pública. Estas infecciones pueden ser transmitidos por diferentes mecanismos, como por contacto directo, ingestión, inhalación, mordeduras o sus combinaciones (Marycruz Martínez, et al., 2015)

2.7.- Enterobacterias

La familia Enterobacteriácea es un grupo de bacterias gramnegativas. aunque se localización habitualmente como saprofitos en el tubo digestivo, y de allí viene su nombre, también son gérmenes ubicuos, que se pueden encontrar en el suelo, el agua y la vegetación, siendo la *Escherichia coli* el agente más prevalente de esta familia. (Farrera, 2017)

Las Enterobacteriaceae son microorganismos que estructuralmente tienen una forma de bastón, miden aproximadamente 1-3 μm de largo y 0,5 μm de diámetro; como en otras bacterias gramnegativas, su envoltura celular se caracteriza por que su membrana interna (o citoplasmática) está conformada de una doble capa de fosfolípidos lo cual regula el paso de cualquier molécula que intente ingresar; mientras que la capa externa, está conformada de un peptidoglucano delgado junto con un espacio periplásmico que posee una gran carga de proteínas.

Entre estas proteínas hay algunas que se difunden hacia el exterior, estas son conocidas como flagelos, que son estructuras que se utilizan para el movimiento y que emergen de una estructura basal que se encuentra en la membrana interna, las fimbrias (o pili comunes), que actúan como adhesinas, y los pili sexuales, son estructuras que contienen plásmidos conjugativos y que se utilizan para mediar la transferencia conjugativa de ADN del plásmido. (Farrera, 2017)

2.8.- Características de *Escherichia coli*.

E. coli posee bacilos gram negativos no esporulante, puede producir de indol a partir de triptófano, no necesita de citratos como fuente de carbono y la no obtención de acetoína.

Como toda Gram -, la cubierta de *E. coli* consta de tres elementos: una membrana citoplasmática, una externa y, en medio, un espacio periplásmico compuesto por un péptido-glucano, siendo esta última estructura la que otorga a la bacteria su forma y rigidez, lo que le permite resistir presiones osmóticas ambientales relativamente altas.

2.8.2.- Patogenicidad de *E. coli*

Hay múltiples cepas de *E. coli* que se pueden hallar dentro de la patología humana con una virulencia característica; Son agentes responsables de muchos casos de gastroenteritis infantil, especialmente en países subdesarrollados, con una letalidad

preocupante, que ha causado la muerte de aproximadamente un millón de niños al año. Estas variedades de este patógenos incluyen al patotipo *E. coli* O157:H7 que en estados unidos es la causa de al menos 20.000 casos de diarrea sanguinolenta y más de 200 decesos al año, debido a una insuficiencia renal que afecta principalmente a niños pequeños y ancianos. (Bautista,. et al., 2020)

Los patotipos, que se expresan con mayor frecuencia en padecimientos, en relación a los síntomas clínicos que generan y factores de patogenicidad son los siguientes: *E. coli* enterotoxigénicas (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* entero agregativas (EA_gEC), *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) y *E. coli* enteroinvasivas (EIEC). (Bautista,. et al., 2020)

2.8.2.- serotipo O157:H7

Se ha evidenciado que el serotipo O157 produce una enterotoxina citotóxica (verotoxinas) sobre las células endoteliales de los vasos, responsables de diarreas hemorrágicas.

Las ECEH constituyen un conjunto de bacterias patógenas responsables de un número de infecciones cada vez mayor. En los años 80, las ECEHS, especialmente el serotipo O157:H7 fueron patógenos emergentes, concretando su importancia para la salud pública alrededor de 1982, después de un brote en los Estados Unidos. (Canet, 2016)

Esta bacteria ha causado un gran numero muertes en los últimos años (sobre todo en países como Estados Unidos, Japón, Escocia, Canadá y Francia). En la actualidad se reportan más de 100 diferentes variantes de ECHE.

Los patotipos de ECHE son responsables de la aparición de signos clínicos variados, que van desde, diarreas simples, hasta una colitis hemorrágica, que puede

empeorar en un síndrome hemolítico y urémico (SHU), que puede ser letal en niños y ancianos; también puede provocar enfermedades como la púrpura trombocitopénica, un padecimiento que consiste en una afectación de la sangre que causa la formación de coágulos de sangre en vasos sanguíneos. Existen otras variantes de *E. coli* productoras de toxina Shiga (ECTS) como los patotipos O55, O111, O103:H2, etc. (Canet, 2016)

2.8.3.- Características bioquímicas *E. coli* O157:H7

El patotipo O157:H7 tiene ciertas variaciones bioquímicas que la distinguen de otras variantes de *E. coli*, entre ellas se menciona el hecho de no poder fermentar el sorbitol en 24 hrs, la incapacidad para producir β glucuronidasa, lo que implica la incapacidad para hidrolizar 4-metil-umbeliferil-D-glucuronido. Muchos factores hacen posible la supervivencia y crecimiento de ECTS en los alimentos, entre los que destacan, la temperatura, el pH, la presencia de sal y la actividad del agua. Algunos estudios sobre temperatura de *E. coli* O157:H7 en carne de res molida sugieren que la cocción de ésta, a una temperatura lo bastante alta como para destruir a las cepas típicas de Salmonella, también lo hará con los organismos de ECTS. (codex alimentarium, 2017)

La temperatura más óptima para la multiplicación del patotipo *E. coli* O157:H7 se encuentra a los 37° C, aunque el organismo también se multiplicara a temperaturas inferiores entre los 8° C a 10° C, incluso a temperaturas altas que van desde los 44° C a 45° C. *E. coli* O157:H7 también sobrevive al proceso de congelación, observándose una reducción en la concentración. El proceso de pasteurización de la leche (72° C durante 16,2 s) es un método seguro para eliminar células de *E. coli* O157:H7. En tanto que en los alimentos cárnicos una temperatura interna aproximadamente de 63° C, supone un punto vital para asegurar la destrucción de *E. coli* O157:H7. Sin embargo, el departamento de Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU recomienda incrementar la temperatura de cocción a 68,3° C, esto después de un brote que involucró a cinco Estados y afectó a más de 700 personas. Se ha observado que *E. coli* O157:H7 es más resistente al ácido que

otras variantes de *E. coli*, lo que aumenta la resistencia de *E. coli* O157:H7 en alimentos ligeramente ácidos, lo que podría explicar la capacidad de sobrevivir durante su paso por el estómago. Algunas ECTS pueden reproducirse en alimentos con un pH desde los 4,4 y un máximo de 9. (codex alimentarium, 2017).

III.- Material Y Métodos

1.- Área de estudio y población muestral

El estudio se realizó en 3 unidades de manejo para la conservación de la vida silvestre (UMAS) en el estado de Chiapas; La huella, ubicada en el Ejido Pedro Méndez, Chiapa de Corzo con latitud 16.3859.0, longitud: 93.0216.8, La cabaña En la carretera costera tramo Arriaga a Tapanatepec con Latitud: 16.230146, Longitud: -93.919444, y por último en La biosfera del pedregal, en la colonia Benito Juárez, Tonalá con Latitud: 15,9230668, Longitud: -93,5393979. Estas unidades fueron seleccionadas por mantener un número alto de ejemplares en cautiverio y por la ubicación geográfica.

Para ello se eligieron a las iguanas verdes de en estas de UMAS por medio de un muestreo estratificado (probabilístico al azar).

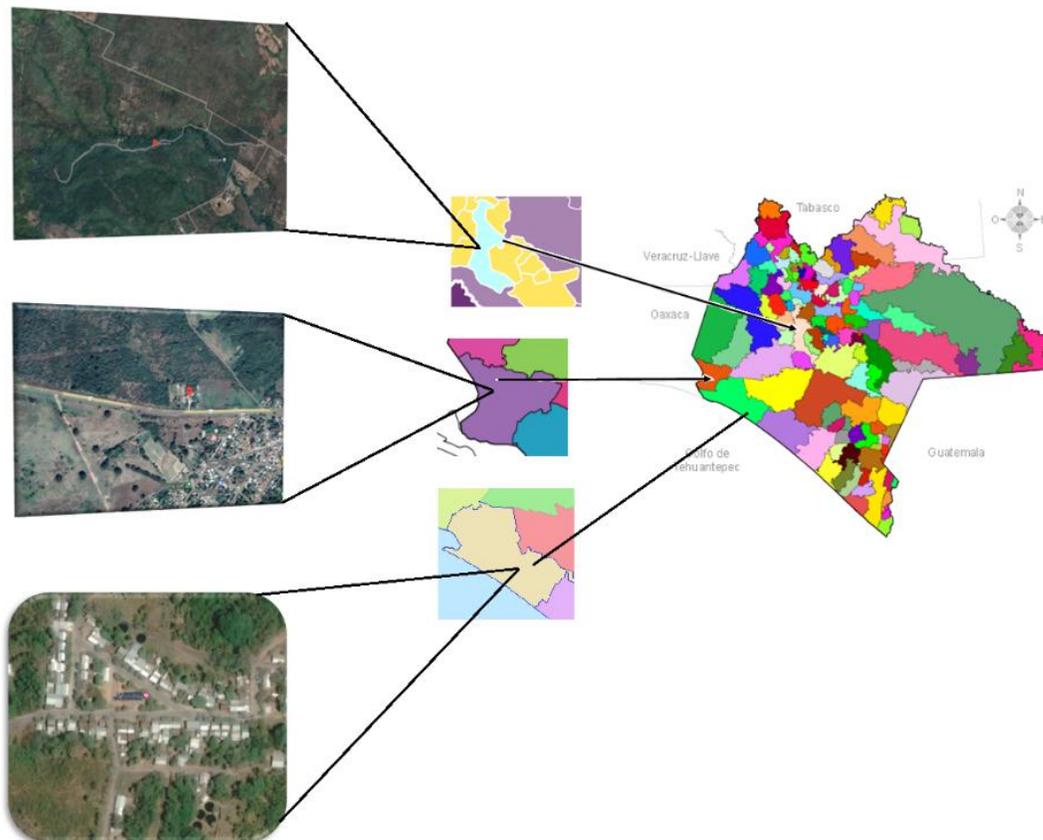


Figura 1 mapa de los municipios donde se ubican las UMAS.



Figura 2 UMA LA HUELLA



Figura 3 UMA BIOSFERA DEL PEDREGAL



Figura 4 UMA LA CABAÑA

3.1.2 Metodología operativa

Se estudió la asociación estadística entre la frecuencia del patógeno y las siguientes categorías:

- La alimentación del animal.
 - Agua
 - Alimento
- Propio la especie.
 - Sexo
 - Edad
- Según el hábitat del animal.
 - Región
- Ciclo productivo
 - Etapa de reproducción
 - Etapa de ovoposición

3.2.- Toma de muestras

Las muestras en los especímenes fueron recolectadas por hisopado cloacal, para ello se insertó un hisopo estéril en la cloaca del reptil y haciendo movimientos de rotación contra las paredes cloacales se garantizó suficiente muestra, todos los procedimientos de muestreo fueron de acuerdo con la guía American Society of Ichthyologists and Herpetologists (HACC, 2014), que garantiza las buenas prácticas durante el muestreo de reptiles. Finalmente, las muestras obtenidas fueron trasladadas al laboratorio de Biología Molecular de la FMVZ-CII de la UNACH para poder aislar, inocular a la bacteria *Escherichia coli*, y proceder a la identificación de las cepas presentes, como se aprecia en la siguiente figura.

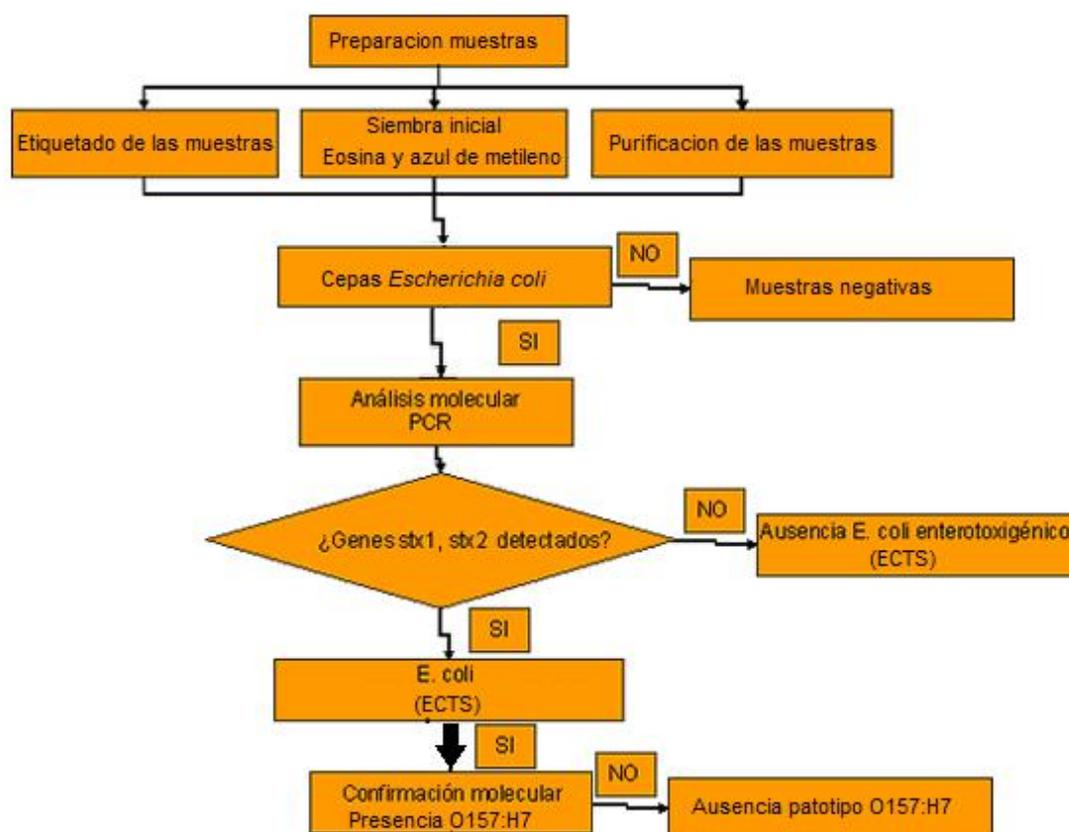


Figura 5 Proceso de las muestras



Figura 6 Toma de las muestras.

3.3.- Cultivo bacteriológico

Las muestras se inocularon en agar de Eosina y Azul de Metileno-EMB (BD-BBL) y simultáneamente en MacConkey-Sorbitol. Los criterios de identificación en los medios de cultivo selectivos y diferenciales fue de acuerdo con la morfología colonial siguiente: para EMB, las colonias de *Escherichia coli* presentaron, a la luz transmitida un centro azul-negro, rodeado de un borde angosto y claro; y brillo metálico azul verdoso, a la luz reflejada, y para MacConkey-Sorbitol *E. coli* exhibe colonias medianas, circulares, convexas, borde entero y de coloración rosada.

3.4.- Análisis bacteriológico de agua.

Para el análisis de agua se utilizó una técnica de trasplante, que es una modificación de la técnica para el análisis de coliformes totales en agua, según el manual práctico de análisis de agua (Fundación Nacional de Salud, 2013). Se recolectaron 41 muestras en frascos de vidrio blanco con boca ancha, tapón de vidrio esmerilado bien ajustado, con capacidad de 125 ml, previamente esterilizados y preparados

con dos gotas (0,1 ml) de Tiosulfato de Sodio a 10% y un tirante de papel aluminio entre la boca y el tapón del frasco; la recolección se llevó a cabo en los bebederos que se encontraban dentro de cada encierro separado de acuerdo con su etapa reproductiva, para ello, se realizó previamente la desinfección de manos con agua y jabón neutro, una vez preparados los materiales se procedió al llenado, con pipetas estériles, limpias y completamente secas, de los frascos, con al menos $\frac{3}{4}$ de su volumen, para luego taparlos e identificarlos, apuntando datos de la recolección, encierro, UMA, etapa y nombre del recolector (Fundación Nacional de Salud, 2013). Para el aislamiento de *E. coli* se realizó un análisis general de agua, para ello se depositó una alícuota de 50 μ L de la muestra en placas de agar, simultáneamente se inóculo en las placas de Agar MacConkey con sorbitol (técnica de trasplantes).

3.5.-Análisis bacteriológico de alimento.

Para el aislamiento de *E. coli* y ECTS O157 se utilizó la técnica modificada para la siembra de alimentos en medios específicos según el Análisis Microbiológico de los Alimentos publicado en el 2011.

Se mezcló 1 g de muestra del alimento que consistía generalmente en una combinación de lechuga, repollo, alfalfa y moringa, en 10 ml de diluyente (caldo peptonado) para obtener una dilución 1:10. Los tubos se incubaron durante 24 horas a 38°C. Posteriormente de la incubación se inocularon 50 μ L de la muestra líquida en la placa de agar. Las placas se incubaron a 38°C durante 24 horas. Se observó la morfología colonial y se seleccionaron las colonias positivas a *E. coli*. (Renaloea, 2011)

3.6.- Determinación molecular de *Escherichia coli* secretora de toxina shiga.

La determinación del patotipo de *E. coli* (ECTS) (*stx1* y *stx2*) se realizó con técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR); se amplificaron los marcadores moleculares que se observan en el cuadro 1.

Cuadro 1 Primers usados empleados en el estudio.

Primer	Secuencia (5'-3')	Objetivo	Proteína codificada	Tamaño (bp)	Referencia
<i>stx1</i>	CTGGATTTAATGTCGCATAGTG (F) AGAACGCCCACTGAGATCATC (R)	<i>stx1</i>	Toxina shiga 1	150	-29
<i>stx2</i>	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC (F) TCGCCAGTTATCTGACATTCTG (R)	<i>stx2</i>	Toxina shiga 2	255	-29
O157	CGGACATCCATGTGATATGG (F) TTGCCTATGTACAGCTAATCC (R)	<i>rfbO157</i>	Polisacárido específico O	259	-33

* F, forward; ** R, reverse.

El ADN total bacteriano se obtuvo mediante lisados bacterianos re-suspendiendo 3 colonias aisladas en 1 ml. de agua desionizada (USB), hirviéndolas durante 1 min y congelándolas hasta su uso. Se utilizó del cepario UNICACH (Javier Gutiérrez Jiménez, et al., 2015), la cepa de la colección *E. coli* 25922 como control negativo, mientras que la ECTS Cepas prototipo EDL933 (O157:H7) se utilizó como control positivo.

Las mezclas de reacción se prepararon con 2.5 µL de Buffer 10x, 1.0 µL de MgCl₂ (50 mM), 2.0 µL de dNTP's (2.5 mM), 0.3 µL Taq polimerasa (5 U/µL), 3.5 µL de la mezcla de iniciadores. Alternativamente también se prepararon, usando una mezcla maestra (Green GoTaq Master mix, Promega) la cual contienen premezclados la Taq polimerasa, el MgCl₂ y los dNTP's (12.5 µL), la mezcla de iniciadores (3.5 µL), el agua libre de nucleasas (7.0 µL) y el lisado bacteriano (2 µL).

Las reacciones se sometieron a las siguientes condiciones de reacción; para los genes *stx1* y *stx2* una desnaturalización inicial a 95°C (5 min, 1 ciclo);

desnaturalización, alineación y extensión a 94°C, 50°C, 72°C respectivamente (45 s para las primeras 2 y 60 segundos para la última temperatura, todas a 35 ciclos) y para el de O157: desnaturalización inicial a 95°C (5 min, 1 ciclo); desnaturalización, alineación y extensión a 95,53°C y 72°C respectivamente (45 s cada temperatura, 32 ciclos) y un paso de extensión final de 10 min a 72°C.

Los productos de PCR se resolvieron en un gel de agarosa al 2.3% a 100 V por 40-60 minutos; como marcador molecular (MPM) se usó la escalera de 100 pares de bases (pb) (Invitrogen). Luego del corrimiento, el gel se tiñó con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y se analizará en el sistema de foto documentación Enduro™ GDS (Labnet internacional).

3.7.- Análisis estadístico.

Se consideraron como variables independientes: La alimentación del animal, Agua, sexo, edad, región, ciclo productivo: reproducción y ovoposición. Como variable dependiente se consideró la positividad para ECTS y ECTSO157. Se realizaron análisis bivariados con las pruebas estadísticas chi cuadrado con significación estadística ($P < 0.05$) y se calculó la Odds Ratio (OR) de la frecuencia (IC 95%). Los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico informático SPSS versión 25.

IV.- Resultados.

Se aislaron 39 cepas de *E. coli* (43.8%) en heces colectadas de 89 iguanas en cautiverio. 23 cepas de *E. coli* (45.09%) se aislaron en iguanas en ciclo de reproducción y 16 cepas (42.1%) se aislaron en iguanas en ciclo de oviposición. A pesar de la mayor tendencia en la frecuencia de *E. coli*, su asociación con el ciclo de reproducción no fue estadísticamente significativa ($p>0.05$). La razón de productos cruzados (OR) fue de 1.13 (IC95%; 0.48-2.63), es decir, el ciclo de reproducción es un factor de riesgo en un 13% para aislar *E. coli* en las heces de las iguanas. El análisis molecular de estas bacterias reveló una mayor frecuencia de ECTS (11.8%) en la población de iguanas en ciclo de reproducción comparado con las iguanas en oviposición (10.5%), principalmente cepas con el marcador molecular *stx1* (11.8%) en heces iguanas en reproducción, no obstante, se detectó el marcador molecular *stx2* (2%) en las iguanas en oviposición. La OR para el marcador molecular *stx1* fue de 2.4 (0.45-12.6). En este mismo sentido, se identificó el marcador molecular O157 en las cepas de *E. coli* aisladas en las iguanas en oviposición (4.5%) y en menor proporción en las iguanas en reproducción (1.1%), la OR fue de 2.7 (0.29-25.4). Según el análisis estadístico, la relación de cepas de *Escherichia coli* secretora de toxina shiga y el ciclo de producción de la iguana, no fue estadísticamente significativa ($p>0.05$), cuadro 2.

Cuadro 2 Frecuencia de Cepas de ECTS aislados en heces de *Iguana iguana* en Chiapas, México, según el ciclo de producción.

Ciclo	Genes de virulencia ECTS: % (N)	<i>p</i>	Estimación de OR	IC 95%
Reproducción (51)	ECTS; 11.8 (6)	0.855	1.13	(0.29-4.33)
Oviposición (38)	ECTS; 10.5 (4)			
Reproducción (51)	stx1; 11.8 (6)	0.289	2.4	(0.45-12.6)
Oviposición (38)	stx1; 5.26 (2)			
Reproducción (51)	stx2; 0	0.098	-	-
Oviposición (38)	stx2; 5.26 (2)			
Reproducción (51)	O157; 1.9 (1)	0.083	2.7	(0.29-25.4)
Oviposición (38)	O157; 10.5 (4)			

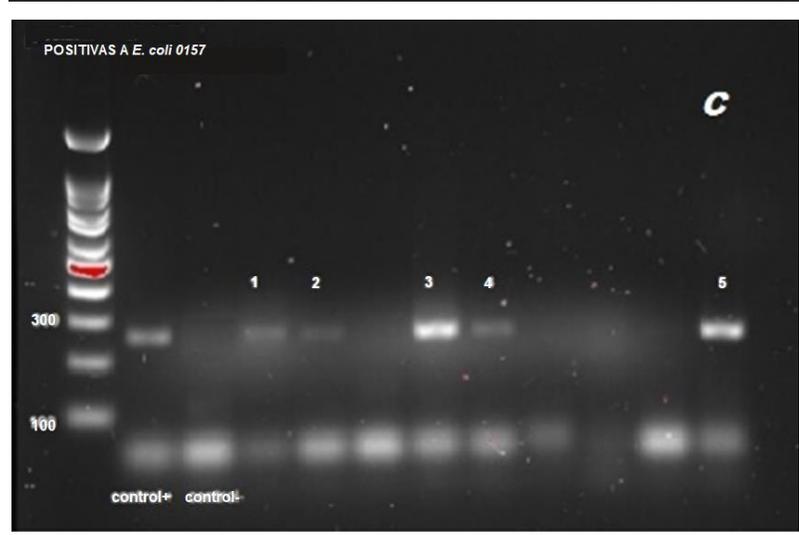
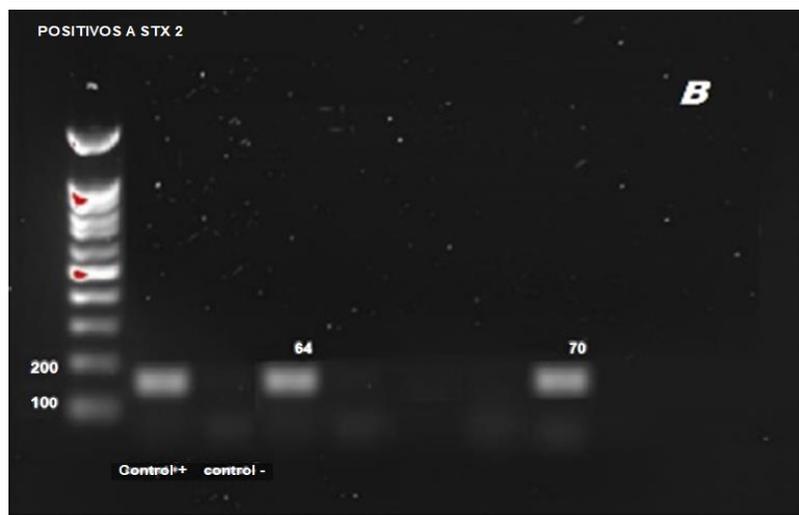


Figura 7,8,9. Imagen de los productos de PCR en un gel de agarosa al 2.3%: A; amplificación del marcador molecular stx1 (185 pb) en cepas de *E. coli* aisladas en iguana verde, B; amplificación del marcador molecular stx2 (165 pb) en cepas de *E. coli* aisladas en iguana verde, C; amplificación del marcador molecular O157 (265 pb) en cepas de *E. coli* aisladas en iguana verde. Marcador molecular de 100 pb (Invitrogen).

Se identificaron 13 cepas de *E. coli* en las iguanas macho (50%) y 26 cepas en las hembras (41.3%), a pesar de la tendencia, la relación de bacteria con el sexo no fue estadísticamente significativa ($p>0.05$). En los machos se determinó la mayor frecuencia de ECTS (15.4%) comparado con las hembras (9.5%), a pesar de la tendencia en machos, la relación entre el sexo y la frecuencia de ECTS no fue estadísticamente significativa ($p>0.05$) y la OR fue de 0.579. La mayor frecuencia de cepas ECTS con el marcador genético *stx1* se encontró en las hembras (9.5%) comparado con los machos (7.7%), sin embargo, la mayor de frecuencia del marcador genético *stx2* (7.7%) y O157 (7.7%) se halló en los machos. A pesar de la tendencia no se observó diferencia estadística significativa (cuadro 2).

Cuadro 3 Frecuencia de Cepas de ECTS aislados en heces de *Iguana iguana* en Chiapas, México, según el sexo.

Sexo	Genes de virulencia ECTS: % (N)	<i>p</i>	Estimación de OR	IC 95%
Hembra (63)	ECTS; 9.5 (6)	0.470	0.579	(0.15-2.25)
Macho (26)	ECTS; 15.4 (4)			
Hembra (63)	stx1; 9.5 (6)	0.784	1.26	(0.24-6.7)
Macho (26)	stx1; 7.7 (2)			
Hembra (63)	stx2; 0	0.083	-	-
Macho (26)	stx2; 7.7 (2)			
Hembra (63)	O157; 4.8 (3)	0.585	0.6	(0.94-3.81)
Macho (26)	O157; 7.7 (2)			

La frecuencia de *E. coli* en la región metropolitana fue de 16 cepas (48.5%) y en la región costa de 23 (41.07%), a pesar de la mayor frecuencia en la zona metropolitana, el análisis estadístico no fue significativo ($p>0.05$) y la OR fue de 0.741. La mayor frecuencia de ECTS (18.2%) se determinó en la región metropolitana comparado con la región costa (7.14%), sin embargo, esta relación

no fue estadísticamente significativo ($p>0.05$), no obstante, la OR fue de 2.9. El marcador molecular *stx1* fue amplificado en mayor frecuencia (12.1%) en la región metropolitana comparado con la costa (7.1%). El marcador molecular O157 en ECTS fue más frecuente en la región metropolitana (9.09%) comparado con la costa (3.57%), tabla 4.

Cuadro 4. Frecuencia de Cepas de ECTS aislados en heces de *Iguana iguana* en Chiapas, México, según la región.

Región	Genes de virulencia ECTS: % (N)	p	Estimación de OR	IC 95%
Metropolitana (33)	ECTS; 18.2 (6)	0.11	2.9	(0.75-11.1)
Costa (56)	ECTS; 7.14 (4)			
Metropolitana (33)	stx1; 12.1 (4)	0.42	0.558	(0.130-2.29)
Costa (56)	stx1; 7.1 (4)			
Metropolitana (33)	stx2; 6.06 (2)	0.135	-	-
Costa (56)	stx2; 0			
Metropolitana (33)	O157; 9.09 (3)	0.355	0.370	(0.059-2.34)
Costa (56)	O157; 3.57 (2)			

La mayor frecuencia de *E. coli* se observó en las iguanas de 4 años (50%) seguido de las iguanas de 5 años (44.4%), 3 años (40.9%), entre otros. La presencia de *E. coli* no fue estadísticamente significativo ($p>0.05$) en ningún caso de edad. El mayor valor de OR (1.5) se identificó en las iguanas de 4 años (cuadro 5).

Cuadro 4. Frecuencia de Cepas de *E. coli* aislados en heces de *Iguana iguana* en Chiapas, México, según la edad.

Edad años (N)	<i>E. coli</i> % (N)	<i>p</i>	Estimación de OR	IC 95%
3 (22)	40.9 (9)	0.808	0.854	(0.32-2.26)
4 (34)	50 (17)	0.386	1.5	(0.63-3.55)
5 (18)	44.4 (8)	0.952	1	(0.36-2.92)
6 (6)	33.3 (2)	0.692	0.622	(0.10-3.58)
7 (3)	33.3 (1)	0.859	1.28	(0.78-21.2)
8 (4)	25 (1)	0.628	0.412	(0.41-4.12)
11 (2)	50 (1)	0.859	0.776	(0.04-12.8)

En las iguanas de 11 años se identificó la mayor frecuencia de ECTS (50%), seguido de las iguanas de 3 años (18.2%), 5 años (16.7%) y 4 años (5.9%). La frecuencia de ECTS no fue estadísticamente significativo ($p > 0.05$) en ningún caso de edad, el mayor valor de Odds Ratio resultó en las iguanas de 11 años (8.6), seguido de 3 años (2.25) y 5 años (1.82), ver cuadro 6.

Cuadro 5. Frecuencia de Cepas de ECTS (N=10) aislados en heces de *Iguana iguana* en Chiapas, México, según la edad.

Edad años (N)	ECTS % (N)	<i>p</i>	Estimación de OR	IC 95%
3 (22)	18.2 (4)	0.25	2.25	(0.57-8.9)
4 (34)	5.9 (2)	0.21	0.37	(0.73-1.84)
5 (18)	16.7 (3)	0.41	1.82	(0.42-7.9)
6 (6)	(0)	-	-	-
7 (3)	(0)	-	-	-
8 (4)	(0)	-	-	-
11 (2)	50 (1)	0.08	8.6	(0.49-150.8)

Se identificó la mayor frecuencia de ECTS O157 en las iguanas de 11 años (50%), seguido de las iguanas de 5 años (11.1%), entre otros. La frecuencia de ECTS O157 no fue estadísticamente significativo ($p > 0.05$) en ningún caso de edad, el mayor valor de Odds Ratio resultó en las iguanas de 11 años (20.7), ver cuadro 7.

Cuadro 6. Frecuencia de Cepas de ECTS O157 (N=5) aislados en heces de *Iguana iguana* en Chiapas, México, según la edad.

Edad años (N)	ECTS O157 % (N)	p	Estimación de OR	IC 95%
3 (22)	4.5 (1)	0.80	0.75	0.8-7.1
4 (34)	2.9 (1)	0.39	0.39	0.41-3.6
5 (18)	11.1 (2)	0.26	2.83	0.44-18.3
6 (6)	(0)	-	-	-
7 (3)	(0)	-	-	-
8 (4)	(0)	-	-	-
11 (2)	50% (1)	0.11	20.7	1.1-395.1

Aislamiento de *E. coli* en agua de bebederos de iguana verde.

El análisis bacteriológico de 41 muestras de agua del área de reproducción, reveló una frecuencia de *E. coli* en 24 muestras (58.5%), este valor fue mayor comparado con la frecuencia de 17 muestras positivas a *E. coli* (41.5%) de 38 muestras de agua del área de oviposición. La relación de la frecuencia de *E. coli* con el ciclo de producción no fue estadísticamente significativo ($p > 0.05$) y la OR fue de 0.573. La mayor frecuencia de ECTS se observó en las muestras de agua del área de las iguanas en ciclo de reproducción (21.9%), La frecuencia de ECTS en el agua no fue estadísticamente significativo ($p > 0.05$) con el ciclo de la iguana, el valor de OR fue menor a 1. Se identificó el marcador molecular *stx1* con mayor frecuencia en las cepas de ECTS aisladas en el área de oviposición (83.3%), además de cepas aisladas en el área de reproducción con el marcador *stx2* (11.1%). Se aislaron cepas ECTS con ambos marcadores *stx1* y *stx2* en iguanas en oviposición (16.6%), además, se identificó el marcador O157 en cepas ECTS con mayor frecuencia en las iguanas en oviposición (50%). El mayor valor de OR (3.42) se identificó en el caso de la frecuencia de ECTS O157 en las muestras de agua relacionadas con el ciclo de oviposición (cuadro 8).

Cuadro 7. Frecuencia de cepas ECTS aislado en agua para iguana verde en cautiverio en Chiapas, México, en función del ciclo.

Ciclo	Genes de virulencia ECTS: % (N)	p	Estimación de OR	IC 95%
Reproducción (41)	ECTS; 21.9 (9)	0.48	0.667	0.21-2.1
Oviposición (38)	ECTS; 15.8 (6)			
Reproducción (9)	stx1; 55.5 (8)	0.45	0.625	0.18-2.1
Oviposición (6)	stx1; 83.3 (5)			
Reproducción (9)	stx2; 11.1 (1)	0.33	0.532	0.41-0.64
Oviposición (6)	stx2; 0			
Reproducción (9)	stx1stx2; 0	0.48	0.526	0.43-0.65
Oviposición (6)	stx1stx2; 16.6 (1)			
Reproducción (9)	O157; 11.1 (1)	0.35	3.42	0.34-34.4
Oviposición (6)	O157; 50 (3)			

Aislamiento de *E. coli* en alimento de *I. iguana*.

Se aislaron 11 cepas de *E. coli* (52.4%) en las muestras de alimento fresco recolectado en el área de las iguanas en oviposición y 10 cepas (27%) en el alimento fresco del área de iguanas en reproducción. La relación de la frecuencia de *E. coli* con el ciclo de producción no fue estadísticamente significativo ($p>0.05$), la OR fue de 1.29 (0.465-3.58). La mayor frecuencia de ECTS se observó en las muestras de alimento fresco del área de las iguanas en ciclo de reproducción (13.5%), La frecuencia de ECTS en el alimento fresco no fue estadísticamente significativo ($p>0.05$) con el ciclo de la iguana, el valor de OR fue menor a 1. Se identificó el marcador molecular *stx1* con mayor frecuencia en las cepas de ECTS aisladas tanto en el área de reproducción como en oviposición (100%), ver cuadro 9.

Cuadro 8. Frecuencia de cepas ECTS aislado en alimento fresco para iguana verde en cautiverio en Chiapas, México, en función del ciclo.

Ciclo	Genes de virulencia ECTS: % (N)	p	Estimación de OR	IC 95%
Reproducción (37)	ECTS; 13.5 (5)	0.432	0.40	0.07-2.21
Oviposición (34)	ECTS; 5.9 (2)			
Reproducción (5)	stx1; 100 (5)	0.432	0.40	0.07-2.21
Oviposición (2)	stx1; 100 (2)			
Reproducción (5)	O157; 20 (1)	1	0.51	0.41-0.64
Oviposición (2)	O157; 0 (0)			

En el ciclo de oviposición se aislaron 18 (62.1%) cepas de *E. coli* de 29 muestras de alimento rezagado del área de iguanas en oviposición y 15 cepas (45.5%) en el área de reproducción. La relación de la frecuencia de *E. coli* aislado de alimento rezagado con el ciclo de producción no fue estadísticamente significativo ($p>0.05$), la OR fue de 1.36 (0.49-3.76). La mayor frecuencia de ECTS se observó en las muestras de alimento rezagado del área de las iguanas en ciclo de reproducción (33.3%), La frecuencia de ECTS en el alimento rezagado no fue estadísticamente significativo ($p>0.05$) con el ciclo de la iguana. Se identificó el marcador molecular *stx1* con mayor frecuencia en las cepas de ECTS aisladas en el área de reproducción como en oviposición (72.7%). Se aislaron cepas de ECTS O157 principalmente en muestras de alimento rezagado del área de reproducción (27.2%) en comparación con el área de oviposición (16.6%). El valor de OR fue menor a 1 en todos los casos, ver cuadro 10.

Cuadro 9. Frecuencia de cepas ECTS aislado en alimento rezagado para iguana verde en cautiverio en Chiapas, México, en función del ciclo.

Ciclo	Genes de virulencia ECTS: % (N)	<i>p</i>	Estimación de OR	IC 95%
Reproducción (33)	<i>ECTS</i>; 33.3 (11)	0.393	0.52	0.16-1.65
Oviposición (29)	<i>ECTS</i>; 20.7 (6)			
Reproducción (11)	<i>stx1</i>; 72.7 (8)	0.194	0.36	0.08-1.51
Oviposición (6)	<i>stx1</i>; 50 (3)			
Reproducción (11)	<i>stx1stx2</i>; 27.2 (3)	0.868	0.52	0.21-6.21
Oviposición (6)	<i>stx1stx2</i>; 50 (3)			
Reproducción (11)	O157; 27.2 (3)	0.616	0.35	0.35-3.63
Oviposición (6)	O157; 16.6 (1)			

V.- Discusión de resultados.

Actualmente es común la preferencia de los reptiles como mascotas, y esto conlleva a mayores preocupaciones por su capacidad como transmisor de infecciones gastrointestinales en humanos como resultado del contacto indirecto, particularmente en niños menores de 5 años y adultos mayores. Existe la preocupación por la frecuencia de bacterias en los reptiles (tortugas, lagartos, iguanas, cocodrilos etc.), que pueden suponer un riesgo a la salud pública. Se han reportado ciertos patotipos de *E. coli* presentes en la iguana verde, entre los que destacan: ECEH, ECEA y ECTS, siendo estas últimas de gran interés pues frecuentemente causan síntomas graves como el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), que puede incluso provocar la muerte en ciertos grupos como son los adultos mayores y menores de edad. En un estudio previo se reveló que la mayoría de las cepas de *E. coli* aisladas en iguana verde (*Iguana iguana*) portaba genes que codifican factores de virulencia asociados con diarrea en humanos (62%) como las que llevan ECTS, ECEA, o patotipos ECET. (Bautista, et al., 2020).

En ese estudio se sospechaba que la contaminación en alimento y las fuentes de agua parecía ser el principal factor para que las iguanas adquirieran cepas ECD, (con una prevalencia de 52 y 48%, respectivamente); no obstante, en esta tesis a pesar de la tendencia en la frecuencia de ECTS en las muestras de agua del área de las iguanas en ciclo de reproducción (21.9%), esta frecuencia en el agua no fue estadísticamente significativo ($p > 0.05$) con el ciclo de la iguana y el valor de OR fue menor a 1. Lo anterior se relaciona con el resultado observado en un estudio con gatos y perros, (Bentancor A; et al., 2008), en el perro no se observó la influencia de la dieta en la carga bacteriana, no así para los gatos, en el que la presentación de casos infecciosos relacionados con alimentos de riesgo alto, se asocia a su dieta frecuente con carne cruda, potenciada con sus hábitos de caza, además, el hábitat y el contacto o convivencia con otros animales demuestran impacto en la proporción de animales portadores de ECTS, para ambas especies.

En los alimentos evaluados se observó la presencia de *E. coli* secretora de toxina shiga, aunque otra forma de determinar si el alimento o agua son un factor de riesgo, o al menos una fuente de infección sería a través de su dieta base, es decir si son herbívoros, carnívoros u omnívoros, como lo que observó, Marta et. al. (Marta Dec. et al., 2022), donde tampoco hubo diferencias significativas entre la frecuencia de *E. coli* en reptiles carnívoros (48,5%, 16 aislados/33 muestras), herbívoros (45,4%, 10/22) y omnívoros (54,5%, 6/11) ($P = 0,886$, $\chi^2 = 0,243$, coeficientes de contingencia = 0,06), esta comparación es viable en iguanas verdes, que, aunque son herbívoras por naturaleza, en los encierros o UMAS, se les suele suministrar alimento de origen animal (procesados)

En un estudio realizado por Ramos et. al. (Ramos, C. et al., 2019) , se observó una frecuencia de aislamiento de *E. coli* en reptiles en cautiverio del 87,5%, y no se encontró diferencia estadística entre la positividad de *E. coli* según los hábitats de los reptiles. Este hallazgo es consistente con los resultados de la presente tesis, en los que la mayor frecuencia de ECTS (18.2%) se determinó en la región metropolitana comparado con la región costa (7.14%), sin embargo, esta relación no fue estadísticamente significativo ($p > 0.05$), a pesar que la OR para ECTS con la región metropolitana fue de 2.9. En suma, estos resultados fueron consistentes con lo publicado por (BATREZ, 2020) y (Bautista, et al., 2020), en los que se reportó la frecuencia de 18.9% de ECTS en muestras de heces obtenidas de iguanas de la región Metropolitana mayor a los reptiles muestreados en la en la región Istmo-Costa, aunque en ese estudio se infiere una asociación entre la procedencia y el grupo patógeno, esto pueden obedecer a que las UMAS de la región Metropolitana, están más propensas a un mayor contacto con el medio urbano, dado que, de acuerdo con el censo del 2015 en esta región de Chiapas, hay una mayor cantidad de población en comparación con la región Istmo. No se descartan otros aspectos que pueden influir en la diseminación de la bacteria, por ejemplo, las iguanas son animales poiquilotermos, o sea su temperatura corporal fluctúa de acuerdo con la temperatura ambiental, el rango de temperatura puede mantenerse entre 29-32 C° durante el día y 20-25 C° durante la noche, por lo que, podría ser un factor para el

éxito en la colonización bacteriana, si la temperatura aumenta, el crecimiento de microorganismos puede generarse en mayor cantidad. (Cerna J.F, 2003).

En esos mismos estudios ((BATREZ, 2020); (Bautista,. et al., 2020)), no se reportó una asociación estadística significativa ($p < 0.05$) entre la edad o el sexo de la iguana y las cepas patógenas, es decir la colonización de las cepas patógenas se presentó en proporciones similares tanto en iguanas adultas (57.42%) y jóvenes (42.57%); esto se asemeja a lo encontrado en el actual estudio, donde se identificaron 13 cepas de *E. coli* en las iguanas macho (50%) y 26 cepas en las hembras (41.3%); en los machos se determinó la mayor frecuencia de ECTS (15.4%) comparado con las hembras (9.5%), la mayor frecuencia de cepas ECTS con el marcador genético *stx1* se encontró en las hembras (9.5%) comparado con los machos (7.7%), sin embargo, la mayor de frecuencia del marcador genético *stx2* (7.7%) y O157 (7.7%) se halló en los machos, a pesar de las tendencias no se observaron diferencias estadísticas significativas en ninguna de las comparaciones.

Este es el primer estudio que relaciona estadísticamente la frecuencia de *E. coli* y la etapa reproductiva de la iguana verde en cautiverio, en su mayoría las investigaciones consideran a los factores como el alimento, agua, y procedencia o hábitat. Los resultados de la tesis evidenciaron cierta tendencia entre la frecuencia de ECTS y los factores evaluados, sin embargo, en ningún caso se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de *E. coli* y alguno de los factores analizados. A pesar de ello, los resultados confirman el aislamiento de patotipos ECTS, y su variante de mayor interés (*E. coli* O157), lo que evidencia sobre la capacidad de la iguana verde *Iguana iguana* como portador de estas bacterias. Se sugieren más estudios sobre la interrelación entre variables y la presencia de los patotipos, no solo a través de modelos que requieren un incremento del tamaño muestral, sino también tomando en consideración variantes que se relacionan directamente con la población objetivo, como las mascotas, así mismo factores propios del hábitat o hogares, ya que los reptiles se están volviendo cada vez más comunes como mascotas domésticas, y con ellos viene el riesgo infecciones no solo de algún patotipo de *E. coli*, sino también de otros patógenos

emergentes, y los ejemplares en vida silvestre, que pueden llegar a ser portadores asintomáticos de estos patógenos (Gopee Neera., et al., 2000); se sugiere llevar a cabo más trabajos sobre tipificaciones de las cepas aisladas en las iguanas verdes, como lo son la genómica y serológica para poder diferenciar las cepas saprofitas de las posibles patógenas para el ser humano.

La iguana verde se ha asociado como portador de otras bacterias de importancia en la salud pública, por lo que sería interesante dilucidar el papel de la iguana como reservorio de otros patógenos como por ejemplo *Salmonella*. Si bien es cierto, la iguana verde en cautiverio es portadora de *E. coli* y algunos de sus patotipos más importantes, por lo que es necesario investigar sobre las medidas de bioseguridad en las unidades de manejo, como lo son el uso de tapetes sanitarios, manejo correcto de los fómites, restricción de los animales como posibles vectores, personal y su vestimenta antes de entrar o salir de los encierros, y los puntos de acceso de la UMA y uso de ropa adecuada, con la finalidad de mitigar la diseminación de los patotipos de *Escherichia coli*.

Conocer el, o los factores de riesgo en iguanas verdes en cautiverio, permite el poder diseñar medidas preventivas destinadas a complementar aquellas basadas en evitar la transmisión de agentes patógenos, (como los patotipos ECTS), de peligro tanto para los humanos como para la propia especie.

VI.-Conclusión.

En la presente tesis se demostró que existe una frecuencia de ECTS (principalmente con el gen *stx1*), así como ECTS O157 independientemente de la etapa del ciclo productivo de la iguana verde. Así mismo, el sexo, la región, la edad, así como el agua y el alimento administrado son factores independientes para la presencia de ECTS o ECTS O157.

Si bien los resultados aquí presentados son un aporte al conocimiento de los factores que influyen en la frecuencia de ECTS en la población de iguana verde en cautiverio, se sugieren más estudios considerando variables propias de la bioseguridad a través de modelos que requieren un incremento del tamaño muestral y así obtener resultados de mayor robustez. El análisis de animales portadores de ECTS mediante la evaluación de aquellos factores de riesgo que condicionan presencia y transmisión merece estudios más profundos.

VII.- Bibliografía

- BATREZ, J. E. (2020). *Genes de virulencia en cepas de Escherichia coli aisladas de iguana verde (Iguana iguana Linnaeus, 1758) en cautiverio*. Tuxtla Gutierrez : UNICACH.
- Bautista,. et al. (2020). Captive green iguana carries diarrheagenic Escherichia coli pathotypes. *Frontiers veterinary science*.
- Bentancor A; et al. (2008). *Factores de riesgo de infección por cepas de Escherichia coli shigatoxigénicas en gatos y perros*. buenos aires: scielo.
- Bentancor, A. et al. (JUNIO de 2008). *SCIELO*. Obtenido de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1668-34982008000100001&lng=es&tlng=es.
- Calderón Mandujano, R. R. (2002). *Propuesta para la realización de 37 fichas biológicas de las especies de herpetofauna incluidas en la NOM-059 presentes en la Península de Yucatán*. mexico, d.f.: conabio.
- Canet, J. J. (16 de ENERO de 2016). *BETELGEUX*. Obtenido de <https://www.betelgeux.es/blog/2016/01/19/escherichia-coli-caracteristicas-patogenicidad-y-prevencion-i/#:~:text=Tambi%C3%A9n%20se%20ha%20demostrado%20que,de%20infecciones%20en%20constante%20aumento>.
- Carolina., et al. (2019). Identification and Characterization of Escherichia coli, Salmonella Spp., Clostridium perfringens, and C. difficile Isolates from Reptiles in Brazil. *Biomed Res Int*.
- Carroz, S. R. (agosto de 2006). *researchgate*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/32937013_La_Iguana_Verde_Como_Especie_Promisoria
- Cerna J.F, N. J.-G. (2003). *MultiplexPCRfordetectionof threeplasmid-bornegenesofenteroaggregative Escherichiacoli strains*. *J ClinMicrobiol*.
- codex alimentarium. (17 de NOVIEMBRE de 2017). Obtenido de <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/meetings/detail/es/?meeting=CCFH&session=49>
- Farrera, I. a. (2017). Susceptibilidad antimicrobiana de Escherichia coli en cocodrilos (archosaurya crocodylia) en el zoológico miguel alvarez del toro. *Tesis de licenciatura*. UNACH, Tuxtla Gutierrez, Chiapas.

- Fundación Nacional de Salud. (2013). *MANUAL PRACTICO DE ANALISIS DEL AGUA*. Brasilia: Coordinación de Comunicación Social.
- Gerardo Uriel Bautista-Trujillo, F. A.-M.-G.-L.-M.-N.-S.-C.-V. (2020). *Captive Green Iguana Carries Diarrheagenic Escherichia coli*. Chiapas: Frontiers.
- Gopee Neera., et al. (2000). A LONGITUDINAL STUDY OF ESCHERICHIA COLI STRAINS ISOLATED FROM CAPTIVE MAMMALS, BIRDS, AND REPTILES IN TRINIDAD. *Zoo and Wildlife Medicine*, 353.
- Javier Gutiérrez Jiménez, et al. (2015). Organización, mantenimiento y preservación de la Colección de Cultivos Bacterianos del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH), México. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*.
- Marta Dec. et al. (2022). Virulence Profiles and Antibiotic Susceptibility of Escherichia coli Strains from Pet Reptiles. *Pathogens*.
- Marycruz Martínez, et al. (Enero - Abril de 2015). La iguana verde (Iguana iguana) y sus parásitos en una unidad de manejo intensivo en la costa de Oaxaca. *Temas de Ciencia y Tecnología vol. 19*, págs. 43-52.
- Mateos-Rodríguez, A. P.-G. (2010). *ENTEROBACTERIAS*. ALBACETE.
- Packer, I. A. (1975). *Bacteriología y virología veterinaria*. zaragoza españa : Acribia .
- Pinacho-Santana B, A. G.-P. (2006). Consideraciones en el manejo reproductivo en iguánidos para aumentar la productividad. *Memorias del IX Taller Nacional Sobre Manejo de Iguanas en cautiverio.*, (págs. 65-72). Guerrero.
- Ramírez-Carroz. (2006). La iguana verde como especie promisoría. *INIA Divulga Recursos Naturales*, (págs. 11-13). Mexico.
- Ramos, C. et al. (2019). Identification and Characterization of Escherichia coli, Salmonella Spp., Clostridium perfringens, and C. difficile Isolates from Reptiles in Brazil. *BioMed research international*.
- Rebhumn, W. C. (1999). *Enfermedades del ganado vacuno lechero*. España : Acribia S.A .
- Renaloe. (2011). *ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS*. ANMAT.
- Rhades., et al. (2015). *Repositorio INTA gov*. Obtenido de https://repositorio.inta.gov.ar/xmlui/bitstream/handle/20.500.12123/12586/INTA_CR_LaPampa-SanLuis_EEAAnquil_Rhades_L._Estidio%20de%20los%20factores%20de%20riesgo%20asociados%20a%20la%20excreci%C3%B3n%20de%20escherichia%20coli%20o157_H7%20en%20bovinos.pdf?

- Roldan, P. G. (2016). *los macroinvertebrados como bioindicadores de la calidad del agua: cuatro décadas de desarrollo en Colombia y Latinoamerica*. RIONEGRO: Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat.
- Roldán-Pérez, G. (2016). *Los macroinvertebrados como bioindicadores de la calidad del agua: cuatro décadas de desarrollo en Colombia y Latinoamerica*. RIONEGRO: Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat. .
- Thaller MC, M. L. (2010). Tracking Acquired Antibiotic Resistance in Commensal Bacteria of Galápagos Land Iguanas: No Man, No Resistance. . *PLoS ONE* 5.
- Valenzuela, L. G. (1981). Contribución al conocimiento de la biología y ecología de *Ctenosaura pectinata* e Iguana iguana (Reptilia: Iguanidae) en la costa de Jalisco. *Tesis de licenciatura*. Universidad Nacional Autónoma de México., Mexico.