



**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y**

**ARTES DE CHIAPAS**

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**T E S I S**

Genes de virulencia en cepas de  
*Escherichia coli* aisladas de iguana  
verde (*Iguana iguana* Linnaeus,  
1758) en cautiverio

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

PRESENTA

**JESÚS EDUARDO PÉREZ BATREZ**



Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Septiembre de 2020

# UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

## TESIS

Genes de virulencia en cepas de  
*Escherichia coli* aisladas de iguana  
verde (*Iguana iguana* Linnaeus,  
1758) en cautiverio

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

**JESÚS EDUARDO PÉREZ BATREZ**

DIRECTOR

Dr. Javier Gutiérrez Jiménez

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

ASESOR

Dra. Lorena Mercedes Luna Cazáres

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Septiembre de 2020



## **AGRADECIMIENTOS**

El presente estudio contó con apoyo financiero procedente del Programa para el Desarrollo del Profesorado (PRODEP) No. C/PFCE-2016-07MSU0002G-13-43 de la Secretaría de Educación Pública de México.

Agradezco al Dr. Javier Gutiérrez Jiménez por la paciencia y dedicación en cada revisión, al igual también por permitirme formar parte de este proyecto.

Se agradece la asistencia proporcionada por el personal de las Unidades de Manejo Ambiental (UMA) de iguana verde del estado de Chiapas.

De igual manera, agradezco a la Dra. Lorena Mercedes Luna Cazáres por el apoyo brindado durante la realización de esta tesis.

Se agradece el apoyo técnico de Dayanf Fernanda Molina, Eglantina Corzo Cobos, Paola Gómez Velázquez, Brenda Ovando Díaz, Gabriel Nucamendi Moguel y Jessica Estrada Vázquez.

## DEDICATORIA

Me gustaría que estas líneas sean para expresar mi más profundo agradecimiento a las personas que me apoyaron incondicionalmente directa o indirectamente en la realización de este proyecto.

Primero quiero agradecer a mis queridos padres Marín Pérez Pérez y Alma Rosa Batrez Juárez por la paciencia que me tuvieron y el apoyo en todas las decisiones buenas o malas que tomo a lo largo de la vida.

A mis hermanos María Magdalena Velázquez Batrez, Alberto Marín Pérez Batrez y Karen Odalis Pérez Batrez, por toda palabra de aliento que me daban cada vez que retornaba a casa.

Otro reconocimiento muy especial es para Addy Dodani Pérez Díaz y Nancy Aracely Pérez Díaz; dos personas que me siguieron diariamente en mi camino universitario sin tener la obligación de hacerlo, siempre estuvieron proporcionándome apoyo.

A mi amiga y compañera de laboratorio Liset Candelaria Pérez Vázquez por hacer que mis días en el laboratorio fueran divertidos a pesar de hacer cientos de PCR.

A mi mejor amigo de la universidad Néstor Kevin Calderón Solís por ser la primera persona en brindarme su amistad cuando llegue por primera vez a Tuxtla Gutiérrez y por acompañarme siempre en los buenos y malos momentos durante estos años de convivencia.

Agradezco a la Lic. Marusia Idzinil Guerrero Peralta por estar siempre en mis momentos críticos y aconsejarme a seguir adelante en lo que me proponga.

Y, por último, pero no menos importante, al odontólogo Exal David Arenas Alvarado por ser ángel y demonio y por hacerme creer que lo esencial es invisible a los ojos.

Esta dedicatoria es especialmente a mi querida tía:

*Profra. Laura Camacho Ramírez †*  
*1969-2020*

*Aprendí el significado de extrañar cuando falleció una persona que realmente quise, porque no se extraña al que no te contesta los mensajes, al que te rompe el corazón o al amigo que se alejó. Se extraña a la persona que no vuelves a ver, ni escuchar su voz y que nunca más vas a poder abrazar.*



# ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS .....	V
ÍNDICE DE FIGURAS .....	VI
RESUMEN .....	VII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Características generales de los reptiles.....	3
2.1.1. Tegumento de los reptiles.....	3
2.1.2. Muda de los reptiles.....	4
2.1.3. Comportamiento de reptiles relacionado con el cautiverio.....	5
2.2. Características de la iguana verde ( <i>Iguana iguana</i> ).....	8
2.2.1. Taxonomía .....	13
2.2.2. Distribución .....	14
2.2.3. Hábitat .....	14
2.2.4. Dieta .....	14
2.2.5. Características sensoriales.....	15
2.2.6. Anatomía de la iguana y su esqueleto.....	16
2.2.7. Aparatos y sistemas de la iguana .....	16
2.3. Aspectos de desarrollo del comportamiento de la Iguana verde.....	17
2.3.1. Comportamiento de defensa territorial.....	18
2.3.2. Comportamiento de combate por apareamiento.....	18
2.3.3. Antidepredadores.....	19
2.3.4. Comportamiento de las crías y los juveniles.....	20
2.3.5. Comportamientos alimenticios.....	20

2.3.6. Comportamiento durante la eliminación de residuos .....	21
2.3.7. Mecanismo de estornudo.....	22
2.3.8. Implicaciones médicas de los comportamientos anormales de la iguana .	22
2.4. Concepto de vida silvestre .....	23
2.4.1. Valor de la fauna silvestre.....	24
2.4.2. Manejo de vida silvestre .....	24
2.4.3. Unidades de Manejo para la Conservación de Vida Silvestre (UMA) .....	26
2.4.4. Objetivo de las UMAS .....	27
2.4.5. Desarrollo de una UMA.....	28
2.4.6. Beneficios de las UMAS .....	28
2.4.7. Riesgo del personal de UMAS .....	29
2.4.8. Requisitos para establecer una UMA.....	31
2.4.9. Plan de manejo de UMAS.....	32
2.5. Requisitos de vivienda para la iguana verde en cautiverio .....	33
2.5.1. Sustrato .....	33
2.5.2. Higiene y vivienda .....	34
2.5.3. Alimentación en cautiverio .....	34
2.5.4. Manipulación y captura en cautiverio.....	34
2.5.5. Requisitos y tiempo de transporte.....	34
2.5.6. Tratamiento rutinario en cautiverio.....	35
2.5.7. Anidamiento en cautiverio.....	35
2.5.8. Periodo de incubación y tamaño de embrague.....	35
2.6. Zoonosis.....	36
2.7. Familia <i>Enterobacteriaceae</i> .....	37
2.7.1 Género <i>Escherichia</i> .....	38

2.8. Patogenicidad y virulencia bacterianas.....	40
2.8.1. <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ETEC).....	42
2.8.2. <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC) también referida como productoras de toxina Vero (VTEC) o secretora de toxina semejante a Shiga (STEC).....	45
2.8.3. <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva (EIEC) .....	48
2.8.4. <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC).....	50
2.8.5. <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC).....	53
2.8.6. <i>Escherichia coli</i> con adherencia difusa (DAEC).....	56
2.8.7. <i>Escherichia coli</i> desprendedora de células (CDEC) .....	58
2.8.8. <i>Escherichia coli</i> adherente-invasiva (AIEC) .....	58
III. ANTECEDENTES .....	60
IV. OBJETIVOS.....	63
4.1 General .....	63
4.2 Específicos.....	63
V. ÁREA DE ESTUDIO .....	64
VI. MÉTODO .....	66
6.1. Población de iguana verde.....	66
6.2. Obtención de muestras .....	66
6.3. Cepas de <i>E. coli</i> control .....	67
6.4. Conservación de cepas de <i>E. coli</i> .....	67
6.5. Obtención de ADN bacteriano.....	67
6.6. Investigación de genes de virulencia de <i>E. coli</i> mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	67
6.7. Análisis de amplicones mediante electroforesis en gel de agarosa .....	69
6.8. Análisis estadístico.....	70



VII. RESULTADOS.....	71
7.1. Distribución de ejemplares de <i>Iguana iguana</i> por región .....	71
7.2. Patotipos de <i>E. coli</i> aisladas de <i>Iguana iguana</i> .....	71
7.3. Identificación de genes de virulencia .....	72
7.4. Asociación entre los patotipos de <i>Escherichia coli</i> con la procedencia de las iguanas. ....	74
7.5. Asociación de la edad y el sexo de <i>I. iguana</i> con el tipo de <i>E. coli</i> .....	75
VIII. DISCUSIÓN .....	76
8.1. Las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de iguana verde albergan genes de virulencia. 76	
8.2. Asociación de la procedencia de iguana verde con los patotipos de <i>E. coli</i> ...	78
8.3. Asociación entre el sexo de las iguanas y la presencia de <i>E. coli</i> patógenas. 79	
IX. CONCLUSIONES .....	81
X. RECOMENDACIONES .....	82
XI. REFERENCIAS DOCUMENTALES.....	83
XII. ANEXO .....	92
Anexo 1. Publicación del trabajo en una revista indizada .....	92

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Reptiles de México en peligro de extinción.....	10
Cuadro 2. Climas y tipos de vegetación de los municipios donde se ubican las UMAS .....	65
Cuadro 3. Primers utilizados para la PCR .....	68
Cuadro 4. Condiciones de reacción para la PCR de ETEC, EPEC, STEC y EIEC ...	69
Cuadro 5. Condiciones de reacción para la PCR de EAEC .....	69
Cuadro 6. Porcentaje de ausencia y presencia de genes utilizados en el estudio ...	72
Cuadro 7. Asociación entre la procedencia de <i>I. iguana</i> con los patotipos de <i>E. coli</i>	75
Cuadro 8. Tabla de contingencia entre la edad y sexo de <i>I. iguana</i> con el tipo de <i>E.coli</i> . .....	75

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Posición y tipos de escamas de reptiles.....	4
Figura 2. Corte esquemático de la piel durante la muda en reptiles.....	5
Figura 3. Iguana verde en cautiverio junto a otra especie distinta.....	6
Figura 4. Dimensiones de un ejemplar joven y adulto.....	8
Figura 5. Ejemplar de iguana verde adulta.....	9
Figura 6. Ojo de iguana verde.....	16
Figura 7. Iguana en posición de defensa ante un depredador .....	18
Figura 8. Iguana verde ( <i>Iguana iguana</i> ) en examinación veterinaria.....	23
Figura 9. Iguana verde en posición elevada y ojos se hacia el objeto de interés.....	30
Figura 10. Tincion de Gram.....	37
Figura 11. Estructura de la pared bacteriana en bacterias.....	38
Figura 12. Sitios de colonizacion de <i>Escherichia coli</i> patógenas .....	40
Figura 13. Mecanismos de patogenicidad microbiana .....	40
Figura 14. Mecanismos de daño al enterocito por patotipos de <i>E. coli</i> .....	42
Figura 15. Mecanismo de daño por <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ETEC).....	45
Figura 16. Internalización y mecanismo de daño de la toxina <i>Stx</i> .....	48
Figura 17. Mecanismos de patogenicidad en <i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC) .....	50
Figura 18. Mecanismo de patogenicidad de EPEC.....	53
Figura 19. Mecanismo de patogenicidad de EAEC .....	55
Figura 20. Mecanismo de patogenicidad de DAEC.....	58
Figura 21. Municipios del estado de Chiapas donde se ubican las UMAS.....	64
Figura 22. Porcentaje de cepas comensales y patógenas .....	71
Figura 23. Amplificación de genes de virulencia típicos en cepas prototipo.....	73
Figura 24. Amplificación de genes de virulencia típicos en cepas de <i>E. coli</i> diarreogénicas aisladas de <i>Iguana iguana</i> .....	74

## RESUMEN

*Escherichia coli* es un bacilo Gram negativo que se encuentra habitualmente en el tracto intestinal de los mamíferos y tiene un impacto relevante para la digestión. Aunque establece una relación comensal con organismos superiores, ciertas clonas denominadas *E. coli* diarreogénicas (DEC), tales como *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* con adherencia difusa (DAEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* desprendedora de células (CDEC) y *E. coli* adherente-invasiva (AIEC), causan diarrea. Así, reptiles como la iguana verde pueden ser portadores de dichas bacterias, lo que representaría un riesgo zoonótico para el humano.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de *E. coli* diarreogénica en iguana verde en cautiverio en Chiapas y determinar si existe asociación de su presencia con la edad y procedencia de los reptiles. Se aislaron un total de 63 cepas patógenas de *E. coli* capaces de causar diarrea (62.3%), donde el patotipo STEC fue el más frecuente (25.7%), en tanto que EPEC fue el de menor frecuencia (3%). No se encontró asociación entre la edad de la iguana con la presencia de DEC ( $p < 0.05$ ); sin embargo, hubo una asociación significativa entre la presencia de DEC con las de iguanas de la región Metropolitana ( $p < 0.05$ ).

Así, la iguana verde mantenida en cautiverio en Chiapas es un reservorio de cepas DEC, lo que representa una fuente de transmisión al ser humano, susceptible de contraer enfermedad gastrointestinal.

## I. INTRODUCCIÓN

*Escherichia coli* es una bacteria Gram negativa de la familia *Enterobacteriaceae* y de la tribu *Escherichia*: es el principal anaerobio facultativo de la microbiota intestinal del humano, en el que tiene un papel importante en el control fisiológico. *E. coli* puede estar presente además en una gran variedad de animales silvestres y domésticos como bovinos, porcinos y ovinos, siendo principalmente los rumiantes y sus heces fecales el reservorio natural de este patógeno (Gallegos *et al.*, 2009). Durante la década de 1940 se comenzó a esclarecer la participación de dicha bacteria como agente causal de las enfermedades humanas (Vidal-Graniel, 2003). Es por ello que la fauna silvestre puede transmitir enfermedades zoonóticas a las poblaciones humanas por el contacto con los animales durante su manejo, por lo que es importante realizar estudios sobre las enfermedades que pueden transmitir (Martínez *et al.*, 2015).

También se ha demostrado que existen variedades particulares de esta bacteria que pueden causar enfermedad diarreica de las que se han identificado por lo menos ocho patotipos, tales como *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) conocida también como, *E. coli* productora de toxina shiga (STEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* de adhesión difusa (DAEC), *E. coli* desprendedora de células (CDEC) y *E. coli* adherente invasiva (AIEC) (Pawłowska y Sobieszcańska, 2017). Cada una de estas posee a nivel cromosomal y plasmídico diferentes genes que participan directamente en la virulencia (Vidal-Graniel, 2003).

Una de las especies silvestres de gran importancia económica en México es la iguana verde (*Iguana iguana* Linnaeus, 1758). Presenta coloraciones variables que van desde el verde olivo a verde brillante y rojizo; esta especie se ha convertido en una fuente de alimento debido al color y sabor de la carne, así como ser comercializada como mascota. Esto ha incidido en la disminución de la población de iguana, por lo que está sujeta a protección especial de acuerdo a la NOM-059-SEMARNAT-2010 y en el Apéndice II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (CITES). Una de las estrategias para

augmentar la población de iguanas es la creación de Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA), que promueven la diversificación de actividades productivas en el sector rural mediante el uso racional, planificado y ordenado de los recursos naturales (Martínez *et al.*, 2015).

Hasta el momento, prácticamente no hay estudios que documenten el papel de la iguana verde como reservorio de variantes patógenas de *Escherichia coli* que causan diarrea, por lo que el propósito de este trabajo fue determinar el potencial de patogenicidad de cepas de *E. coli* aisladas de iguana verde manejada en varias UMAS de Chiapas. Ello permitirá conocer si este reptil alberga estas bacterias con potencial zoonótico para el humano y, en su caso emitir recomendaciones para un mejor control sanitario de estos animales en cautiverio.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Características generales de los reptiles

El término se aplica a los organismos que se arrastran para su desplazamiento (reptan). Los reptiles son animales vertebrados que se incluyen en cuatro grupos: orden Testunines que incluye a las tortugas; orden Scumata que comprende las lagartijas y serpientes; orden Crocodilia representado por los cocodrilos y orden Rhynchocephalia donde se encuentra tuatara o esfenodontes. Entre las características más distintivas de estos animales es su piel que se diferencia por ser seca, cubierta de escamas y desprovista de glándulas que las ayuda a protegerse de la desecación, estos presentan respiración pulmonar y en las tortugas acuáticas una parte de su respiración se lleva en la piel, así como en el epitelio de faringe y cloaca (Canseco-Márquez y Gutiérrez-Mayén, 2010).

Los reptiles son un grupo que adquieren comúnmente la radiación solar como fuente externa para poder regular su temperatura corporal, es por ello que se les denomina ectodermos. Estos animales presentan alimentación variada; las tortugas son omnívoras, es decir, que se alimentan de plantas y animales; los cocodrilos son animales carnívoros; las serpientes y lagartijas se alimentan de vertebrados e invertebrados y las iguanas de plantas (*Idem*).

#### 2.1.1. Tegumento de los reptiles

La piel presenta dos capas; la dermis que está compuesta por el corion (laxo y compacto) y tejido subcutáneo, incluyendo células adiposas y epidermis que comprende tres capas: el estrato profundo o capa generatriz (capa de células cúbicas), el estrato intermedio con trazas de queratinización (zona límite de la muda) y estrato córneo (más o menos queratinizado). Este último se divide en estrato profundo de queratina  $\alpha$  (forma más común de queratina) y uno superficial de queratina  $\beta$  (dura, resistente y no elástica). La epidermis presenta un crecimiento cíclico y por cada muda se acumulan dos ciclos de crecimiento (Meneghel, 2006).

La mayoría de las especies de reptiles tiene el cuerpo cubierto de escamas que de acuerdo a su morfología pueden ser clasificadas en imbricadas; las cuales son de

tamaño pequeño y laminar, gruesas en la parte proximal y finas en la parte distal, son libres y están montadas sobre la proximal de la siguiente escama y las yuxtapuestas que pueden ser pequeñas o medianas, existen dos tipos; las granuladas o tubérculos escamosos que son redondeadas y los escutelos o placas, son de gran tamaño, planas y continuas (Figura 1) (*Idem*).

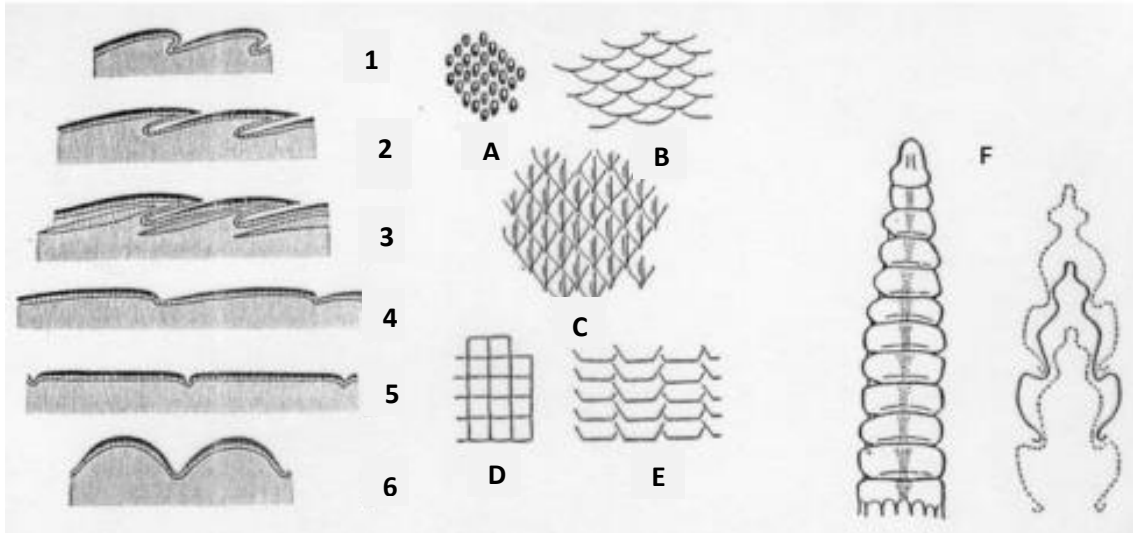


Figura 1. Posición y tipos de escamas de reptiles. (1 y 2) Imbricada; (3) Imbricadas con osteodermo subyacente; (4) Subimbricadas; (5) Yuxtapuestas; (6 y A) Granulares; (B) redondeadas; (C) Carenadas o quilladas; (D y E) Cuadrangulares; (F) cascabel (Meneghel, 2006).

### 2.1.2. Muda de los reptiles

La muda en los reptiles es un proceso de cambio de la capa más externa de piel, necesaria para permitir el crecimiento del animal, la cual se produce incluso antes de la eclosión. La capa córnea de la primera generación se separa de la epidermis de la segunda generación por el estrato intermedio, donde las células son menos queratinizadas (Figura 2). El periodo de premuda comprende opacidad de la córnea y disminución de la actividad general. Su duración es variable según la temperatura, humedad, fisiología y parámetros individuales, el periodo también es variable, entre 1 y 12 meses. La muda es una actividad sometida a los controles hipofisario y tiroideo. La ablación de la tiroides inhibe la formación del estrato intermedio y las mudas no se



suprimen, si no que demoran mucho más. Los ofidios suelen mudar en forma completa y la muda sale completa, en el resto de los reptiles la muda es en parches y en las tortugas se pueden acumular sucesivas mudas sobre ellas (Meneghel, 2006).

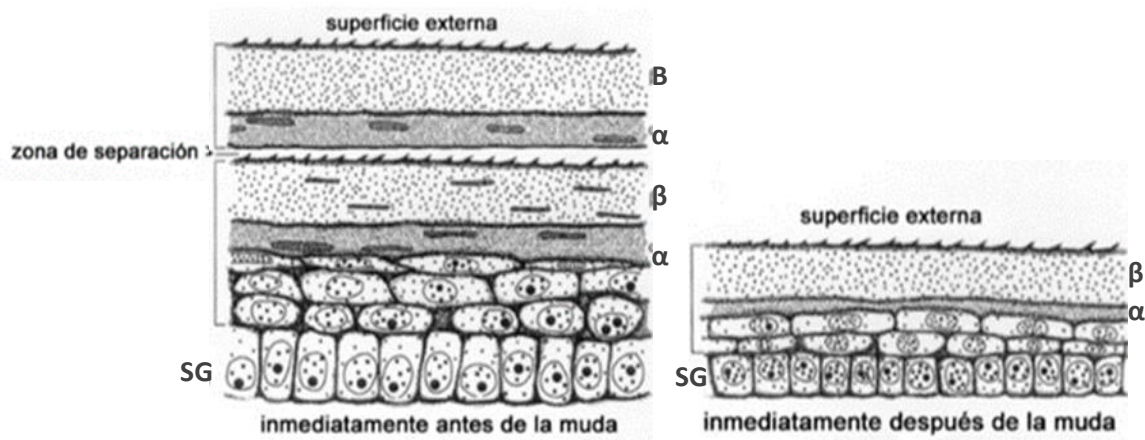


Figura 2. Corte esquemático de la piel durante la muda en reptiles. Se muestran dos estadios, pre y post-muda (SG), estrato germinativo ( $\alpha$ ), capa de queratina ( $\alpha$  y  $\beta$ ) y capa de queratina ( $\beta$ ) (Meneghel, 2006).

Los reptiles periódicamente desprenden su piel y, según la especie, el desprendimiento se producirá completa o en pedazos. Los reptiles a menudo se frotran contra superficies duras como rocas para liberarse de la piel vieja. Un reptil en crecimiento generalmente se desprende de su piel con más frecuencia por ello es aconsejable no manejarlos justo antes de un cobertizo. A menudo, un reptil se negará a alimentarse en este momento (Mayer y Bays, 2006).

### 2.1.3. Comportamiento de reptiles relacionado con el cautiverio

Una característica de los reptiles es que pueden comportarse agresivos cuando se encuentran en un estado de estrés o encierro. Por ello, para evitar este tipo de comportamientos, independientemente de la especie, es inapropiado proporcionar un número excesivo de presas o dejarlas en el recinto por mucho tiempo con un reptil sin interés por alimentarse, esto permite que las especies de presas (ya sean ratones, ratas o grillos) potencialmente puedan causar daño al reptil. También se debe tener en cuenta el comportamiento social o antisocial de una especie determinada para decidir

si es posible enjaular a los congéneres o miembros de diferentes especies juntos (Figura 3), ya que algunas especies de reptiles son naturalmente gregarias (de Vosjoli, 2002).

Por lo anterior, suele ser muy estresante y a menudo peligroso mezclar especies o albergar congéneres si son de naturaleza solitaria como la iguana verde adulta. Por otra parte, los geckos leopardo (*Eublepharus macularis*) y los dragones barbudos (*Pogona vitticeps*) prosperan mejor cuando se mantienen en grupos, especialmente cuando un solo macho se mantiene con múltiples hembras, por ello, los reptiles machos en jaulas que les permitan visualizar a otros machos puede ser socialmente estresante para ellos. Por lo tanto, es mejor evitar una configuración en la que exista contacto visual directo entre ellos (de Vosjoli, 2002).



Figura 3. Iguana verde en cautiverio junto a otra especie distinta (Mayer y Bays, 2006).

El recinto donde se encuentran cautivos debe ser de un tamaño apropiado que permita a los reptiles termorregularse a medida que se mueven alrededor de él y es recomendado proporcionar espacio y escondites adecuados para aliviar el estrés

asociado con el cautiverio. También se deben considerar las tendencias de alimentación al colocar reptiles juntos. Por ejemplo, no sería apropiado poner una especie carnívora con una especie herbívora y fomentar una situación depredador-presa (Mayer y Bays, 2006).

Otras mascotas de compañía, como gatos, perros y pájaros que deambulan libremente en el área en la que se encuentran los reptiles, pueden ser percibidas como depredadores y crear estrés psicológico que conduce a la supresión inmune. Es necesario saber si una especie es arbórea, terrestre o acuática, con el fin de proporcionar el mejor ambiente. Por ejemplo, muchos propietarios y los practicantes en las UMAS no consideran que las iguanas verdes son de naturaleza arbórea y deberían tener dentro de sus jaulas ramas para escalar. Las jaulas para las iguanas deben ser altas. Por otro lado, las iguanas de roca (especies de *Cyclura*) buscan lugares para excavar. Estos comportamientos deberían ser tomados en cuenta al crear y acondicionar recintos apropiados para los reptiles (*Idem*).

El estrés se puede minimizarse cuando la vivienda no es peligrosa para las especies de reptiles y al proporcionar suficiente espacio y escondites apropiados. Se ha teorizado que la actividad de tomar el sol observada en los reptiles, puede indicar una posición jerárquica en un grupo, por lo que el más dominante está en la posición más alta para tomar el sol. Por ejemplo, en un estudio de iguanas verdes juveniles cautivas, alojadas en un sitio donde el calor suplementario y los sitios de percha fueron limitados, mostró una divergencia en el crecimiento y el comportamiento, ya que los machos dominantes crecieron rápidamente y usaron las fuentes de calor suplementarias dos veces más que otros machos subordinados (*Idem*).

Sin embargo, los reptiles juveniles a menudo exhiben un estilo de vida más social. Mientras que las iguanas no sean sexualmente activas para evitar peleas entre machos y haya suficiente comida disponible, los juveniles se agregarán sin comportamientos agonistas. Esto es evidente en las iguanas verdes juveniles, que tienden a permanecer en el suelo y viven bajo arbustos gruesos en grupos, a menudo duermen con la cabeza apuntando hacia el exterior del cepillo para permitir la detección temprana de los depredadores lo que demuestra el hecho de que la

organización social de algunos reptiles puede ser más compleja de lo que se pensaba anteriormente (Mayer y Bays, 2006).

Para los reptiles mascotas, el manejo regular y suave durante períodos de tiempo crecientes puede ayudarlos a aclimatarse al manejo. Sin embargo, es importante darse cuenta de que algunas especies son más sensibles a este procedimiento. Es igualmente importante recordar que, como criaturas salvajes, los reptiles nunca son domesticados y actuarán y reaccionarán instintivamente; por lo tanto, no pueden ser completamente domesticados (*Idem*).

## 2.2. Características de la iguana verde (*Iguana iguana*)

Es un reptil de hábitos arbóreos, diurno, herbívoro, que en estado adulto puede alcanzar hasta 2 m de longitud (Figura 4) (Martinez-Salazar *et al.*, 2015). Cabe mencionar que los ejemplares en cautiverio alcanzan dimensiones inferiores respecto a los ejemplares en estado silvestre, ya que se rompen la cola frecuentemente y la nueva nunca alcanza la misma longitud original (Millefanti, 2016). Generalmente pesan entre 4.5 y 8 kg, promediando 7 kg pero pueden alcanzar hasta los 18 kilogramos (Martinez-Salazar *et al.*, 2015).

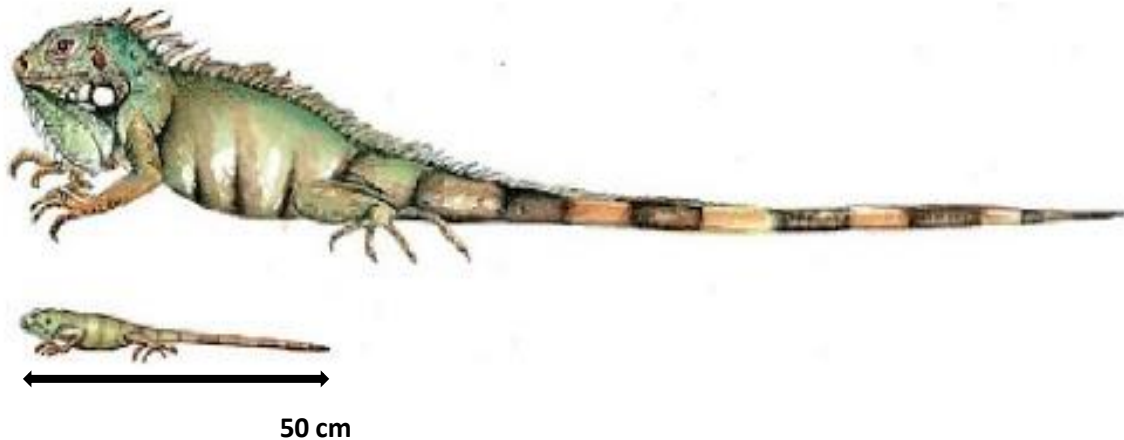


Figura 4. Dimensiones de un ejemplar joven y adulto (Millefanti, 2016).

La iguana verde presenta una cabeza grande redondeada en su parte anterior, con una membrana timpánica a cada lado donde justo encima se encuentra una serie de escamas modificadas en forma de tubérculo y debajo se encuentra una escama auricular o subtimpánica rodeada de un borde negro (Figura 5). Bajo la mandíbula hay

una gran papada, también denominada gola, rodeada en su zona anterior por una cresta, mientras que en la región dorsal se halla otra, que al variar la zona corporal en la que se encuentra, adopta la denominación de cresta occipital, dorsal y caudal (Millefanti, 2016).



Figura 5. Ejemplar de iguana verde adulta. Se aprecia la membrana timpánica (MT) y la escama auricular (EA) (Millefanti, 2016).

Cuando se encuentra amenazada, la iguana verde puede sumergirse en fuentes de agua durante varios minutos mientras pasa la amenaza, o bien pueden caer de una altura de hasta 40-50 pies (Mayer y Bays, 2006).

En la línea media dorsal del cráneo tiene un ojo parietal, el cual es un órgano sensorial, aunque no es un verdadero "ojo", ya que sirve como un medidor de energía solar y ayuda en la maduración de los órganos sexuales, la glándula tiroides y glándulas endocrinas. El efecto visual de este 'ojo' se limita principalmente a la detección de sombras depredadoras desde arriba. La cola de las iguanas verdes puede romperse si es atrapada por un depredador, pero vuelve a crecer sin daño permanente. La iguana verde adulta tiene pocos depredadores naturales, además de los grandes felinos y cocodrilos. Se pueden encontrar poblaciones salvajes en California, Florida y Hawai (EUA). Estas poblaciones consisten en individuos que

escaparon del cautiverio o fueron liberados deliberadamente por sus dueños las cuales son realmente dañinas para las especies nativas ya que suelen competir por las fuentes de alimentos. Cabe destacar que es ilegal poseer iguanas en un estado como Hawai, a pesar de que existen poblaciones salvajes (Mayer y Bays, 2006).

Las iguanas son una fuente de proteína para los humanos, además se les atribuyen cualidades medicinales (Arcos-García *et al.*, 2010). Es una especie que es cazada tradicionalmente por los nativos y mestizos para su consumo, lo que ha disminuido la población natural poniéndola así sujeta a protección especial de acuerdo a la NOM-059-SEMARNAT-2010 y en el apéndice dos de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES por sus siglas en inglés) (Cuadro 1) (Martínez-Salazar *et al.*, 2015), es por ello que se crearon programas de desarrollo para evitar la extinción. Las Unidades de Manejo para la Conservación de Vida Silvestre (UMAS) son alternativas para atenuar el problema (Martínez-Salazar *et al.*, 2015), sin embargo, en México las condiciones reproductivas de las hembras en cautiverio es poco conocida (Arcos-García *et al.*, 2010).

Cuadro 1. Reptiles de México en peligro de extinción (CITES-Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2014).

Nombre común del reptil	Nombre científico	Estatus	Apéndice CITES
Escorpión de árbol, lagarto alicante de bromelia	<i>Abronia taeniata</i>	Sujeta a protección especial	-
Iguana negra	<i>Ctenosaura pectinata</i>	Amenazada	I
Iguana verde	<i>Iguana iguana</i>	Sujeta a protección especial	II
<b>Caimanes y cocodrilos</b>			
Caimán	<i>Caimán cocodrilus</i>	Sujeta a protección especial	II
Cocodrilo de pantano	<i>Crocodylus moreletti</i>	Sujeta a proteccion especial	I

Cocodrilo de río	<i>Crocodylus acutus</i>	Sujeta a protección especial	I
<b>Serpientes</b>			
Cascabel	<i>Crotalus molossus</i>	Sujeta a protección especial	-
Cascabel tropical	<i>Crotalus durissus</i>	Sujeta a protección	-
Culebra sorda mexicana	<i>Pituophis deppei</i>	Amenazada	-
Culebra real coralillo	<i>Lampropeltis triagulus</i>	Amenazada	I
Boa	<i>Boa constrictor</i>	Amenazada	I
<b>Tortugas</b>			
Pochitoque	<i>Kinosternon acutum</i>		I
Pochitoque	<i>Kinosternon herrerae</i>	Sujeta a protección especial	I
Tortuga galápagos	<i>Staurotypus triportacus</i>	Sujeta a protección especial	I
Tortuga lagarto	<i>Chelydra serpentina</i>	Sujeta a protección especial	I
Tortuga pinta	<i>Trachemys scripta</i>	Sujeta a protección especial	I

El Apéndice I del CITES prohíbe el comercio internacional, salvo si la importación se efectúa con fines no comerciales (alrededor de 510 especies de animales y 320 especies de plantas). El Apéndice II menciona que el comercio internacional de estas especies está reglamentado siempre y cuando no se ponga en peligro su supervivencia (alrededor de 4 066 de especies de animales y 25 161 especies de plantas), en tanto que el Apéndice III permite el comercio internacional bajo determinadas condiciones (CITES, 2014).

A continuación, se describe el reglamento del comercio de especímenes de especies incluidas en el Apéndice II como la *Iguana iguana*, de acuerdo al CITES (2014).

1. Todo comercio de especies incluidas en el Apéndice II se realizará de conformidad con las disposiciones de esta reglamentación:
2. La exportación de cualquier espécimen de una especie incluida en el Apéndice II requerirá la previa concesión y presentación de un permiso de exportación, el cual únicamente se concederá una vez satisfechos los siguientes requisitos:
  - a) Que una autoridad científica del estado de exportación haya manifestado que dicho proceso no perjudicará la supervivencia de esa especie.
  - b) Que una autoridad administrativa del estado de exportación haya verificado que el espécimen no fue obtenido en contravención de la legislación vigente en dicho estado sobre la protección de su fauna y flora.
  - c) Que una autoridad administrativa del estado de exportación haya verificado que todo espécimen vivo será acondicionado y transportado de manera que se reduzca al mínimo el riesgo de heridas, deterioro en su salud o maltrato.
3. Una autoridad científica de cada parte vigilará los permisos de exportación expedidos por ese estado para especímenes de especies incluidas en el Apéndice II y las exportaciones efectuadas de dichos especímenes. Cuando una autoridad científica determine que la exportación de especímenes de cualquiera de esas especies debe limitarse a fin de conservarla, a través de su hábitat, en un nivel consistente con su papel en los ecosistemas donde se halla y en un nivel suficientemente superior a aquel en el cual esa especie sería susceptible de inclusión en el Apéndice I, la autoridad científica comunicará a la autoridad administrativa competente las medidas apropiadas a tomarse, a fin de limitar la concesión de permisos de exportación para especímenes de dicha especie.
4. La importación de cualquier espécimen de una especie incluida en el Apéndice II requerirá la previa presentación de un permiso de exportación o de un certificado de reexportación.
5. La reexportación de cualquier espécimen de una especie incluida en el Apéndice II requerirá la previa concesión y presentación de un certificado de reexportación, el cual únicamente se concederá una vez satisfechos los siguientes requisitos:



- a) Que una autoridad administrativa del estado de reexportación haya verificado que el espécimen fue importado en dicho estado de conformidad con las disposiciones de la presente convención.
  - b) Que una autoridad administrativa del estado de reexportación haya verificado que todo espécimen vivo será acondicionado y transportado de manera que se reduzca al mínimo el riesgo de heridas, deterioro en su salud o maltrato.
6. La introducción procedente del mar de cualquier espécimen de una especie incluida en el Apéndice II requerirá la previa concesión de un certificado expedido por una autoridad administrativa del estado de introducción. Únicamente se concederá un certificado una vez satisfechos los siguientes requisitos:
- a) Que una autoridad científica del estado de introducción haya manifestado que la introducción no perjudicará la supervivencia de dicha especie.
  - b) Que una autoridad administrativa del estado de introducción haya verificado que cualquier espécimen vivo será tratado de manera que se reduzca al mínimo el riesgo de heridas, deterioro en su salud o maltrato.
7. Los certificados a que se refiere el párrafo 6 del presente artículo podrán concederse por períodos que no excedan de un año para cantidades totales de especímenes a ser capturados en tales períodos, con el previo asesoramiento de una autoridad científica que haya consultado con otras autoridades científicas nacionales o, cuando sea apropiado, autoridades científicas internacionales.

### **2.2.1. Taxonomía**

**Reino:** Animalia

**Subreino:** Eumetazoa

**Phylum:** Chordata

**Subfilo:** Vertebrata

**Clase:** Reptilia

**Orden:** Squamata

**Suborden:** Lacertilia

**Infraorden:** Iguania

**Familia:** Iguanidae

**Género:** Iguana

**Especie:** *Iguana iguana* Linnaeus, 1758 (Solorzano y Canales, 2009).

### **2.2.2. Distribución**

La iguana verde es originaria de los bosques húmedos tropicales de América Latina (Martinez-Salazar *et al.*, 2015). Además, ha sido introducida a Anguilla (Isla e islotes que son territorios británicos en el Caribe oriental), Las Bahamas, Barbuda, Islas Vírgenes Británicas, Islas Canarias, Islas Caimán, así como Florida y Hawai en los Estados Unidos (Bock, 2015).

En México se encuentra desde Sinaloa hasta Chiapas (por el Pacífico) y desde Veracruz hasta Quintana Roo en la parte del Golfo (Arcos-García *et al.*, 2010).

### **2.2.3. Hábitat**

*Iguana iguana* se encuentra en el bosque húmedo tropical y mayormente vive de forma arbórea, descendiendo al suelo principalmente para anidar. Puede habitar otros tipos de hábitat como el bosque seco, bosque de galería, sabanas con poca vegetación arbórea e islas con vegetación exclusivamente arbustiva. Estos animales duermen principalmente entre la vegetación, pero en algunos casos se ha observado individuos durmiendo en túneles que construyen en el suelo (*Idem*).

### **2.2.4. Dieta**

La iguana verde es uno de los pocos herbívoros generalistas de dosel de los bosques tropicales, aunque presentan preferencia por algunas especies de plantas. Los caracoles e insectos que habitan en la vegetación forman parte de su alimentación secundaria, también se ha documentado el consumo de tejidos de animales muertos (Bock, 2015). Las iguanas de cría tienden a comer heces de las iguanas adultas, lo que puede ser una adaptación para adquirir la flora intestinal tan necesaria para la

descomposición de los alimentos y hacerlos disponibles para la absorción, la que generalmente dura de 1 a 3 semanas. Se sabe que la iguana verde de cría también come tierra desde el interior de su cámara de nido, los microbios presentes en el suelo pueden ayudar en la descomposición de la materia vegetal dura que se convertirá en su dieta básica. La mayor parte de la digestión ocurre en el colon saculado, donde la flora intestinal descompone la celulosa (Mayer y Bays, 2006).

### **2.2.5. Características sensoriales**

La mayoría de las especies de reptiles no usan solo la visión, sino que combinan la vista con otros sentidos para procesar la información. Debido a que existen tantas especies diferentes de reptiles, no es sorprendente que la estructura del ojo difiera entre ellas. Se ha demostrado que las iguanas verdes tienen una buena agudeza visual, pueden distinguir los colores, entidades, contornos y actividades desde lejos. Utilizan dos ojos para ver el panorama y poder desplazarse por espesas selvas en busca de alimento. Los ojos son de tamaño pequeño, el iris es de color bronce y poseen tres párpados que se denominan inferior, superior y nictitante (Figura 6) (De Vosjoli *et al.*, 2007).

El oído de las iguanas carece de conducto auditivo, en lugar de este, poseen una membrana timpánica que se ubica externamente y que les otorga la capacidad de captar muy fácilmente los sonidos (*Idem*).

Una característica muy importante, desde el punto de vista de la anatomía de la iguana, es la presencia de un ojo parietal (también llamado pineal o tercer ojo). Este órgano fotosensorial es parte del epítalamo, es sensible a la luz y a la oscuridad por lo que regula el ritmo circadiano y también participa de la producción de hormonas para la regulación de la temperatura (termorregulación) (*Idem*).



Figura 6. Ojo de iguana verde. Se aprecia el ojo de tamaño pequeño, el iris con una coloración bronce (De Vosjoli *et al.*, 2007).

### **2.2.6. Anatomía de la iguana y su esqueleto**

El esqueleto de las iguanas es muy similar al que encontramos en los mamíferos, la diferencia más significativa es la ausencia de escápulas, por lo que su cintura escapular se encuentra incompleta. Poseen cuatro extremidades con cinco dedos cada una, las uñas son grandes y afiladas. En los miembros posteriores, los dedos tres y cuatro se encuentran más desarrollados, lo que colabora con el desplazamiento arborícola (De Vosjoli *et al.*, 2007).

En la anatomía de la iguana, el cráneo se encuentra bien formado, las mandíbulas son fuertes y robustas, presentan numerosos dientes de tamaño pequeño que se encuentran adaptados para triturar hojas y flores (*Idem*).

### **2.2.7. Aparatos y sistemas de la iguana**

De acuerdo a la descripción que hace De Vosjoli *et al.* (2007) el aparato digestivo de la iguana verde es largo y compartimentado, el cual da lugar para contener grandes cantidades de vegetales en especial en el colon, el cual se encuentra saculado. Para la excreción de desechos, al igual que el resto de los reptiles, presentan una cloaca antes del comienzo de la cola.

La lengua de la iguana verde es carnosa con la que realiza un típico lengüeteo, el cual consiste de exponer e introducir la lengua repetidas veces para captar

partículas que se encuentran en el ambiente y así presentarlas a su órgano de Jacobson (órgano auxiliar al sentido del olfato).

En cuanto al sistema cardiorrespiratorio, las iguanas no poseen diafragma, por lo que no presentan una verdadera cavidad torácica separada de la abdominal. El corazón se encuentra formado por solo tres aurículas (dos aurículas y un ventrículo).

El sistema nervioso destaca por la presencia de un cerebro con dos hemisferios lisos, los bulbos olfativos y los ópticos se encuentran desarrollados. La médula espinal se prolonga hasta el final de la cola.

### **2.3. Aspectos de desarrollo del comportamiento de la Iguana verde (*Iguana iguana*)**

Para comprender el comportamiento de los reptiles, se debe tener en cuenta su naturaleza evolutiva. El concepto de ontogenia es relativamente nuevo en la investigación herpetológica. Se pueden clasificar aproximadamente cinco etapas de desarrollo en la vida de un reptil:

1. Etapa prenatal o embrionaria, con énfasis en el desarrollo y la genética.
2. Etapa de cría o juvenil, en la cual una alta tasa de crecimiento es característica y puede aumentar el nivel de reacciones de lucha o de huida observados, así como la competencia intraespecífica, principalmente por alimentos.
3. Etapa de madurez sexual o edad adulta joven e involucra un cambio del crecimiento a la madurez sexual y el comportamiento asociado.
4. Edad adulta, cuando el crecimiento continuo es mínimo o nulo y la reproducción está aumentando (por ejemplo, un gran tamaño de embrague).
5. Se caracteriza por el proceso metabólico del reptil más viejo (Mayer y Bays, 2006).

Las etapas ontogénicas se basan principalmente en cambios en el comportamiento. El conocimiento límite de estas etapas y sus patrones de comportamiento asociados es especialmente significativo en el manejo de una colonia reproductiva. En la iguana verde macho, el tamaño del poro de la glándula femoral y

la cantidad de secreciones están correlacionadas con la edad y el mantenimiento de relaciones de dominio, además que se relaciona positivamente con los niveles plasmáticos de testosterona durante la temporada de reproducción en individuos mayores de 12 meses de edad. Para el manejo de reptiles en cautiverio es de suma importancia conocer la estructura social de las especies de reptiles (Mayer y Bays, 2006).

### **2.3.1. Comportamiento de defensa territorial**

La defensa territorial suele ser un comportamiento intraespecífico, ya que un individuo solo defenderá su territorio de un tipo específico. La reacción de defensa territorial más fuerte se puede ver en las especies de reptiles más sociales. Los comportamientos agresivos en la naturaleza se estimulan en respuesta a los depredadores y a establecer territorios (Figura 7). Las iguanas machos pueden ser bastante agresivas y se ha documentado que se matan entre sí por peleas territoriales (Pough, 2004).



Figura 7. Comportamiento de *I. iguana* en la defensa territorial. Se aprecia un ejemplar de iguana verde en posición de defensa ante un depredador (Mayer y Bays, 2006).

### **2.3.2. Comportamiento de combate por apareamiento**

El comportamiento motivado por apareamiento es uno de los más comúnmente observados y descritos en reptiles. Pocas especies de reptiles han demostrado ser monógamas. El combate por apareamiento ocurre entre dos machos de la misma especie (combate intrasexual). En contraste, la lucha no suele provocar víctimas

mortales, el ganador tendrá el derecho de aparearse y el animal subordinado tendrá que abandonar el grupo o retirarse temporalmente. Desafortunadamente, las lesiones graves y las muertes son mucho más comunes en reptiles en cautiverio, porque el macho subordinado no tiene la oportunidad de huir (Merin y Bush, 2000).

Los problemas con la agresión sexual hacia los humanos por parte de los reptiles se han reportado más comúnmente con la iguana verde durante la temporada de reproducción, que es cuando los niveles hormonales fluctúan. Algunas iguanas volverán a su comportamiento dócil después de que se complete la temporada de reproducción, pero otras pueden seguir siendo agresivas. La castración de iguanas machos antes de la madurez sexual puede ayudar a disminuir la posibilidad de agresión relacionada con la reproducción hacia las personas y otras mascotas (Merin y Bush, 2000).

### **2.3.3. Antidepredadores**

Diferentes especies de reptiles han desarrollado diversos comportamientos para evitar o frustrar a los depredadores. Los comportamientos defensivos se pueden separar en categorías pasivas y activas. Aunque la mayoría de las especies de presas intentarán evitar la detección o huir de la zona de peligro inmediata (comportamiento pasivo), a veces es necesaria la interacción directa y la confrontación con el depredador (comportamiento activo). Las iguanas verdes cautivas generalmente no se encuentran con ningún depredador natural, pero algunos de los comportamientos pueden ser provocados por los cuidadores, especialmente si el vínculo humano-reptil no está bien establecido. Esta es la razón por la cual el conocimiento de estos patrones de comportamiento es extremadamente significativo en el entorno clínico, ya que la mala interpretación de estos comportamientos tiene el potencial de causar daños tanto al reptil como al manipulador (Mayer y Bays, 2006).

Los lagartos a menudo usan la cola para golpear a los depredadores o si son provocados en la sala de examen. Una iguana verde grande puede asumir una postura en forma de U con la cabeza y la cola presentadas cuando se defiende de la presunta depredación. En esta postura, el cuerpo está protegido, la cola puede usarse como arma o sacrificarse y la boca está lista para infligir lesiones si es necesario (*Idem*).

Las iguanas pueden perder el aspecto distal de la cola cuando son agarradas por un depredador perseguidor o alguna persona. Con frecuencia, el trozo de cola que se cae continuará retorciéndose para distraer al depredador mientras el reptil se escapa. Por lo tanto, la cola nunca debe usarse para contenerlas. La cola se rompe en un plano de fractura en el centro de una vértebra. Después de varios meses, una varilla cartilaginosa más corta reemplazará el hueso y las escamas que lo cubren serán irregulares y descoloridas (Mayer y Bays, 2006).

#### **2.3.4. Comportamiento de las crías y los juveniles**

Las iguanas verdes de incubación, usan los dientes para penetrar la cáscara del huevo y permanecen en él con la cabeza expuesta por hasta 24 horas mientras se absorbe la yema. Posteriormente se desprenden inmediatamente después de la eclosión y comienzan a comer hojas jóvenes en unos 6 a 9 días. Se pueden notar movimientos bruscos de la lengua, sacudidas de la cabeza y extensión de la papada, así como frotar las patas traseras y el abdomen sobre el sustrato poco después de la eclosión. Durante los primeros 6 meses exhiben movimientos de cabeza los cuales se cree que anuncian una posición espacial entre los conoespecíficos y también pueden ayudar en la coordinación de las actividades grupales (*Idem*).

Durante los primeros 6 meses, las iguanas tienden a permanecer con los hermanos en grupos para dormir a través del reconocimiento del olor de la glándula femoral. Los juveniles en vida silvestre se encuentran principalmente en matorrales de vegetación espinosa y solo comienzan a posarse a medida que van envejeciendo. Se ha documentado el canibalismo de animales jóvenes por parte de sus padres, lo que lleva a las iguanas jóvenes a migrar a nuevos territorios (*Idem*).

#### **2.3.5. Comportamientos alimenticios**

El comportamiento de alimentación está estrechamente relacionado con los sistemas sensoriales, ya que la ubicación de las presas y los alimentos debe lograrse con uno o más sentidos antes de que ocurra la alimentación real. Por lo tanto, cualquier condición patológica que afecte los órganos sensoriales puede alterar significativamente el comportamiento de alimentación. Además, aunque cada vez hay más y mejores datos sobre el manejo nutricional correcto de los reptiles y se siguen



recopilando, las enfermedades directamente relacionadas con la desnutrición siguen siendo una presentación común. Siendo que los reptiles son asintomáticos, las enfermedades no detectadas, a menudo evidenciadas por cambios de comportamiento, pueden pasar desapercibidas por el propietario o el cuidador, las cuales pueden conducir a la anorexia o regurgitación. Las condiciones patológicas del tracto gastrointestinal superior tendrán un impacto negativo en la respuesta de alimentación (Kalvig *et al.*, 1991).

La causa más común de anorexia en reptiles cautivos está relacionada con un entorno inapropiado. Por ejemplo, un sustrato o humedad incorrectos, alimentos del tipo y tamaño inadecuados (*Idem*).

El estrés y la competencia social de las iguanas en cautiverio, causados por el espacio limitado y los espacios ocultos visualmente insuficientes y seguros, pueden provocar anorexia y se considera parte del "síndrome de mala adaptación", con la aparición concomitante de otras enfermedades, disminuyendo sus actividades rutinarias y de alimentación (*Idem*).

La temperatura ambiental también puede afectar el comportamiento de alimentación en *I. iguana*. Un estudio reportó que a medida que la temperatura del área de alimentación preferida disminuía, las iguanas abandonaban el lugar. Esto se corroboró cuando emigraron a otra fuente de alimento menos preferido por los reptiles, que se encontraba disponible, pero sobre todo porque la temperatura del recinto era mayor. Muchas se vuelven anoréxicas en temperaturas más frías, por lo que es importante distinguir si la anorexia tiene una causa patológica en esa especie o si es una ocurrencia estacional del reptil. La edad avanzada también puede conducir a dicha enfermedad (Balasko y Cabanac, 1998).

### **2.3.6. Comportamiento durante la eliminación de residuos**

La frecuencia y la cantidad de eliminación de heces y orina varía significativamente entre las diferentes especies de reptiles. En la mayoría de ellas, la micción y defecación ocurren simultáneamente. La eliminación normal de desechos en reptiles incluye tres partes: orina líquida transparente, uratos calcáreos blancos y materia fecal de color verdoso a parduzco que son bastante sueltas y voluminosas; se ha demostrado que

los tiempos de tránsito gastrointestinal en la iguana son de hasta 55 horas, periodo que sirve como factor biológico para la dispersión de semillas y como coadyuvante en la germinación de semillas (Liu *et al.*, 2004).

En la naturaleza, la mayoría de los reptiles generalmente no entran en contacto cercano con sus heces fecales, pero la situación en cautiverio es muy diferente, ya que muchos reptiles (incluyendo la iguana), se alimentan en el fondo de los recintos donde la contaminación fecal es un escenario común. La reinfección constante con parásitos intestinales es una secuela de un espacio confinado y condiciones de higiene subóptimas, ya que a menudo defecan en sus recipientes de agua, por lo que deben lavarse y cambiarse a diario. Las infestaciones parasitarias crónicas son difíciles de tratar con parasiticidas y los exámenes fecales regulares deben ser parte del examen físico de rutina. Es imperativo que la muestra de heces esté lo más fresca posible y que se realice un examen de frotis directo, así como una prueba de flotación fecal (*Idem*).

#### **2.3.7. Mecanismo de estornudo**

Las iguanas verdes estornudan con frecuencia, expulsando una solución salina concentrada, que es secretada por las glándulas en las cavidades nasales. Se pueden formar costras alrededor de las fosas nasales, esta sustancia blanca cristalina puede contener sales de cloruro de sodio y potasio. Al igual que con otras especies, cualquier estornudo que provoque una secreción nasal compuesta de moco amarillo o verde descolorido no es normal y el animal debe ser tratado por un veterinario con experiencia en el cuidado de la salud de los reptiles (Mayer y Bays, 2006).

#### **2.3.8. Implicaciones médicas de los comportamientos anormales de la iguana**

El comportamiento anormal puede ser percibido cuando los ojos se encuentran medio cerrados, desenfocados, con incapacidad o falta de voluntad para moverse, cabeza y extremidades extendidas, depresión, falta de interés en los alrededores y la falta de corrección y reflejos propioceptivos (Figura 8). Cuando se manipula o coloca en una mesa de exploración, las iguanas se encuentran en silencio con la cabeza extendida, los ojos cerrados y los pies plantados firmemente. Los manipuladores suponen que este comportamiento es indicativo de satisfacción. Sin embargo, es más probable que

este comportamiento esté asociado con la sumisión, el miedo o la enfermedad, debido al estrés de un ambiente extraño plagado de sonidos, olores extraños y depredadores potenciales (Mayer y Bays, 2006).



Figura 8. Iguana verde durante una revisión veterinaria. El ejemplar tiene los ojos cerrados y se mantiene inmóvil (Mayer y Bays, 2006).

## **2.4. Concepto de vida silvestre**

Vida silvestre es un término técnico utilizado para referirse a los animales que habitan de forma libre en las distintas regiones del país. Por lo tanto, vida silvestre y fauna silvestre tienen el mismo significado (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales [SEMARNAT], 2009).

Par efectos de Ley, en México, la vida silvestre está conformada por los animales invertebrados y vertebrados residentes o migratorios, que viven en condiciones naturales en el territorio nacional y que no requieren del cuidado del hombre para su supervivencia (*Idem*).

Algunos libros sobre el manejo de fauna, explican que este concepto se aplica únicamente a los vertebrados terrestres, ya que hay muy poca experiencia sobre el manejo de invertebrados (insectos y moluscos, entre otros). Una manera fácil de explicar el concepto de vida silvestre es el de la SEMARNAT (2009), “todo animal no

doméstico que vive, crece y muere en los bosques, selvas y desiertos de México y no necesitan del cuidado del hombre”.

#### **2.4.1. Valor de la fauna silvestre**

La fauna silvestre es uno de los recursos naturales renovables básicos, además del agua, el aire, el suelo y la vegetación, es decir, un beneficio que podemos utilizar y reponer para utilizarlo continuamente. Todas las especies nativas de animales y plantas silvestres, constituyen la riqueza y diversidad de los ecosistemas y forman parte del patrimonio natural de cada región de nuestro país y del mundo en general (SEMARNAT, 2009)

Normalmente, la sociedad valora las cosas de acuerdo a su utilidad, le otorga un valor económico expresado en dinero. Puede ser denominado valor de mercado, valor comercial o valor no comercial. El valor de mercado es lo mínimo que se pide y lo máximo que se ofrece por un bien o servicio; varía en el tiempo y el espacio según la oferta y la demanda. Las poblaciones de animales sometidas a uso comercial poseen valor de mercado por consumo directo como bienes de uso, por ejemplo, la carne para el consumo doméstico. Cuando tales bienes son objetos de compra y venta, adquieren valor comercial, un precio y, por lo tanto, valor económico evidente. Este valor es simple y claro, pero aplicable sólo al conjunto que forman los animales domésticos, objeto de uso y comercio (*Idem*).

La fauna silvestre es uno de los atractivos principales del turismo de la naturaleza, pues genera ingresos directos y empleos para las regiones en desarrollo, sumados al valor recreacional y educativo para la gente de la ciudad, a menudo distanciada de la naturaleza en su vida cotidiana (*Idem*).

#### **2.4.2. Manejo de vida silvestre**

México tiene la urgente necesidad de hacer un uso cuidadoso y adecuado de todos sus recursos, a fin de asegurar el crecimiento demográfico y económico. Al mismo tiempo, es básico que los miembros de la comunidad o localidad sean los beneficiarios principales de los valores de la fauna silvestre, lo cual debe estimularlos a usar este recurso de una manera sostenible, es decir, mediante el manejo de vida silvestre (SEMARNAT, 2009)

Una definición sencilla de manejo de vida silvestre corresponde al arte de usar la tierra para producir cosechas sostenidas anuales de animales silvestres con fines de aprovechamiento. Esto indica que debemos dedicar tierra y esfuerzo para producir bienes o servicios, igual que en la agricultura, la ganadería o el manejo forestal, excepto que, en este caso, el producto es la fauna silvestre (*Idem*).

El primer paso es formular el propósito de manejo de los animales silvestres, luego se deciden las acciones a realizar, seguida de la búsqueda de fuentes de financiamiento, se realiza un plan de manejo para verificar que las poblaciones se mantienen estables; todo lo anterior tiene que adecuarse a la biología de la especie (*Idem*).

El manejo de vida silvestre es regulado por las leyes mexicanas. Todo manejo tiene que adaptarse a La Ley General de Vida Silvestre (LGVS) a través de la autorización correspondiente por la SEMARNAT que es estrictamente la instancia gubernamental facultada para proporcionar permisos, autorizaciones y supervisión para este tipo de proyectos (*Idem*).

Sin embargo, los animales en cautiverio corren mayor riesgo de enfermarse debido al encierro provocado, es por ello que las actividades como el manejo de los animales en cautiverio puede propiciar la presencia de patógenos en ellos, lo que causa la muerte, en el caso de esta investigación de iguanas recién nacidas. Además, las enfermedades producidas por bacterias oportunistas y Gram negativas afectan frecuentemente a estos reptiles (Lara-López y Gonzáles, 2002). Aunado a ello, se incrementa así el riesgo de transmisión de enfermedades al hombre, lo que constituye una amenaza para la salud pública (Dabanch, 2003).

Además, no solo los animales en cautiverio son propensos a presentar agentes patógenos, también los animales silvestres que después de ser capturados llegan a los mercados para su venta, teniendo así el tiempo suficiente de contacto con personas quienes pueden contraer al agente patógeno: también se suman otros factores como el estrés de captura, traslado, manejo y la mala alimentación (Yardo-Jaramillo, 2017). Por ello, el manejo inadecuado puede generar transmisión de enfermedades al hombre, lo que se denomina zoonosis (Martínez *et al.*, 2015).

### **2.4.3. Unidades de Manejo para la Conservación de Vida Silvestre (UMA)**

En México es necesario usar cuidadosamente los recursos naturales y asegurar el crecimiento demográfico y económico de una manera sostenible mediante el manejo de vida silvestre. De acuerdo a la Ley General de Vida Silvestre (LGVS) el manejo de fauna silvestre se divide en dos categorías: extensivo (en vida libre) e intensivo (encierro). El primero es por medio de técnicas de conservación y manejo de hábitat, monitoreo de poblaciones y reproducción de especies con fines de aprovechamiento, ello hace posible mantener la riqueza genética y taxonómica en casi todos los ecosistemas de México. En el manejo intensivo se genera la reproducción de especies nativas mediante manipulación directa y manejo zootécnico, bajo condiciones de encierro de la especie y de acuerdo al tipo de aprovechamiento se puede clasificar en extractivo, no extractivo y mixto (SEMARNAT, 2009).

Actualmente, el aprovechamiento sustentable de la vida silvestre se realiza a través de las UMAS, las cuales pueden funcionar como centros productores de pies de cría, como bancos de germoplasma, como nuevas alternativas de conservación y reproducción de especies, en labores de investigación, educación ambiental, capacitación, así como en unidades de producción de ejemplares, partes y derivados que pueden ser incorporados a los diferentes circuitos del mercado legal, con el propósito de contribuir a compatibilizar y a reforzar mutuamente la conservación de la biodiversidad con las necesidades de producción y desarrollo socioeconómico de México (*Idem*).

Cada una debe contar con un plan de manejo aprobado por la SEMARNAT de acuerdo al Artículo 3º fracción XLV y 40 de LGVS. La planeación es la que describe y programa actividades de manejo de especies silvestres y su hábitat en donde se establecen metas e indicadores de éxito en función del hábitat y las poblaciones (Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad [CONABIO], 2012).

Las UMAS se registran en la Dirección General de Vida Silvestre (DGVS), en las Delegaciones Federales de la SEMARNAT, de acuerdo al tipo de manejo bajo las siguientes categorías:

1. Manejo en vida libre: se refiere al que se hace con ejemplares o poblaciones de especies que se desarrollan en condiciones naturales, sin imponer restricciones a sus movimientos, donde se pueden realizar actividades de conservación y aprovechamiento sustentable.
2. Manejo intensivo: es aquel que se realiza sobre ejemplares o poblaciones de especies silvestres en condiciones de cautiverio y tienen como fin la recuperación de especies o poblaciones para su posterior reintegración a la vida silvestre (CONABIO, 2012).

En México existen alrededor de 91 UMAS distribuidas en 16 estados, de los cuales Oaxaca, Michoacán, Guerrero y Chiapas concentran más de la mitad (60.4%). Sin embargo, una de las problemáticas es que no cuentan con registros productivos que brinden una selección de individuos más eficientes en cautiverio (Lopez, 2008).

#### **2.4.4. Objetivo de las UMAS**

Las UMAS tienen como objetivo promover metodologías alternativas de producción compatibles con el cuidado del medio ambiente, a través del uso racional, ordenado y planificado de los recursos naturales renovables en ellas contenidos, frenando o revertiendo los procesos de deterioro ambiental (SEMARNAT, 2009).

Modifican substancialmente las prácticas de subvaloración, el uso abusivo y los modelos restrictivos tradicionalmente empleados en el país para la gestión de la vida silvestre. Intentan crear oportunidades de aprovechamiento que sean complementarias de otras actividades productivas convencionales, como la agricultura, la ganadería o la silvicultura (*Idem*).

Las UMAS también responden a las demandas de la sociedad en cuanto a las alternativas viables de desarrollo socioeconómico en México, pues buscan promover la diversificación de actividades productivas en el sector rural, basadas en el binomio conservación–aprovechamiento de los recursos naturales. Con ello se logran generar fuentes alternativas de empleo, ingresos para las comunidades rurales, generación de divisas, valorización de los elementos que conforman la diversidad biológica y el mantenimiento de los servicios ambientales focales que prestan al lugar y a sus áreas aledañas (De Vosjoli *et al.*, 2007).

#### **2.4.5. Desarrollo de una UMA**

Es una propuesta hacia una nueva alternativa de actividades de producción sustentable, al igual que una percepción en cuanto a los beneficios derivados de la conservación de la biodiversidad. Las demandas de la sociedad por contar con alternativas viables de desarrollo socioeconómico en México, han sido en parte respondidas por las UMAS, las cuales buscan promover la diversificación de actividades productivas en el sector rural, basadas en el binomio conservación- aprovechamiento de los recursos naturales, logrando así fuentes alternativas de empleo (SEMARNAT, 2009).

La herramienta clave para la realización del manejo sustentable en la UMA es el plan de manejo, el cual es elaborado por un especialista acreditado ante la SEMARNAT. Para tener un aprovechamiento exitoso, se necesita que se desarrolle un adecuado plan de manejo de los recursos naturales presentes en el área donde se implementará, al igual que existan eficientes mecanismos de vigilancia y se asegure un mantenimiento sano de las poblaciones. El número de especímenes que se pretende aprovechar debe ser mucho menor a la cantidad que se reproduce naturalmente y esto debe ser avalado por estudios que así lo demuestren (*Idem*).

Se tendrá a una persona para desarrollar los estudios sobre la dinámica poblacional de las especies y las relaciones de reproducción y aprovechamiento para proporcionar la información del estado de la especie, cantidad de individuos, ciclos biológicos, control de su alimentación, condiciones del hábitat y salud de la población (*Idem*).

#### **2.4.6. Beneficios de las UMAS**

Entre los beneficios que se pueden obtener por medio de la implementación de una UMA de manejo de vida silvestre están:

1. Económicos: el aprovechamiento de los recursos naturales de una manera controlada y supervisada, es una buena alternativa para generar una fuente importante de ingreso pudiéndose dar de manera directa o indirecta.
2. Ambientales: es la encargada de buscar alternativas de producción amigables a través del uso justo, ordenado y planificado de los recursos naturales



renovables existentes en la zona y en esta se promueve su conservación y aprovechamiento sustentable, evitando así la alteración.

3. Sociales: crea alternativas de empleo comunitario para generar ingreso a las comunidades rurales cercanas a la UMA, lo que habilita la satisfacción de las necesidades básicas de los habitantes, también genera una armonía social entre la convivencia y el desarrollo integral (Comisión Nacional Forestal [CONAFOR], 2009).

#### **2.4.7. Riesgo del personal de UMAS**

El manejo de la iguana verde en UMAS puede clasificarse como una actividad peligrosa ya que esta especie incluye comportamientos agresivos al presentarse en territorio extraño, al presentar garras y dientes afilados, podría infligir una herida grave a una persona, otro ejemplo es la cola, la cual utilizan como un látigo como método de defensa y podría dañar el ojo de una persona (De Vosjoli *et al.*, 2007).

El reconocimiento de comportamientos defensivo y agresivo es probablemente una de las observaciones más importantes. La agresividad de los reptiles puede representar un peligro para la seguridad del personal si no se instruye a los empleados sobre la restricción y el manejo adecuados. Se debe enfatizar y reforzar la capacidad de los reptiles para infligir lesiones. El reconocimiento temprano de un individuo estresado puede ayudar a evitar lesiones al animal, al guía y al examinador. Cuando sea apropiado, las uñas de los reptiles deben cortarse antes de algún manejo para minimizar el trauma al personal y al examinador. Además, muchas especies de lagartos no se sueltan cuando muerden y pueden morder de manera más asertiva a medida que la "víctima" lucha. Las diferentes especies de reptiles demuestran una amplia variedad de patrones de comportamiento defensivo y se necesita una amplia experiencia en el manejo para interpretar los comportamientos con precisión (Mayer y Bays, 2006).

Las iguanas como mascotas pueden infligir lesiones al manejador, en tanto que las iguanas dóciles normalmente pueden volverse temerosas y, por lo tanto, agresivas (Figura 9). Los propietarios son propensos a besar sus iguanas en los labios y acariciarlas en la cabeza en un intento de calmarlas, es por ello que el veterinario o los miembros del personal deben advertir a los propietarios que cuando este reptil está

agitado, puede morderlos y los propietarios deben abstenerse de estas costumbres (De Vosjoli *et al.*, 2007).



Figura 9. Iguana verde en alerta. El reptil se encuentra en posición elevada y los ojos dirigidos hacia el objeto de interés, presta para la reacción de lucha o huida (Mayer y Bays, 2007).

A pesar de las precauciones, es probable que en algún momento se produzca una mordedura de iguana. Los intentos que se realizan para abrirle la boca solo aumentan la fuerza de mordisco de una iguana, si después de varios segundos o minutos (dependiendo de la gravedad de la mordedura y la tolerancia al dolor de la víctima) la iguana no suelta su agarre, entonces la iguana y la persona adjunta deben bajarse al piso. La mayoría de las iguanas liberarán inmediatamente lo que estén mordiendo y asumirán una postura defensiva o huirán (*Idem*).

Algunos reportes señalan que la aplicación de alcohol en la nariz de la iguana hace que libere su agarre, pero según la experiencia de algunos practicantes, aumenta el miedo de la iguana y, por lo tanto, aumenta la fuerza de mordedura la cual es un riesgo, ya que en esta especie se ha reportado la presencia de *Salmonella sp.*, la cual puede

causar enfermedades zoonóticas, por ello, hay una serie de recomendaciones (anotadas abajo) que podrían reducir los riesgos asociados con su manejo en cautiverio:

1. Usar protección para los ojos como gafas o anteojos para que la cola de las iguanas no pueda dañar dicha zona.
2. Lavarse las manos y cualquier objeto con el que la iguana haya entrado en contacto.
3. Limpiar semanalmente los tazones de comida y agua con blanqueador para detener la propagación de bacterias (De Vosjoli *et al.*, 2007).

#### **2.4.8. Requisitos para establecer una UMA**

La CONAFOR (2009) apoya con recursos económicos para la contratación de personas físicas o morales, con capacidad técnica y legal en la elaboración del plan de manejo de la vida silvestre (UMAS extensivas), siempre y cuando el propietario silvicultor cumpla con los requisitos que establecen las reglas de operación vigentes del programa ProÁrbol.

Las personas interesadas deben acudir a la SEMARNAT, donde deben llenar un formato de aviso correspondiente que incluye datos personales como nombre o razón social, domicilio, teléfono, entre otros datos y documentos que acrediten los derechos de propiedad o legítima posesión. También debe incluir el tipo de manejo que pretende realizar, la descripción de las características físicas y biológicas del predio y su estado de conservación, así como las instalaciones que se consideren relevantes para el manejo. Por último, deben entregar un plano (carta topográfica del INEGI) donde esté trazado el polígono de la unidad de manejo y señaladas las colindancias, el trazo de caminos, rutas de acceso y estructuras que el interesado considere importantes para su ubicación (Comisión Nacional Forestal, 2009).

Los puntos que se deben cumplir para dar de alta una UMA ante la SEMARNAT son:

1. Registro de las unidades

2. Manejo del hábitat
3. Monitoreo poblacional de las especies de interés
4. Aprovechamiento controlado
5. Plan de manejo
6. Certificación de la producción

#### **2.4.9. Plan de manejo de UMAS**

Una herramienta clave para la realización de manejo sustentable en las UMAS es el plan de manejo, el cual es elaborado por un especialista acreditado ante la SEMARNAT, este es autorizado, si se garantiza la conservación de los ecosistemas, sus elementos, la viabilidad y permanencia de las poblaciones de las especies dentro del predio en el que se realizará el aprovechamiento, en especial en aquellas que serán sujetas a algún tipo de aprovechamiento (SEMARNAT, 2009).

Los propietarios deben ser los responsables de realizar las diversas actividades de manejo, darles seguimiento permanente, aplicar tareas de vigilancia y solicitar la autorización del aprovechamiento, la captura y la extracción o colecta (*Idem*).

Para tener un aprovechamiento exitoso en la UMA, es necesario que en el plan de manejo se desarrolle un adecuado manejo principalmente del hábitat, que presente mecanismos de vigilancia eficientes y que se asegure un mantenimiento sano de las poblaciones. El número de especímenes que se pretende aprovechar debe ser menor al número que se reproduce naturalmente y esto debe ser avalado por estudios que lo demuestren. El técnico será responsable de desarrollar los estudios sobre la dinámica poblacional de las especies y la relación reproducción- aprovechamiento, sustentados científicamente, con el fin de proporcionar información sobre el estado de las especies, el número de individuos, sus ciclos biológicos, hábitos alimentarios, condiciones de su hábitat y estado de salud de la población dentro de cada unidad (SEMARNAT, 2009).

El plan de manejo se realiza de acuerdo a los objetivos de la UMA y términos establecidos por la SEMARNAT, por lo que está sujeto a dictamen y verificación periódica y deberá garantizar la defensa de los ecosistemas y la viabilidad de las poblaciones de todas las especies existentes en la unidad registrada. Con el mencionado plan, se asegura la contribución a la protección y manejo del hábitat de la

vida silvestre, bajo el esquema de aprovechamiento intensivo y extensivo, mediante técnicas específicas de manejo, monitoreo y mejoramiento, complementando las acciones realizadas por el gobierno, junto a la participación efectiva de las comunidades locales (CONAFOR, 2009).

## **2.5. Requisitos de vivienda para la iguana verde en cautiverio**

Dado que la iguana verde prefiere descansar en lo alto de ramas horizontales, en lugar de aferrarse a una pared vertical de la jaula, la vivienda de estos reptiles debe tener muchas ramas horizontales de ancho distinto para permitirles tomar el sol. El alambre no es adecuado para alojar iguanas verdes más grandes, ya que puede causar lesiones al individuo mientras se frota la nariz u otras zonas del cuerpo. Al ser muy persistentes, buscan un punto débil de la malla para escapar, pudiendo romper el alambre y lesionarse. Como las iguanas verdes son criaturas arbóreas, prefieren estar a gran altura, por ello, es necesario que el recinto tenga muchas ramas en el dosel arbóreo (De Vosjoli *et al.*, 2007).

Las iguanas jóvenes pueden competir por estos espacios con los machos adultos (que son más agresivos y solitarios), por lo que es necesario separarlos en jaulas diferentes que contengan troncos en el suelo o arbustos pequeños (*Idem*).

Las iguanas suelen estresarse si su recinto es demasiado pequeño, por esto es necesario asegurarse que no existan espacios pequeños en donde las iguanas jóvenes puedan alojarse. Se pueden colocar plantas naturales, pero hay que asegurarse que no sean nocivas para la iguana (*Idem*).

### **2.5.1. Sustrato**

Las iguanas lamen con la lengua a su alrededor. Este comportamiento les permite reunirse y obtener información sobre su entorno, por ello, sustratos como virutas de madera, mantillo, arena o polvo no son apropiados. Todo lo que se adhiera a la lengua será ingerido, incluyendo sustancias no digeribles que pueden causar daño en su tracto digestivo. Son recomendables periódico con tinta no tóxica, toallas de papel y turba o musgo (De Vosjoli *et al.*, 2007).

### **2.5.2. Higiene y vivienda**

Los recintos deben limpiarse diariamente, los recipientes de agua se retiran y se asean con detergente y agua tibia una vez a la semana, los recipientes de comida se desinfectan y esterilizan para detener la propagación de bacterias u otros microbios causantes de enfermedades. En cuanto a la jaula, se limpia por completo al menos una vez por semana y retirar cualquier sustrato dañado o sucio (*Idem*).

### **2.5.3. Alimentación en cautiverio**

Dado que la iguana verde es herbívora, es importante seguir el plan de alimentación basada en hojas, verduras y frutas (*Idem*).

La cantidad de alimento que se agrega depende mucho de la cantidad de iguanas presentes en el recinto. Una buena manera de encontrar cuánto alimento implementar, es monitorear las iguanas recién llegadas y ver cuánta comida comen, compensando o descompensando para lograr una cantidad exacta sin que quede nada y así lograr la cantidad adecuada (*Idem*).

### **2.5.4. Manipulación y captura en cautiverio**

Si las iguanas verdes se mantienen afuera sin calor durante la noche, entonces la mañana sería el mejor momento para atraparlas, ya que las iguanas al absorber el calor del sol se vuelven más activas disminuyendo las posibilidades de ser atrapadas a medida que el día se calienta. Si las iguanas se mantienen durante la noche con una fuente de calor, entonces no habrá ningún buen momento ya que tendrán la energía suficiente para maniobrar en caso de querer capturarlas (De Vosjoli *et al.*, 2007).

El instinto de las iguanas verdes es aferrarse a lo que sea, por ello cuando se captura un individuo se debe asegurar que no esté sujeto de algún objeto y así tirar lentamente de ella, ya que, si se fuerza, se corre el riesgo de arrancar sus garras o lastimarla (*Idem*).

Para capturarlas se puede emplear una bolsa, la que hay que tenerla al revés para que la iguana no tenga sus garras, cabeza o cola atrapados (*Idem*).

### **2.5.5. Requisitos y tiempo de transporte**

El contenedor para transportar a estos reptiles debe estar ventilado, con aberturas lo suficientemente pequeñas como para prevenir el escape del animal y tener cuidado de

que los contenedores no estén expuestos a condiciones extremas de calor o frío. También debe estar correctamente etiquetado y marcado con la dirección del destinatario y número de teléfono, revisar además que las etiquetas no bloqueen los orificios de ventilación (De Vosjoli *et al.*, 2007).

El mejor momento para transportar iguanas verdes es muy temprano por la mañana o la tarde, esto para evitar el calor del sol en la bolsa o caja de transporte, ya que las iguanas son reptiles y no pueden sudar para contrarrestar la alta temperatura por la exposición prolongada al calor del sol (*Idem*).

#### **2.5.6. Tratamiento rutinario en cautiverio**

Los tratamientos de rutina que se llevan a cabo en el cautiverio de la iguana verde, incluyen pruebas de inspección fecal periódicas para descartar o asegurar la presencia de parásitos en el cuerpo. También se realizan inspecciones regulares de ácaros, dentro y alrededor de su recinto, así como controles regulares de otros ectoparásitos como garrapatas (De Vosjoli *et al.*, 2007).

#### **2.5.7. Anidamiento en cautiverio**

Las iguanas verdes hembras en vida silvestre, cavan túneles y cámaras en la arena y el suelo para ovopositar. A las iguanas hembras en cautiverio, es necesario colocares un poco de tierra o arena en un recipiente o caja colocada de lado (para simular un túnel) en el que la hembra cave y recueste sus huevos. Si la hembra no encuentra un sitio de anidación adecuado, puede retener la puesta de huevos con consecuencias que ponen en riesgo su salud (De Vosjoli *et al.*, 2007).

#### **2.5.8. Periodo de incubación y tamaño de embrague**

La incubación varía de 90 a 120 días, el tamaño y la cantidad de huevos puestos varía según el tamaño de las hembras, su estado nutricional y su madurez. Las hembras pueden poner incluso hasta 65 huevos de color crema en el nido, pero el promedio de la nidada es de 10 a 30. Los nidos también se pueden compartir con varias hembras si el espacio de anidación es limitado (*Idem*).

En las UMAS de iguana verde el manejo adecuado de la incubadora es de vital importancia para lograr producir una mayor cantidad de individuos y de buena calidad, de lo contrario, pueden presentarse enfermedades que afecten a los huevos en el

proceso de incubación como por ejemplo contaminación por hongos. Estos se presentan por el exceso de humedad en el sustrato de incubación y presentan cambios en la tonalidad del huevo y una película aterciopelada que recubre al huevo. Los hongos que invaden al huevo suelen ser aislados de manera normal de la cloaca de hembras adultas, razón por la cual no se puede mantener libres de hongos a los huevos, por ello se debe utilizar tratamientos pos-infección (ketoconazol, griseofulvina, etc) y manejar la humedad del sustrato para evitar la aparición de los hongos u otros patógenos que de igual manera pueden afectar a las crías recién nacidas pudiendo comprometer la viabilidad de las poblaciones y de igual manera desencadenar un foco de infección entre individuos de la misma especie o incluso infectar al personal de manejo, generando zoonosis (Fuentes, 2012).

## **2.6. Zoonosis**

Son enfermedades infecciosas transmisibles de animales vertebrados al ser humano, los agentes patógenos involucrados pueden ser bacterias, virus, parásitos y hongos entre otros. En los últimos años se ha demostrado que la población animal comparte su hábitat con el hombre, donde los agentes que generan la infección pueden ser transmitidos por distintos mecanismos tales como el contacto directo, ingestión, inhalación, vectores intermediarios y mordeduras (Dabanch, 2003).

Ciertos animales ofrecen compañía y actúan como guardianes, permaneciendo en la mayoría de los casos dentro de las casas en constante contacto con sus dueños. Por otro lado, muchos animales silvestres o de vida libre pueden mantener algunas relaciones indirectas con el hombre constituyendo reservorios o fuentes de infección primaria, siendo las zoonosis de origen bacteriano una fuente importante de infecciones para los humanos, por la relación que mantienen con algunos de ellos y las deficiencias de las medidas de control (Mattar *et al.*, 2000).

Los agentes etiológicos bacterianos de la zoonosis son de gran relevancia en Salud Pública. Las bacterias zoonóticas están presentes en los animales, que actúan como reservorios y generalmente no contraen la enfermedad, aunque pueden diseminar el microorganismo con relativa rapidez. Las bacterias pueden causar enfermedades en el hombre (y que además son las más frecuentes), entre ellas se



pueden citar a *Salmonella spp.* que colonizan aves domésticas, así como a *E. coli* secretora de toxina Shiga, presente en bovinos. Estas y otras bacterias incluso llegan a crecer en alimentos o carne mal cocida, generando enfermedades de transmisión alimenticia (ETA), las que representan aproximadamente el 70 % de los casos de enfermedad diarreica aguda. Las principales causas de muerte en humanos por ETA están referidas a *Salmonella*, *L. monocytogenes*, *Campylobacter*, *E. coli* productora de toxina Shiga y *Shigella* (Sparo y Schell, 2011).

Vega y Castellanos (2017) mencionan que para controlar cualquier enfermedad transmisible es importante conocer su epidemiología, así como los datos fiables de vigilancia que sean pertinentes en cuanto a su prevalencia y distribución geográfica. En las últimas décadas la actividad humana ha generado muchos cambios por factores como la rápida urbanización, las prácticas agrícolas intensivas, el deterioro del medio ambiente y el mal uso de antimicrobianos: todo ello ha desestabilizado la dinámica de los microorganismos, es por ello que es importante documentar la presencia de dichos patógenos en los animales (Vega y Castellanos, 2017).

## 2.7. Familia *Enterobacteriaceae*

Esta familia constituye un grupo grande y heterogéneo de bacterias Gram negativas (Puerta-García y Mateos-Rodríguez, 2010), incluye más de 20 géneros bacterianos, más de 120 especies y miles de serotipos, siendo los géneros patógenos más conocidos de esta familia *Escherichia*, *Yersinia*, *Salmonella* y *Shigella* (Figura 10) (Prats, 2006).

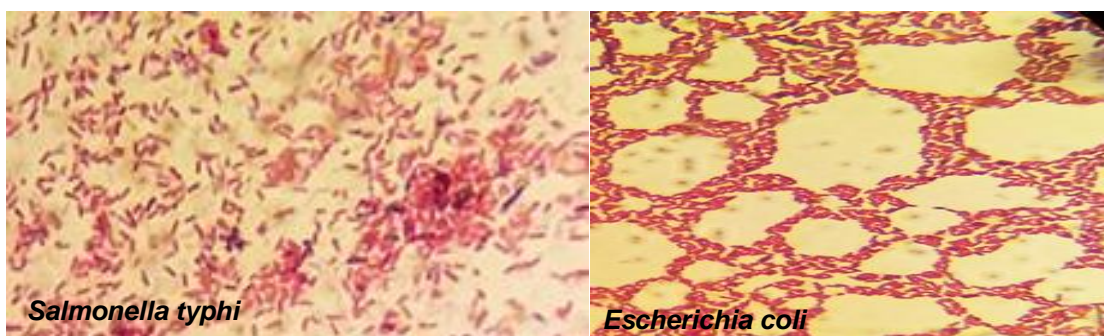


Figura 10. Bacilos Gram negativos de *Salmonella Typhi* y *E. coli*. Fotografías: Pérez Batrez, J.E.

Esta familia recibe su nombre por su localización habitual como saprofitos en el tubo digestivo, por lo que se trata de gérmenes ubicuos, encontrándose de forma universal en el suelo, el agua y la vegetación, así como formando parte de la flora intestinal normal de muchos animales además del hombre. Los miembros de esta familia son microorganismos con forma de bastón (bacilos) con una pared bacteriana con doble membrana, distinta de las Gram positivas (Figura 11) por lo general los bacilos miden de 1-3  $\mu\text{m}$  de largo y 0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro, la membrana externa compleja consiste en otra doble capa de fosfolípidos que incluyen lipopolisacáridos (LPS) en la parte más externa (además de ser un importante factor de virulencia de estas bacterias), lipoproteínas (fijadas al peptidoglucano), proteínas porinas multiméricas (que facilitan el paso de diversas sustancias, incluidos los antibióticos betalactámicos) y otras proteínas de la membrana externa ( Puerta-García y Mateos-Rodríguez, 2010).

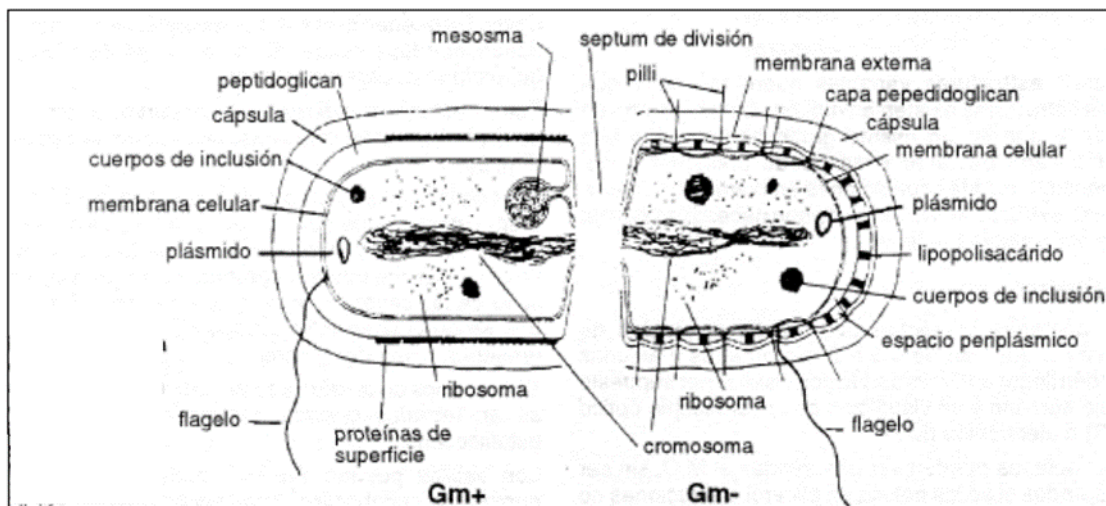


Figura 11. Estructura de la pared celular de las bacterias. Izquierda Gram positiva (Gm+) y derecha Gram negativa (Gm-) (Puerta-García y Mateos-Rodríguez, 2010).

### 2.7.1 Género *Escherichia*

El género *Escherichia* (género tipo de la familia *Enterobacteriaceae*) está compuesto por cinco especies: *E. blattae*, *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* y *E. vulneris* (Noguera, s.a), de éstas, *E. coli* es la especie que normalmente habita en el tracto intestinal de seres humanos y animales; aunque la mayoría de estas bacterias son inofensivas, algunas clonas producen o causan enfermedad (Madsen, 2000). La

primera descripción de *E. coli* data de 1885, cuando Theodore Escherich la aisló de heces de niños con diarrea y la denominó *Bacterium coli commune*; esto lo condujo a pensar que este microorganismo era el agente causal de la diarrea, aunque después se observó que también estaba presente en materia fecal de niños y adultos sanos. Poco más tarde, en 1919, Aldo Castellani y Albert Chalmers cambiaron el nombre acuñado por Escherich por el de *Escherichia coli* (Beck, 2000). La idea de considerar a *E. coli* como un agente causal de diarrea resurgió en 1940, cuando niños de Europa y Norteamérica comenzaron a presentar severos cuadros diarreicos. El microbiólogo John Bray y el médico John Beavan, inmunizaron a un conejo con una de las cepas de *E. coli* recuperada de un niño enfermo y con el antisuero obtenido, aglutinó un 92% de las cepas de *E. coli* aisladas de niños con diarrea. Este hallazgo causó gran revuelo y se desarrollaron estudios similares que sentaron las bases para la identificación e incriminación de cepas de *E. coli* como agentes causales de diarrea infantil; Neter acuñó entonces el término *E. coli* enteropatógena (EPEC) para referirse a ellas (Levine, 1987). Mediante fenómenos como la transferencia horizontal, algunas cepas comensales de *E. coli* pueden convertirse en microorganismos patógenos y causar enfermedad en los seres vivos susceptibles (Kaper *et al.*, 2004).

Es así que las cepas patógenas de *E. coli* poseen mecanismos de patogenicidad específicos que superan las defensas de un hospedero, es así que un microorganismo patógeno posee la capacidad de producir un daño, a cualquier nivel, en un organismo hospedero susceptible y se determina por su virulencia. Debido a la eficiencia de esos mecanismos, una bacteria puede ser poco virulenta o muy virulenta (Cárdenas-Perea *et al.*, 2014).

Se ha reportado que la transmisión de esta bacteria a los humanos puede ser en forma directa o indirecta, pudiendo ser por contaminación de los alimentos a partir de material fecal, agua contaminada, así como el contacto con personas o animales enfermos (Gallegos *et al.*, 2009). Las enfermedades causadas de dicha bacteria puede limitarse a la mucosa o diseminarse en todo el organismo ocasionando enfermedades en el tracto urinario, septicemia, meningitis y diarrea (Figura 12) (Molina *et al.*, 2010).

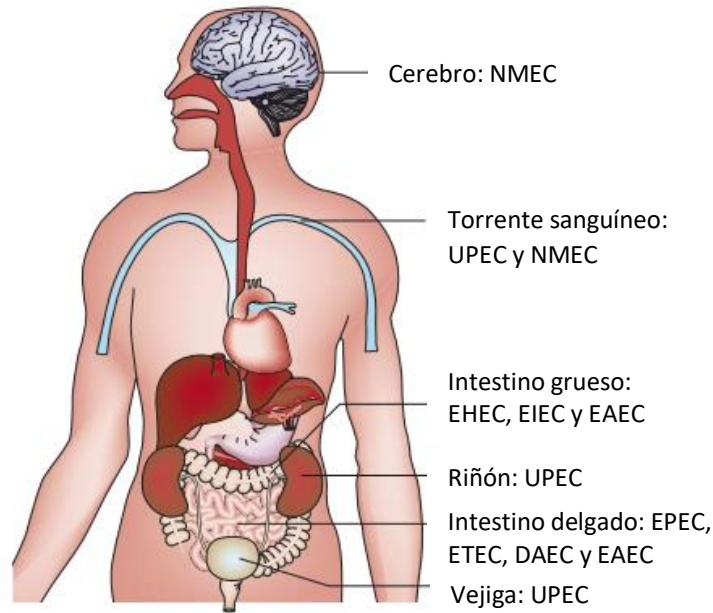


Figura 12. Sitios anatomicos de colonizacion de *Escherichia coli* patógenas (Croxen y Finlay, 2010).

## 2.8. Patogenicidad y virulencia bacterianas

La patogenicidad microbiana es el proceso por el cual los microorganismos causan enfermedad. El mecanismo comienza por la exposición y adherencia de los patógenos a las células hospedadoras, seguida de la invasión, la infección lo que lleva a la secreción de toxinas y el daño a un tejido (Figura 13) (Madigan *et al.*, 2015).

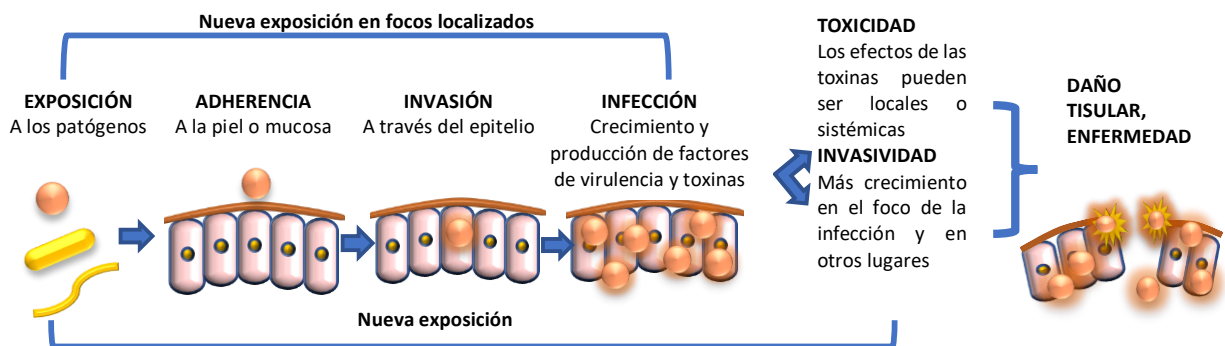


Figura 13. Mecanismos de patogenicidad microbiana. Tras la exposición a un microorganismo patógeno, los procesos controlados por estos microbios pueden ocasionar una enfermedad. Fuente: Esquema modificado de Madigan *et al.*, 2015.

El grado en el que se presenta la patogenicidad se llama virulencia y se refiere a la capacidad relativa de un patógeno para causar un daño en el huésped. Esta es el resultado de las interacciones entre el hospedador y patógeno. La virulencia puede ser medida con el número de células de un patógeno que elimina al 50% de individuos de un grupo experimental, es decir la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) (Madigan *et al.*, 2015).

Una de las afecciones más comunes en poblaciones de América son las enfermedades gastrointestinales, las que constituyen una de las principales causas de morbilidad y muerte en México y el mundo. Durante, 2017 se reportaron 5 771 681 casos de infecciones intestinales en México, en tanto que en Chiapas se registraron 218 771 (Anuario morbilidad, 2017). Así este tipo de infecciones se sitúan dentro de las principales enfermedades en países en vías de desarrollo, afectando principalmente a niños y ancianos. Uno de los principales agentes bacterianos que ocasionan dichas afecciones son los diferentes patotipos de *Escherichia coli*, bacteria que normalmente se encuentra como comensal en el tracto intestinal de animales incluyendo al hombre (Otero, 2014).

Los patotipos poseen muchas estrategias de virulencia, por ejemplo, la adhesión a las células huésped es un requisito para todos los patotipos, y con frecuencia se logra a través de apéndices largos llamados fimbrias o pili. Luego de la adhesión, *E. coli* debe subvertir los procesos de la célula hospedadora, a menudo utilizando proteínas secretadas (Mattehw y Brett, 2010).

El genoma de *E. coli* patógena es diverso pudiendo tener un tamaño de hasta 1 Mb más grande que los de los aislamientos comensales, esto debido principalmente a la adquisición de las islas de patogenicidad (PAI) y otros materiales genéticos accesorios. Se estima que los aislados de *E. coli* secuenciados tienen un genoma central de aproximadamente 2 200 genes y un pan-genoma de aproximadamente 13 000 genes. Es intrigante que, aunque los genomas de la mayoría de los aislados patógenos de *E. coli* pueden codificar más de 5 000 genes, menos de la mitad de estos constituyen el genoma central. Esto permite una diversidad genética sustancial y plasticidad en aislamientos patógenos (Mattehw y Brett, 2010).

Ciertas clonas han adquirido sus propios mecanismos característicos para dañar a las células huésped. Las más estudiadas son seis variedades (Figura 14), las que se distinguen por su mecanismo de daño particular.

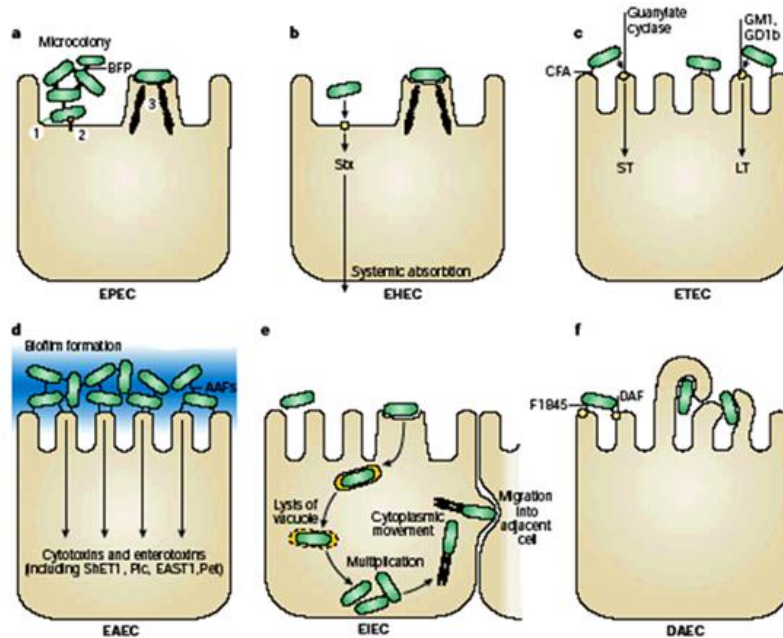


Figura 14. Mecanismos de daño al enterocito por patotipos de *E. coli* (Kaper *et al.*, 2004).

Actualmente y con base en su mecanismo de patogenicidad, las cepas de *E. coli* causantes de diarrea se clasifican en ocho patotipos (Farfán-García, 2016) que a continuación se describen.

### 2.8.1. *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC)

Esta cepa es la principal causa de diarrea en niños de países en desarrollo, presentándose cada año alrededor de 280 millones de infecciones en niños menores de 4 años, de los cuales entre 300 000 a 500 000 mueren y se cree que más de 40 millones son asintomáticos. También se conoce como diarrea del viajero y es frecuente aislarla de personas asintomáticas. En algunos casos la diarrea por ETEC puede ser leve, sin presencia de moco o sangre o en otros casos puede ser profusa causando deshidratación grave, algunos casos presentan cefalea y vómito (Farfán-García *et al.*, 2016).

Esta bacteria no solo afecta al ser humano, ya que también es una causa importante de diarrea en animales domésticos, específicamente en terneros y lechones. La cepa ETEC produce una o más enterotoxinas, que pueden ser la *lt* y/o *st*. A su vez, la toxina *st* se divide en los subtipos *stI* y *stII*, con importancia en humanos. Para que las toxinas puedan internalizarse en el epitelio del intestino delgado, ETEC se une a las células epiteliales mediante factores de colonización específicos, los que son variables estructuralmente (Robins-Browne *et al.*, 2016).

Esta cepa coloniza la mucosa del intestino delgado por medio de pilis o fimbrias que presentan diversas formas (Rodríguez-Angeles, 2002). Estas son estructuras en la superficie necesarias para la adhesión denominados factores de colonización (CFs: colonization factors) y que en ETEC son llamados antígenos de superficie coli (CSs: Coli surface antigens), antígenos de los factores de colonización (CFAs: colonization factor antigens) o PCFs (putative colonization factors) (Farfán-García *et al.*, 2016).

Como se mencionó anteriormente, el principal mecanismo de patogenicidad es la síntesis de alguna o ambas enterotoxinas termolábil (*lt*) y/o termoestable (*st*); sus genes se encuentran en un plásmido que también puede tener información genética para los CFA's, aunque algunos genes de *st* se han encontrado en transposones (Rodríguez-Angeles, 2002).

La adherencia en ETEC es mediada por los CFs, los que reconocen receptores de las células epiteliales del intestino delgado como la fibronectina, glicoesfingolípidos y glicoproteínas, permitiendo su colonización. Algunos de estos CFs se han asociado a movilidad y autoagregación bacteriana. Sin embargo, en aproximadamente 50% de las cepas de ETEC no se logran identificar los CFs. Para la adherencia, la bacteria expresa la proteína EtpA, exoproteína de adhesión situada al extremo del flagelo, para permitir que los CFs se adhieran a ésta, después, el auto-transportador EatA (EatA: autotransporter A) que pertenece a la familia de las serin-proteasas, inhiben la actividad de EtpA, lo que da origen a la adhesión de ETEC a los enterocitos por el loci toxigénico de invasión A, una proteína de membrana externa y el loci toxigénico de invasión B (Farfán-García *et al.*, 2016).

El segundo mecanismo de patogenicidad son las enterotoxinas, donde el principal factor de virulencia de ETEC son las enterotoxinas termoestables (*st*) y enterotoxinas termolábiles (*lt*). Existen dos tipos de *lt* (*lt*-I y *lt*-II), las cuales están directamente asociadas al ser humano, cada toxina se divide en dos subunidades A y B, *lt* es secretada dentro de las vesículas de la membrana externa (OMVs: outer membrane vesicles) mediante el sistema de secreción tipo 2 y posteriormente con ayuda de la subunidad B, la toxina *lt* se une al gangliósido GM1, que por endocitosis permite que las OMV ingresen al citoplasma. Una vez allí, se dirige al aparato de Golgi y al retículo endoplasmático (*Idem*).

La subunidad LT-A1 (presente en el citosol) se une mediante ribosilación del ADP, a los nucleótidos de guanina (Gs), inhibe la actividad de GTPasa y activa la adenilatociclasa, las cuales producen un aumento del AMP cíclico, lo que estimula la secreción de cloruro y demás electrolitos a través del canal regulador transmembranal de la fibrosis quística (CFTR) e impide la absorción intestinal, generando de esta forma la intensa diarrea secretora. La toxina *st* se une a la guanilato-ciclasa-C (GC-C) y aumenta el GMP cíclico dependiente de la proteína quinasa II, ocasionando el mismo efecto observado con la toxina *lt* al aumentar la secreción por el CFTR (Figura 15) (*Idem*).



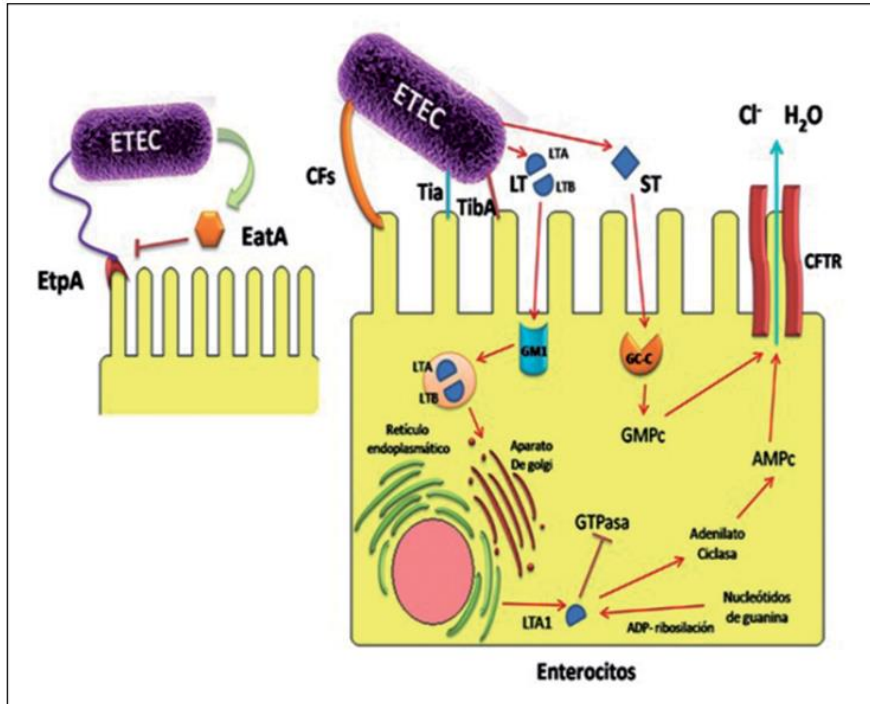


Figura 15. Mecanismo de daño por *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) (Farfán-García *et al.*, 2016).

### 2.8.2. *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) también referida como productoras de toxina Vero (VTEC) o secretora de toxina semejante a Shiga (STEC)

El descubrimiento de este patotipo se remonta hacia 1982, durante un brote de diarrea sanguinolenta asociado a la ingesta de hamburguesas mal cocidas; actualmente se acepta como el agente causal de la colitis hemorrágica y del síndrome urémico hemolítico (HUS) siendo la dosis infecciosa mínima menor a 100 células (Riley *et al.*, 1983). Este grupo es capaz de producir una toxina (codificada por bacteriófagos) muy similar a la producida por *Shigella dysenteriae* (Rípodas-Navarro *et al.*, 2017). El determinante de la virulencia definitoria de la EHEC es la toxina Shiga (también conocida como Verotoxina), la cual es codificada por fagos y es responsable de las manifestaciones potencialmente mortales de las infecciones como la colitis hemorrágica (CH) y el síndrome urémico hemolítico (SUH), sin embargo, no todas las cepas de *E. coli* productoras de toxina Shiga causan CH y SUH y el termino EHEC es usado para las que si generan esos síndromes. Las propiedades que distinguen a las

EHEC de las STEC que no causan dichos síndromes son factores de virulencia accesorios que hacen que la bacteria se adhiera al epitelio del intestino (Robins-Browne *et al.*, 2016).

Las personas afectadas por cepas EHEC presentan dolor abdominal, diarrea acuosa con sangre y poco o nada de fiebre, a este cuadro se le conoce como colitis hemorrágica (CH) y se asocia con casos aislados de síndrome urémico hemolítico (SUH), caracterizado por daño renal agudo, trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática. A estas cepas también se les denominó como VTEC, dada la actividad citotóxica que exhibe sobre células Vero en cultivo (línea celular derivada del riñón de mono verde africano) (Rodríguez-Ángeles, 2002).

STEC puede afectar a los humanos en cualquier etapa de su vida, a quienes puede provocar enfermedad grave. Más de 400 serotipos de STEC han sido implicados en los brotes esporádicos humanos que van desde enfermedad leve a colitis hemorrágica y SUH en los casos más graves. La colitis hemorrágica, mediada por las toxinas *Stx* puede progresar a colitis gangrenosa, perforación del intestino, peritonitis o sepsis (Croxen y Finlay, 2010).

En cuanto a sus mecanismos de patogenicidad, STEC interacciona con los enterocitos en la que participa la intimina y el sistema de secreción tipo III (T3SS). La unión de la intimina con su receptor Tir y a la nucleolina, contribuyen en la adherencia inicial de STEC a la célula, lo que produce lesiones A/E características de este patotipo. Al igual que en EPEC, los factores que participan en la formación de esta lesión están codificadas en la isla de patogenicidad LEE (Farfán-García *et al.*, 2016).

Las STEC secretan las toxinas *Stx1* y *Stx2*, las que son inmunológicamente diferentes además de que cada cepa puede secretar una o ambas, *Stx2* es una toxina que se presenta principalmente en los casos de SUH y está constituida por las subunidades A y B (Figura 16-a). De acuerdo a Farfán-García *et al.* (2016) la entrada a la célula y la distribución de la toxina hacia diferentes partes del organismo son mediadas por tres mecanismos principales:

1. Macropinocitosis (MPC): este permite la entrada de *Stx* cuando el receptor de las membranas globotriaosilceramida 3 (Gb3) no es expresado por la célula, como en el caso de los enterocitos, es estimulada por la reorganización de la actina mediante la proteína P secretada por *E. coli* (EspP) que contribuye a la formación de microcolonias y a la adhesión a células epiteliales de colon (Figura 16-b).
2. Transcitosis: en este mecanismo la toxina pasa de un espacio extracelular a otro mediante vesículas (Figura 16-b), aunque no se ha esclarecido formalmente. Se ha descrito que aumenta debido a la MPC (Macropinocitosis) y facilita la propagación sistémica de la toxina hacia las células endoteliales que expresan Gb3, siendo el endotelio glomerular el que expresa los mayores niveles.
3. Endocitosis: la subunidad B de la toxina se une al receptor Gb3 y mediante la invaginación de la membrana celular, la toxina es introducida al citoplasma. Adicionalmente, el fragmento A1 de la subunidad A, realiza la actividad enzimática sobre el ARNr 28S, inhibe la síntesis proteica y conduce a la muerte celular (Figura 16-c).

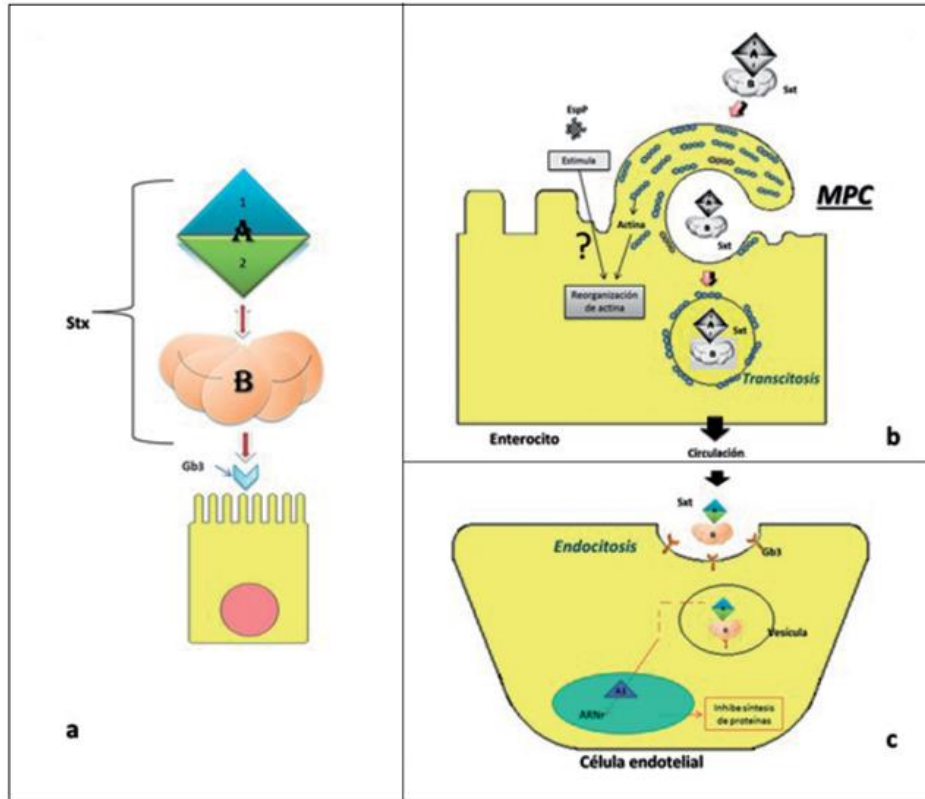


Figura 16. Internalización y mecanismo de daño de la toxina Stx de *E. coli* enterohemorrágica, a) conformación de las toxinas stx; b) mecanismo de transcitosis de stx; c) endocitosis de la toxina stx (Farfán-García *et al.*, 2016).

### 2.8.3. *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC)

Esta variante patogénica comparte muchas características genéticas, bioquímicas y factores de virulencia con *Shigella* spp. y, por ende, su mecanismo de patogenicidad es muy similar. EIEC es potencialmente capaz de provocar colitis inflamatoria y disentería, aunque también puede presentarse diarrea acuosa indistinguible de la ocasionada por otros patotipos de *E. coli* (Kaper *et al.*, 2004). EIEC es una bacteria cuyo genoma ha experimentado eventos de recombinación genética lo que ha favorecido su adaptación patológica, incluida la pérdida de material genético (Croxen y Finlay, 2010).

Como se mencionó anteriormente, tiene una estrecha relación con *Shigella*, en términos de la enfermedad que causan, ya que ambas bacterias causan disentería bacilar y el determinante de la virulencia es un plásmido conocido como pINV, el cual

confiere a EIEC la capacidad de ser invasivo (Croxen y Finlay, 2010). Este plásmido codifica un sistema de secreción tipo 3 que permite que EIEC penetre las células epiteliales, se muevan dentro de éstas e invadan las células vecinas, sin embargo, EIEC tiene otros determinantes de virulencia incluidas adhesinas y toxinas (Robins-Browne *et al.*, 2016).

Las personas infectadas por este patógeno exhiben diarrea acuosa, con sangre, moco y dolor abdominal, pero en algunos casos sólo se presenta diarrea, lo cual la hace indistinguible de la producida por ETEC y menos grave que la causada por *Shigella*. Las cepas EIEC se asocian más a brotes que a casos aislados, en los que la transmisión puede ser de persona a persona, por ingestión de alimentos y agua contaminada, todo ello lo convierte en un patógeno importante. Existen pocos estudios epidemiológicos que demuestran la carga mundial de diarrea por EIEC, debido a que estas cepas suelen ser identificadas como *Shigella spp.* Existe evidencia científica que demuestra la estrecha relación filogenética y bioquímica entre estas dos bacterias (Farfán *et al.*, 2016), ya que son descarboxilasa negativa, no móviles y lactosa negativa (Rodríguez-Ángeles, 2012).

En la mucosa del colon, EIEC invade inicialmente las células M y mediante transcitosis, la bacteria atraviesa (en una vacuola fagocítica) la barrera epitelial para invadir los macrófagos. En éstos la proteína IpaB lisa la vacuola en el citoplasma e induce apoptosis vía de la caspasa para finalmente ser liberada y alcanzar el polo basolateral, posteriormente la bacteria ingresa a las células del intestino mediante el reconocimiento de los receptores CD44 y  $\alpha 5\beta 1$  integrina; gracias a la proteína IpaB y al complejo IpaBCD bacteriano consigue multiplicarse en el citoplasma, sale del fagosoma y se desplaza lateralmente entre células. Para esto, la proteína VirG, que se encuentra al extremo de EIEC, promueve la aproximación de N-WASP y por medio de la polimerización de la actina, se forma el complejo VirG\*N-WASP\*actina y al otro extremo de la bacteria, VirA favorece la generación de protuberancias y permite el traspaso a las células proximales (Figura 17) (Farfán-García *et al.*, 2016).

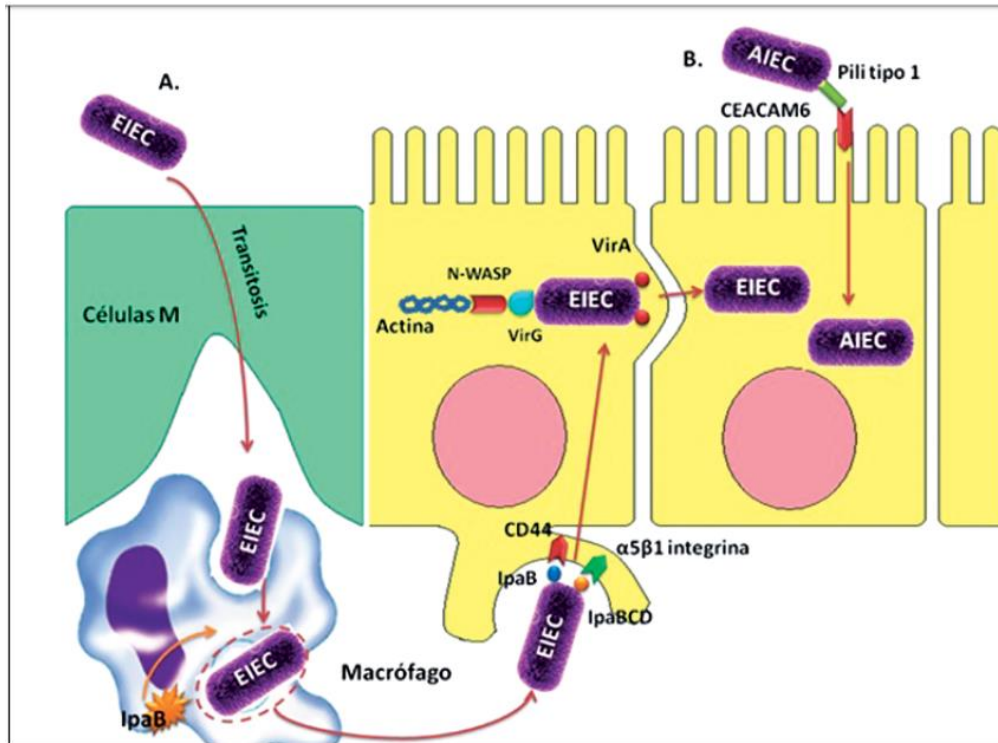


Figura 17. Mecanismos de patogenicidad en *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) (Farfán-García *et al.*, 2016).

Otros factores de virulencia adicionales que se han identificado en EIEC son la proteasa SepA y la aerobactina (para fijar hierro), ambas codificadas en islas de patogenicidad (Kaper *et al.*, 2004).

#### 2.8.4. *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC)

Fue el primer grupo que se identificó serológicamente y se asoció con casos de diarrea en infantes, siendo la adherencia su principal factor de patogenicidad (Rodríguez-Ángeles, 2002). Durante la década de 1940 se comenzó a esclarecer la participación de *Escherichia coli* como agente causal de enfermedad humana. Investigadores del Reino Unido y Estados Unidos descubrieron que ciertos serotipos somático-flagelares (O:H) de *E. coli* estaban asociados con casos esporádicos de diarrea infantil en el verano, además de algunos brotes epidémicos de gastroenteritis en guarderías; a este grupo se le denominó EPEC para diferenciar a este tipo virulento de las bacterias de flora normal (Vidal, 2003).

Se cree que la unión inicial de EPEC a enterocitos en el intestino delgado involucra los pili formadores de haces que se codifican en el plásmido del factor de adherencia (Croxen y Finlay, 2010).

EPEC alberga genes de virulencia codificados en la isla de patogenicidad denominada LEE (locus de barrido de enterocitos). Dentro de esta isla se encuentra el gen *eae*, que codifica una adhesina de membrana externa conocida como intimina, además está codificado un sistema secretor de proteínas tipo 3 (T3SS) para trasladar rápidamente Tir al citoplasma de las células huésped en un proceso que posiblemente se inicia a través de la detección de Ca<sup>2+</sup>. Tir se expone entonces en la superficie de la célula huésped y actúa como un receptor para la intimina. Las interacciones con intimina conducen a la agrupación de Tir, que luego es fosforilada por varias tirosinas quinasa del huésped. Los experimentos *in vitro* demostraron que la fosforilación de Tir recluta a Nck al sitio de unión, lo que activa la funcionalidad neuronal (Croxen y Finlay, 2010).

Posteriormente se demostró que la fosforilación de Tir es prescindible en la formación de lesiones A/E (adhesión y borrado) *ex vivo*, ya que una mutante de fosforilación de Tir todavía puede reclutar N-WASP independientemente de Nck. Esto ejemplifica la importancia de evaluar críticamente las diferencias entre los fenotipos que se ven *in vitro* y lo que realmente puede ocurrir *in vivo* (Croxen y Finlay, 2010).

Las proteínas codificadas en la isla LEE están asociadas con lesiones de borrado y adherencia al epitelio intestinal, rasgo característico en la patología de las EPEC; algunos estudios señalan que la intimina y la proteína EspB son determinantes de virulencia esenciales para EPEC. Existen además otros determinantes de virulencia en este patotipo como el pilus formador de haz (BFP), aunque algunos aislados carecen de dicha fimbria, por lo que se han denominado atípicas, las que varían en su capacidad de virulencia y pueden llegar a generar enfermedad, generalmente en niños (Robins-Browne *et al.*, 2016). Representan una causa importante de diarrea potencialmente mortal en bebés de países en desarrollo (Croxen y Finlay, 2010).

Recientemente se publicó la secuencia completa del genoma de EPEC y se encontraron aproximadamente 400 genes más que en *E. coli* K-12, pero

aproximadamente 650 genes menos que EHEC O157: H7, sugiriendo que el repertorio de factores de virulencia adquiridos que son necesarios para convertirse en EPEC puede ser sustancialmente más pequeño que el requerido para los otros patotipos (Croxen y Finlay, 2010).

La caracterización de las cepas EPEC atípicas ha cobrado importancia debido a que su aislamiento ha aumentado no sólo en niños asintomáticos sino también en niños durante brotes epidémicos de diarrea. En la infección intestinal por EPEC se producen cambios en la actividad fisiológica normal del enterocito, éste pierde su capacidad absorptiva y los solutos se acumulan en el lumen intestinal, lo que conduce a diarrea acuosa. Los mecanismos fisiopatológicos que originan el cuadro diarreico se relacionan principalmente con la alteración de la célula intestinal debido a la formación de lesiones A/E y la formación de pedestales (Farfán-García *et al.*, 2016).

La diarrea causada por EPEC es probablemente el resultado de la conjunción de diversos mecanismos que implican la secreción iónica, permeabilidad intestinal exacerbada, reacción inflamatoria y pérdida de la absorción intestinal resultado de la eliminación de microvellosidades (Kaper *et al.*, 2004). El mecanismo de adherencia de EPEC (Figura 18), está mediado por un flagelo y por el pili tipo IV (BFP), que también une las bacterias entre sí formando microcolonias, permitiendo que éstas se separen y colonicen.

EPEC y STEC tienen un sistema T3SS que inyecta proteínas en la célula, dentro de ellas se encuentra EspF que se dirige al nucléolo donde bloquea el procesamiento del ARNr. La proteína Map induce la formación de filopodios, activando una GTPasa para que posteriormente EspH interrumpa a la GTPasa, favoreciendo que la proteína Tir (unida a la intimina) se fosforile en tirosina, la que se une a proteínas adaptadoras como Nck o Crk. Posteriormente, Nck activa a N-WASP que a su vez activa Arp 2/3, mediador de la polimerización de actina. La unión Tir-Intimina finalmente provoca la reorganización de la actina, alterando la morfología y formando las lesiones de adhesión y borrado (A/E) (Farfán-García *et al.*, 2016).



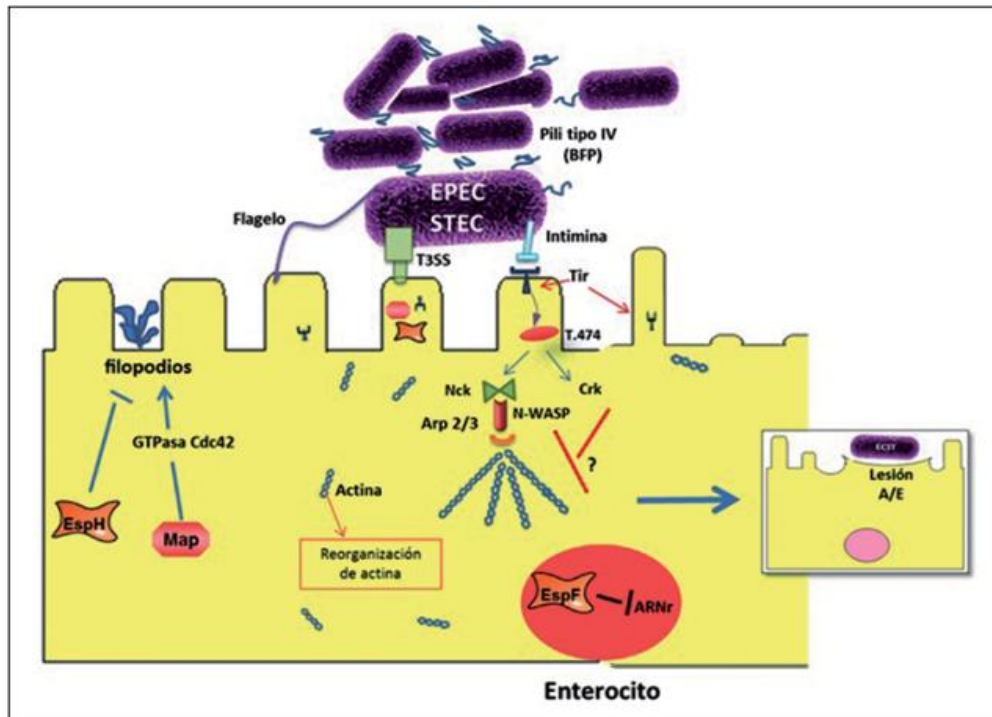


Figura 18. Mecanismo de patogenicidad de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) (Farfán-García *et al.*, 2016).

Para la detección de EPEC se emplean pruebas fenotípicas como el ensayo de adherencia a células HEP-2 *in vitro*, en el que las células bacterianas se agrupan formando microcolonias adheridas a las células (adherencia localizada), también el ensayo de tinción de actina fluorescente (FAS) que revela la acumulación de actina en los sitios donde la bacteria se adhiere a la célula; en tanto, también existen técnicas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o el uso de sondas de DNA, donde se detectan los genes que codifican factores de virulencia (Nataro y Kaper, 1998).

### 2.8.5. *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)

Hacia la mitad de los años 80 únicamente se reconocían los fenotipos de adherencia localizado y el difuso entre las cepas de *E. coli* diarreogénicas, sin embargo, Nataro *et al.* (1987) dilucidaron un tercer fenotipo de adhesión entre estas cepas en el que las bacterias se disponían formando agregados en forma de “ladrillos apilados” sobre la superficie de las células y en el cristal. Ellos acuñaron el término *E. coli* enteroadherente-agregativa (EA-AggEC) para referirse a ellas, aunque actualmente se

le denomina *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (Nataro *et al.*, 1987; Vial *et al.*, 1988). Además de presentar el característico fenotipo de adhesión, estas cepas no secretan las enterotoxinas LT o ST (Kaper *et al.*, 2004). Recientemente se ha desarrollado un sistema en microplaca como método de diagnóstico alternativo basado en la capacidad de este patotipo para formar biopelículas (Wakimoto *et al.*, 2004); sin embargo, el ensayo de adherencia en células HEp-2 es aun considerado el “estándar de oro” para detectar este patotipo (Nataro y Kaper, 1998).

EAEC se describió por primera vez en 1987 en un niño con diarrea aguda en Lima, Perú. En varias regiones del mundo, este patotipo es el más frecuente incluso superando a *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), siendo el patógeno bacteriano más común identificado en heces diarreicas. En Estados Unidos, este patógeno emergente se está reconociendo cada vez más como la principal causa de diarrea esporádica en adultos y niños, donde los alimentos contaminados parecen ser la principal fuente de infección y se han visto implicados en varios brotes de diarrea (Boisen *et al.*, 2013).

Las células de EAEC se adhieren a la mucosa intestinal, la coloniza y produce un efecto citotóxico que causa diarrea de tipo acuosa sin fiebre, con secreción de moco de larga duración (de más de 14 días) siendo los seres humanos su único reservorio (Vidal-Graniel, 2003), entre estas cepas existe gran variabilidad en la presencia de factores de patogenicidad (Farfán-García *et al.*, 2016). Presentan un plásmido denominado pAA en el que se encuentran genes que codifican para una adhesina fimbrial, responsable de la adherencia agregativa a células HEp-2 y al epitelio intestinal. El contagio de persona a persona es por vía fecal-oral y es necesario aislar al paciente como una medida de seguridad para evitar contaminación de familiares (Vidal-Graniel, 2003).

Esta bacteria forma microcolonias y se adhiere en un patrón de adherencia-agregativa (AA) a células HEp-2 y HeLa descrito como de “ladrillos apilados”. EAEC presenta el plásmido pAA, donde están codificados varios factores de virulencia, entre los que se incluye al regulador AggR perteneciente a la familia de activadores transcripcionales AraC/XylS; se sugirió el término “EAEC típica” a aquellas que lo expresan. Algunos genes regulados por este gen son proteínas necesarias para la

expresión del patrón AA mediante las fimbrias AAF y sus variantes I, II, III y IV, codificadas por los genes *aggA*, *aafA*, *agg3A* y *agg4A*, respectivamente. La formación de microcolonias se favorece cuando están presente los genes regulados por AggR aunque también, cuando no está alguno de ellos (incluyendo AggR), lo que indica la existencia de factores de colonización alternativos aún no descritos (Farfán-García *et al.*, 2016).

En la adhesión también están involucradas proteínas de membrana externa como Hra-1 con actividad de aglutinina y adhesina, Hra2 con actividad de adhesina y Tia, homóloga de Hra-1, proteína implicada en la adhesión e invasividad, la que también se ha descrito en ETEC. Durante la colonización bacteriana actúa un complejo denominado Aat, requerido para el transporte de la dispersina (codificada por el gen *aap*), ambos regulados por AggR y codificados en el plásmido pAA. Aat se encarga de mediar la secreción de la dispersina desde la membrana externa bacteriana, para promover la colonización de la mucosa intestinal (Figura 19) (*Idem*).

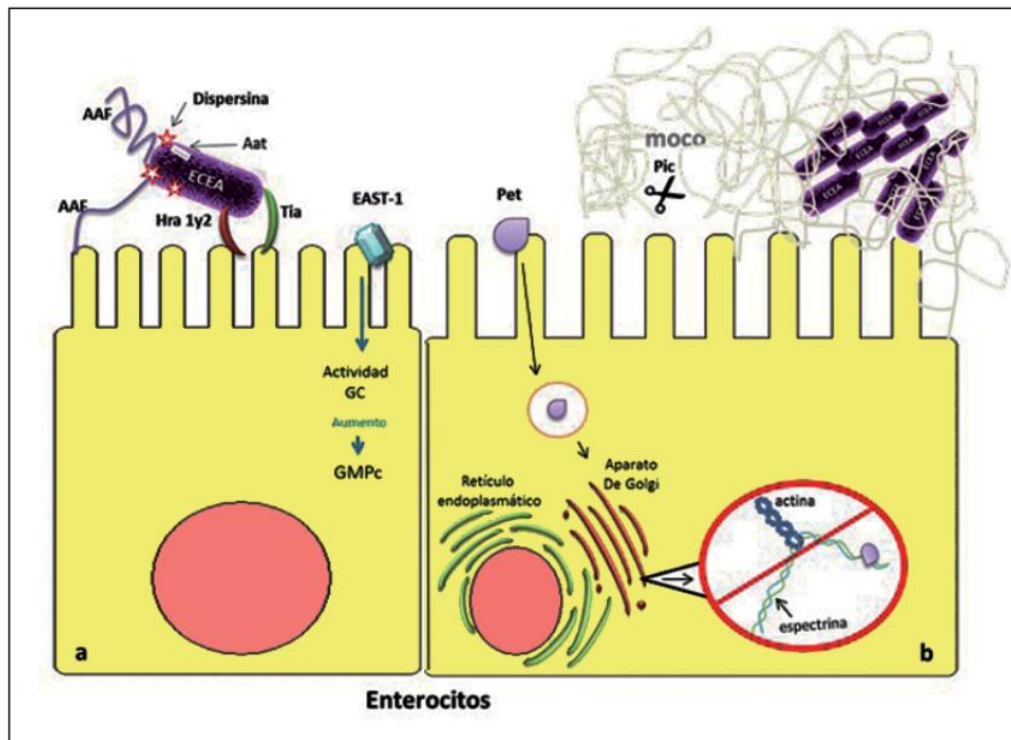


Figura 19. Mecanismo de patogenicidad de *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (Farfán-García *et al.*, 2016).

EAEC presenta factores no regulados por AggR como la enterotoxina 1 codificada por *astA*, que altera el transporte de iones e induce aumento del GMPc96 y una variedad de proteínas transportadoras tipo serina-proteasas (SPATEs) con actividad citotóxica o no (Figura 19-b). Dentro de los SPATEs se encuentran la proteasa involucrada en la colonización intestinal (Pic) (grupo no citotóxicos) la cual es una proteasa que incrementa el número de células caliciformes y la concomitante producción de moco; este material atrapa las bacterias auto-aglutinándolas en el epitelio intestinal. Pic también es responsable de la actividad mucinolítica que le abre paso a través de esta capa de moco. Otra de las toxinas codificadas por EAEC es la toxina codificada en plásmidos (Pet), la cual también pertenece a la familia SPATEs y tiene actividad citotóxica mediante la unión a espectrina en la membrana del complejo de Golgi, bloquea su función y causa el redondeamiento de la célula (Farfán-García *et al.*, 2016).

Al igual que las EPEC atípicas, las EAEC son genéticamente diversas con la probabilidad de que algunos tipos sean más virulentos que otros (Robins-Browne *et al.*, 2016).

#### **2.8.6. *Escherichia coli* con adherencia difusa (DAEC)**

La definición de esta variante se basa en el patrón de adherencia observado en el ensayo in vitro en el que las células bacterianas se adhieren alrededor de las células o cubriendo toda su superficie (Scaletsky *et al.*, 1984). Al igual que EAEC, las DAEC también se distinguen por su patrón de adherencia difusa a las células de cultivo de tejidos. Este fenotipo es mediado entre otros factores por adhesinas como la fimbria F1845 perteneciente a la familia Dr y a la proteína AIDA (secretada mediante el sistema de autotransportadores), la cual queda anclada a la membrana y es capaz de conferir autoagregación bacteriana (Sherlock *et al.*, 2004). Las cepas que expresan AIDA-I tienen otros determinantes de virulencia, como la toxina *STb* (Robins-Browne *et al.*, 2016).

Estas cepas exhiben un fenotipo de adherencia sobre células HEp-2, en el que las bacterias se adhieren de forma azarosa; también se inducen proyecciones de la membrana celular. La lesión se lleva a cabo mediante un mecanismo complejo, que

induce la degeneración de las microvellosidades y altera la morfología normal de la región apical del enterocito (Riveros *et al.*, 2011). Las cepas DAEC tienen la capacidad de inducir la formación de estructuras protuberantes, semejantes a dedos, las cuales confieren protección a las bacterias, pero la presencia de dichas estructuras no se ha demostrado *in vivo*. El grupo DAEC se puede aislar tanto de personas sanas como en personas con diarrea, siendo más importante en niños de 4 a 5 años. Los principales síntomas que se presentan son diarrea acuosa sin sangre y sin leucocitos (Rodríguez-Ángeles, 2002).

A pesar de ser un grupo ampliamente estudiado, poco se conoce sobre sus mecanismos de patogenicidad y de las cuales las principales características son la unión mediante adhesinas a la mucosa intestinal. Las cepas DAEC expresan adhesinas afimbriales (Afa) y adhesinas fimbriales (Dr) que están en la superficie de la membrana externa de la bacteria. Se subdividen en dos, la típica Afa/DrDAEC y la atípica Afa/DrDAEC que tienen como características la misma organización genética y la unión al factor de aceleración (hDAF) (Farfán-García *et al.*, 2016).

Como se mencionó anteriormente, se han descrito dos adhesinas principales de DAEC que permiten la adherencia al enterocito, la adhesina involucrada en la adherencia difusa (AIDA-I) y la adhesina fimbrial 1845 (F1845), la cual se ha descrito en la cepa C1845 de tipo silvestre cuyo receptor es la proteína hDAF. Al originarse esta unión, ocurre un alargamiento de las microvellosidades (Rodríguez-Ángeles, 2002).

La lesión de la membrana celular inducida por la bacteria ocasiona elongación, daño en las microvellosidades y reordenamiento de las proteínas en el citoesqueleto; lo que genera aumento de la permeabilidad del enterocito (Figura 20) (Robins-Browne *et al.*, 2016).

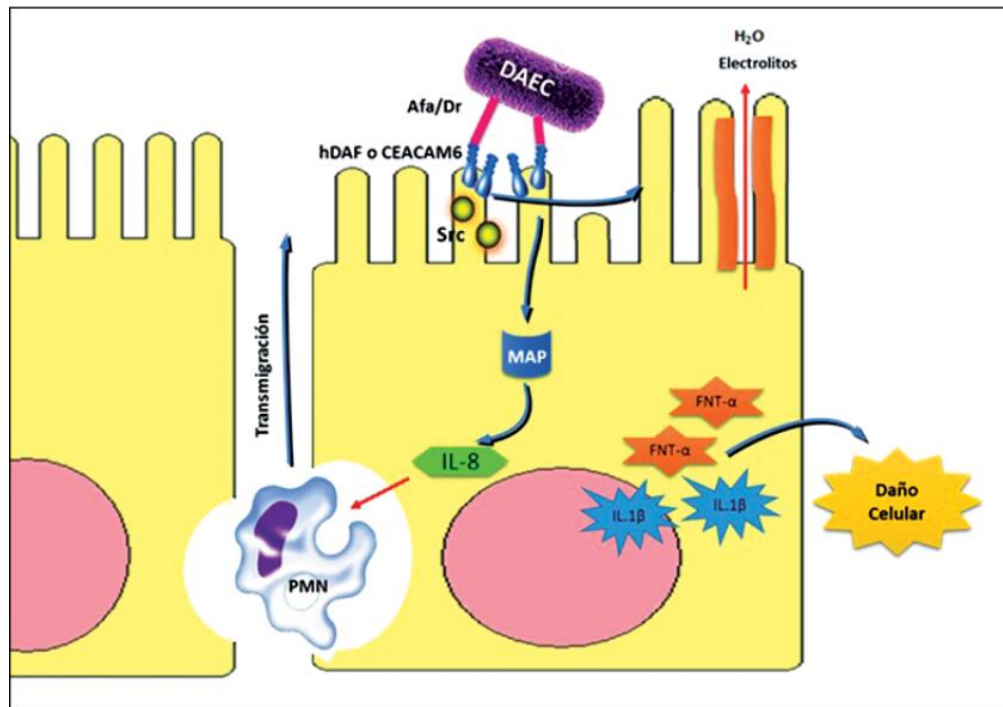


Figura 20. Mecanismo de patogenicidad de *Escherichia coli* con adherencia difusa (DAEC) (Farfán-García *et al.*, 2016).

Otro efecto causado por DAEC y que pudiera explicar el mecanismo de la enfermedad entérica, involucra la reducción de enzimas como la dipeptidilpeptidasa e isomaltasa presentes en el borde en cepillo del enterocito (Kaper *et al.*, 2004).

### 2.8.7. *E. coli* despreendedora de células (CDEC)

Las cepas CDEC se definieron originalmente por su capacidad para separar o desprender células de cultivo de tejidos de soportes sólidos en ensayos de adherencia o en un ensayo de desprendimiento de células. Un estudio sobre la patogenia de CDEC, reportó que tales cepas poseían un pili asociado a pielonefritis (P-pili) y producían K-hemolisina así como el factor necrotizante citotóxico 1 (CNF1) (Abduch *et al.*, 2002).

### 2.8.8. *E. coli* adherente-invasiva (AIEC)

Esta cepa no está asociada a enfermedades diarreicas, aunque se asocia al desarrollo de la enfermedad de Crohn, la cual es una enfermedad intestinal inflamatoria crónica

donde AIEC se presenta en el lumen intestinal (íleon) de pacientes enfermos, el proceso inflamatorio puede ocurrir en todo el tracto gastrointestinal.

Las principales características de la patogenicidad de AIEC son la adhesión, la invasión, la supervivencia dentro de los macrófagos y la formación de biopelículas. AIEC posee dos mecanismos de invasión a la célula, la bacteria se mueve a través de los flagelos, los que median el acercamiento a la célula epitelial y por medio de la adhesina FimH, se une a los residuos oligomanósidos del receptor de superficie CEACAM6 de la célula hospedera (Farfán-García *et al.*, 2016).

El segundo mecanismo es mediante la invasión de las células M, AIEC posee una fimbria polar larga (LPF) que permite la aproximación a las células M y al igual que EIEC, utiliza el mismo proceso para atravesar la célula por medio de transcitosis, lo que posteriormente lleva a la formación de granulomas (Robins-Browne *et al.*, 2016).

Los pacientes con la enfermedad de Crohn también presentan en las células epiteliales estrés del retículo endoplásmico, debido a que el factor de transcripción XBP1 origina un aumento en la expresión de gp96, que funge como receptor de la proteína transmembranal OmpA, generada por vesículas de membrana externa (OMV). OmpA promueve la virulencia del patotipo al participar en la adhesión, invasión y la permanencia de bacterias intracelulares (Farfán-García *et al.*, 2016).

Aunque se sabe poco sobre la etiopatología de la enfermedad de Crohn, se hipotetiza que se presenta una desregularización de la respuesta inmune del huésped frente a la flora bacteriana residente y a otros antígenos intraluminales en personas susceptibles (Rodríguez-Ángeles, 2002). Para tratar esta enfermedad se han probado diferentes estrategias como anticuerpos anti-integrinas, anti-factor de necrosis tumoral alfa (anti-TNF $\alpha$ ) y agentes inmunosupresores para evitar la adhesión de AIEC a la célula hospedera. De hecho, las cepas AIEC se recuperan con mayor frecuencia de pacientes con la enfermedad de Crohn que de personas sanas, sin embargo, no está claro si estas bacterias contribuyen a dicha enfermedad o si están simplemente adaptadas y favorecidas en el tejido intestinal afectado por esta enfermedad (Robins-Browne *et al.*, 2016).

### III. ANTECEDENTES

A continuación, se describen algunos trabajos sobre la prevalencia de *E. coli* virulentas en animales, con énfasis en los reptiles.

Murinda *et al.* (2004) determinaron la presencia de marcadores de virulencia de STEC tales como *stx1*, *stx2*, *flicC*, *hly* y *eaeA* en 400 aislados de *Escherichia coli* recuperadas de tejido purulento proveniente de mastitis de vacas lecheras, así como de terneros, cerdos, perros, loros, iguanas, productos alimenticios y casos de enfermedades humanas (es decir: diarrea y síndrome urémico hemolítico (SUH)). Sus resultados revelaron la presencia de la toxina *stx1* (0.7%), *stx2* (32%), así también el flagelo *flicC* (97.3%), además reportaron una prevalencia de los genes que codifican para la entero hemolisina e intimina (*eaeA*), ambas con 98%. Los aislados positivos para las toxinas estudiadas en este trabajo se asociaron principalmente con el ganado y los humanos, las cepas provenientes de mastitis (n=105), cerdos, perros, loros e iguanas (n=48) no exhibieron genes para las toxinas *stx1* y *stx2*.

Do *et al.* (2005) en el sureste de Queensland, Australia identificaron genes que codificaron para las toxinas STa, STb y Lt en 126 cepas de *E. coli* que causaron diarrea en cerdos neonatos, de 1 a 3 semanas de edad y destetados. Un total de 113 aislados poseían genes de virulencia de ETEC incluidos 14 de 15 aislamientos de cerdos neonatos presentaron ETEC (93.3%), 18 de 23 aislamientos de cerdos de 1 a 3 semanas (78.3%) y 81 de 88 aislamientos de cerdos destetados (92.1%). El serotipo O149 fue el patotipo más prevalente en cerdos neonatos y en los de 1-3 semanas de edad, en tanto que los serotipos O149 y O141 fueron más frecuentes en cerdos destetados. 13 aislados fueron negativos para genes de virulencia de ETEC, categorizados como no patógenos.

Aidar-Ugrinovich *et al.* (2007) investigaron la presencia de STEC y EPEC en 546 muestras fecales de terneros (264 con diarrea y 282 sanos) en granjas de São Paulo, Brasil. El gen *eaeA* se detectó en 25% de las cepas STEC y en todas las cepas EPEC, la enterohemolisina *ehxA* se detectó en 51% de las cepas STEC y en 80% de las cepas EPEC, mientras que el gen *saa* (que codifica para una adhesina de STEC),



se amplificó en cepas STEC negativas al gen *eaeA*. Las 15 cepas EPEC aisladas en este estudio fueron negativas para los genes *eaf* y *bfp*.

Sosa *et al.* (2008) aislaron cepas de *E. coli* y *Salmonella sp.* a partir de 48 muestras de heces fecales obtenidas de 30 tortugas cautivas pertenecientes a la Marina del Puerto de Veracruz, siete de un estanque particular del Puerto de Veracruz y 11 mantenidas en una pecera de la zona metropolitana de la ciudad de México. Se recuperaron 24 cepas de *E. coli* y 8 de *Salmonella enterica*, la serotipificación de las *Salmonella* aisladas identificó a las ocho cepas como del grupo D, perteneciendo las a la especie *S. enteritidis* (*S. enterica*). De las cepas de *E. coli*, solo una exhibió el gen *stx1* (0.24%) y una el gen *stx2* (0.24%).

Gallegos *et al.* (2009) buscaron el serotipo O157:H7 en 18 aislados de *E. coli*, nueve obtenidos de cerdos y la misma cantidad de reses. De estos, 12 exhibieron los genes *rfbE* y *flicC* (que determinan al serotipo O157:H7) y cuatro aislados exhibieron los genes *stx1*, *stx2* y *eaeA* (uno aislado de res y tres de cerdo); ellos concluyeron que este patógeno puede estar presente en ambos tipos de animales.

Por otra parte, Wheeler *et al.* (2012) tomaron muestras de heces de 29 iguanas terrestres (*Conolophus sp.*), 50 iguanas marinas (*Amblyrhynchus cristatus*), 10 tortugas gigantes (*Geochelone nigra*) y seis muestras de agua de mar de las Islas Galápagos. Ellos aislaron 18 cepas de *E. coli* (dos de iguana terrestre, una de iguana marina, diez de agua de mar y cinco de tortugas gigantes) y cinco de *Salmonella enterica*; tres pertenecientes al serovar Sandiego y dos al serovar 47:b:1,5 (todas aisladas de iguana marina); de estas, nueve cepas de *E. coli* recuperadas de reptiles, fueron resistentes a ampicilina (dos de iguana terrestre, una de iguana marina y seis de agua de mar); 13 fueron resistentes a doxiciclina (ocho muestras de agua y cinco de tortugas gigantes); 16 presentaron resistencia a tetraciclina (una de iguana terrestre, una de iguana marina, nueve de agua de mar y cinco de tortugas gigantes) y en cuanto a la resistencia de trimetoprima /sulfametoxazol solo se presentó en una cepa aislada de tortuga marina. Por ello especularon que los reptiles en contacto con el humano están expuestos a la adquisición de bacterias que colonizan al hombre, fortaleciéndose el intercambio de cepas bacterianas con distintos rasgos genéticos.

Zotta *et al.* (2015) buscaron los genes *stx1*, *stx2* y *rfb* en cepas de *E. coli* aisladas de 162 muestras de materia fecal de animales de compañía (96 perros y 66 gatos). Sus resultados demostraron que en ninguna de las muestras procesadas se detectaron los genes que codifican para la producción de las toxinas Shiga 1 y 2 (*stx1*, *stx2*) ni el gen *rfb*. Los autores indicaron que la ausencia de dichas toxinas pudo deberse a los cuidados que tienen los perros muestreados, tales como administración de alimentos balanceados cuya elaboración implica procesos de cocción o ingestión de agua potable.

Un trabajo realizado previamente en el estado de Chiapas, menciona que aislaron 80 cepas de *Escherichia coli* provenientes de heces de 110 iguanas de 34 criaderos, allí se reportó también una baja prevalencia de STEC, presentándose en solo dos cepas (1.8%), aunque ambas con la presencia de las toxinas *stx1*, *stx2* y el factor de virulencia intimina (*eaeA*). Se menciona que a pesar de que se presentó en menor frecuencia, la iguana verde puede ser un reservorio de cepas pertenecientes a grupos patógenos de *E. coli*, lo que representa un riesgo para humanos y animales (Corzo-Cobos *et al.*, 2016).

## IV. OBJETIVOS

### 4.1 General

Determinar la presencia de *Escherichia coli* causante de diarrea en heces de iguana verde (*Iguana iguana*) en cautiverio.

### 4.2 Específicos

- Identificar genes específicos para los grupos patógenos: *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), *Escherichia coli* secretora de toxina semejante a Shiga (STEC), *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC), *Escherichia coli* enteropatógeno (EPEC), *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), *Escherichia coli* con adherencia difusa (DAEC).
- Analizar la asociación entre la edad y procedencia de las iguanas con el grupo patogénico de *E.coli*.

## V. ÁREA DE ESTUDIO

Esta investigación se realizó en seis Unidades de Manejo Ambiental (UMAS) ubicadas en cinco municipios de Chiapas. De la región metropolitana: 1) Chiapa de Corzo, ubicada entre los paralelos 16°17' y 16°55' de latitud norte y los meridianos 92°48' y 93°06' de longitud oeste a una altitud que varía de 200 a 1 800 m; 2) Tuxtla Gutiérrez, la capital del estado, localizada entre los paralelos 16°38' y 16°51' de latitud norte y los meridianos 93°02' y 93°15' de longitud oeste a una altitud entre 200 y 1 500 m; 3) Ocozocoautla de Espinosa, ubicado entre los paralelos 16°25' y 17°10' de latitud norte y los meridianos 93°11' y 93°52' de longitud oeste a una altitud de 100 y 1 800 m. Las localizadas en la región Istmo-Costa en los municipios de 4) Tonalá, entre los paralelos 15°40' y 16°15' de latitud norte y los meridianos 93°19' y 94°01' de longitud oeste, con una altitud entre 0 y 2 500 m y 5) Pijijiapan, que se encuentra entre los paralelos 15°24' y 15°53' de latitud norte y los meridianos 92°50' y 93°31' de longitud oeste, altitud entre 0 y 2 500 m (Instituto Nacional de Geografía e Informática [INEGI], 2010) (Figura 21).

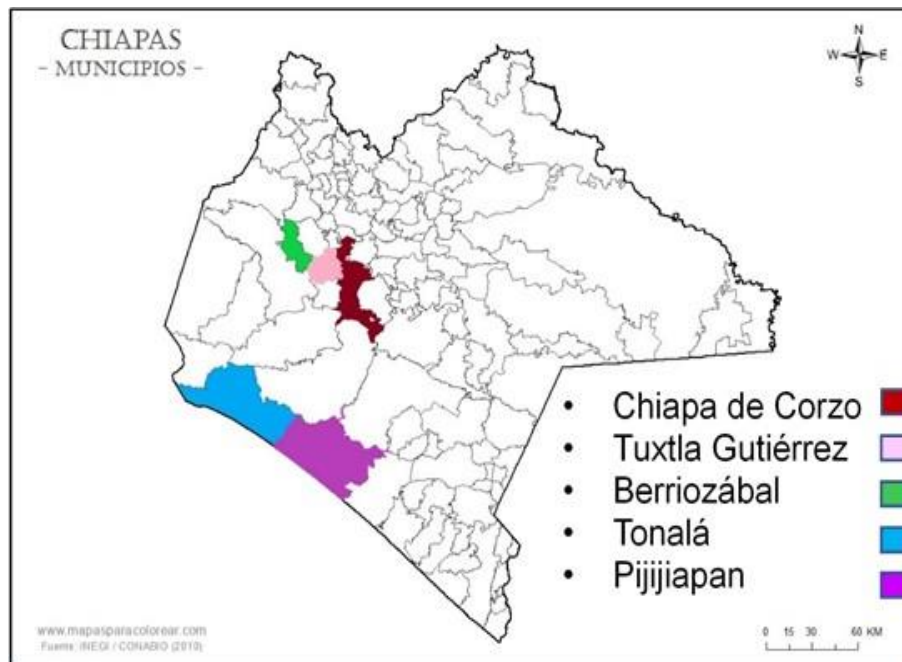


Figura 21. Municipios del estado de Chiapas donde se ubican las UMAS estudiadas (INEGI/CONABIO, 2010).

Cada uno de los municipios donde se localizan las UMAS estudiadas, presentan características que se muestra en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Climas y tipos de vegetación de los municipios donde se ubican las UMAS de este estudio (INEGI, 2010).

Región	Municipio	Clima	Vegetación
Metropolitana	Chiapa de Corzo	Cálido subhúmedo	Selva, bosque, sabana
Metropolitana	Tuxtla Gutiérrez	Cálido subhúmedo	selva y bosque
Metropolitana	Berriozábal	Tropical	Selva, bosque, sabana
Istmo-Costa	Tonalá	Cálido subhúmedo	Selva, manglar, bosque, sabana
Istmo-Costa	Pijijiapan	Cálido subhúmedo	Selva, manglar, bosque y Vegetación de dunas costeras

## VI. MÉTODO

### 6.1. Población de iguana verde

Este estudio fue aprobado por el Comité para el Cuidado de Animales de la Universidad Autónoma de Chiapas (No. 06/VET/RPR/269/16). Durante el periodo de septiembre del 2015 a marzo 2017 se seleccionaron 101 especímenes de *Iguana iguana* en cautiverio de seis UMAS: 49 de la región Istmo-Costa y 52 de la región Metropolitana de Chiapas, México. En estas regiones se encuentran la mayoría de las UMAS en Chiapas.

En las UMAS de la región metropolitana, los reptiles se encontraban en jaulas de 27 o 25 x 33 pies, en tanto que los de la región Istmo-Costa se encontraban en espacios abiertos de 16 x 33 pies, aunque limitados con malla. La dieta de los reptiles consistía principalmente de lechuga, zanahoria y repollo y el agua potable se dispuso en bebederos *ad libitum*. Los reptiles fueron retirados de sus encierros y se clasificaron de acuerdo a la edad: 43 iguanas juveniles (6 a 18 meses de edad) y 58 adultos (más de 36 meses de edad). Dado que en las iguanas juveniles no es posible determinar el sexo, ésta variable solo se determinó entre la población adulta. Las iguanas machos exhibieron abultamiento del hemipene (las hembras carecen de dicha característica) además de presentar poros femorales más grandes que las hembras (Arcos-García *et al.*, 2010). En este trabajo se analizaron 55 hembras y 59 machos.

### 6.2. Obtención de muestras

Se obtuvieron muestras de materia fecal de la cloaca de 101 iguanas. La toma de muestra fue hecha por alumnos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Chiapas (UNACH), quienes introdujeron un hisopo estéril en la cloaca de la iguana, se giró lentamente para tomar el fluido y se colocó en medio de transporte Stuart. Posteriormente se etiquetó con número de control, fecha y UMA muestreada. Una vez en el laboratorio de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNACH, las muestras se sembraron por estría cruzada en agar MacConkey e incubaron a 37°C/24h y se identificaron mediante pruebas bioquímicas.

### **6.3. Cepas de *E. coli* control**

Se utilizaron seis cepas de referencia de *E. coli*: *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* enteropatógena (EPEC) E2348/69, *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) H10407, *E. coli* secretora de toxina Shiga (STEC) EDL933, *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) E1 y *E. coli* enteroagregativa (EAEC) 042. Todas las cepas provenían del cepario del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (Gutiérrez-Jiménez *et al.*, 2015).

### **6.4. Conservación de cepas de *E. coli***

Para poder identificar las cepas de *E. coli* aisladas de iguanas, se asignó el acrónimo IRI (Insolation Related to Iguana) seguida de un número consecutivo. Para conservar las cepas de *E. coli*, estas se sembraron de forma masiva en agar Luria Bertani (LB) y se incubaron a 37°C/24 h. El crecimiento se cosechó en caldo LB suplementado con glicerol del 20% y se mantuvieron a -80°C (Tedeschi y De Paoli, 2011)

### **6.5. Obtención de ADN bacteriano**

El ADN bacteriano se obtuvo lisando las células bacterianas. Para ello se transfirieron diez colonias aisladas en 1 mL de agua libre de nucleasas estéril (UBS ®) y se agitó en un vortex hasta lograr la homogeneidad. Posteriormente, la suspensión bacteriana se colocó en baño María en ebullición por un minuto y se conservaron a -20° C hasta su uso.

### **6.6. Investigación de genes de virulencia de *E. coli* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Las reacciones se prepararon a un volumen final de 25 µL mezclando 10.5 µL de agua libre de nucleasas (Promega), 12.0 µL de GoTaq® Green Master Mix (Promega), 1.0 µL de oligonucleótidos comerciales (Integrated DNA Technologies, IDT ®) (Cuadro 3) y 1.5 µL del lisado bacteriano.

Cuadro 3. Primers utilizados para la PCR (modificado de Cerna *et al.*, 2003 y López-Saucedo *et al.*, 2003).

Patotipo de <i>E. coli</i>	Gen	Secuencia (5´- 3´)	Tamaño de amplicón (pb)	Concentración (mm)
<b>ETEC</b>	<i>Lt</i>	F: GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC R: CGG TCT CTA TAT TCC CTG TT	450	0.4
	<i>St</i>	F: ATT TTT CTT TCT GTA TTG TCT T R: CAC CCG GTA CAA GCA GGA TT	190	0.4
<b>EPEC</b>	<i>bfpA</i>	F: AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC R: GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA	324	0.4
	<i>eaeA</i>	F: GAC CCG GCA CAA GCA TAA GC R: CCA CCT GCA GCA ACA AGA GG	384	0.4
<b>STEC</b>	<i>stx1</i>	F: CTG GAT TTA ATG TCG CAT AGT R: AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC	150	0.4
	<i>stx2</i>	F: GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC R: TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G	255	0.4
<b>EIEC</b>	<i>lal</i>	F: GGT ATG ATG ATG ATG AGT CCA R: GGA GGC CAA CAA TTA TTT CC	650	0.4
<b>EAEC</b>	<i>Aap</i>	F: CTT GGG TAT CAG CCT GAA TG R: AAC CCA TTC GGT TAG AGC AC	310	0.4
	<i>aggR</i>	F: CTA ATT GTA CAA TCG ATG TA R: AGA GTC CAT CTC TTT GAT AAG	457	0.4
	<i>AA probe</i>	F: CTG GCG AAA GAC TGT ATC AT R: CAA TGT ATA GAA ATC CGC TGT	629	0.4

F= forward (directo); R=Reverse (reverso).

Las reacciones se sometieron en un termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf) en las condiciones mostradas a continuación (Cuadros 4 y 5).



Cuadro 4. Condiciones de reacción para la PCR de ETEC, EPEC, STEC y EIEC (López-Saucedo *et al.*, 2003).

Etapa de reacción	Temperatura	Tiempo	
Pre calentamiento	50°C	2 minutos	
Desnaturalización inicial	95°C	5 minutos	
Desnaturalización	95°C	45 segundos	40 ciclos
Alineamiento	50°C	45 segundos	
Extensión	72°C	45 segundos	
Extensión final	72°C	10 minutos	

Cuadro 5. Condiciones de reacción para la PCR de EAEC (Cerna *et al.*, 2003)

Etapa de reacción	Temperatura	Tiempo	
Pre calentamiento	50°C	2 minutos	
Desnaturalización inicial	95°C	5 minutos	
Desnaturalización	95°C	45 segundos	40 ciclos
Alineamiento	55°C	45 segundos	
Extensión	72°C	45 segundos	
Extensión final	72°C	10 minutos	

## 6.7. Análisis de amplicones mediante electroforesis en gel de agarosa

Los productos de la reacción de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 2.5 % usando regulador TAE 1X (Tris-acetato-EDTA) como diluyente, aplicando 100 volts durante 30 minutos. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) por 15 minutos y se visualizaron en un transiluminador de luz UV (Enduro™ GDS®), se tomaron fotografías con el programa del equipo y las bandas se interpretaron con respecto a los controles positivos. Como marcador de peso molecular se usó la escalera de 100 pares de bases (pb) (Invitrogen®).

## **6.8. Análisis estadístico**

Con los datos se construyó una matriz de datos en hojas de cálculo de Excel ®; las frecuencias se determinaron mediante estadística descriptiva y para analizar la asociación entre las variables no paramétricas se usó la prueba de  $X^2$  o prueba exacta de Fisher, el valor de significancia estadística se estableció cuando  $p \leq 0.05$ . Los análisis se hicieron con el programa SPSS o PAST (<https://folk.uio.no/ohammer/past/>).

## VII. RESULTADOS

### 7.1. Distribución de ejemplares de *Iguana iguana* por región

De las 101 iguanas muestreadas, el 51% proviene de la región metropolitana y el 49% de la región Istmo-Costa.

### 7.2. Patotipos de *E. coli* aislados de *Iguana iguana*

Se aislaron un total de 63 cepas patógenas de *E. coli* de las heces de *I. iguana* (62.3%), siendo STEC el patotipo más frecuente con 26 muestras positivas (25.7%), seguido de EAEC y ETEC con 17 muestras positivas para cada una (16.8% cada una). El patotipo de menor frecuencia fue EPEC con tres aislados (3%), el 37.7% de las cepas no presentaron genes de virulencia, por lo que se categorizaron como comensales (Figura 22).

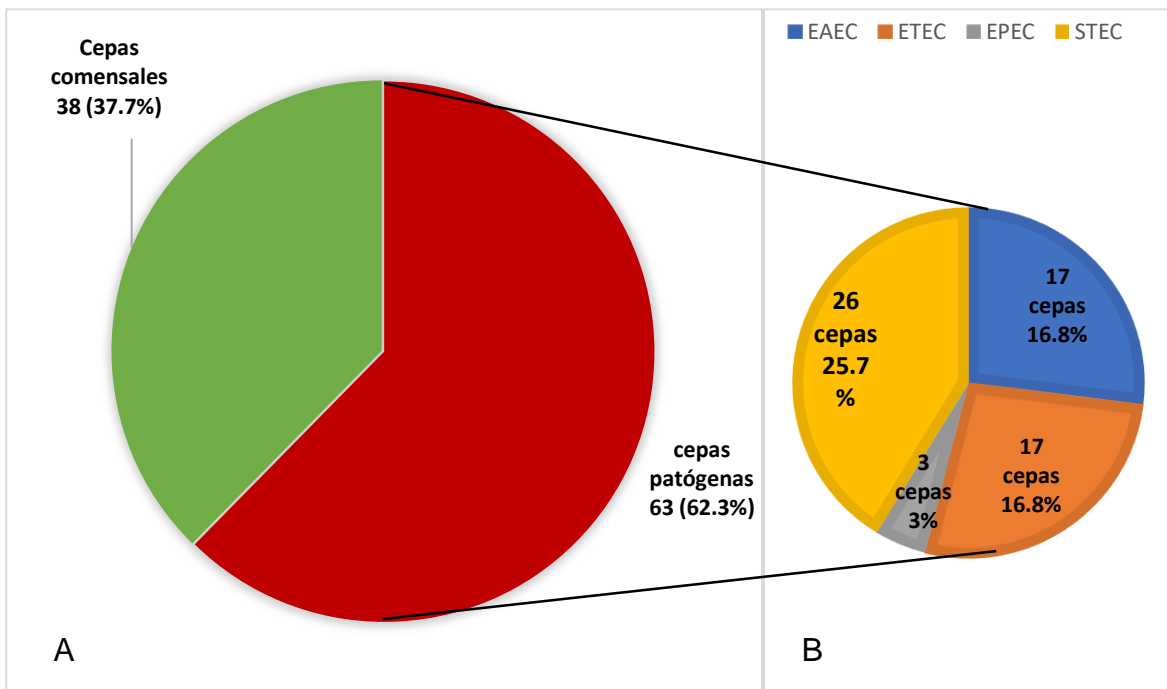


Figura 22. Distribución de patotipos de *E. coli* aisladas de *I. iguana* en Chiapas. A) Proporción de cepas comensales y patógenas (izquierda); B) proporción de patotipos de *E. coli*.

### 7.3. Identificación de genes de virulencia

De los genes diana de este estudio, el que se observó con más frecuencia fue el gen *stx1* que constituyó el 24.8 %, seguido del gen *aap* con 16.8 % mientras que los genes *AA probe* y *stx2* se detectaron en el 1% (para cada gen) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Genes de virulencia típicos de *E. coli* aislados de *I. iguana* en Chiapas, México.

Patotipo de <i>E. coli</i> en heces de <i>I. iguana</i>	Gen	Ausente N (%)	Presente N (%)	P
EAEC	<i>Aap</i>	84 (83.2)	17 (16.8)	0.0001
	<i>AA probe</i>	100 (99.0)	1 (1.0)	
	<i>aggR</i>	101 (100.0)	0 (0.0)	
ETEC	<i>Lt</i>	89 (88.1)	12 (11.9)	0.359
	<i>St</i>	94 (93.1)	7 (6.9)	
EPEC	<i>bfpA</i>	98 (97.0)	3 (3.0)	1.000
	<i>eaeA</i>	99 (98.0)	2 (2.0)	
STEC	<i>stx1</i>	76 (75.2)	25 (24.8)	0.000002
	<i>stx2</i>	100 (99.0)	1 (1.0)	
EIEC	<i>ial</i>	101 (100.0)	0 (0.0)	

En la figura 23 se muestran los amplicones que codifican genes de virulencia típicos en cepas de *E. coli* diarreogénica que corresponden a los patotipos utilizado en este estudio. La cepa *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) E1, exhibió el gen *ial*; la cepa *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC) EDL933 con los genes *stx1* y *stx2*; los genes *Lt* y *st* de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), en tanto que los genes *bfpA* y *eaeA* se amplificaron en *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), para *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) 042 exhibio los genes *aap*, *aggR* y *AA probe*.

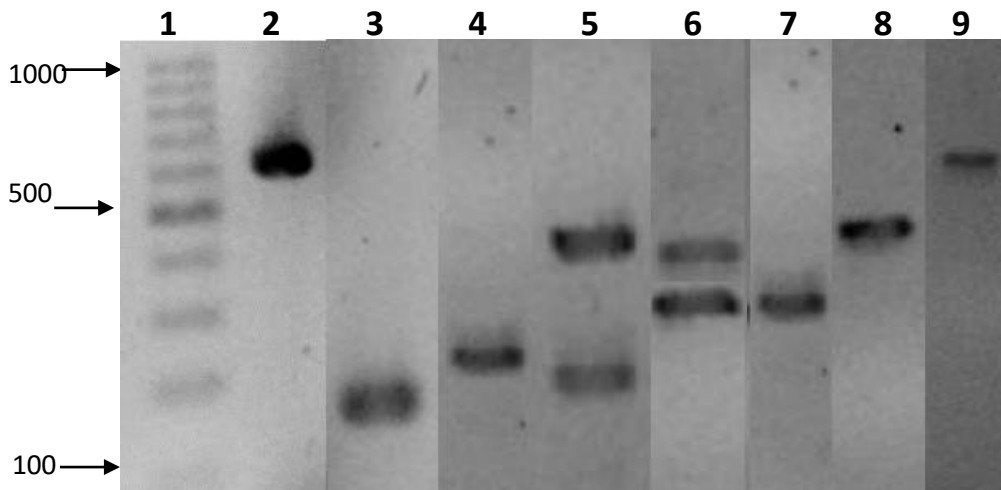


Figura 23. Amplificación de genes de virulencia típicos en cepas prototipo de *E. coli* diarreogénicas. Carriles: 1, marcador de peso molecular (Escala de 100 pb) ; 2, gen *ial* (-pb) en *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) E1; 3 y 4, genes *stx1* y *stx2* en *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC) EDL933 respectivamente; 5, genes *lt* y *st* en *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) H10407; 6, genes *bfpA* y *eaeA* en *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) E2348/69; 7, gen *aap* en *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) 042; 8, gen *aggR* en *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) 042; 9, marcador *AA probe* en *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) 042.

En la figura 24 se pueden observar genes de virulencia representativos en cepas de *Escherichia coli* diarreogénica obtenidas de *I. iguana*. Por ejemplo, en la cepa IRI-125 se amplificó el gen *stx1*, en tanto que en la cepa IRI-118 el gen *stx2*. Los genes *aap* y *AA probe* típicos de EAEC, se amplificaron en las cepas de *E. coli* IRI-158 e IRI-159, respectivamente, en tanto que los marcadores moleculares *lt* y *st* de ETEC se observaron en la cepa IRI-126 y los genes *bfpA* y *eaeA* de EPEC en la *E. coli* IRI-245.

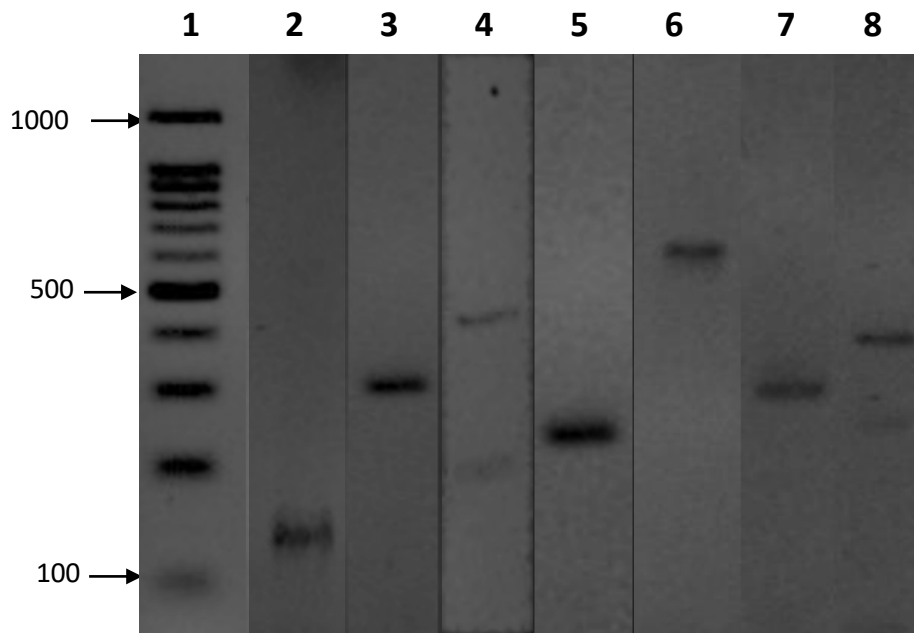


Figura 24. Amplificación de genes de virulencia típicos en cepas de *E. coli* diarreogénicas aisladas de *I. iguana*. Carriles; 1, marcador de peso molecular (Escalera de 100 pb); 2, gen *stx1* en *E. coli* IRI-125; 3, gen *aap* en *E. coli* IRI-138; 4, genes *lt* y *st* en cepas de *E. coli* IRI-126; 5, gen *stx2* en *E. coli* IRI-118; 6, marcador *AA probe* en *E. coli* IRI-159; 7, gen *bfpA* en IRI-245; 8, gen *eaeA* en IRI 247 *E. coli*.

#### 7.4. Asociación entre los patotipos de *Escherichia coli* con la procedencia de las iguanas.

Se encontró una asociación significativa entre la procedencia de los patotipos de *E. coli* aisladas de iguana y la procedencia de estas. Las cepas categorizadas como STEC únicamente se recuperaron en iguanas de UMAS de la región metropolitana. Por otro lado, las cepas EPEC solo se detectaron en la región Istmo-Costa ( $P < 0.05$ ) (Cuadro 7).

Cuadro 7. Asociación entre la procedencia de *I. iguana* con los patotipos de *E. coli*

Variante de <i>E. coli</i>	Región		P
	Metropolitana N (%)	Istmo-Costa N (%)	
EAEC	13 (12.9%)	4 (4%)	1.5x10 <sup>-9</sup>
ETEC	9 (8.9%)	8 (7.9%)	
EPEC	0 (0.0%)	3 (3%)	
STEC	26 (25.7%)	0 (0%)	
Comensal	13 (12.9%)	25 (8%)	
<b>Total</b>	52 (51.5%)	49 (48.5%)	

El valor de P se calculó con la prueba exacta de Fisher.

### 7.5. Asociación de la edad y el sexo de *I. iguana* con el tipo de *E. coli*

No se encontró una diferencia significativa entre la edad o el sexo de las iguanas con los diferentes patotipos de *E.coli*, es decir, la colonización por estas bacterias fue independiente de ese factor (Cuadro 8).

Cuadro 8. Tabla de contingencia entre la edad y sexo de *I. iguana* con el tipo de *E.coli*.

Patotipo de <i>E.coli</i>	Edad		P
	Juveniles N (%)	Adultas N (%)	
EAEC	11 (8.7)	6 (5.2)	0.337
ETEC	7 (5.5)	10 (8.7)	
EPEC	3 (2.4)	0 (0.0)	
STEC	13 (10.3)	12 (10.4)	
<b>Total</b>	34 (26.9)	28 (24.3)	
	Sexo		0.91
	Machos N (%)	Hembras N (%)	
EAEC	3 (5.0)	3 (5.4)	
ETEC	5 (8.5)	5 (9.0)	
EPEC	0 (0.0)	0 (0.0)	
STEC	7 (11.9)	6 (11.0)	
<b>Total</b>	15 (25.4)	14 (25.4)	

El valor de P se calculó con la prueba exacta de Fisher.

## VIII. DISCUSIÓN

La iguana verde (*Iguana iguana*) es un reptil de suma importancia para el equilibrio ecológico, ya que: 1) constituye una fuente de proteína al ser depredada por algunos mamíferos, aves e incluso otros reptiles; 2) su papel en la diseminación de semillas y 3) su excremento actúa como abono orgánico enriqueciendo la tierra de las zonas donde vive, algunas personas incluso le atribuyen propiedades curativas a la sangre de este reptil para el tratamiento del asma, en tanto que la grasa es utilizada para la cicatrización de heridas o como antiinflamatorio (Martínez-Salazar *et al.*, 2015) obligando así a generar alternativas para su preservación, tales como las Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMAS) (Lopez, 2008).

Las actividades en las UMAS involucran el manejo de los animales, lo que puede propiciar la presencia de patógenos en ellos, por lo que se generan riesgos de transmisión de enfermedades a los animales domésticos vertebrados e incluso al hombre, constituyendo una amenaza para la salud pública (Dabanch, 2003). Sin embargo, no solo los animales en cautiverio son propensos a presentar agentes patógenos, sino también los animales silvestres que después de ser capturados llegan a los mercados para su venta, teniendo así el tiempo suficiente de contacto con personas quienes pueden contraer al agente patógeno, a estos deben sumarse factores como el estrés de captura, traslado, manejo y mala alimentación (Yardo-Jaramillo, 2010).

### **8.1. Las cepas de *E. coli* aisladas de iguana verde albergan genes de virulencia**

Varias especies de bacterias han sido aisladas de reptiles, entre ellas *E. coli*, *Aeromonas sp.*, *Pseudomonas sp.* y, por tanto, son consideradas responsables de infecciones en reptiles. Las bacterias pueden penetrar a través de heridas, cuerpos extraños, entre otros mecanismos (Bayron *et al.*, 1999), Farfán-García *et al.* (2016) mencionan que las cepas patógenas de *Escherichia coli*, en especial el patotipo STEC, son altamente de carácter zoonótico y de gran importancia en salud pública.



Este estudio reveló que más de la mitad de cepas de *E. coli* aisladas de heces de iguana verde (62.3%), presentaron genes de virulencia de los diferentes patotipos. La variedad con mayor prevalencia fue STEC (25.7%) siendo la toxina *stx1* la más frecuente (24.8%). En contraste con el trabajo presentado aquí, un estudio que investigó la presencia de toxinas de STEC en cepas de *E. coli* aisladas de 48 tortugas en cautiverio provenientes del Puerto de Veracruz y la zona metropolitana de la ciudad de México, reportó una baja prevalencia (4.1%).

Los autores señalaron que los oligonucleótidos empleados para analizar las cepas de *E. coli* aisladas de tortugas, fueron los usados para analizar cepas patógenas aisladas de humanos, por lo que la baja prevalencia pudo obedecer a que dichos oligonucleótidos pudieron no detectar variantes de la toxina *stx* encontradas en los animales; finalmente ellos proponen efectuar estos análisis, aunque empleando oligonucleótidos que detecten variantes de esta toxina (Sosa *et al.*, 2008).

De manera similar, un estudio echo en Chiapas, México, también reporto una baja prevalencia de STEC (1.8%), luego de analizar 80 cepas de *E. coli* aisladas de heces de 110 iguanas de 34 criaderos. Los autores mencionaron que, aunque la prevalencia fue baja, la iguana verde puede ser un vehículo de este tipo de cepas que representan un riesgo para humanos y animales (Corzo-Cobos *et al.*, 2016)

En el presente estudio, los patotipos EAEC y ETEC fueron los que se recuperaron detrás de STEC, con una prevalencia de 16.8% (para ambos). Para el patotipo EAEC, el gen más prevalente fue *aap* (16.8%), seguido del marcador *AA probe* (1%); dicho marcador solo en una muestra puso visualizarse, en tanto que en ninguna cepa se amplificó el marcador *aggR*; dichas características ubican a las cepas EAEC como atípicas. Este hallazgo fue similar a un trabajo que comparó el perfil de virulencia entre cepas EAEC aisladas de humanos y animales (terneros, lechones y caballos), donde el marcador *aggR* solo se encontró en los aislados humanos, pero en ninguno de los aislados de procedencia animal, por ello, los investigadores especularon que los animales no fungen como reservorio de EAEC con capacidad de causar daño (Uber *et al.*, 2006).

Para las cepas ETEC de la presente investigación, el gen *lt* fue el más frecuente (11.9%) seguido del *st* (6.9%). Aunque no se ha establecido un papel de ETEC como patógeno en iguana verde, este patotipo causa colibacilosis en cerdos y terneros, y en menor medida en gatos, perros, además de otros animales de granja como borregos y cabras, en donde ha sido de mucho interés, por estar relacionada con enfermedades humanas en muchos aspectos, siendo en aves o reptiles donde se ha publicado poca información sobre enfermedades causadas por ETEC (Nagy 1999; Nagy 2005).

El patotipo EPEC se presentó con menor prevalencia (3%), siendo el gen *bfpA* el exhibido en todas las muestras, seguido del gen *eaeA* (Cuadro 6). Aunque la presencia de este patógeno fue menor en dichos animales evaluados, un trabajo realizado por Sánchez *et al.* (2015), quienes realizaron un estudio con primates *Aotus* (Aotidae) con diarrea en cautiverio (78 ejemplares), aislaron cepas en un 10.8%, quienes mencionan que dicho hallazgo tiene relevancia por su potencial zoonótico. Sin embargo, hay que destacar que EPEC es uno de los patotipos de mayor frecuencia en humanos, específicamente en infantes, tal como lo menciona Varela *et al.* (2007) quienes aislaron 40 cepas de *E. coli* provenientes de 95 niños, de las cuales la más prevalente fue EPEC (65%).

## **8.2. Asociación de la procedencia de iguana verde con los patotipos de *E. coli***

En este estudio se encontró una asociación entre la procedencia y el grupo patógeno tales como las cepas STEC (25.7%) que se recuperaron en muestras de heces obtenidas de iguanas de la región Metropolitana, en tanto que las cepas EPEC se recuperaron solo en la región Istmo-Costa (3%). Sin embargo, no existen trabajos que fundamenten claramente la presencia de tales patotipos en determinadas regiones, aunque se menciona que un factor que puede favorecer tal fenómeno es la temperatura. Un estudio menciona que las iguanas en cautiverio deben de mantener una temperatura entre los 32°C a 35°C, por lo que, si la temperatura aumenta, el crecimiento de microorganismos puede generarse en mayor cantidad (García, 2003).

Sin embargo, las diferencias reportadas aquí más bien 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 al censo del 2015 en esta región de Chiapas, hay una mayor cantidad de población (775 232 habitantes) en comparación con la región Istmo-Costa (230 749 habitantes) (CEIEG, 2014). Un estudio que apoyo dicha hipótesis es aquel que reporto una prevalencia de 13.8% de DEC aisladas de heces de 94 niños de Chiapa de Corzo, una localidad que pertenece a la región Metropolitana (Gutiérrez-Jiménez, 2019). Además, se puede especular que las iguanas mantenidas en la región metropolitana pueden carecer de un mejor manejo por parte del personal de las UMAS, en comparación con la región Istmo-Costa. También sería interesante explorar si contemplan el uso de antibióticos, lo que podría condicionar la emergencia de cepas patógenas de *E. coli*.

Se deduce que los principales grupos de reptiles mantenidos en cautiverio presentan particularidades de manejo, diferentes a las de los animales de compañía (perros y gatos). Estos aspectos, aunado a que los agentes etiológicos responsables de la mayor parte de las patologías de los reptiles son específicos, hacen que las interpretaciones de los hallazgos resultantes de la exploración deban hacerse basándose en los conocimientos particulares de cada animal (Bayron *et al.*, 1999).

Los resultados presentados aquí pueden ser de gran utilidad para instaurar medidas sanitarias durante el manejo de la iguana verde en cautiverio, con el propósito de reducir su papel como reservorio de bacterias patógenas como *E. coli* diarreogénica y de esa manera, el riesgo de propagación al ser humano.

### **8.3. Asociación entre el sexo de las iguanas y la presencia de *E. coli* patógenas**

Los reptiles pueden tolerar pequeñas cantidades de parásitos que se mantienen pasivos dentro del tubo gastrointestinal, pero el efecto secundario es la desnutrición ya que pueden absorber más del 40% de los nutrientes disponibles del hospedero, además, en un animal estresado, la pérdida de nutrientes puede tener más efecto. El conocimiento del ciclo biológico de los parásitos internos y externos que infestan a la *I. iguana*, permitirá establecer un método adecuado de control parasitario cuando esta especie sea mantenida en cautiverio, además de que se pueden evitar problemas de

zoonosis por el manejo directo que realiza el personal en las unidades de manejo (Martínez-Salazar *et al.*, 2015).

Martínez-Salazar *et al.* (2015) mencionan que en el caso de animales en cautiverio, los agentes patógenos causantes de enfermedades, pueden presentarse en iguanas adultas y jóvenes, en machos y en hembras sin ninguna diferencia, a esto se le atribuye al hecho de que se puede producir una infestación por medio del agua y comida ingerida entre diferentes etapas por el mal manejo que pueda realizarse; aunado a ello está el estrés como factor adicional, ya que éste disminuye las defensas del animal y se favorece la colonización parasitaria, donde los factores que permiten el desarrollo, la multiplicación y la propagación de parásitos es el contacto con los restos de comida, sus propios residuos (mudas de piel, excretas, fluidos corporales, etc.), así también como espacios pequeños y sobrepoblados.

En los resultados obtenidos en el presente trabajo, no se encontró una diferencia 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%); en tanto que la misma proporción en iguana macho y hembras (Cuadro 8).

Además de señalar la importancia comercial de la iguana verde, este reptil también se usa como mascota en algunos países de Latinoamérica incluyendo el sureste mexicano, de esta manera los animales usados con este propósito pueden considerarse como una fuente potencial de zoonosis y, como se reportó en el presente estudio, pueden albergar cepas de *E. coli* patógenas capaces de causar diarrea. Por tanto, los hallazgos mostrados aquí deben ser de utilidad para impulsar la adaptación de medidas sanitarias durante el manejo de la iguana verde en cautiverio, con el propósito de reducir su potencial como especie de reptil acarreadora de bacterias patógenas. Es necesario también plantear estudios adicionales que revelen el perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos de las cepas de *E. coli* aisladas de las iguanas, dado que la resistencia antimicrobiana es otro de los factores de virulencia importantes en *E. coli* y con el potencial daño al ser humano.

## IX. CONCLUSIONES

- La proporción de cepas DEC aisladas fue de 62.3% (n=63).
- La variedad patógena más frecuente de *Escherichia coli* fue la STEC (25.7%), seguida de EAEC y ETEC (16.8% para cada patotipo).
- La variedad patógena de menor frecuencia fue la EPEC (3%).
- Las cepas STEC se recuperaron de ejemplares de *I. iguana* de UMAS de la región Metropolitana y las cepas EPEC en la región Istmo-Costa.
- No se encontró asociación entre la edad o el sexo de *I. iguana* con la presencia de *E. coli* causante de diarrea.

## X. RECOMENDACIONES

- El o los manipuladores de las iguanas deben utilizar guantes y desinfectantes durante el manejo de los nidos, crías, jaulas, comederos, bebederos y estructuras de transporte.
- El manipulador debe tener conocimiento de cómo capturar y sostener a los individuos para evitar alguna mordedura de iguana que puede transmitir enfermedades zoonóticas.
- Llevar un monitoreo constante para detectar alguna anomalía en el comportamiento de algún individuo, si este presenta cambios, aislarlo y tomar muestras para ser evaluadas por un especialista y así poder confirmar o descartar enfermedades zoonóticas.
- Las jaulas en las que se encuentran los individuos deben ser del tamaño adecuado para evitar el estrés de las iguanas.
- Asegurarse que el individuo este en las condiciones ambientales adecuadas.
- Los especímenes deben estar separados por etapas juvenil-adulto para evitar transmisión de enfermedades entre ellos.
- Llevar un buen control nutricional, así mismo una buena selección y desinfección de la comida para evitar ingresar algún patógeno al organismo o generar alguna otra enfermedad.
- Asegurarse que el espécimen vendido sea un individuo totalmente sano para evitar transmisiones patógenas al comprador y explicarle sobre los pros y los contras de adquirir un individuo.

## XI. REFERENCIAS DOCUMENTALES

- Abduch, V. L., Piantino, A. J., Silva, F. R., Brinkley, C. y Affonso, I. C. 2002. Cell-detaching *Escherichia coli* (CDEC) strains from children with diarrhea: identification of a protein with toxigenic activity. *FEMS Microbiology Letters*. 217: 191-197.
- Aidar-Ugrinovich, L., Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J. E., Leomil, L., Dahbi, G., Mora, A., Onuma, D. L., Silveira, W. D. y Pestana de Castro, A. F. 2007. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brasil. *International Journal of Food Microbiology*. 115: 297-306.
- Arcos-García, J., Reynoso, V. H., Mendoza, G. D. y Hernández, D. 2010. Identificación del sexo y medición del crecimiento de iguana negra (*Ctenosaura pectinata*) en las etapas de cría y juvenil. *Revista Veterinaria México*. 36: 53-62.
- Balasko M y Cabanac M. 1998. Behavior of juvenile lizards (*Iguana iguana*) in a conflict between temperature regulation and palatable food. *Brain Behavior Evolution*. 52 (6): 257-262.
- Bayrón, A., Brotóns, N. J., Albert, A. y Talavera, J. 1999. Patología ocular en reptiles. *Clínica Veterinaria de Pequeños Animales*. 19 (3): 227-282.
- Beck, R. W. 2000. A chronology of microbiology in historical context. 8ª Edición. ASM Press. Washington, D.C., U.S.A.
- Bock, B. 2015. *Iguana iguana* Linnaeus 1758, Iguana verde, iguana común. Losada. Medellín. Colombia.
- Boisen, N., Krogfelt, K. A. y Nataro, J. P. 2013. Enteroaggregative *Escherichia coli*. En: Donnenberg M. (Ed.). *Escherichia coli: Pathotypes and principles of pathogenesis*. Elsevier. Baltimore, Maryland, USA. Pp. 247-273.
- Canseco, L. y Gutierrez, M. 2010. Anfibios y reptiles del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. CONABIO-UNAM. Mexico, D.F.

- Cárdenas, M. E., Cruz O. R., Gándara-Ramírez, J. L. y Pérez-Hernández, M. A. 2014. Factores de virulencia bacteriana: la inteligencia de las bacterias. *Elementos*. 94: 35-43.
- Cerna, F., Nataro, J. y Estrada-García, T. 2003. Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 41: 2138-2140.
- Comisión Nacional Forestal (CONAFOR). Reglas de operación. 2009. <https://www.gob.mx/conafor>. Consultado el 10 de mayo del 2020.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad (CONABIO). 2012. Biodiversidad Mexicana. <https://www.gob.mx/conabio>. Consultado el 16 de septiembre de 2018.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). 2012. Proyecto de evaluación de las Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) (1997-2008). Resultados de la Fase I: Gestión y Administración. Proyectos CONABIO: HV003, HV004, HV007, HV012 y HV019. <https://www.gob.mx/conabio>. Consultado el 21 de noviembre del 2019.
- Comité Estatal de Información Estadística y Geográfica de Chiapas. 2014. Región 1: Metropolitana. <http://www.ceieg.chiapas.gob.mx>. Consultado el 30 de junio del 2019.
- Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (CITES) .2014. Apéndice I, II y III. <https://cites.org/esp/disc>. Consultado el 15 de mayo del 2020.
- Corzo-Cobos, E., Saldaña-Molina, D., Estrada-Vázquez, J., Jiménez-Guzmán, A., Gómez-Velázquez, P., Ruiz-Sesma, H., Tejeda-Cruz, C., Ibarra-Martínez, C., Mendoza-Nazar, P., Ruiz-Sesma, B., Oliva-Llaven, M. A., Gutiérrez-Jiménez, J. y Bautista-Trujillo, G. 2016. Identificación de *Escherichia coli* enterohemorrágica en heces de iguana verde (*Iguana iguana*) en Chiapas. Congreso Mesoamericano de Investigación UNACH. Chiapas. Pp. 899-903.



- Croxen, M. A. y Finlay, B. B. 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*. 8: 26-38.
- Dabanch, P. 2003. Zoonosis. *Revista Chilena de Infectología*. 1 (20): 47-51.
- De Vosjoli P.2002. Essential concepts of herpetoculture, using the five stages to improve veterinary care. *Exotic DVM Magazine*. 3 (6): 33-36.
- De Vosjoli, P., Donoghue, S., Klingenberg, R y Blair, D. 2007. The Green iguana manual: From the Advanced Vivarium System. CompanionHouse Books. Whiting, U.S.A.
- Do, T., Stephens, C., Townsend, K., Wu, X., Chapman, T., Chin, J., McCormick, B., Bara, M. y Trott, D. J. 2005. Rapid identification of virulence genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates associated with diarrhoea in Queensland piggeries. *Australian Veterinary Journal*. 83 (5): 293-299.
- Farfán-García, A. E., Ariza-Rojas, S. C., Vargas-Cardenas, F. A. y Vargas-Remolina, L. B. 2016. Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Revista Chilena de Infectología*. 33: 438-450.
- Fuentes-Vicente, C. 2012. Procedimiento de Incubación de Iguana Verde (*Iguana iguana*) en la UMA "Lucertas" de Cd. Gral. Miguel Alemán, Municipio de Cosamaloapan de Carpio. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Veracruzana. Veracruz, México.
- Gallegos, M., Morales, A., Álvarez, G., Vásquez, J., Morales, L., Martínez, I. y Maldonado, J. 2009. Caracterización de aislados de *Escherichia coli* O157:H7 en canales de bovinos y porcinos mediante PCR. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Zulia*. 19: 139-146.
- García-Zendejas, V. 2013. Frecuencia de parásitos de reptiles en cautiverio en diferentes colecciones del Estado de Morelos. Tesis de Licenciatura. Instituto de Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Cuernavaca, Morelos.

- Gutiérrez-Jiménez, J., Luna-Cazares, L. M., Cruz, L. M., De Aquino-López, J. A., Sandoval-Gómez, D. y León-Ortiz, A. 2019. Children from a rural region in the Chiapas Highlands, Mexico, show an increased risk of stunting and intestinal parasitoses when compared with urban children. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*. 76: 18–26.
- Gutiérrez-Jiménez, J., Luna-Cazares, L. M., Mendoza-Orozco, I., Díaz-Marina, G., Burguete-Gutiérrez, J. y Feliciano-Guzmán, F. 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*. 35: 95-102.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2010. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. <http://www.inegi.org.mx/geo>. Consultado el 19 de agosto de 2019.
- Kalvig, B. A, Maggio-Price, L, Tsuji, J. y Giddens, W. 1991. Salmonellosis in Laboratory housed iguanid lizards (*Sceloporus spp.*). *Journal Wildlife Diseases*. 27 (4): 551-556.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P. y Mobley, H. L. T. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. 2: 123-140.
- Lara-López, M. S. y Gonzáles, A. 2002. Alimentación de la iguana verde *iguana iguana* (squamata: iguanidae) en la mancha, Veracruz, México. *Acta Zoológica Mexicana*. 85: 139-152.
- Levine, M. M. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *Journal Infectious Diseases*. 155: 377-389.
- Liu, H., Platt, S. G. y Borg, C. K. 2004. Seed dispersal by the Florida box turtle (*Terrapene carolina bauri*) in pine rockland forests of the lower Florida Keys, United States. *Oecologia*. 138 (4): 539-546.

- López-Saucedo, C., Cerna, J. F., Villegas-Sepúlveda, N., Thompson, R., Velázquez, R., Torres, J., Tarr, F. y Estrada-García, T. 2003. Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases*. 1 (9): 127-131.
- López-Zamudio, A. 2008. Patrones de dominancia en el comportamiento reproductivo de machos adultos de iguana verde (*Iguana iguana*) en cautiverio. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Veracruzana. Veracruz, México.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H. y Stahl, D. A. 2015. Brock. Biología de los microorganismos. 14ª edición. PEARSON. Madrid, España.
- Madsen, E. L. 2000. Nucleic-acid characterization of the identity and activity of subsurface microorganisms. *Hydrogeology Journal*. 8: 112-125.
- Martínez-Salazar., M., Arcos, J. L., Veléz, L., Mendoza, G. D. y López R. 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*. 55 (19): 43-52.
- Máttar, S., Visbal, J. y Bermúdez, A. 2000. Zoonosis: cerca o lejos de nosotros?. *Revista MVZ Córdoba*. 1 (5): 5-9.
- Mayer, J. y Bays, T. B. 2006. Reptile behavior. En: Bays, T. B., Lightfoot, T., Mayer, J. (Eds.). *Exotic pet behavior: Birds, reptiles and small mammals*. Elsevier. Saint Louis, Misuri, U.S.A. Pp. 103-162.
- Meneghel, M. 2006. Biología animal: Reptiles de Uruguay. <https://www.serpentario.edu.uy>. Consultado el 15 de noviembre del 2018.
- Merin, D. S. y Bush, S. P. 2000. Severe hand injury following a green iguana bite. *Wilderness and Environmental Medicine*. 3 (11): 225-226.
- Millefanti, M. 2016. La iguana: Compra, cria, reproducción, prevención y cura de las enfermedades. De Vecchi. Mexico D.F.

- Murinda, S. E., Nguyen, L. T., Landers, T. L., Draughon, F. A., Mathew, A. G., Hogan, J. S., Smith, K. L., Hancock D. D. y Oliver S. P. 2004. Comparison of *Escherichia coli* Isolates from humans, food, and farm and companion animals for presence of Shiga toxin-producing *E. coli* virulence markers. *Foodborne Pathogens and Disease*. 3: 178-184.
- Nagy, B. y Fekete, P. Z. 1999. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Journal Veterinary Medical Research*. 30: 259-284.
- Nagy, B. y Fekete, P. Z. 2005. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *International Journal of Medical Microbiology*. 7 (295): 443-454.
- Nataro, J. P. y Kaper, J. B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 1 (11): 142-201.
- Nataro, J. P., Kaper, J. B., Robins-Browne, R., Prado, V., Vial, P. y Levine, M. M. 1987. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatric Infectious Diseases Journal*. 9 (6): 829-831.
- Noguera-Moya, O. V. (s.d.). Resistencias a fluoroquinolonas en aislados clínicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores y no productores de Betalactamasas de espectro extendido: Epidemiología en nuestro medio y análisis genético de este fenómeno. Tesis de Doctorado. Facultad de Medicina. Universidad Miguel Hernández. Elche, España.
- Otero-Álvarez, V. 2014. Incidencia, comportamiento y control de tipos patógenos de *Escherichia coli* (STEC y EPEC) en leche y queso de oveja. Tesis de Doctorado. Facultad de Veterinaria. Universidad de León. España.
- Pawłowska, B. y Sobieszcańska, B. M. 2017. Intestinal epithelial barrier: The target for pathogenic *Escherichia coli*. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. 9 (26): 1437-1445.
- Pérez-Riquelme, A. 2017. Investigación de genes asociados a resistencia a antibióticos en patotipos de *E. coli* por la técnica de la Reacción en Cadena de

- la Polimerasa (PCR) en tortuga mora (*Testudo graeca*). Tesis de Maestría. Universidad de Murcia. Murcia.
- Pough F. 2004. Herpetology. 4ª edición. Prentice Hall. Sunderland, Massachusetts, U.S.A.
- Puerta-Garcia, E. A. y Mateos-Rodriguez, F. 2010. Enterobacterias. *Medicine*. 51 (10): 3426-3431.
- Riley, L. W., Remis, R. S., Helgerson, S. D., McGee, H. B., Wells, J. G., Davis, B. R., Hebert, R. J., Olcott, E. S., Johnson, L. M., Hargrett, N. T., Blake, P. A. y Cohen, M. L. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *The New England Journal Medicine*. 12 (308): 681–685.
- Rípodas, A., Fernández, D. y Macho, M. 2017. Investigación de *Escherichia Coli* productor de toxinas Shiga (STEC) en carnes y derivados cárnicos. *Sanidad militar*. 3 (73): 147–152.
- Riveros, M., Barletta, F., Cabello, M., Durand, D., Mercado, E., Contreras, C., Rivera, F., Mosquito, S., Lluque, A. y Ochoa, T. 2011. Patrones de adherencia de cepas de *Escherichia coli* difusamente adherente (DAEC) provenientes de niños con y sin diarrea. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 1 (28): 21-28.
- Rodriguez, A. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*. 5 (44): 464-475.
- Scaletsky, I. C., Silva, M. L. y Trabulsi, L. R. 1984. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infection and Immunity*. 2 (45): 534-36.
- Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 2009. Unidades de Manejo para la Conservación de Vida Silvestre (UMA). <https://www.gob.mx/semarnat>. Consultado el 21 de octubre de 2018.

- Sherlock, O., Schembri, M. A., Reisner, A. y P. Klemm. 2004. Novel roles for the AIDA adhesin from diarrheagenic *Escherichia coli*: cell aggregation y biofilm formation. *Journal of Bacteriology*. 23 (186): 8058-8065.
- Solórzano-Aburto, E. L. y Canales-Valle, S. M. 2009. Estudio de las estructuras anatómicas de la especie iguana verde (*Iguana iguana*) en Nicaragua. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencia Animal. Universidad Nacional Agraria. Managua, Nicaragua.
- Sosa, L. A., Del Rio, J. C. Córdova, R., Cuenca, N. M., Valdivia, E. G., Alba, F. y Valdivia, G. 2008. Aislamiento en México de *Escherichia coli* productoras de toxinas de Shiga (Stx) y de Salmonella enterica a partir de tortugas (*Trachemis scripta*) mantenidas en cautiverio. *Revista Electrónica de Clínica Veterinaria*. 8 (3): 1-13.
- Sparo, M. y Schell, C. 2011. Bacterias Zoonóticas Y Alimentos. *Journal of Food Science*. 3:1-7.
- Tedeschi, R. y De Paoli, P. 2011. Collection and preservation of frozen microorganisms. *Methods in Molecular Biology*. (675): 313-326.
- Vega-Villa, V. M. y Castellanos-Pérez, M. 2017. Caracterización de las enfermedades pos-inundación de las principales comunidades del municipio de playas de Catazajá del periodo 2011 a 2014. Proyecto de Investigación. Centro Mesoamericano de Estudios en Salud Pública (CEMESAD). Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.
- Vial, P., Robins-Browne, R., Lior, V., Kaper, J., Nataro, J., Maneval, D., Elsayed, A. y Levine, M. 1988. Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. *Journal of Infectious Diseases*. 1 (158): 70-79.
- Vidal-Graniel., J. E. 2003. *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC): Una causa frecuente de diarrea infantil. *Salud en Tabasco*. 1 (9) : 188–193.

- Wakimoto, N., Nishi, J., Sheikh, J., Nataro, J. P., Sarantuya, J., Iwashita, M., Manago, K., Tozuda, K., Yoshinaga, M. y Kawano, Y. 2004. Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 5 (71): 687-690.
- Wheeler, E., Hong, P., Bedon, L. y Mackie, R. 2012. Carriage of antibiotic-resistant enteric bacteria varies among sites in Galapagos reptiles. *Journal of wildlife diseases*. 1 (48): 56-67.
- Yardo-Jaramillo, E. 2017. Zoonosis y manejo de animales silvestres y exóticos en la consulta privada. Congreso Latinoamericano de Emergencia y Cuidados Intensivos LAVECCS. Punta del Este, Uruguay. Pp. 1-17.
- Zotta, M., Lavayén, S., Hollmann, P. y Lanfranconi, V. 2015. Animales domésticos como reservorio de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en Mar del Plata. *Journal of the Selva Andina Reseach Society*. 1 (6): 2-9.

## **XII. ANEXO**

### **Anexo 1. Publicación del trabajo en una revista indizada**





# Captive Green Iguana Carries Diarrheagenic *Escherichia coli* Pathotypes

Gerardo Uriel Bautista-Trujillo<sup>1</sup>, Federico Antonio Gutiérrez-Miceli<sup>2</sup>, Leonel Mandujano-García<sup>1</sup>, María Angela Oliva-Llaven<sup>1</sup>, Carlos Ibarra-Martínez<sup>1</sup>, Paula Mendoza-Nazar<sup>1</sup>, Benigno Ruiz-Sesma<sup>1</sup>, Carlos Tejeda-Cruz<sup>1</sup>, Liset Candelaria Pérez-Vázquez<sup>3</sup>, Jesús Eduardo Pérez-Batrez<sup>3</sup>, Jorge E. Vidal<sup>4,5</sup> and Javier Gutiérrez-Jiménez<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Chiapas, Tuxtla Gutiérrez, Mexico, <sup>2</sup> Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Tuxtla Gutiérrez, Mexico, <sup>3</sup> Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Tuxtla Gutiérrez, Mexico, <sup>4</sup> Rollins School of Public Health, Emory University, Atlanta, GA, United States, <sup>5</sup> Department of Microbiology and Immunology, University of Mississippi Medical Center, Jackson, MS, United States

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Paul Wigley,  
University of Liverpool,  
United Kingdom

### Reviewed by:

Steven Lee Foley,  
National Center for Toxicological  
Research (FDA), United States  
Kenneth James Genovese,  
United States Department of  
Agriculture, United States

### \*Correspondence:

Javier Gutiérrez-Jiménez  
javier.gutierrez@unicach.mx

### Specialty section:

This article was submitted to  
Veterinary Infectious Diseases,  
a section of the journal  
Frontiers in Veterinary Science

**Received:** 10 July 2019

**Accepted:** 10 February 2020

**Published:** 26 February 2020

### Citation:

Bautista-Trujillo GU,  
Gutiérrez-Miceli FA,  
Mandujano-García L,  
Oliva-Llaven MA, Ibarra-Martínez C,  
Mendoza-Nazar P, Ruiz-Sesma B,  
Tejeda-Cruz C, Pérez-Vázquez LC,  
Pérez-Batrez JE, Vidal JE and  
Gutiérrez-Jiménez J (2020) Captive  
Green Iguana Carries Diarrheagenic  
*Escherichia coli* Pathotypes.  
*Front. Vet. Sci.* 7:99.  
doi: 10.3389/fvets.2020.00099

The green iguana appears to be a carrier for bacteria causing gastrointestinal infections in humans. The presence of diarrheagenic *E. coli* (DEC) pathotypes, however, has not been studied in this reptile. The aim of the current work was to investigate the prevalence of DEC in the intestines of 240 captive green iguanas, their phylogenetic groups, and the antibiotic susceptibility profile. *E. coli* strains were isolated from 41.7% ( $N = 100/240$ ) of the intestinal content of green iguanas. DEC strains was identified in 25.9% of the screened population and were detected in the majority (62%,  $p = 0.009$ ) of those reptiles carrying *E. coli* strains. Among DEC strains, STEC strains carrying the *stx1* gene were the most prevalent pathotype isolated (38.7%), followed by EAEC and ETEC (27.4% each). Genetic markers of DEC strains belonging to the EHEC pathotype were not detected. More than a half of DEC strains were classified into the Clade I-II phylogroup (64.5%), followed by the phylogroup A (14.5%). The antibiotic susceptibility method demonstrated that a high proportion of DEC strains were resistance, or non-susceptible, to carbenicillin, amikacin, and ampicillin. We conclude that the green iguana kept in captivity is a carrier of DEC strains bearing resistance to first-line antibiotics, including penicillins. Given the increase presence of the green iguana in Latin American households, these reptiles represent a potential source of transmission to susceptible humans and therefore a potential source of gastrointestinal disease.

**Keywords:** diarrheagenic *Escherichia coli*, prevalence, Iguana, Chiapas, antibiotic resistance, zoonosis

## INTRODUCTION

*Escherichia coli* is a commensal bacteria found in the gastrointestinal tract of human and animals. Its ability to acquire virulence genes has originated strains that cause serious gastrointestinal infections in humans as well as animals (1). *E. coli* pathogenic strains are responsible for ~56 million cases of diarrhea causing 0.2 million annual deaths worldwide, most of it in children between 2 and 5 years of age (2).

Based on the virulence traits of this Gram-negative bacterium and the location of the infection within the human host, pathogenic *E. coli* strains are classified in Diarrheagenic *E. coli* (DEC) and Extra intestinal *Escherichia coli* (ExPEC). This last group includes uropathogenic *E. coli* (UPEC) and neonatal meningitis *E. coli* (NMEC). The DEC group includes Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), Enteropathogenic *E. coli* (EPEC), Enteroinvasive *E. coli* (EIEC), Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC), Enteroaggregative *E. coli* (EAEC), and diffusely adherent *E. coli* (DAEC) (3). EHEC (Enterohemorrhagic *E. coli*) is a subgroup of STEC strains associated with outbreaks and severe clinical illness in humans (4). Among the DEC pathotypes, STEC infections cause diarrhea, and hemorrhagic colitis but the infection occasionally progress to hemolytic uremic syndrome (HUS) that despite severe sequela can cause death (5). STEC virulence is mainly based on its ability to produce two isoforms of the Shiga toxin (Stx): Stx1 and Stx2, related to infections in human, mainly subtypes Stx2 (6). Multiple STEC serotypes have been reported in outbreaks of human disease, being the most frequent STEC O157, followed by non-O157 serotypes including O26, O103, O111, O21, O45, and O145 strains (7).

It have been reported that bovines, ovines, goats, pigs, dogs, and cats are reservoirs of different DEC strains (8). Ruminants, for example, are an important reservoir of DEC strains with their feces representing a key source of contamination of water and food that cause infections to humans. Several epidemiological studies have demonstrated the zoonotic potential of STEC strains. For instance, a study conducted in Belgium analyzing diarrheic calves found that 58% of STEC strains were capable of inducing the attaching/effacement (A/E) lesion, followed by EPEC strains (38%); the O26 and O111 serogroups were the most frequent (47.5 and 30%, respectively) (9). Another study found a prevalence of 0.7% of STEC serotype O103:H2 strains in feces of Norwegian sheep (10). A work conducted in Iran showed the presence of STEC strains in healthy calves and goats (26.3 and 27.5%, respectively) (6).

Recently, in Mexico, a high prevalence of STEC (40.7%) and ETEC (26.7%) was observed in dairy cows, besides reporting the presence of *E. coli* serotype O157:H7 and O104:H12 (11). The presence of DEC strains in wild animals seems to be low in comparison to their prevalence in humans and ruminants. EPEC (typical and atypical) and STEC strains have been isolated from captive wild birds in Brazil (12, 13). A study that surveyed animals from zoos in India demonstrated a low prevalence of DEC strains in wild ruminants (STEC 7.14%; EPEC 1.58%), in non-ruminant animals (STEC 3.48%; EPEC 5.81%) and wild birds (EPEC 5.84%) (14).

In Mexico and in other South American countries, the green iguana (*Iguana iguana* Linnaeus, 1758) has played an important role in the economy of some regions of these Latin America countries as these animals are sold for human consumption but also kept as pets. These factors led to a dramatic decline of iguana populations the last few years. Important efforts, however, to preserve the species have emerged in Mexico such as a special protection is in place according to the Mexican Official Norm NOM-059-SEMARNAT-2010 (15) as well as efforts to promote

their conservation by means of the Wildlife Management Units (WMU) (16).

Iguana species can carry in their intestines *Salmonella* species (17, 18) and *Escherichia coli* (19–21). The prevalence of *E. coli* in iguana species ranges from 40 to 70%. For example, in the Ricord's iguana (*Cyclura ricordi*) the prevalence reported was 50% (22), while in the land iguana (*Conolophus pallidus*) from the Galapagos Island it was 70.83% (19). Regarding the green iguana, studies have reported an *E. coli* prevalence of 40% (21) and 53.2% (18). To the best of our knowledge, whether the green iguana can carry DEC pathotypes has not been previously investigated and it was the main motivation for this study.

Therefore, the goal of this study was to investigate the prevalence of DEC strains colonizing the intestines of captive *I. iguana*. To figure out whether a subset of DEC strains is associated to intestinal colonization of the green iguana, we also determined their phylogenetic group as well as their susceptibility to first-line antibiotics.

## MATERIALS AND METHODS

### Green Iguana Population

This study was approved by the Committee for Animal Care of the University Autonomous of the Chiapas state (approval ID number 06/VET/RPR/269/16). From autumn 2015 to spring 2017, a total of 240 captive *I. iguana* were selected from the WMU as follows: 112 specimens from the Istmo-Costa region and 128 iguanas from the Metropolitan region of Chiapas, Mexico. Those regions of the State of Chiapas concentrate the majority of WMU for green iguana. The reptiles at WMU from the Metropolitan region were maintained in cages of 27 or 253 ft<sup>3</sup>, while reptiles from the Istmo-Costa region were placed in wired mesh confinements of 16 × 33 ft. Lettuce, carrots, and cabbage constitute the daily food source and potable water was available *ad libitum* from water fountains. The reptiles were safely retrieved from their respective cages and were classified in accordance to their age: 126 juvenile iguanas (6–18 months of age) and 114 adults (more than 36 months of age). As juvenile iguanas present physical characteristics that do not allow distinguishing males from females, sex was determined only within the adult population. Male iguanas presented swelling of the hemipenis (females lack of this characteristic) and bigger femoral pores than females (23). The study utilized 55 females and 59 males.

### Isolation of *E. coli* and Identification of DEC Strains

Intestinal content was collected in accordance to approved guidelines (24). Briefly, a sterile swab was introduced into the cloaca and after rotating gently, it was placed in Stuart agar gel (Copan) for its transportation to the laboratory. Swabs were streaked immediately onto Eosin and Methylene Blue agar (BD-BBL) and incubated at 37°C for 24 h. Up to 10 lactose fermenting colonies were selected and analyzed by standard biochemical tests. MacConkey agar plates with sorbitol were used for the detection of EHEC serotype O157:H7 (25). *E. coli* strains were

also genetically identified by PCR amplification of the *uidA* gene, that encodes for  $\beta$ -glucuronidase specific for *E. coli* (26).

## Diarrheagenic *E. coli* Pathotypes, Serogroups, and Phylogenetic Group's Identification by Polymerase Chain Reaction (PCR)

The following reference strains were used: *E. coli* strain (ATCC® 25922™) as a negative control, while EAEC 042 (044:H18), ETEC H10407 (O78:H11), EPEC E2348-69 (O127:H6), STEC EDL933 (O157:H7), and EIEC E11 (O124NM) prototype strains were used as a positive control in PCR reactions. Strains were kindly provided by Dr. Teresa Estrada-García from CINVESTAV, Mexico, and deposited into the bacterial collection of the University of Sciences and Arts of the state of Chiapas (27).

To obtain bacterial DNA, bacterial lysates of each of the 10 previously selected colonies were prepared by resuspending it in 1 mL of deionized water and then boiling the preparation for 10 min. The bacterial lysate was centrifuged at maximum speed for 5 min and DNA-containing supernatant was separated and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until used. Specific gene-targets for Enteroaggregative *E. coli* (EAEC) (*aap*, *aggR*, and *AAprobe* genes) were amplified by a technique described by Cerna et al. (28). For Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) (*lt* and *st* genes), Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) (*bfpA* and *eaeA* genes), Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) (*stx1* and *stx2* genes), and Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) (*ial* gene), we utilized targets and conditions described by López-Saucedo et al. (29). The *eae* and *hlyA* genes, molecular markers for Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), a well-known STEC sub-group that cause disease in humans, were amplified as established by Oswald et al. (30) and Schmidt et al. (31), respectively. The STEC strains were further analyzed in order to detect the O26, O45, O103, O111, O113, O121 and O145 antigens. To this end, primers amplifying the *wzx* gene (O- antigen flippase) in the O-antigen gene clusters were utilized as described by DebRoy et al. (32). The O157 antigen was investigated by amplifying the *rfb* gene (O- specific polysaccharide), according to Paton and Paton (33).

*E. coli* strains were further classified, using a quadruplex PCR method, into seven phylogroups: A, B1, B2, C, D, E, F, and the cryptic Clade I (34). This method is based in the presence or absence of *chuA*, *yjaA*, *arpA*, *trpA* genes and the TSPE4 C2 DNA fragment. PCR conditions and primers are shown in **Table 1**. PCR reactions were run in a thermal cycler C1000 (BioRad) and PCR products were analyzed through electrophoresis in agarose gel (2%) ran at 80 V for 1 h. Agarose gels were stained with SyberGreen® (Invitrogen), and photographed with the Molecular Imager® Gel Doc™ XR System (BioRad). The lambda molecular weight markers (100 and 1,000 bp) were used (Invitrogen, USA).

## Antimicrobial Susceptibility Analysis

The disk- diffusion method was utilized following recommendations by the Clinical and Laboratory Standards Institute (35). The following antimicrobial susceptibility test discs (BD BBL™ Sensi-Disc™) were utilized, according

to different antimicrobial categories: Penicillins, ampicillin (AMP;10  $\mu\text{g}$ ) and carbenicillin (CAR;100  $\mu\text{g}$ ); aminoglycosides, amikacin (AMK;30  $\mu\text{g}$ ), netilmicin (NET;30  $\mu\text{g}$ ) and gentamicin (GEN;10  $\mu\text{g}$ ); cephalosporins, cephalothin (CEF;30  $\mu\text{g}$ ) and cefotaxime (CTX;30  $\mu\text{g}$ ); quinolones, ciprofloxacin (CIP;5  $\mu\text{g}$ ) and norfloxacin (NOR;10  $\mu\text{g}$ ); phenicols, chloramphenicol (CHL;30  $\mu\text{g}$ ); folate inhibitor, trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT;25  $\mu\text{g}$ ) and furans, nitrofurantoin (NIT;300  $\mu\text{g}$ ). Strains resistant to  $\beta$ -lactams were further analyzed with amoxicillin-clavulanic acid discs (AMC; 20/10  $\mu\text{g}$ ). *E. coli* Non-susceptible strains (including intermediate and resistant phenotypes) to at least three antibiotics from different antimicrobial categories were recorded as multi-drug resistant (MDR) strains (36).

## Statistical Analysis

Prevalence of *E. coli* pathotypes, serogroups, phylogenetic groups, and susceptibility to antibiotics were analyzed by descriptive statistics. Proportions of typical molecular markers among DEC strains were analyzed by binomial test. The analysis between categorical variables was performed using the two-tailed Fisher's Exact test or Chi-Square test (when the frequencies were higher than 5) establishing a significance level when  $p < 0.05$ . All statistical analyses were conducted using the IBM SPSS statistics software (Chicago, SPSS Inc.).

## RESULTS

### Diarrheagenic *E. coli* Identification

We isolated 100 *E. coli* strains of fecal samples collected from 240 iguanas kept in captivity. DEC strains was identified in 25.9% of the screened population of *I. iguana* and were detected in the majority [62% ( $N = 62$ ),  $p = 0.009$ ] of those reptiles carrying *E. coli* strains ( $N = 100$ ). Among DEC strains, STEC (40.3%) was the most prevalent category followed by EAEC (27.4%, with a significant frequency of the *aap* gene) and ETEC (27.4%). EPEC strains had the lowest prevalence (4.9%) (**Table 2**). EHEC O157:H7 gene markers were not amplified by PCR neither EHEC strains were detected on MacConkey/sorbitol agar plates.

Our PCR approach revealed a statistically significant higher frequency of STEC strains carrying the *stx1* gene in comparison to those carrying *stx2*. The *eae* and *hlyA* virulence genes were not amplified in any of these STEC strains suggesting that they did not belong to the EHEC category. Accordingly, O- antigen genes carried by EHEC's most common serotypes (e.g., O26, O45, O103, O111, O113, O121, O145, and O157) were not amplified in any of these strains.

### Investigation of Phylogenetic Groups

Given that these iguanas are in captivity we sought to investigate whether DEC strains were related by obtaining their phylogenetic group. Among these *E. coli* strains ( $N = 62$ ), the clade I or II phylogroup was significantly the most predominant (64.5%), followed by phylogroups A and B2. Some of DEC strains (17.8%) could not be assigned to a known phylogroup (**Table 3**). Thus, DEC isolated from *I. iguana* may be related since the majority of strains were classified in clade I or II.

**TABLE 1** | Primers used in this study.

Primer pair	Sequence (5'-3')	Target	Encoded protein	Size (bp)	Reference
uidA	AAAACGGCAAGAAAAAGCAG (F*) ACGCGTGGTTAACAGTCTTGCG (R**)	<i>uidA</i>	$\beta$ -glucuronidase	147	(26)
aap	CTTGGGTATCAGCCTGAATG (F) AACCCATTTCGGTTAGAGCAC (R)	<i>aap</i>	Aggregative adherence fimbria	310	(28)
aggR	CTAATTGTACAATCGATGTA (F) AGAGTCCATCTCTTTGATAAG (R)	<i>aggR</i>	Transcriptional activator	457	(28)
AA probe	CTGGCGAAAGACTGTATCAT (F) CAATGTATAGAAATCCGCTGTT (R)	AA probe	Anti-aggregation protein transporter	629	(28)
lt	GGCGACAGATTATACCGTGC (F) CGGTCTCTATATTCCCTGTT (R)	<i>lt</i>	Heat-labile enterotoxin	450	(29)
st	ATT TTTCTTTCTGTATTGTCTT (F) CACCCGGTACAAGCAGGATT (R)	<i>st</i>	Heat-stable enterotoxin	190	(29)
bfpA	AATGGTGCTTGGCGCTTGCTGC (F) GCCGCTTTATCCAACCTGGTA (R)	<i>bfpA</i>	Bundle-forming pilus	324	(29)
eaeA	GACCCGGCACAAGCATAAGC (F) CCACCTGCAGCAACAAGAGG (R)	<i>eaeA</i>	Intimin	384	(29)
ial	GGTATGATGATGATGAGTCCA (F) GGAGGCCAACAATTATTCC (R)	<i>ial</i>	Invasion-associated locus	650	(29)
stx1	CTGGATTTAATGTCGCATAGTG (F) AGAACGCCCACTGAGATCATC (R)	<i>stx1</i>	Shiga toxin 1	150	(29)
stx2	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC (F) TCGCCAGTTATCTGACATTCTG (R)	<i>stx2</i>	Shiga toxin 2	255	(29)
SK1	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC (F)	<i>eae</i>	Structural gene for intimin	881	(30)
SK2	CCCGGATCCGTCTCGCCAGTA TTCG (R)				
hlyA1	GGTGCAGCAGAAAAAGTTGTA G (F)	<i>hlyA</i>	$\alpha$ -hemolysin	1,550	(31)
hlyA4	TCTCGCCTGATAGTGTGGTA (R)				
O26	CAATGGGCGGAAATTTAGA (F) ATAATTTTCTCTGCCGTCGC (R)	<i>wzx</i> (O26)	O-antigen-flippase	155	(32)
O45	TGC AGT AAC CTG CAC GGG CG	<i>wzx</i> (O45)	O-antigen-flippase	238	(32)
O45	AGCAGGCACAACAGCCACTACT				
O103	TTGGAGCGTTAACTGGACCT	<i>wzx</i> (O103)	O-antigen-flippase	321	(32)
O103	GCTCCCGAGCACGTATAAAG				
O111	TGTTTCTTCGATGTTGCGAG	<i>wzx</i> (O111)	O-antigen-flippase	438	(32)
O111	GCAAGGGACATAAGAAGCCA				
O113	TGCCATAATTCAGAGGGTGAC	<i>wzx</i> (O113)	O-antigen-flippase	514	(32)
O113	AACAAAGCTAATTGTGGCCG				
O121	TCCAACAATTGGTCGTGAAA	<i>wzx</i> (O121)	O-antigen-flippase	628	(32)
O121	AGAAAGTGAAATGCCCGT				
O145	TTCATTGTTTTGCTTGTCTCG	<i>wzx</i> (O145)	O-antigen-flippase	750	(32)
O145	GGCAAGCTTTGGAAATGAAA				
O157	CGGACATCCATGTGATATGG (F) TTGCCATGTACAGCTAATCC (R)	<i>rfbO157</i>	Polisacárido específico O	259	(33)
chuA.1b	ATGGTACCGGACGAACCAAC (F)	<i>chuA</i>	Membrane hemin receptor	288	(34)
chuA.2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA (R)				
yja.1b	CAAACGTGAAGTGTGACAGGAG (F)	<i>yjaA</i>	Stress response protein	211	(34)
yja.2b	AATGCGTTCCTCAACCTGTG (R)				
ArpAgpE.	GATTCATCTTGTCAAAATATGCC (F) GAAAAGAAAAAGAATCCCAAGAG (R)	<i>arpA</i>	Regulator of acetyl CoA synthetase	301	(34)
trpAgpC.1	AGTTTTATGCCAGTGCGAG (F)	<i>trpA</i>	Operon leader peptide	219	(34)
trpAgpC.2	TCTGCGCCGGTCAAGCCC (R)				
trpBA	CGGCGATAAAGACATCTTAC (F) GCAACGCGGCTGGCGGAAG (R)	<i>trpA</i> (control interno)	Operon leader peptide	489	(34)
TSPE4 C2	CACTATTCGTAAGGTCTATCC (F) AGTTTATCGCTGCGGGTCTGC (R)	TspE4.C2	Anonymous DNA fragment	152	(34)

\*F, forward; \*\*R, reverse.

There was not association between the prevalence of *E. coli* pathotypes and the age or sex of the iguanas. Regarding the geographic region where these reptiles are kept in captivity, a statistically significant association was observed between STEC strains isolated from iguanas kept at the Metropolitan (i.e., urban) region in comparison to those from the Istmo-Costa (i.e., rural) (Table 4).

## Antimicrobial Susceptibility of DEC Strains

Because these DEC strains represent a potential source of contamination for humans and therefore a source of gastrointestinal disease, we investigated their susceptibility to antibiotics utilized to treat gastrointestinal disease caused by Gram negative bacteria. More than a half of DEC strains were non-susceptible to antibiotics from the penicillin category, as well as two out of three antibiotics belonging to aminoglycosides. This trend was also observed when DEC strains were tested for their susceptibility to cephalothin and norfloxacin. 82.3% ( $N = 51$ ) of DEC strains were non-susceptible to at least three antibiotics from different antimicrobial categories, and therefore strains were considered as multi-drug resistant (MDR). All strains non-susceptible to ampicillin were susceptible to amoxicillin-clavulanic acid (data not shown). In addition, the majority of strains were susceptible to ciprofloxacin and chloramphenicol (Figure 1).

## DISCUSSION

*Escherichia coli* is an ubiquitous Gram negative bacteria considered as one of the main constituent of the gastrointestinal

tract of animals (37), humans (38), as well as reptiles such as turtles (39) and snakes (40). Nevertheless, there is almost no information about the presence and prevalence of *E. coli* pathotypes, such as DEC's in the intestines of reptiles (41). This study revealed that the majority of *E. coli* strains isolated from *I. iguana* carried genes encoding virulence factors associated with diarrhea in humans (62%) such as those carried by STEC, EAEC, or ETEC pathotypes. We found similar carriage prevalence of the pathogenic variants of DEC strains in *I. iguana* regardless sex or age.

How do Iguanas acquire pathogenic DEC strains? Contamination of their food and water sources seems to be the main driver for iguanas to acquire DEC strains. Preliminary results from our group found a high prevalence of DEC strains in water and food samples (52 and 48%, respectively) from the Metropolitan region than that in the Istmo-Costa region (17 and 13%, respectively); STEC strains was the more frequently pathotype isolated. Besides that water offered to iguanas in the Metropolitan region might be contaminated with DEC strains, cleaning of their water fountains can take up to a week allowing further growth of DEC strains in that water source. Given that cattle farms are not commonly found in the metropolitan region, and cattle have been reported as a main reservoir for DEC strains, the source of DEC strains that contaminate water in the urban sites might be human feces.

Several studies have demonstrated that *E. coli* pathotypes are isolated from dairy cows (8), sheep (42), and pigs (43). In Mexico, a prevalence of 40.7 and 26.7% for the carriage of STEC or ETEC in bovine, respectively, was reported in the states of Jalisco, Sinaloa, and Sonora (11). The prevalence of STEC strains among livestock in southern Mexico is unknown but current studies in our laboratories are investigating the presence of DEC's in livestock in the same geographical regions as those studied in this work. To the best of our knowledge, however, the presence of DEC strains in the intestine of iguanas had not been reported.

Acquisition of these DEC strains also can be a result of coprophagy, a behavior seen in iguanas because it is required for biochemical digestion of vegetables of their diet (44). Captivity in urban settings along with the mentioned coprophagy should also account for the presence of DEC strains in the intestine of iguanas. These observations are supported by the fact that a statistical significant association was observed in this study between intestinal carriage of STEC strains and iguanas kept in captivity at a metropolitan region of Chiapas. Reptiles may be in closer contact with human feces because of the crowdedness of an urban setting. Data supporting this hypothesis includes our own observations reporting the isolation of DEC's (13.8%) from the

**TABLE 2 |** DEC strains and their typical virulence genes isolated from *I. iguana* in Chiapas, Mexico.

Feces samples with DEC pathotype: % (N)	Virulence gene: % (N)	P
STEC: 40.3 (25)	<i>stx1</i> : 38.7 (24) <i>stx2</i> : 1.6 (1)	0.000002
EAEC: 27.4 (17)	<i>aap</i> : 27.4 (17) AA probe: 1.6 (1)	0.0001
ETEC: 27.4 (17)	<i>lt</i> : 19.3 (12) <i>st</i> : 11.3 (7)	0.359
EPEC: 4.9 (3)	<i>bfpA</i> : 4.9 (3) <i>eaeA</i> : 3.2 (2)	1.000
Total: 100.0 (62)		

**TABLE 3 |** Phylogenetic groups of DEC strains isolated in captive *I. iguana* in Chiapas.

Phylogenetic groups	DEC strains % (N)						P
	STEC <i>stx1</i>	EAEC	ETEC	EPEC	STEC <i>stx2</i>	Total	
A	25.0 (6)	0.0 (0)	17.6 (3)	0.0 (0)	0.0 (0)	14.5 (9)	0.005
B2	0.0 (0)	5.8 (1)	5.9 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)	3.2 (2)	
Clade I-II	75 (18)	70.5 (12)	41.2 (7)	66.6 (2)	100.0 (1)	64.5 (40)	
Unknown	0.0 (0)	5.8 (4)	35.3 (6)	33.3 (1)	0.0 (0)	17.8 (11)	

**TABLE 4** | Associations among DEC strains and some characteristics of *I. iguana* in Chiapas, Mexico.

Characteristic of <i>I. iguana</i> (N)	STEC stx1 % (N)	EAEC % (N)	EPEC % (N)	EPEC % (N)	STEC stx2 % (N)	p
<b>Age</b>						
Juvenile (126)	10.3 (13)	8.7 (11)	5.5 (7)	2.4 (3)	0.0 (0)	0.337
Adult (114)	9.6 (11)	5.2 (6)	8.7 (10)	0.0 (0)	0.8 (1)	
<b>Sex</b>						
Male (59)	11.9 (7)	5.0 (3)	8.5 (5)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.91
Female (55)	9.0 (5)	5.4 (3)	9.0 (5)	0.0 (0)	2.0 (1)	
<b>Region</b>						
Metropolitan (127)	18.9 (24)	9.4 (12)	7.1 (9)	0.0 (0)	0.8 (1)	<0.001
Istmo-Costa (113)	0.0 (0)	4.4 (5)	7.0 (8)	2.6 (3)	0.0 (0)	

feces of 94 children from Chiapa de Corzo, a locality belonging to the metropolitan region (45). Our findings agree with those by Sylvester et al. (21) whom demonstrated an association between the prevalence of *E. coli* carriage and certain geographic regions. We hypothesize that factors such as the weather, season of the year (summer and autumn), such as well as a potential hygiene deficiency when handling iguanas (fecal contamination in water and food in cages) favors the acquisition of DEC bacteria (46, 47).

In the current study, the prevalence of STEC carrying the *stx1* gene was higher than that of those carrying the *stx2* gene (Table 1). However, these strains were not EHEC as none carried the *eae* and *hlyA* genes, neither genes that encode for the following O antigens associated to EHEC strains: O26, O45, O103, O111, O113, O121, O145, and O157. Stx toxins represent the key virulence factor for diarrheal disease caused by STEC strains (6). Stx2 toxin is more virulent than Stx1 because that toxin is responsible for causing Hemolytic Uremic Syndrome in humans (48). Similar to the current work, a study conducted in Isla Cabritos National Park (Dominican Republic) and Granada (West Indies) failed to isolate EHEC O157:H7 from *I. iguana* (21, 49). EHEC strains belonging to serotypes O157, O26, O145, and O111 have been isolated from cases of HUS in humans from USA and Europe (50, 51). Therefore, our data indicate that *I. iguana* kept in captivity carries Stx1-producing STEC strains but not EHEC strains.

The present study also revealed that the *E. coli* isolates were grouped mainly in Clade I-II. As such, our results agree with studies demonstrating that environmental *E. coli* strains belong to different cryptic clades (52). According to this technique, the majority of *E. coli* strains could be assigned to the phylogroups mentioned above, however, in order to analyze in deep the clonality, or not, more sophisticated molecular assays such as whole genome sequence are warranted (53).

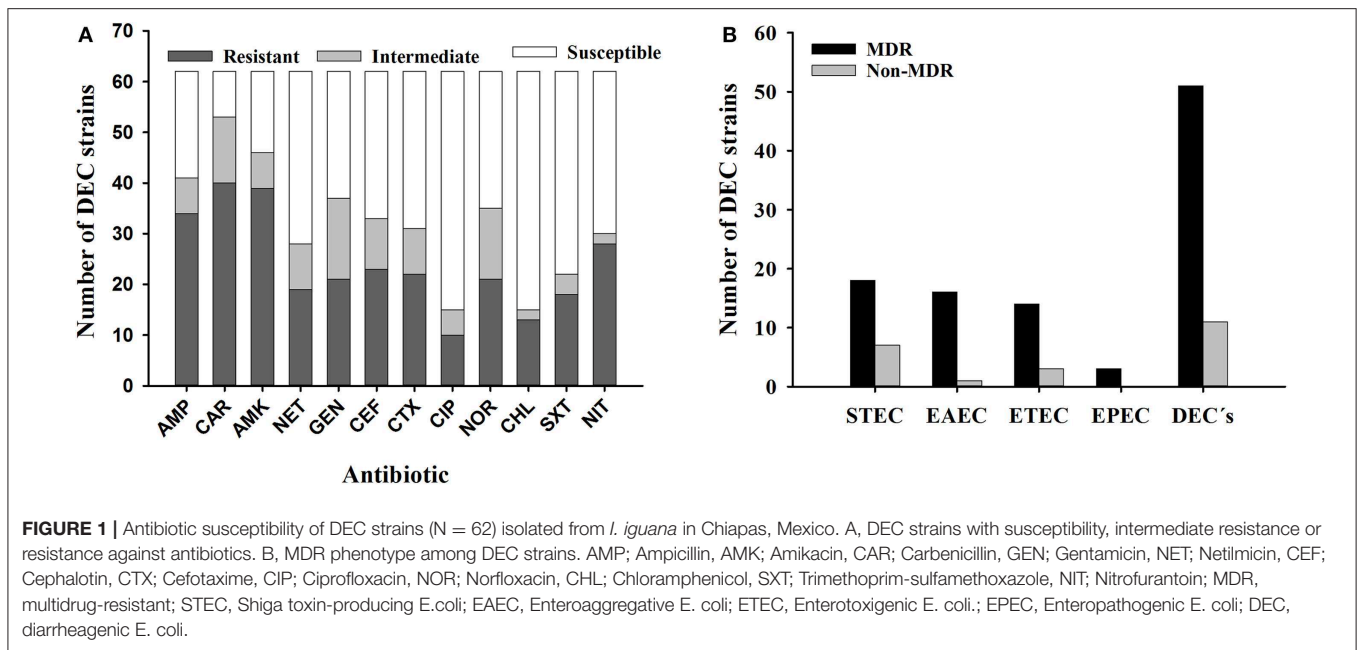
Regarding susceptibility to antibiotics, the majority of DEC strains were non-susceptible to at least three antibiotics from the different categories assessed, including penicillins, aminoglycosides, and some of the broad-spectrum antibiotics cephalothin and norfloxacin. For all DEC's strains analyzed, the MDR phenotype was mainly observed among STEC strains ( $N = 18$ ) (Figure 1). Studies recently published showed a similar prevalence Amezcuita-Lopez et al. (54) investigated antibiotic resistance (i.e., aminoglycosides, cephalosporins, penicillins, and

tetracyclines) among STEC strains recovered from healthy farm animals at North Western Mexico and showed that nearly half of those strains exhibited a MDR profile; strains were associated to human disease. A study of *E. coli* strains ( $N = 841$ ) isolated from feces of healthy cattle from northwest and western Mexico, showed that STEC and ETEC pathotypes were the most prevalent (40.7 and 26.7%, respectively); in some STEC strains (25.7%), resistance to penicillins, cephalosporins, tetracycline, and trimethoprim/sulfamethoxazole was observed (11). Another work conducted in Brazil showed that 19/57 *E. coli* strains isolated from sheep were non-susceptible to sulfonamides (57.9%), followed by non-susceptibility to ampicillin as well as cephalosporins (47.3% each); among those strains the acquired antimicrobial resistance, the gene encoding beta-lactamases was the most prevalent (55). These data, along with those described in the current study, are worrisome since treatment failure is expected in the event of a zoonosis leading to outbreaks of gastrointestinal illness. While DEC strains had not been isolated from iguanas until this study, in other studies where normal flora *E. coli* were isolated from iguanas captured at a Caribbean island, authors reported susceptibility to different antibiotics of their iguana's *E. coli* isolates (21). The non-susceptibility to antibiotics observed in DEC strains isolated from iguanas in Chiapas might indicate that resistance to antibiotics is a consequence of the acquisition of strains from humans since these reptiles are not treated with antibiotics during their life-span. Moreover, antibiotic resistance is not a common trait in bacteria isolated from wildlife animals (19). Therefore, our findings suggest a microbiological impact caused by the conditions of captivity.

The green iguana is utilized as a pet in some Latin American countries, including in South Mexico. Animals used with this purpose are considered as a potential source of zoonosis and, as observed in this study, they may also bear strains with resistance to commonly used antibiotics that may complicate infections in the event of outbreaks of zoonotic origin.

## CONCLUSIONS

The current study demonstrated the presence of diarrheagenic *E. coli* (mainly STEC) in *I. iguana* kept in captivity. The findings of the current work might be extremely useful for the sanitary



efforts that are made during the green iguana handling, with the purpose of reducing its potential as a carrier for pathogenic bacteria. Additional studies about the genetic lineage of the DEC pathotypes found in the green iguana will allow us to understand the clonal origin and predict possible bacterial outbreaks in humans with DEC strains from reptiles kept in captivity, which may represent a risk for public health.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets generated for this study are available on request to the corresponding author.

## ETHICS STATEMENT

This animal study was reviewed and approved by Committee for Animal Care of the University Autonomous of the Chiapas state (approval ID number 06/VET/RPR/269/16).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

GB-T, FG-M, and BR-S conceived and design of the study. LM-G, MO-L, CI-M, PM-N, and CT-C obtained fecal samples

from iguanas, as well laboratory work. LP-V and JP-B determine virulence genes and phylogenetic analyses. GB-T, JV, and JG-J performed the statistical analysis and wrote the first draft of the manuscript. All authors contributed to manuscript revision, read, and approved the submitted version.

## FUNDING

Financial support was partially granted to JG-J by the Program for Strengthening Educational Quality of the University of Science and Arts of the State of Chiapas (grant number C/PFCE-2016-07MSU0002G-13-43).

## ACKNOWLEDGMENTS

We want to thank Dayanf Fernanda Saldaña-Molina, Eglantina Corzo-Cobos, Paola Gómez-Velázquez, Brenda OvandoDiaz, Gabriel Nucamendi-Moguel, and Jessica Estrada-Vázquez, for their contribution in the data collection. We also thanks the assistance provided by personnel of the Wildlife Management Units of the State of Chiapas, Mexico. This manuscript has been released as a Pre-Print at bioRxiv [<http://dx.doi.org/10.1101/624544> (56)].

## REFERENCES

- Kambire O, Adingra AA, Yao KM, Koffi-Nevry R. Prevalence of virulence genes associated with diarrheagenic pathotypes of *Escherichia coli* isolates from water, sediment, fish, and crab in Aby Lagoon, Cote d'Ivoire. *Int J Microbiol.* (2017) 2017:9532170. doi: 10.1155/2017/9532170
- Nyanga PL, Onyuka J, Webale MK, Were T, Budambula V. *Escherichia coli* pathotypes and Shigella sero-groups in diarrheic children in Nairobi city, Kenya. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* (2017) 10:220–8.
- Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* (2013) 26:822–80. doi: 10.1128/CMR.00022-13
- Torres AG, Amaral MM, Bentancor L, Galli L, Goldstein J, Krüger A, et al. Recent advances in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* research in Latin America. *Microorganisms.* (2018) 6:E100. doi: 10.3390/microorganisms6040100
- Oh KH, Shin E, Jung SM, Im J, Cho SH, Hong S, et al. First isolation of a hybrid shigatoxigenic and enterotoxigenic *Escherichia coli* strain harboring

- the *stx2* and *elt* genes in Korea. *Jpn J Infect Dis.* (2017) 70:347–8. doi: 10.7883/yoken.JJID.2016.237
6. Taghadossi R, Shakibaie MR, Alzade H, Hosseini-Nave H, Askari A, Ghanbarpour R. Serogroups, subtypes and virulence factors of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from human, calves and goats in Kerman, Iran. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* (2018) 11:60–7.
  7. Tang Y, Kim H, Singh AK, Aroonnuan A, Bae E, Rajwa B, et al. Light scattering sensor for direct identification of colonies of *Escherichia coli* serogroups O26, O45, O103, O111, O121, O145 and O157. *PLoS ONE.* (2014) 9:e105272. doi: 10.1371/journal.pone.0105272
  8. Singh P, Sha Q, Lacher DW, Del Valle J, Mosci RE, Moore JA, et al. Characterization of enteropathogenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle and deer in a shared agroecosystem. *Front Cell Infect Microbiol.* (2015) 5:29. doi: 10.3389/fcimb.2015.00029
  9. Fakhri I, Thiry D, Duprez JN, Saulmont M, Iguchi A, Pierard D, et al. Identification of Shiga toxin-producing (STEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* in diarrhoeic calves and comparative genomics of O5 bovine and human STEC. *Vet Microbiol.* (2017) 202:16–22. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.02.017
  10. Sekse C, Sunde M, Hopp P, Bruheim T, Cudjoe KS, Kvitle B, et al. Occurrence of potentially human-pathogenic *Escherichia coli* O103 in norwegian sheep. *Appl Environ Microbiol.* (2013) 79:7502–9. doi: 10.1128/AEM.01825-13
  11. Navarro A, Cauich-Sánchez PI, Trejo A, Gutiérrez A, Díaz SP, Díaz C, et al. Characterization of diarrheagenic strains of *Escherichia coli* Isolated from cattle raised in three regions of Mexico. *Front Microbiol.* (2018) 9:2373. doi: 10.3389/fmicb.2018.02373
  12. Sanches LA, Gomes MDS, Teixeira RHF, Cunha MPV, Oliveira MGX, Vieira MAM, et al. Captive wild birds as reservoirs of enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC). *Braz J Microbiol.* (2017) 48:760–3. doi: 10.1016/j.bjm.2017.03.003
  13. Lopes ES, Maciel WC, Medeiros PHQ, Bona MD, Bindá AH, Lima SV, et al. Molecular diagnosis of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from psittaciformes of illegal wildlife trade. *Pesquisa Vet Bra.* (2018) 38:762–6. doi: 10.1590/1678-5150-pvb-5083
  14. Milton AAP, Agarwal RK, Priya GB, Aravind M, Athira CK, Rose L, et al. Captive wildlife from India as carriers of Shiga toxin-producing, enteropathogenic and enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Vet Med Sci.* (2019) 81:321–7. doi: 10.1292/jvms.18-0488
  15. Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA). *Mexican Official Norm NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección Ambiental-Especies Nativas de México de Flora y Fauna Silvestres-Categorías de Riesgo y Especificaciones Para su Inclusión, Exclusión o Cambio-Listade Especies en Riesgo.* Ciudad de México (2016). Available online at: <https://www.gob.mx/profepa/documentos/norma-oficial-mexicana-nom-059-semarnat-2010> (accessed April 1, 2019).
  16. Sisk TD, Castellanos VAE, Koch GW. Ecological impacts of wildlife conservation units policy in Mexico. *Front Ecol Environ.* (2007) 5:209–12. doi: 10.1890/1540-9295(2007)5[209:EIOWCU]2.0.CO;2
  17. Sylvester W, Amadi V, Pinckney R, Macpherson C, McKibben J, Bruhl-Day R, et al. Prevalence, serovars and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* spp. from wild and domestic green iguanas (*Iguana iguana*) in Grenada, West Indies. *Zoo Pub Health.* (2014) 61:436–41. doi: 10.1111/zph.12093
  18. Romero SB, Čížek A, Masariková M, Knotek Z. Choanal and cloacal aerobic bacterial flora in captive green iguanas: a comparative analysis. *Acta Vet Brno.* (2015) 84:19–24. doi: 10.2754/avb201584010019
  19. Thaller MC, Migliore L, Marquez C, Tapia W, Cedeno V, Rossolini GM, et al. Tracking acquired antibiotic resistance in commensal bacteria of galapagos land iguanas: no man, no resistance. *PLoS ONE.* (2010) 5:e8989. doi: 10.1371/journal.pone.0008989
  20. Chaprazov T, Dimitrov R, Stamatova-Yovcheva K. Oral abscess associated with cranial tooth loss in green iguana (*Iguana iguana*). *Turk J Vet Animal Sci.* (2013) 37:615–7. doi: 10.3906/vet-1302-18
  21. Sylvester W, Amadi V, Hegamin-Younger C, Pinckney R, Macpherson C, McKibben J, et al. Occurrence of antibiotic resistant *Escherichia coli* in green iguanas (*Iguana iguana*) in Grenada, West Indies. *Int J Vet Med Res Rep.* (2014) 2014:1–8. doi: 10.5171/2014.260412
  22. Maria R, Ramer J, Reichard T, Tolson PJ, Christopher MM. Biochemical reference intervals and intestinal microflora of free-ranging ricord's iguanas (*Cyclura ricordii*). *J Zoo Wildl Med.* (2007) 38:414–9. doi: 10.1638/1042-7260(2007)38[414:BRIAIM]2.0.CO;2
  23. Arcos-García JL, Reynoso Rosales VH, Mendoza Martínez GD, Hernández Sánchez D. Identificación del sexo y medición del crecimiento en iguana negra (*Ctenosaura pectinata*) en las etapas de cría y juvenil. *Vet México.* (2005) 36:53–62.
  24. American Society of Ichthyologists and Herpetologists (ASIH). *Guidelines for Live Amphibians and Reptiles in Field and Laboratory Research.* Lawrence, KS (2004). Available online at: <https://www.asih.org/animal-care-guidelines> (accessed April 1, 2019).
  25. Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet.* (2005) 365:1073–86. doi: 10.1016/S0140-6736(05)71144-2
  26. Tsai YL, Palmer CJ, Sangermano LR. Detection of *Escherichia coli* in sewage and sludge by polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol.* (1993) 59:353–7. doi: 10.1128/AEM.59.2.353-357.1993
  27. Gutiérrez-Jiménez J, Luna-Cazárez LM, Mendoza-Orozco MI, Díaz-Marina GJ, Burguete-Gutiérrez JC, Feliciano-Guzmán JM. Organization, maintenance, and preservation of the bacterial culture collection of the biological sciences institute, University of Science and Arts of Chiapas (UNICACH), Mexico. *Revista Soc Venezolana Microbiol.* (2015) 35:95–102.
  28. Cerna JF, Nataro JP, Estrada-García T. Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol.* (2003) 41:2138–40. doi: 10.1128/JCM.41.5.2138-2140.2003
  29. López-Saucedo C, Cerna JF, Villegas-Sepulveda N, Thompson R, Velazquez FR, Torres J, et al. Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis.* (2003) 9:127–31. doi: 10.3201/eid0901.010507
  30. Oswald E, Schmidt H, Morabito S, Karch H, Marches O, Caprioli A. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infect Immun.* (2000) 68:64–71. doi: 10.1128/IAI.68.1.64-71.2000
  31. Schmidt H, Beutin L, Karch H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect Immun.* (1995) 63:1055–61. doi: 10.1128/IAI.63.3.1055-1061.1995
  32. DebRoy C, Roberts E, Valadez AM, Dudley EG, Cutter CN. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O45, O103, O111, O113, O121, O145, and O157 serogroups by multiplex polymerase chain reaction of the *wzx* gene of the O-antigen gene cluster. *Foodborne Pathog Dis.* (2011) 8:651–2. doi: 10.1089/fpd.2010.0769
  33. Paton AW, Paton JC. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfbO111, and rfbO157. *J Clin Microbiol.* (1998) 36:598–602. doi: 10.1128/JCM.36.2.598-602.1998
  34. Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep.* (2013) 5:58–65. doi: 10.1111/1758-2229.12019
  35. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard.* Wayne, IL: Clinical and Laboratory Standards Institute (2015).
  36. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* (2012) 18:268–81. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
  37. Smati M, Clermont O, Bleibtreu A, Fourreau F, David A, Daubie AS, et al. Quantitative analysis of commensal *Escherichia coli* populations reveals host-specific enterotypes at the intra-species level. *Microbiologyopen.* (2015) 4:604–15. doi: 10.1002/mb03.266
  38. García-Mazcorro JF, Garza-González E, Marroquín-Cardona AG, Tamayo JL. Caracterización, influencia y manipulación de la microbiota gastrointestinal en salud y enfermedad. *Gastroenterol Hepatol.* (2015) 38:445–66. doi: 10.1016/j.gastrohep.2015.01.004



39. Benites NR, Pessoa C, Bandini L, Saidenberg A, Moreno A, Sakata S, et al. Microbiota bacteriana e fúngica presentes na cloaca de jabutis-piranga (*Geochelone carbonaria*) criados em domicílio. *Vet Zoo.* (2013) 20:102–110.
40. Bastos HM, Lopes LFL, Gattamorta MA, Matushima ER. Prevalence of enterobacteria in bothrops jararaca in São Paulo State: microbiological survey and antimicrobial resistance standards. *Acta Sci Biol Sci.* (2008) 30:321–6. doi: 10.4025/actasciobiolsci.v30i3.536
41. Nagy B, Fekete PZ. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Vet Res.* (1999) 30:259–84.
42. Martins FH, Guth BE, Piazza RM, Leao SC, Ludovico A, Ludovico MS, et al. Diversity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in sheep flocks of Parana State, Southern Brazil. *Vet Microbiol.* (2015) 175:150–6. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.11.003
43. Abubakar RH, Madoroba E, Adenubi O, Morar-Leather D, Fasina FO. Bacterial pathogens of pigs with particular reference to *Escherichia coli*: a systematic review and meta-analysis. *J Vet Med Animal Health.* (2017) 9:159–85. doi: 10.5897/JVMAH2017.0594
44. Mayer J, Bays TB. Reptile behavior In: Bays TB, Lightfoot T, Mayer J, editors. *Exotic Pet Behavior.* Saint Louis, MO: WB Saunders (2006). p. 103–62.
45. Gutierrez-Jimenez J, Luna-Cazares LM, Cruz LM, De Aquino-Lopez JA, Sandoval-Gomez D, Leon-Ortiz AT, et al. Children from a rural region in the Chiapas Highlands, Mexico, show an increased risk of stunting and intestinal parasitoses when compared with urban children. *Bol Med Hosp Infant Mex.* (2019) 76:18–26. doi: 10.24875/BMHIME.M19000051
46. Koteswar B, Reddy AD, Ravi G, Karunasagar I. Occurrence of pathotypes of *Escherichia coli* in aquatic environment. *Int J Curr Microbiol App Sci.* (2017) 6:3266–75. doi: 10.20546/ijcmas.2017.609.402
47. Zhou Y, Zhu X, Hou H, Lu Y, Yu J, Mao L, et al. Characteristics of diarrheogenic *Escherichia coli* among children under 5 years of age with acute diarrhea: a hospital based study. *BMC Infect Dis.* (2018) 18:63. doi: 10.1186/s12879-017-2936-1
48. Orth D, Grif K, Khan AB, Naim A, Dierich MP, Wurzner R. The Shiga toxin genotype rather than the amount of Shiga toxin or the cytotoxicity of Shiga toxin *in vitro* correlates with the appearance of the hemolytic uremic syndrome. *Diagn Microbiol Infect Dis.* (2007) 59:235–42. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2007.04.013
49. Adesiyun AA. Absence of *Escherichia coli* O157 in a survey of wildlife from Trinidad and Tobago. *J Wildl Dis.* (1999) 35:115–20. doi: 10.7589/0090-3558-35.1.115
50. Perelle S, Dilasser F, Grout J, Fach P. Detection by 5'-nuclease PCR of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157:H7, associated with the world's most frequent clinical cases. *Mol Cell Probes.* (2004) 18:185–92. doi: 10.1016/j.mcp.2003.12.004
51. Valilis E, Ramsey A, Sidiq S, DuPont HL. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*-A poorly appreciated enteric pathogen: systematic review. *Int J Infect Dis.* (2018) 76:82–7. doi: 10.1016/j.ijid.2018.09.002
52. Kumar N, Nahid F, Zahra R. Association of virulence factors, phylogenetic groups and antimicrobial resistance markers in *Escherichia coli* from Badin city, Pakistan. *J Chemother.* (2017) 29:8–13. doi: 10.1080/1120009X.2016.1154682
53. Kwong JC, McCallum N, Sintchenko V, Howden BP. Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology. *Pathology.* (2015) 47:199–210. doi: 10.1097/PAT.0000000000000235
54. Amezcua-Lopez BA, Quinones B, Soto-Beltran M, Lee BG, Yambao JC, Lugo-Melchor OY, et al. Antimicrobial resistance profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and Non-O157 recovered from domestic farm animals in rural communities in Northwestern Mexico. *Antimicrob Resist Infect Control.* (2016) 5:1. doi: 10.1186/s13756-015-0100-5
55. Furlan JPR, Gallo IFL, de Campos A, Navarro A, Kobayashi RKT, Nakazato G, et al. Characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) obtained from feces of sheep in Brazil. *World J Microbiol Biotechnol.* (2019) 35:134. doi: 10.1007/s11274-019-2712-z
56. Bautista-Trujillo GU, Gutiérrez-Miceli FA, Mandujano-García L, Oliva-Llaven MA, Ibarra-Martínez C, Mendoza-Nazar P, et al. Captive green iguana is a reservoir of diarrheogenic *Escherichia coli* pathotypes. *bioRxiv.* (2019) 624544. doi: 10.1101/624544

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Bautista-Trujillo, Gutiérrez-Miceli, Mandujano-García, Oliva-Llaven, Ibarra-Martínez, Mendoza-Nazar, Ruiz-Sesma, Tejeda-Cruz, Pérez-Vázquez, Pérez-Batrez, Vidal and Gutiérrez-Jiménez. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.