Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENCIA DE *Salmonella*, sp. y *Campylobacter*, sp. EN AVES DE LA COLECCIÓN DEL ZOOLÓGICO DE CHAPULTEPEC "ALFONSO L. HERRERA"

T E S I S

(Idónea Comunicación de Resultados)

Que para obtener en grado de

Maestro en Ciencias Agropecuarias

PRESENTA

M.V.Z. OSVALDO LÓPEZ DÍAZ

COMITÉ TUTORAL:

Director:

Dr. Daniel Martínez Gómez

ASESORES: **Dr. Antonio Verdugo Rodríguez**
M en C. Javier Ojeda Chávez

MÉXICO, D.F. JULIO 2011

DEDICATORIAS

A Dios por darme la oportunidad de despertar cada día con nuevos sueños y obsequiarme todo lo necesario para alcanzarlos.

A mi Mamá Esther Díaz Díaz por darme todo su cariño y ser un ejemplo de valor y tenacidad, no hubiera llegado hasta aquí sin ti, te amo.

A mi Papá Alejandro Virgilio López Carrasco, por tu ejemplo de fortaleza, por acompañarme durante este proceso no importando cansancio, malestar o dolor hasta el día que continuaste sólo tu camino. Gracias por recordarme lo verdaderamente importante, nos vemos. . .

A Juan, Julio y Karina por guiarme con sus experiencias, por los buenos ratos, por su apoyo y cariño, los quiero. . .

A Brenda, Sicarú y Diego por recordarme lo bonito que es sorprenderme y amar sin interés alguno.

A Irene por sus enseñanzas que siguen rindiendo frutos.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Daniel Martínez Gómez por abrir las puertas de su laboratorio y brindar su conocimiento, amistad e infinito apoyo a las "rarezas" de la fauna silvestre. Este nuevo logro también es tuyo.

Al Dr. Antonio Verdugo Rodríguez por su amistad y apoyo, sus enseñanzas teóricas y personales, por escuchar y por reprender en el momento necesario.

Al M. en C. MVZ Javier Ojeda Chávez por aguantar y aguantar pacientemente como un verdadero padre los berrinches, los momentos inquisitivos, enojos, frustraciones y tristezas del hijo que nunca quisiste tener (dígase yo), además de transmitirme tus conocimientos como asesor, sabes que te admiro, respeto y quiero muchísimo.

Al. M. en C. EDV MVZ. Ignacio Rangel Rodríguez por sus enseñanzas, por su apoyo durante este proceso, por su cariño incondicional, por sus regaños y por todo eso que te hace ser un excelente amigo y el mejor patólogo. Tú también eres mi anemia no regenerativa.

Al MVZ EPA Everardo Montfort Ramírez por todo el apoyo durante la realización de este trabajo, porque gracias a tu vocación y excelentes cuidados en beneficio de las aves silvestres este trabajo fue posible, gracias por ser mi amigo.

A la Dra. Rosalía Pastor Nieto por su apoyo incondicional a nivel laboral y personal como Directora Técnica y de Investigación, sin su apoyo esto no hubiera podido llegar a realizarse, mil gracias.

Al M. en C. MVZ. Emilio Rendón Franco por estar cerca todos estos años, por compartir y continuar con el sueño de la fauna silvestre, además de alentarme a mejorar de la peor manera que sabes hacerlo.

A la M. en C. EDV MVZ. R. Angélica Ruíz Romero por su ayuda desinteresada durante este trabajo, por la compañía hasta altas horas de la noche, por tu ¡Ay amigo, que horrible siembras! que sirvió para superarme. "Una hoja de respeto y admiración para ti".

Al Dr. Honoris Causa Luis A. Quijano Márquez por su apoyo técnico y personal en el desarrollo de este proyecto, porque existen seres que aparecen en tu vida y se vuelven parte de ti ¿qué puedo decirte hermanito? acá estamos.

A Mariela T. Díaz Negrete por su apoyo, paciencia y amistad que sin duda ayudaron en gran parte a concluir esta etapa de la mejor manera, sabes que se te quiere.

A Adriana Rivera Cruz, Ángeles Pintado Escamilla, Antonio Sandoval Zárate, Carlos Moreno González, Eduardo Veyán Gómez, Elena Alcaráz Sosa, Erika Servín Zamora, José Luís González Mendoza, Mariano Sánchez Trocino, Rogelio Campos

Morales, Salome Cabrera Romo, Saúl Soto Mendoza y Xochitl Ramos Magaña por su gran amistad y por compartir conmigo su conocimiento y cariño por la fauna silvestre.

A la Dra. Delia Xochitl Vega Manríquez por su amistad, consejos y apoyo a nivel personal y profesional, que siempre han sido de gran ayuda.

A mis amigas del laboratorio de Microbiología Agropecuaria UAM-Xochimilco Estela, Ingrid, Blanca e Irán por su apoyo que siempre hizo más fácil los momentos difíciles y más agradables los momentos de esparcimiento.

CONTENIDO

Pág.

RESUMEN 1
INTRODUCCIÓN 2
MEDICINA DE LA CONSERVACIÓN 2
AVES SILVESTRES 4
SALMONELOSIS EN AVES 6
EPIDEMIOLOGÍA 9
SALMONELLA 10
COMPOSICIÓN ANTIGÉNICA 11
FACTORES DE VIRULENCIA 13
SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO III 14
PATOGENIA 17
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN 18
CAMPYLOBACTERIOSIS 19
EPIDEMIOLOGÍA 20
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN 21
FACTORES DE VIRULENCIA 22
PATOGENIA 26
HIPÓTESIS 28
OBJETIVO GENERAL 28
MATERIALES Y MÉTODOS 29
I. ORIGEN Y CARACTERÌSTICAS DE LAS MUESTRAS 29
II. DETERMINACIÓN DE MUESTRA REPRESENTATIVA 29
III. CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE LAS AVES SELECCIONADAS 29
IV. COLECCIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS 29
V. DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO TRADICIONAL 30
Salmonella 30
Campylobacter 30
VI. DIAGNÓSTICO MOLECULAR 30
EXTRACCIÓN DE ADN PARA *Salmonella* 30
CUANTIFICACIÓN DE ADN 31
DETERMINACIÓN DE CANTIDAD MÍNIMA DETECTABLE... 31
SELECCIÓN DE INICIADORES PARA *Salmonella* 32
PCR PARA *Salmonella* 32
EXTRACCIÓN DE ADN PARA *Campylobacter*..... 32
SELECCIÓN DE INICIADORES PARA *Campylobacter* 33
PCR PARA *Campylobacter jejuni-coli* 33
RESULTADOS..... 34
NÚMERO DE MUESTRAS 34
DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO TRADICIONAL 35

Salmonella 35
Campylobacter 35
DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA *Salmonella* 37
EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE CALDO SELENITO.. 37
PCR PARA *Salmonella* 38
DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA *Campylobacter*..... 44
EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE CALDO TIOGLICOLATO..... 44
PCR PARA *Campylobacter*..... 45
DISCUSIÓN..... 48
CONCLUSIONES 52
PROSPECTIVAS 52
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 53

INDICE DE CUADROS

Pág.

CUADRO 1. Número de individuos muestreados clasificados por orden aviar ... 35

CUADRO 2. Aislamientos morfológicamente compatibles con *Campylobacter* ... 36

CUADRO 3. Muestras clínicas positivas a Salmonella mediante PCR para fragmentos de los genes *invA* y *sopE*..... 41

CUADRO 4. Muestras clínicas positivas a *Campylobacter jejuni-coli* mediante PCR para un fragmento del gen *flaA*..... 47

ÍNDICE DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. ADN extraído de muestras clínicas a partir de caldo selenito 37

Figura 2. Fragmento del gen *invA* para *Salmonella* sp amplificado a partir del ADN control positivo de *Salmonella typhimurium* extraído de Caldo Selenito a diferentes concentraciones 38

Figura 3. PCR para el gen *sopE* de *Salmonella* sp. a partir del ADN control positivo de *Salmonella typhimurium* extraído de Caldo Selenito a diferentes concentraciones 39

Figura 4. PCR correspondiente a un fragmento del gen *invA* para *Salmonella* sp a partir de muestras de ADN extraídas de Caldo Selenito..... 42

Figura 5. PCR correspondientes a un fragmento del gen *sopE* para *Salmonella* sp. a partir de muestras de ADN extraídas de Caldo Selenito..... 43

Figura 6. ADN de muestras clínicas extraídas de Caldo Tioglicolato 44

Figura 7. PCR correspondientes a un fragmento del gen *flaA* para *Campylobacter jejuni-coli* a partir del ADN control positivo de *Campylobacter jejuni* extraído de Caldo Tioglicolato a diferentes concentraciones 45

Figura 8. PCR correspondientes a un fragmento del gen *fla*A para *Campylobacter jejuni-coli* a partir de muestras de ADN, extraídas de Caldo Tioglicolato 46

RESUMEN

La salmonelosis y la campilobacteriosis enfermedades de presencia mundial, son ocasionadas por enterobacterias Gram negativas, las cuales afectan a diversos vertebrados incluyendo al hombre. Aunque su patogenia, es diferente ambas enfermedades tienen importancia debido a que producen diarreas en varias especies incluyendo aves domésticas y silvestres, generando pérdidas económicas a nivel productivo y ocasionando mortalidades que pueden poner en riesgo las poblaciones de aves silvestres.

En algunas ocasiones, estas últimas pueden comportarse como portadores asintomáticos, lo que representa un problema serio en la conservación, pues debido a su gran movilidad geográfica, ya sea por su comercialización como aves ornamentales o por migraciones naturales, pueden fungir como vectores, llegando a infectar aves en peligro de extinción, en áreas naturales o colecciones zoológicas.

En este trabajo se evaluó la presencia de estos dos microorganismos en la colección de aves del zoológico de Chapultepec "Alfonso L. Herrera", con el fin de poder establecer factores de riesgo en poblaciones cautivas. Se colectaron un total de 103 muestras cloacales de aves pertenecientes a los ordenes: Anseriformes, Falconiformes, Galliformes, Gruiformes, Piciformes, Psittaciformes, Sphenisciformes y Strigiformes utilizando técnicas de bacteriología molecular (Reacción en cadena de la polimerasa, PCR) y tradicional (aislamiento). Para *Salmonella* sp. la PCR a partir de muestras de heces aviares, mostró un 50.48 % de amplificación positiva para los genes *invA* y *sopE*; sin que se obtuvieran aislamientos, en el caso de *Campylobacter* sp. se obtuvieron 18.44 % de amplificaciones positivas a la presencia del gen *flaA* por medio de PCR y un 8.73 % de aislamientos compatibles morfológicamente. Esto evidencia la presencia de *Salmonella* y *Campylobacter* en la población de aves pertenecientes a esta colección. Los resultados obtenidos proporcionan herramientas de utilidad como las técnicas moleculares para estudios epidemiológicos que servirán para establecer medidas preventivas ante estos agentes y fortalecer los programas de conservación de aves silvestres en México.

INTRODUCCIÒN

MEDICINA DE LA CONSERVACIÓN

El término "Medicina de la Conservación" se utilizó para describir un complejo concepto a nivel de salud. Utilizando las disciplinas de salud y ecología juntas, la medicina de la conservación representa un intento por examinar el mundo de una manera integral y como la interacción de las especies está ligada a los procesos ecológicos que rigen la vida.[1]

La biología de la conservación y la medicina de la conservación comparten el objetivo de tratar de conservar la salud ecológica. La medicina de la conservación estudia las múltiples interacciones entre patógenos y la presencia de enfermedades, así como las interacciones entre especies y ecosistemas, centrándose en el estudio del contexto ecológico de salud y de recuperación de los problemas de salud ecológica.

La medicina de la conservación ha emergido como un nuevo campo interdisciplinario para hacer frente a la compleja interrelación entre salud y ambientes deteriorados. Como tal la medicina de la conservación examina los vínculos entre cambios en la estructura del hábitat y uso de la tierra, reemergencia de agentes infecciosos, parásitos, contaminantes ambientales, así como mantenimiento de la biodiversidad y funciones del ecosistema como mantener la salud de las comunidades vegetales y animales, incluyendo a los seres humanos, también se ocupa de estudiar los efectos de las enfermedades en las especies en peligro de extinción y el funcionamiento de los ecosistemas, así como los cambios en la diversidad de especies o la presentación y transmisión de enfermedades.[2]

La medicina de la conservación provee nuevas habilidades, nuevas herramientas y una nueva visión en los campos de la biología, medicina y conservación. Esto incluye nueva investigación biomédica y recursos diagnósticos para dirigir los problemas de conservación, por ejemplo el desarrollo de nuevas técnicas de monitoreo no invasivo, así como el establecimiento de equipos interdisciplinarios de profesionales en la salud ecológica para evaluar y remediar los problemas de ésta. Conceptualmente la medicina de la conservación es un nexo entre los campos de la salud humana, la salud animal y la salud del ecosistema.[1]

La extinción de especies animales y vegetales es uno de los síntomas más preocupantes del deterioro ambiental en el mundo, ya que constituye un proceso irreversible que elimina material genético único e irremplazable y pone en riesgo la sobrevivencia de la misma especie humana. En la actualidad los esfuerzos de conservación de vida silvestre se llevan a cabo, principalmente, a través de dos estrategias básicas: la conservación *in situ* y la conservación *ex situ*. La primera involucra todas las acciones desarrolladas en ambientes naturales, basada principalmente en la creación y manejo de áreas protegidas, como lo son parques y

reservas naturales. En tanto que la conservación *ex sítu* involucra todas las acciones que se pueden desarrollar para apoyar la supervivencia de las especies silvestres, fuera de su lugar de origen, principalmente a través de zoológicos, acuarios y criaderos.[3]

En el año 2005 la Organización Mundial de Zoológicos y Acuarios publicó su estrategia Mundial de Conservación, en donde menciona que hacia el siglo XXI éstas instituciones deberán constituir centros de conservación en donde se realice la concientización de los visitantes hacia las relaciones sostenibles entre los seres humanos y la naturaleza, se inculquen los valores de los ecosistemas y la necesidad de conservar la biodiversidad para practicar la ética conservacionista.[3]

Actualmente, los zoológicos, acuarios y jardines botánicos tienen la oportunidad de establecerse como modelos de conservación integrada a través de las estrategias planteadas. Esto requiere que estas instituciones incorporen todos los aspectos de su trabajo con las actividades de conservación. Los elementos fundamentales a trabajar son los valores de sustentabilidad y conservación además de la responsabilidad social y ambiental; las principales actividades deben dirigirse hacia la conservación de las especies amenazadas y el mantenimiento de un ecosistema sano. Los conceptos y actividades que los zoológicos deben desarrollar y apoyar para lograr la conservación integrada son la conservación de poblaciones silvestres, ciencia e investigación, manejo de poblaciones, educación y capacitación, comunicación, colaboración, sustentabilidad, bioética y bienestar animal.[3]

La capacidad de los centros de fauna como los zoológicos y acuarios sigue siendo limitada para satisfacer las necesidades biológicas de los animales silvestres. De aquí la importancia de buscar estrategias que permitan la interconexión de los programas de conservación tanto *in situ* como *ex situ* y combinen a su vez, puntos de vista ecológicos y económicos para llevar a cabo una integración sostenible entre las poblaciones humanas y el ambiente. Los programas de conservación *ex situ* deben de complementar los programas de conservación *in situ*, asegurando a largo plazo el análisis y propagación de especies raras y amenazadas, además de fungir como un apoyo a los programas de conservación de aquellas especies en sus hábitats de origen. [3]

Las poblaciones existentes en los zoológicos deben ser manejadas para apoyar la sobrevivencia de las especies en la naturaleza ya que son los componentes cruciales para iniciar programas de reproducción. Para todo esto es necesario que las colecciones de animales vivos sean mantenidas adecuadamente garantizando satisfactoriamente la longevidad, propagación y el bienestar de cada uno de los animales. Las poblaciones manejadas apropiadamente pueden servir como invaluables reservorios genéticos para la sobrevivencia de las especies en la naturaleza.[3]

Los zoológicos a diferencia de los museos, tienen la peculiaridad única de mantener colecciones de seres vivos, estas colecciones son objeto de actividades rutinarias para proporcionarles toda clase de cuidados, actualmente se cuentan con más conocimientos sobre la biología, las necesidades físicas y conductuales y los cuidados

de la fauna silvestre en cautiverio.[3] La base fundamental de un programa médico veterinario exitoso en los zoológicos es la medicina preventiva, debido a la dificultad en el diagnóstico y el tratamiento oportuno de las enfermedades en la fauna silvestre, además de que generalmente se requiere la inmovilización de los animales con el riesgo que esto implica. Estos programas consideran diversos aspectos con el objeto de mantener a la colección libre de enfermedades, evitando la introducción de éstas a partir de otras colecciones, asegurando con esto que los animales sean mantenidos en condiciones adecuadas y evitando la diseminación de enfermedades a otras instituciones, a las poblaciones silvestres e incluso al humano.[3]

La medicina preventiva tiene muchos componentes que deben ser considerados por los médicos veterinarios que trabajan en fauna silvestre en cautiverio como la higiene, diseño de albergues, vacunación, control parasitario, profilaxis dental, estudios postmortem, disposición adecuada de cadáveres, nutrición, prevención de exposición accidental a sustancias tóxicas, control de plagas, registros médicos y expedientes clínicos, cuarentena, evitar la consanguinidad y el programa de salud personal. El monitoreo rutinario de los animales de la colección hace posible la detección temprana de enfermedades, incrementando la posibilidad de realizar un tratamiento exitoso así como de prevenir la transmisión de enfermedades hacia otros ejemplares.[3]

AVES SILVESTRES

Las aves representan la clase más abundante y diversa de vertebrados, con alrededor de 9700 especies, éstas habitan cada continente y ocupan virtualmente todos los hábitats con excepción de la profundidad de los océanos. Debido a su gran distribución y características su clasificación se encuentra basada en órdenes los cuales son modificados constantemente debido a sus características morfológicas variables y actualmente por estudios de ADN.[4]

Las aves mexicanas ocupan el décimo primer lugar en el ámbito mundial en número de especies, ya que cuenta con 1076 que representan a 468 géneros, 78 familias y 22 órdenes. Lo que equivale al 81 % de los órdenes, el 51 % de las familias y el 27 % de los géneros del mundo. Alrededor de 100 especies, que equivale al 10 % del total nacional, son endémicas de México en donde más de la mitad de las aves migratorias de Norte América pasan entre 6 y 8 meses al año.[4]

En México alrededor de 14 especies de aves se consideran extintas, 20 a 56 se consideran en peligro de extinción, 14 a 121 amenazadas y 40 a 162, vulnerables, además, en los últimos 30 años México ha sufrido la extinción de aproximadamente 11 especies aviares.[4] En general las especies son afectadas por tres tipos de causas que incluyen a la destrucción de especies consideradas plagas o depredadores, la cacería para obtener alimento o trofeos cinegéticos y el tráfico de especies o sus productos. También existen factores indirectos de extinción, los cuales incluyen actividades como la destrucción de los ecosistemas naturales, la introducción de las especies exóticas y la contaminación ambiental pero sin lugar a dudas el factor principal de amenaza para

la conservación a largo plazo de la fauna y flora es la fragmentación del hábitat. El deterioro ambiental, producto del rápido avance de las fronteras agrícola, forestal, ganadera y urbana, pone en serio peligro la perpetuación de ecosistemas completos y de miles de especies de plantas y animales.[4, 5]

Las aves silvestres son de gran importancia en la salud pública, porque pueden ser infectadas por un gran número de microorganismos patógenos transmisibles al humano ya que cruzan fronteras nacionales e internaciones y pueden convertirse en grandes vectores para cualquier bacteria, virus, parásitos u organismos resistentes a drogas. Entre los más importantes se encuentran los que corresponden a enfermedades infecciosas emergentes como los Arbovirus, Virus del Oeste del Nilo, Borrelia, Virus de la influenza A y bacterias patógenas entéricas como *Salmonella* y *Campylobacter*. Recientemente las complejas interacciones entre las enfermedades de animales silvestres, animales domésticos y humanos apenas han comenzado a describirse.[6]

La salmonelosis y la campilobacteriosis en aves silvestres han sido reportadas en múltiples trabajos alrededor del mundo. En Canadá se presentó un brote de *Salmonella* entre el invierno de 1997 y el verano de 1998 afectando a diversos géneros de aves canoras.[6, 7] También se ha determinado la presencia de este microorganismo en palomas capturadas en Colorado, Estados Unidos;[8] patos silvestres en Australia[9] y distintas especies de paseriformes en Noruega.[5] En Yucatán, México en el año 1989, se obtuvieron 9 aislamientos de *Salmonella* sp. a partir de flamencos (*Phoenicopterus ruber ruber*) de vida libre en proceso agónico debido a una intoxicación.[10] En 2006 se realizó un monitoreo serológico contra *Salmonella entérica* subespecies entérica serovariedad Gallinarum-Pullorum en palomas (*Zenaida asiatica* y *Zenaida macrocura*) de Tamaulipas, las que presentaron una seroprevalencia del 26.4 %[11] Aunque México se considera libre de *Salmonella* Gallinarum en aves domésticas desde el año 2009, no existe información detallada de la prevalencia de éste microorganismo en aves silvestres.[12]

En el caso de *Campylobacter* sp. ésta bacteria ha sido aislada a partir de muestras biológicas de una gran variedad de especies de aves silvestres en países como Estados Unidos, Noruega, Dinamarca, Suiza, España, Francia, Inglaterra y Japón en donde se ha relacionado con brotes diarreicos en otras especies de animales silvestres e incluso del hombre. En pocas investigaciones, los aislamientos pudieron relacionarse con patologías de aves silvestres. La participación de las aves como diseminadoras de *Campylobacter* sp. hacia las poblaciones humanas ha cobrado relevancia al encontrarse flujos de este enteropatógeno entre aves silvestres - mamíferos domésticos y silvestres y humanos.[13-18]

SALMONELOSIS EN AVES

La paratifoidea es la salmonelosis producida por cualquiera de las distintas cepas patógenas móviles de *Salmonella*. En aves de producción, la enfermedad ocasiona grandes pérdidas económicas en las primeras dos semanas de vida al producir diarreas y septicemia, en estos casos los sobrevivientes permanecen como portadores asintomáticos.[19-21] La infección inicia mediante la ingestión, la fuente es usualmente heces o alimento y agua contaminados con materia fecal. El diagnóstico en estos casos se obtiene a través de análisis bacteriológicos que incluyen aislamientos a partir de los tejidos afectados (bazo o articulaciones) de las aves que han mostrado signos clinicos de enfermedad. La identificación de portadores asintomáticos es muy difícil, debido a que éstos no muestran signos, sin embargo periódicamente excretan el microorganismo en heces favoreciendo la diseminación de la infección. En aves domésticas como tratamiento además de la antibioterapia se utiliza la denominada "exclusión competitiva" que consiste en realizar una mezcla de flora normal para reducir la carga de *Salmonella* sp. en aves portadoras. [19-21]

La pulorosis causada por *S.* Pullorum, es rara en América del Norte, pero no en el resto del mundo, provoca diarreas, anorexia, ceguera, torticolis en pollos menores a dos semanas, ocasionando una mortalidad entre 2 y el 10 % de la población. En el caso de una infección generalizada *S.* Pullorum infecta el ovario de las aves, para después infectar al embrión en huevo. La mortalidad es debido a la septicemia y es mayor entre la segunda y tercer semana de vida, se piensa que puede existir una resistencia a *S.* Pullorum en líneas como la Leghorn. La infección puede darse de manera horizontal o vertical. Además de las gallinas y pavos, otras muchas especies aviares pueden ser susceptibles a la pulorosis, pero en menor grado. Los hallazgos a la necropsia son emaciación y anemia, hígado e intestinos pálidos, incluso algunos de éstos con escaso contenido semisólido y sacos vitelinos no absorbidos, inflamación severa articular y periarticular, principalmente en las articulaciones tarsales y del ala. El hígado se observa aumentado de tamaño con un puntilleo blanquecino difuso y hemorragias petequiales, además puede presentarse hidropericardio con fluído de apariencia turbia y lesiones nodulares blanquecinas que asemejan tumoraciones en corazón y molleja. A nivel esplénico se pueden observar bazos pálidos o moteados y en pulmón nodulaciones cafés. Histológicamente puede observarse separación de las fibras musculares y una infiltración de macrófagos, linfocitos, células plasmáticas y heterófilos en miocardio y la muscular de la molleja. La lesión en hígado es una necrosis hepatocelular coagulativa con pequeños focos de infiltrado heterófilo-mononuclear, incremento del tejido linfoide portal y focos de granulocitopoyesis extramedular. Una aguda y severa depresión linfocítica en bazo y una disminución linfocítica cortical, así como expansión medular en múltiples lóbulos del Timo. Las lesiones articulares consisten en sinovitis aguda con una extensa infiltración de células plasmáticas en la membrana sinovial. Una bronconeumonía con consolidación y presencia de heterófilos y células mononucleares en los bronquios terciarios. Las aves sobrevivientes mantienen la bacteria y pueden transmitirlas a las crías. La eliminación de las aves reproductoras

infectadas detectadas mediante serología puede controlar a ésta enfermedad y los tratamientos con antibióticos reducen la mortalidad.[20]

Los polluelos afectados que llegan a eclosionar se encuentran moribundos o mueren súbitamente sin signos clínicos. La mortalidad comienza a elevarse entre los 4 y 5 días de edad, teniendo su pico en la segunda o tercer semana. [21] La signología es similar a la de la infección por *S. typhimurium* se observa disnea asociada a neumonía, algunas aves muestran diarreas blanquecinas, conjuntivitis, inflamación de las articulaciones y cojera, en raras ocasiones se presenta signología nerviosa. Las aves que sobreviven presentan un tamaño irregular, con retraso en el crecimiento y plumas en mal estado, convirtiéndose en vectores del agente causal. Las lesiones son similares a las de las gallinas, además de que se ha encontrado ovulación celómica que ocasiona una obstrucción y de manera secundaria una celomitis, así como también atrofia de ovarios y testículos.[21]

La tifoidea aviar ocasionada por *Salmonella* Gallinarum es una septicemia aguda o enfermedad crónica de las aves domésticas. Los signos de la enfermedad son diarreas verde-amarillentas, disneas y muerte a partir del primer día de vida y hasta los 28 días de edad. En la necropsia se pueden observar el hígado y el bazo incrementados de tamaño, la serosa de los intestinos se observan hemorrágicas y el recto puede presentar heces amarillentas. El hígado puede presentar una coloración verde a bronce, con focos de necrosis sobre el parénquima. El bazo puede presentar focos necróticos y la enteritis es de tipo catarral. En el caso del corazón, este puede presentan un puntilleo blanquecino sobre el miocardio y hemorragias en la grasa pericárdica, el endocardio y proventrículo se encuentran severamente congestionados. Los pulmones y riñones se observan aumentados de tamaño y congestionados. Histológicamente, el hígado muestra congestión, degeneración grasa y hepatitis parenquimatosa difusa, con áreas focales de necrosis e infiltración de células mononucleares en áreas periportales. También puede observarse hiperplasia severa de células retículoendoteliales en bazo ocasionalmente acompañadas de áreas de necrosis, desintegración de las fibras musculares e infiltración de células mononucleares en miocardio, congestión e infiltración de células mononucleares subepiteliales en mesobronquios y congestión e infiltración perivascular de células mononucleares en riñones. Esta enfermedad se trata con antibioterapia y es controlada mediante la eliminación de aves infectadas, o puede realizarse una bacterina empleando una variante de cepa rugosa, la cual disminuye la mortalidad. [20]

La arizonosis aviar es un grave problema en la industria de la cría de pavos ya que produce una alta mortalidad y una disminución en la producción y en la tasa de incubación. Los pavos parecen ser el hospedero primario de esta serovariedad en particular, aunque el espectro de hospederos en otros serotipos sea ilimitado. La infección es transmitida a partir del huevo y los brotes ocurren en individuos jóvenes durante las tres primeras semanas de vida, la infección puede enmascararse debido a los tratamientos de antibioterapia en los primeros días. La mortalidad varía del 3.5 al 15 % y es generalmente alta durante las primeras tres semanas, llegando a extenderse hasta las 5 semanas. En pavos la infección por *S. arizonae* es indistinguible de otras

formas de salmonelosis. Los pavipollos presentan apatía, escalofríos, acurrucados cerca de la fuente de calor, con diarrea y signología nerviosa como incoordinación, convulsiones, cuello torcido y tortícolis, así como pobre e irregular crecimiento, además de las lesiones similares en gallinas, los pavos llegan a presentar exudado caseoso en ciego, sacos aéreos y en cavidad celómica en general, un pequeño pero significativo grupo de individuos presenta secreción y opacidad ocular, así como exudado purulento en meninges.[21]

A la fecha se sabe que en pavos se han aislado más de 100 serovariedades de Salmonella, siendo las más comúnmente aisladas: *S.* newport, *S.* reading, *S.* bredeney y *S.* enteritidis. La transmisión puede darse de manera vertical u horizontal, siendo la vertical la de mayor importancia para *S.* gallinarum, *S.* pullorum, *S.* arizonae, *S.* senftenberg, *S.* typhimurium y *S.* hadar. Se sabe que es más común la infección por *S.* typhimurium en huevos no pigmentados ya que estos presentan un cascarón más fino y poros más grandes. Además se sabe que las infecciones por *S.* typhimurium en pavos es encontrada cuatro veces más frecuente que en gallinas. Este grupo de infecciones es una de las enfermedades bacterianas más importantes en pavos y genera grandes pérdidas de pollos durante el primer mes después de la eclosión, siendo su pico máximo a los 10 días. El período de incubación va de los 2 a los 5 días, la mortalidad en los pavos jóvenes varía del 10 al 20% y en los brotes graves puede llegar a más del 80%. Los pavipollos pueden infectarse unos pocos días después de la incubación entrando a la madurez. Los signos clínicos pueden estar presentes incluso si ocurre la infección durante la incubación o varios días después de la eclosión, presentando somnolencia, debilidad, alas caídas, plumaje erizado y letargo, emaciación y cojera por artritis. La diarrea no es un signo constante y las lesiones macroscópicas son similares a las de las gallinas a excepción de presentar una enteritis ulcerativa muy evidente. [21]

En el caso de patos, puede ser que el hábito gregario de la especie en su estado natural y el hecho de que tiende a nadar, alimentarse y beber en sus efluentes por milenios, generó una tolerancia genética a cepas de organismos potencialmente patógenos que se encuentran en el intestino. Cualquiera que sea la razón, los patos no son infectados de manera frecuente por *Salmonella* sp. y en pocas ocasiones se enferman por este agente. La fase septicémica de *Salmonella* sp. puede presentarse y la mayoría de las ocasiones se encuentra relacionada a situaciones de estrés ambiental o de manejo. Las infecciones son más comunes en animales muy jóvenes en donde se ha generado un estrés térmico o de mala higiene de incubadoras.[21-23] Los signos clínicos de la enfermedad por lo regular aparecen en patos jóvenes y generalmente comienzan después de la eclosión. La signología es característica de las demás infecciones por *Salmonella* sp. La transmisión horizontal de *Salmonella* sp. por ambientes contaminados, aves silvestres y parásitos es universalmente reconocida. El papel de los vectores, incluso humanos y la falla en la bioseguridad de estas fuentes son igualmente probables. El adecuado manejo de los residuos de heces y camas de patos, su adecuado embalaje y disposición pueden formar una herramienta fundamental para evitar la diseminación de esta enfermedad. Se sabe que en la infección vertical por *Salmonella* sp. una característica particular que protege a los

embriones es que el cascarón del huevo de los patos es muy grueso y esto puede generar una barrera contra la infección, además que el ovario se encuentra infectado.[21]

EPIDEMIOLOGÍA

La salmonelosis es una zoonosis infecciosa producida por patógenos del género Salmonella sp, descrita por el veterinario Daniel Salmon en 1885[24], tiene una distribución mundial y afecta a gran parte de los vertebrados incluyendo al hombre. Algunos serotipos son relativamente específicos de hospedero, mientras otros, principalmente *S. typhimurium*, *S. anatum*, y *S. newport*, afectan a un amplio rango de hospederos como aves silvestres y roedores, los cuales pueden esparcir microorganismos durante los periodos de enfermedad, convalecencia y portador asintomático. [20]

Todos los animales incrementan el riesgo de desarrollar la enfermedad, si la flora normal es alterada, circunstancia que se traduce en animales susceptibles a la exposición exógena o activación de infecciones silenciosas.[20]

Los humanos parecen ser susceptibles a todos los serotipos de *Salmonella*, el origen más importante de la infección son los animales y el consumo de sus productos. Las aves de producción y los productos derivados de estas en especial los huevos, son la mayor causa de salmonelosis en humanos. *Salmonella enterica* serotipo enteritidis, es especialmente la más adaptada a la infección a través del huevo. Las cepas aviares pueden llegar a infectar al hombre debido a que este se encuentra relacionado con las aves desde la transportación, manejo, utilización y consumo de productos y subproductos. *Salmonella typhimurium*, comúnmente ocasiona gastroenteritis, no obstante algunos serotipos presentan también un gran potencial de invasión, por ejemplo *Salmonella cholerae-suis* y *S. Dublín*. [20, 21] Actualmente la Organización Mundial de la Salud considera a las enfermedades adquiridas por el alimento como padecimientos en constante vigilancia y manifiesta que de todos los padecimientos que afectan al ser humano el 29% son enfermedades diarreicas y aunque las estadísticas varían entre las fuentes de origen y los reportes que envían los diferentes países, una referencia son los reportes de los Estados Unidos de Norte América en donde en el año 2010 las salmonelosis ocuparon el segundo lugar de padecimientos diarreicos adquiridos por el alimento ocasionando 1,027,561 casos, 19, 336 individuos hospitalizados y 378 defunciones. En los países en desarrollo de Latinoamérica, Asía y África, la salmonelosis presenta una prevalencia desde 200 a 500 casos por 100,000 habitantes. En el caso de México para el año 2010 la Secretaría de Salud reportó 5,681,092 casos de enfermedades diarreicas de las cuales 44,553 fueron *Salmonella typhimurium* y 122,422 fueron asociadas a *S. paratyphi* y otras serovariedades de Salmonella.[25-27]

Salmonella

El género *Salmonella* se encuentra dentro de la familia *Enterobacteriaceae* y agrupa a cocobacilos Gram negativos generalmente móviles por flagelos perítricos (excepto las variedades Gallinarum y Pullorum), no esporulados, desprovistos de cápsula y oxidasa negativos. De acuerdo a estas características y otras evidenciadas por medio de reacciones bioquímicas, el género se ha dividido en dos especies: *S. entérica*; la cual comprende seis subespecies encontradas en animales y *S.bongori*, considerada como saprófita, dado que no es patógena para los vertebrados.[19-21] Comúnmente los microorganismos patógenos del género *Salmonella* producen infecciones en el tracto gastrointestinal, el cual colonizan, permaneciendo en el por largos períodos en los cuales la liberación de la bacteria es intermitente, como ya se ha mencionado.[21]

Los sistemas de clasificación empleados con las bacterias basan sus criterios de agrupación de especies y géneros en estudios filogenéticos de secuencias nucleotídicas, como los genes rRNA 16 y rRNA 23S. En el caso de los microorganismos contenidos en el género *Salmonella*, el análisis de estas secuencias han permitido dividir este género nuevamente en sólo dos especies *S. entérica* y *S. bongori*. A su vez *S. enterica* se ha dividido en las subespecies *entérica*, *indica, arizonae, diarizonae, salamae* y *houtenae* mediante estas mismas secuencias. Tomando como base estos estudios filogenéticos se ha propuesto la teoría en la cual se establece que los géneros *Salmonella* y *E. coli* podrían haber tenido un antecesor común hace 120 a 160 millones de años atrás, periodo que coincide con el origen de los mamíferos. *E.coli* se desarrolló como comensal y patógeno oportunista de mamíferos y aves. Los organismos del género *Salmonella* se mantuvieron asociados con los reptiles y evolucionaron posteriormente como patógenos intracelulares desarrollando genes para la invasión de células epiteliales del hospedador, mediante el desarrollo de distintos mecanismos los cuales le permitieron la extensión del espectro ecológico a mamíferos y aves, especializándose en su adaptación a estos.[21]

Las características del género *Salmonella* que los agrupan dentro de la familia *Enterobacteriaceae* son: fermentación de glucosa, producción de H2S, reducción de nitritos a nitratos y reacción negativa en la prueba de oxidasa. Los organismos del género *Salmonella* pueden crecer en medios básicos con glucosa y carbono como única fuente de energía, así como amonio como fuente de nitrógeno. En las pruebas bioquímicas básicas algunas excepciones son: *S. typhi* la cual no decarboxila la ornitina y falla el crecimiento en citrato. *Salmonella paratyphi* A falla en la producción de H2S, en la decarboxilación de la lisina y el crecimiento en citrato. Además algunas serovariedades de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* puede llegar a fermentar la lactosa.[21]

COMPOSICIÓN ANTIGÉNICA

Dentro de la misma especie, los microorganismos del género *Salmonella* están divididos en serovariedades de acuerdo a su estructura y la combinación de los antígenos somático (O) y flagelar (H), existiendo más de 2500 serovariedades identificadas.[19] El antígeno O también denominado cadena O es el inmunógeno más abundante de las bacterias Gram negativas, además de ser uno de factores de virulencia más importantes y el responsable de estimular respuestas humorales y celulares durante la infección. El antígeno O forma parte del lipopolisacárido (LPS) que se encuentra en la envoltura celular y consiste en oligosacáridos unidos por un tipo, orden y repetición de azúcares que difieren entre serovariedades. Hasta el día de hoy se han identificado 67 antígenos O, los cuales pueden presentarse solos, combinados o simplemente estar ausentes. [19, 21]

Se ha reportado la existencia de algunas mutantes en el género *Salmonella* que presentan defectos en la síntesis de los oligosacáridos de la cadena O, la cual no es sintetizada adecuadamente. Las colonias de estas mutantes tienen una apariencia opaca con bordes filamentosos, razón por la cual algunas veces se refieren a ellas como cepas rugosas. En contraste las colonias de las cepas con cadenas O normales presentan una morfología mucoide de bordes lisos, por lo que se les llama cepas lisas. Las cepas rugosas se consideran atípicas y éstas no aglutinan con antisuero O. Estas cepas con antígenos O incompletos (cepas rugosas), son utilizadas para la producción de vacunas atenuadas como la vacuna de paratifoidea del ganado (*Salmonella dublín*).[19, 21]

Como ya se ha mencionado el antígeno O es un importante factor de virulencia en organismos del género *Salmonella* que participa en la interacción con el hospedador particularmente en la evasión de la inmunidad innata durante la interacción inicial con células fagocíticas especializadas o el complemento.[21]

Los antígenos H son termolábiles y se consideran una parte integral del flagelo de las serovariedades que lo presentan.[19, 21] Los flagelos están compuestos por subunidades protéicas llamadas flagelina. Se conocen dos sistemas genéticos que permiten la expresión de diferentes flagelinas, las cuales pueden ayudar al microorganismo a sobrevivir frente a las defensas del hospedador. Los genes que codifican a estos dos tipos de flagelina, *fliC* y *fljB*, son similares pero no idénticos, se cree que ambos pudieron haberse desarrollado de un gen ancestral. Los serotipos no móviles de *Salmonella* sp. como Gallinarum tienen también en su genoma los genes estructurales y posiblemente el hecho de que sean inmóviles se deba más bien a un defecto en el sistema de ensamblaje del flagelo. Kilger y Grimont en 1993 encontraron que el gen *fliC* estaba presente en la serovariedad Gallinarum no móvil.[28] Otras serovariedades de *Salmonella* consideradas monofásicas pueden tener también ambos genes solo que no expresan alguno por defectos en la inversión de fase.[29]

Existen alrededor de 50 alelos del gen *fliC* y más de 30 del gen *fljB*. El gen *fliC* tiene tres regiones: la 5´ de 300 pares de nucleótidos, la región 3' de 200 pares de nucléotidos y la región media de 350 pares de nucléotidos. Las regiones distales 5´ y 3´ son muy conservadas, por lo que cruzan con diversas serovariedades, sin embargo la secuencia de la región media es hipervariable con menos del 32% de homología entre serovariedades. Lo anterior se explica con el hecho de que las regiones de los extremos amino y carboxilo de la flagelina son esenciales para la polimerización y secreción de la flagelina, de ahí que sean secuencias altamente conservadas, mientras que la región media que no tiene un papel funcional, lleva el epítopo importante del antígeno H, incluso cuando se compararon distintas cepas, se observó que aquellas con genotipos similares presentaban diferentes genes *fliC* y a la inversa, cepas con altos niveles de diferencias genotípicas tenían genes *fliC* idénticos. Lo anterior sugiere que se ha producido el intercambio de genes de flagelina posiblemente por transducción, lo que generó la variación alélica de *fliC* y la diversidad de serovares en las poblaciones naturales de *Salmonella* sp.[30, 31]

Otro antígeno importante en el género *Salmonella* es el Vi encontrado en las serovariedades Typhi, Paratyphi C y Dublín, es un homopolímero lineal de ácido 2-acetamido-2deoxy-D-galacturonico, ligado por enlaces alfa 1-4. Los genes involucrados en el control genético de la producción de este polisacárido capsular están ubicados en tres locus (*viaA*, *viaB* y *ompB*). Los genes *viaA* y *ompB* no se limitan a las especies productoras de Vi o a los géneros que están involucrados en la regulación y síntesis de Vi. El locus *viaB* se encuentra sólo en las cepas que producen antígeno Vi. Éste locus está ligado con genes que codifican para proteínas involucradas en la síntesis de polisacáridos (*wcdABCD*), exportación de polisacáridos (*wza, wzm, wzt, wzf*) y anclaje en la superficie bacteriana (*wcd*E). El antígeno Vi es receptor de los fagos VII, VIII y VIIV. [32]

Las dos membranas se conectan en varios puntos conocidos como zonas de adhesión, éstas sirven para facilitar el transporte de materiales hidrofóbicos como el LPS, de la superficie interna de la membrana citoplasmática a la membrana externa y puede ser un sitio de síntesis de algunas proteínas de membrana externa. La membrana externa está compuesta por una bicapa de lípidos que rodea la capa de péptidoglicano y protege al periplasma del ambiente externo. La membrana externa permite el transporte pasivo de moléculas seleccionadas dentro del periplasma, al mismo tiempo, la membrana externa sirve para proteger componentes delicados de la membrana citoplasmática de la acción de detergentes, sales biliares ácidos grasos y azucares. La membrana externa de salmonela puede considerarse como un tamiz molecular con la finalidad de permitir el paso de los nutrimentos requeridos para acceder al periplasma y resistir la penetración de sustancias peligrosas del medio externo como lipasas y proteasas.[21]

El péptidoglicano está compuesto de residuos alternados de N-acetil ácido murámico y N-acetil glucosamina, que forman grandes cadenas con enlaces covalentes. El péptidoglicano confiere rigidez y forma a la bacteria. El espacio periplásmico contiene numerosas proteínas solubles que usualmente tienen varias funciones, por ejemplo la

fosfatasa alcalina donde los solutos que no tienen sistema de transporte son convertidos a una forma que puede transportarse a través de la membrana citoplasmática a aquellas que participan fijando nutrimentos como aminoácidos y azucares favoreciendo su transporte.[21]

La estructura del lipido A proveniente de las serovariedades de *S. entérica* es considerablemente conservada y se encuentra en la membrana externa formando parte de la bicapa de lípidos siendo responsable de las propiedades endotóxicas del LPS; consiste de dos fragmentos de glucosamina unidos por enlaces Beta 1-6. El lípido A ha sido conocido por inducir efectos patofisiológicos, como choque endotóxico, pirogenicidad, activación del complemento, cambios hemodinámicos y coagulación. Dentro de los efectos inmunológicos se conocen la mitogenicidad de los linfocitos B y la activación de los macrófagos, se sabe que estos efectos están mediados por la inducción y liberación de numerosas citocinas provenientes de monocitos y macrófagos: El interferón, el factor de necrosis tumoral, el factor estimulante de colonias y la interlucina IL-1; Además de que las funciones del lípido A (endotoxina) contribuyen a la patogenicidad o actividad tóxica de las bacterias Gram negativas como *Salmonella*.[21]

Los genes requeridos para la biosíntesis de la cadena O varían de una serovariedad a otra, éstos contienen azúcares diferentes en la repetición de oligosacáridos. Sin embargo, exísten similitudes básicas en estos genes provenientes de las serovariedades que han sido examinadas. El número de genes involucrados en la síntesis de la cadena lateral O son 19. Entre las enterobacterias hay dos sistemas de síntesis de antígeno O basados en los genes involucrados en la adhesión del primer azúcar de la cadena O, que es un transportador lipidico. La mayoría de las serovariedades de *Salmonella* usan el producto del gen wba (*rfbp*) y su alternativa es el gen *wecA* (RFE). [21]

FACTORES DE VIRULENCIA

Dentro de los estudios moleculares, se han identificado cinco islas de patogenicidad, estos estudios muestran un importante papel de la secreción de proteínas y antígenos en las funciones de la patogénesis.

La expresión de la fimbria está relacionada con numerosas señales celulares y medioambientes, su expresión en nichos específicos juega un papel importante para la supervivencia de la bacteria, salmonella puede producir numerosas fimbrias, que participan en varias funciones y son importantes para el mantenimiento y la supervivencia del organismo en el huésped y su entorno, sus funciones podrían incluir: estabilización del organismo en las células intestinales, colonización de tejidos en el sitio específico de unión a los receptores proteicos de la matriz tisular, mantenimiento en las infecciones persistentes en el hospedador y en las células fagocíticas, así como la supervivencia en nichos específicos del animal infectado, evasión de las defensas inmunológicas específicas del hospedador mediante la presentación de epítopes sobre la fimbria, incrementar la supervivencia en un ambiente ya que envuelve al organismo

en fimbrias altamente hidrofóbicas, que son resistentes a los cambios en la temperatura, pH y la disponibilidad de agua.[21]

Los factores de virulencia de *Salmonella* son los responsables de las lesiones presentes en la salmonelosis que producen los signos clínicos sistémicos y entéricos. Algunos de los factores de virulencia descritos a la fecha comprenden sistemas de secreción responsables de la translocación de toxinas que permiten la invasividad y sobrevivencia intracelular de *Salmonella* sp y el lipopolisacárido (LPS). El LPS o endotoxina está involucrado en el desarrollo de vasculitis y trombosis. En el caso de infecciones entéricas, se absorbe una gran cantidad de endotoxinas por la enteritis que *Salmonella* spp produce, en infecciones sistémicas, se afectan principalmente hígado, bazo u otros tejidos produciéndose lesiones vasculares. [19]

Otros factores de virulencia son las enterotoxinas, las cuales son producidas por varias serovariedades de *Salmonella* y son muy similares a la enterotoxinas termolábiles de *E. coli* y a la toxina de cólera producida por *Vibrio cholerae*. Las enterotoxinas se relacionan con las células epiteliales intestinales y producen un incremento intracelular de adenosin monofosfato cíclico, ocasionando un desbalance en la secreción de cloro, sodio, potasio y agua dentro del lumen intestinal, produciendo diarrea.[19] Las citocinas, estimuladas por algunas serovariedades de *Salmonella* ocasionan también un incremento en la permeabilidad de la membrana celular del epitelio intestinal. Las citocinas aparecen ligadas a cationes como el calcio o el magnesio, lo que ocasiona los cambios estructurales en la membrana de la célula, resultando en la salida selectiva de moléculas.[19]

Finalmente para algunas cepas de *Salmonella* sp se han descrito la existencia de plásmidos R que proveen de resistencia para algunos antibióticos.[19]

La infección ocurre después de la ingestión de *Salmonella*. La interacción entre el hospedero y *Salmonella* depende del estado de colonización, la resistencia del hospedador, dosis infectante y la especie de *Salmonella*. La enfermedad puede ocurrir inmediatamente o poco tiempo después de la infección considerándose tardía, la interacción inicial puede resultar en la colonización (sin enfermedad) del hospedero, pero con un cambio en el ambiente intestinal que modifique la microbiota normal, *Salmonella* puede proliferar y la enfermedad llega a manifestarse.[20]

SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO III

Una característica esencial en la patogenicidad de *Salmonella* es su habilidad de manipular a su célula hospedadora en una interacción bioquímica denominada "cross talk", lo cual conduce a la respuesta tanto de la bacteria como de la célula hospedera. *Salmonella* responde a la presencia de la célula hospedera por activación de un sistema especializado de secreción de proteínas llamado Tipo III o dependiente de contacto[33] Este sistema permite a ciertos bacilos Gram negativos secretar e inyectar proteínas de patogenicidad en el citosol de la célula hospedadora eucariótica, las proteínas inyectadas frecuentemente reensamblan factores eucarióticos con

funcionamiento de señales de transducción y son capaces de interferir con vías de señalización de la célula hospedera.[34]

En el caso de *Salmonella*, la redirección de señales celulares de transducción resulta en la reorganización del citoesqueleto de la célula hospedera; la interacción de patógenos bacterianos dentro de las células hospederas, está particularmente caracterizada por factores que están localizados en la superficie bacteriana o son secretados en el espacio extracelular.[35] El término "secreción" es usado para describir el transporte activo de proteínas del citoplasma a través de las membranas internas y externas en el sobrenadante bacteriano o en la superficie de la célula bacteriana. El sistema de secreción Tipo III transporta las proteínas directamente del citoplasma de la bacteria hasta el citoplasma de la célula eucariótica, sin pasar por el periplasma. *Salmonella* presenta maquinarias dedicadas a la traslocación de proteínas que permiten a las proteínas bacterianas de patogenicidad ser liberadas directamente en el citosol de las células hospederas eucarióticas, además de presentar interacciones bacteria-hospedero que llevan a la remodelación bioquímica de la célula hospedera, teniendo vías de transducción de señales para facilitar la infección bacteriana, colonización y replicación dentro del hospedero.[36]

El sistema de secreción Tipo III es codificado en dos distintos grupos de genes llamados islas de patogenicidad 1 y 2 (SPI 1 y SPI 2), los cuales parecen jugar dos papeles diferentes durante la patogénesis, SPI 1 es requerida para la penetración inicial a la mucosa intestinal y SPI 2 necesaria para los estados subsecuentes de infección sistémica. El término SPI se utiliza para denominar a fragmentos de expresión de ADN cromosomal que codifica un número de proteínas reguladoras importantes para la patogenicidad.[37]

La Isla de patogenicidad I es requerida para el ingreso de Salmonella a la célula hospedera, está localizada en su centisoma 63 y en ella se encuentran genes implicados en su patogenicidad. Está dividida en dos grupos de genes que codifican la maquinaria de secreción para invadir la mucosa: *inv-spa* y *prg-org*;[38]estos genes se encargan de codificar proteínas que cumplen con diversas funciones en el proceso de invasión. Otros genes codifican proteínas involucradas en el proceso de invasión, que son secretadas al interior de la célula hospedera, translocando las señales celulares del hospedero, induciendo la activación de efectores que producen disrupción del citoesqueleto de la célula hospedera y la internalización de la bacteria, y en los macrófagos inducen apoptosis.[39] La expresión de los genes de invasión también requiere la proteína reguladora central HilA, la cual es codificada por el gen *hilA* en SPI 1, la proteína HilA es requerida para la expresión del sistema de secreción Tipo III[40] El gen *hila* es un regular transcripcional de genes de invasión, su exposición es activada por la proteína SirA que es codificado por el gen *Sir* A. La expresión de *hilA* también es regulada por PhoP-PhoQ un sistema de dos componentes que gobierna la virulencia, mediante la adaptación a ambientes limitados en magnesio y regula numerosas actividades celulares en varias especies. Aunque varios reguladores han sido implicados en la expresión de genes de invasión, ninguno ha sido concluyentemente determinado de interactuar con algún promotor.[41]

El sistema de secreción Tipo III está compuesto por un complejo denominado "De aguja". La arquitectura de este complejo semeja un cuerpo basal del gancho flagelar, sugiriendo una relación entre estas dos estructuras. El complejo aguja se extiende entre la membrana interna y externa de la pared bacteriana. Está compuesto de dos pares de anillos internos y externos que presumiblemente anclan la estructura a la membrana interna y externa de la pared bacteriana. Los anillos están conectados por una estructura en forma de vara, las cuales forman la base del complejo. Este sistema de secreción dirige la exportación de varias proteínas como atpasas, proteinas regulatorias y estructurales, formadoras de canales, lipoproteínas, moléculas efectoras para células hospederas, chaperonas, etc. Algunas de estas proteínas transitoriamente ensamblan una estructura apendicular llamada invasoma,[34] mientras otras son traslocadas en la célula hospedera donde ellas activan o interfieren con las vías de transducción de señales celula-hospedero conduciendo a una variedad de respuestas, que son dependientes del tipo de célula infectada. En células no fagocíticas, *Salmonella* induce cambios en la membrana plasmática de la célula hospedadora y profundos rearreglos del citoesqueleto que se parecen estructuralmente al *ruffling* de membrana inducido por varios agonistas. El *ruffling* de membrana es acompañado por macropinocitosis que conduce a la internalización bacteriana. En el caso de macrófagos la *Salmonella* induce efectos citotóxicos caracterizados inicialmente por una rápida inhibición del *ruffling* de membrana y macropinocitosis, seguido por la inducción de muerte celular apoptótica.[34]

Existen diferentes propuestas sobre vías de señalización inducidas por proteínas inyectadas por *Salmonella* que provocan rearreglo del citoesqueleto de la célula eucariótica e internalización de la bacteria. Una de las vías propuestas es donde *Salmonella* inyecta en la célula eucariótica las proteínas SopE y SptP transportadas por el sistema de secreción tipo II e inyectadas por el complejo en aguja en la célula eucariótica, donde Sop E activa las proteínas CDC42, que están en forma inactiva en el citoplasma de la célula eucariótica ligando GDP, al activarse esta proteína CDC42 liga GTP, aumentando la fosfolipasa G y por medio de los segundos intermediarios inositol trifosfato y diacil glicerol aumenta la concentración de calcio permitiendo el rearreglo del citoesqueleto. La proteína SptP estaría implicada en la fosforilación de los residuos de tirosina de receptores ubicados al nivel de la membrana de la célula eucariótica, produciéndose así también la disrupción del citoesqueleto y el *ruffling* de membrana.[42]

La otra vía de señalización propuesta es la que menciona que *Salmonella* inyecta por medio del complejo en aguja proteínas transportadas por medio del sistema de secreción tipo III como SopE, SopB que al ingresar en la célula eucariótica activan las proteínas Cdc42 y Rac1 que ligan GDP que se encontraban inactivas pasando el GDP a GTP. Estando Cdc42 y Rac 1 activadas induce la activación de la quinasa p21 que a su vez activa a la proteína quinasa activada por mitógenos iniciándose una cascada de señalización de segundos mensajeros como P38, Jan quinasa e inositol kappa beta, kappa alfa que inducen el factor nuclear kappa beta y el inositol kappa beta, toda esta señalización produce la activación de respuesta nuclear en la célula eucariótica.[34]

Se cree que las proteínas Cdc42 y Rac1 también podrían activar la proteína del síndrome de Wiscot Aldrich que estaría involucrada en el rearreglo del citoesqueleto de actina. Otra vía señalizada por Cdc42 y Rac1 es por medio de la fosfolipasa A2 que degrada el ácido araquidónico en varios compuestos por intermedio de la 5 lipooxigenasa produciendo leucotrienos A4, C4 y D4 que se cree, aumentan la permeabilidad de la membrana celular eucariótica permitiendo la entrada de calcio y produciendo el rearreglo del citoesqueleto o *ruffling* de membrana que permite la entrada de *Salmonella* sin que la célula eucariótica oponga resistencia. Estas dos vías presentan elementos en común y son muy aceptadas para explicar cómo sucede la entrada de *Salmonella* a las células epiteliales del intestino delgado. Estas señales inducidas por *Salmonella* son de vida corta. Después de la infección bacteriana las células hospederas retoman su morfología normal. Este fenómeno es mediado por la proteína SptP que también es liberada por el sistema de secreción tipo III y vuelve a su estado inactivo a las proteínas Cdc42 y Rac 1.[42]

El entendimiento de las vías de transducción de señales de la célula hospedera que son activadas por *Salmonella*, los determinantes bacterianos responsables de activar estas vías de señalización, y los mecanismos por los cuales la bacteria estimula la respuesta celular por el contacto cercano con las células hospederas, son el punto de partida para desarrollar estrategias a mediano y largo plazo de prevención de las infecciones producidas por *Salmonella*, como por ejemplo vacunas, mediante el bloqueo de genes como los descritos anteriormente que están involucrados en el proceso de invasión.[42]

PATOGENIA

La manifestación clínica más común de la salmonelosis es la diarrea, sin embargo en algunas ocasiones puede presentarse la septicemia dependiendo las condiciones específicas en el hospedero y de la cepa de *Salmonella* involucrada. Algunas de las condiciones críticas en el hospedero incluyen edad, estado inmunológico, enfermedades previas y la integridad de la flora normal que proporciona resistencia a la colonización, es decir, en la superficie de las placas de Peyer o tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) se encuentran las células M, las cuales junto con células epiteliales del intestino delgado distal, son el blanco principal en la salmonelosis. Si estas células se encuentran, "desocupadas" un número relativamente pequeño de bacterias, pueden ocasionar la enfermedad, este estado de vacío o desocupación celular depende del estado de la flora normal, si la flora es alterada por estrés o antibióticos, entonces la dosis infectante no tiene que ser alta para que *Salmonella* pueda tener acceso a las células blanco.[19-21]

La adhesión es el primer paso en el proceso de varias infecciones, en el caso de la salmonelosis está mediado por una o más adhesinas como Agf, Pef, Lpf, entre otras.[19] Después de la adhesión *Salmonella* penetra como resultado de la inducción de proyecciones de la membrana en las células blanco, (pinocitosis), inducido por toxinas translocadas por el sistema de secreción Tipo III. Los microorganismos en este momento pueden ser encontrados en las células blanco, tejido de la submucosa y MALT.[19] La respuesta inflamatoria iniciada por la liberación de varias citocinas

provenientes de las células del hospedador afectado, es inducida por la interacción de componentes de la pared celular como el LPS y peptidoglicano con receptores TLR's, esta inflamación estimula la respuesta de los neutrófilos y macrófagos.[19, 21] La respuesta de los polimorfonucleares puede ser reflejada en una neutropenia periférica. Los polimorfonucleares son altamente eficientes en la fagocitosis y destrucción de la *Salmonella*, además del macrófago que lo realiza en menor proporción. [20]

La diarrea es sólo el resultado de la sintesis de prostaglandinas por el reclutamiento de polimorfonucleares (y en consecuencia de la afectación de las células del hospedero), así como la activación de varias rutas de inositol, que afectan a las células. El resultado es la secreción de iones de cloro y agua. Si la cepa infectante de *Salmonella* tiene propiedades de diseminación y crecimiento rápido puede establecerse la septicemia.[19-21]

Durante la diseminación a otros órganos, *Salmonella* se encuentra fuera del medio intracelular, exponiéndose a la actividad bactericida del complemento y otras proteínas, para contrarrestar esta actividad, los microorganismos del género *Salmonella*, han desarrollado sistemas de modificación de componentes sobre envoltura celular que los hacen resistentes a estos mecanismos. Otro mecanismo importante durante la infección es la captación de Fe^{2+} por parte de la bacteria, en el caso de *Salmonella*, se realiza por la secreción de sideróforos y enterobactinas que remueven el hierro que se encuentra ligado a proteínas del hospedador.[20]

La multiplicación de los organismos resulta en una endotoxemia, con incremento de los signos y el curso de la enfermedad.[19, 20] Si el proceso infeccioso es limitado al tracto intestinal, las lesiones pueden consistir en inflamación hemorrágica del intestino delgado distal y del intestino grueso, ocasionando una necrosis superficial. En la forma septicémica de la enfermedad, existen cambios inflamatorios en el hígado, bazo y tejido intestinal, también pueden encontrarse hemorragias en pericardio, sufusiones peritoneales y en corteza adrenal.[19, 21]

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN

Salmonella presenta requerimientos nutricionales sencillos y su crecimiento in vitro es algunas veces posible en un medio simple con sal y glucosa, desarrollándose mejor en temperaturas entre 10 y hasta 49 °C. A temperaturas entre 0 y 5 °C el organismo se mantiene viable pero en ocasiones no es posible su crecimiento.[19-21]

Los procedimientos selectivos son recomendados para el aislamiento de *Salmonella* a partir de muestras fecales ya que estas contienen una mezcla de flora bacteriana. Los medios de enriquecimiento, contienen agentes de inhibición selectiva de otras bacterias diferentes a *Salmonella* para favorecer el crecimiento de ésta, como por ejemplo: caldo tetrationato, Rappaport-Vassili-adis y caldo selenito. Pequeñas piezas de tejido provenientes de bazo, hígado, linfonodos mesentéricos e intestino delgado o grueso, así como pequeñas cantidades de heces, pueden ser inoculadas dentro de medios de enriquecimiento y después de una incubación a 37 °C durante 48 h, el cultivo es colocado en medios selectivos como MacConkey, XLD, verde brillante, Salmonella-

Shigella o agar Rambach. Estos medios diferencian los géneros de la familia *Enterobacteriaceae* basados en la fermentación de lactosa y otras reacciones bioquímicas. Varias serovariedades del género de *Salmonella* no son fermentadoras de lactosa, como algunos miembros del género *Proteus*, *Citrobacter* y *Enterobacter*. [19-21]

Los microorganismos del género *Salmonella* sp, son anaerobios facultativos. Con algunas excepciones, todas producen gas proveniente de la fermentación de los azucares como glucosa y maltosa. Sin embargo el dulcitol e inositol son utilizadas de manera variable y la sacarosa no es fermentada por estos microorganismos. En los cultivos, la reducción de nitratos a nitritos y la producción de sulfuro de hidrógeno son características de las cepas de *Salmonella*.[19-21]

Se han desarrollado múltiples pruebas para la identificación de *Salmonella* como la tipificación por bacteriófagos para *S. typhimurium* y *S. Enteritidis* la cual es usada internacionalmente para estudios epidemiológicos, ya que existen diversos tipos de fagos que han sido asociados con especies que afectan a animales o que son patógenos para el humano. También se han desarrollado pruebas serológicas como el Inmunoensayo enzimático (ELISA) para la determinación y cuantificación de títulos de anticuerpos contra *Salmonella* en suero.[21] Existen también pruebas que detectan el ADN específico de *Salmonella* mediante iniciadores específicos en la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual ha sido desarrollada para la identificación y detección de *Salmonella* spp en muestras de comida, heces, agua, etc. [20, 43-45]

CAMPYLOBACTERIOSIS

Los microorganismos del género Campylobacter, se encuentran alrededor del mundo como comensales del tracto gastrointestinal de un gran número de especies animales domésticas y silvestres. En explotaciones pecuarias las infecciones ocasionadas por este microorganismo son importantes debido a las pérdidas económicas que ocasionan los abortos e infertilidad en el ganado. La infección de los animales se transmite por vía venérea y los organismos pueden incubarse asintomáticamente en el tracto genital y digestivo durante largos periodos de tiempo. *C. jejuni* tiene una amplio reservorio de especies, que incluyen aves, perros, gatos, ovejas y cabras; *C. coli* afecta principalmente a cerdos; *C. fetus* afecta principalmente a ovejas y cabras y *C. lari* de gaviotas, con excepción de ésta especie, éstos son el reservorio de origen para las infecciones en humanos. [46]

EPIDEMIOLOGÍA

Los brotes de infecciones humanas han sido asociados al consumo de leche, agua o comida contaminada, los cuales proveen el vehículo para la transmisión en humanos. La infección humano-humano se realiza mediante la vía fecal-oral y en el caso de *C. fetus*, ocasiona una presentación septicémica fatal en individuos inmunosuprimidos.[46] De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, la campilobacteriosis es una de las principales enfermedades diarréicas adquiridas por los alimentos, la cual sigue en importancia a la salmonelosis. En los Estados Unidos de Norte América en el año 2010 la campilobacteriosis se sitúo en el cuarto lugar de las enfermedades diarréicas con 845,024 casos que ocasionaron 8,463 hospitalizaciones y 76 defunciones. En nuestro país no existen estadísticas de esta enfermedad y se encuentra englobada en la estadística de "infecciones intestinales por otros organismos y mal definidas" que equivalen a 4,701,671 casos.[27]

Los miembros de éste género son bacterias Gram negativas, que no forman esporas, presentan una forma de S o espiral, con flagelos polares aislados a uno o ambos extremos, lo que le confiere una movilidad característica, como la de un sacacorchos. Estas bacterias son microaerófilas, pero algunas pueden crecer también aeróbica o anaeróbicamente. No fermentan ni oxidan los carbohidratos. Algunas especies particularmente *C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari*, son termófilas y crecen óptimamente a 42°C. Pueden colonizar superficies mucosas, generalmente del tracto gastrointestinal, en la mayoría de las especies de mamíferos y aves. La especie *C. jejuni* comprende dos subespecies (*C. jejuni* subespecie *jejuni* y *C. jejuni* subespecie *doylei*) que pueden diferenciarse debido a su reducción del nitrato ya que la subespecie *doylei* no reduce el nitrato. La subespecie *C. jejuni* se aisla de manera más común que la *C. doylei*. *Campylobacter jejuni* y *C. coli* son las especies patógenas más importantes ya que causan zoonosis.[47] Aunque las infecciones pueden ser autolimitadas, pueden producirse complicaciones, como bacteremias, Síndrome de Guillain Barré, artritis reactiva y aborto.[48]

Los microorganismos del género *Campylobacter* spp son la causa principal de enfermedades intestinales bacterianas en humanos identificadas en muchos países industrializados.[49] Más del 80 % de los casos en humanos son producidos por *C. jejuni* y alrededor del 10 % por *C. coli*. Otras especies de *Campylobacter* como *C. consisus*, *C. upsaliensis*, *C. lari* y *C. fetus*, también pueden asociarse con diarreas en humanos. La detección de *Campylobacter* es poco común en países en desarrollo.[50] Se cree que, básicamente, la fuente de infección por *C. jejuni*, *C. coli* en humanos es la manipulación o el consumo de carne contaminada, especialmente carne de aves de corral. Sin embargo el contacto con animales domésticos y ganado, el consumo de agua contaminada y alimento en zonas de alta prevalencia son factores de riesgo para la infección de los individuos.[51]

Generalmente, *Campylobacter jejuni* y *C. coli* se consideran comensales del ganado, animales domésticos y aves. Sin embargo se han asociado con enfermedades en varios hospedadores. En perros y gatos, especialmente en animales jóvenes o

animales sometidos a estrés, se asocia a *C. jejuni* con diarrea [52, 53] y ésta es una fuente de infección humana bien reconocida.[49] Los perros y gatos son también frecuentemente colonizados por *C. upsaliensis* y *C. helveticus*, respectivamente.[54] Se han descrito brotes de enteritis asociadas con *Campylobacter* en algunos animales incluyendo grupos de primates no humanos e incluso pequeños mamíferos criados en laboratorio. Se han aislado grandes cantidades de *Campylobacter* de lechones, corderos y terneros con enteritis, pero también se encuentran organismos en animales sanos. En aves de corral, la enfermedad es rara, a pesar de los altos niveles de colonización con *C. jejuni* y *C. coli*. Se han descrito brotes de hepatitis aviar, pero el papel patogénico de *Campylobacter* spp. en estos brotes no está claro.[55]

Campylobacter jejuni, C. coli, C. hyointestinalis, C. sputorum, así como *Campylobacter fetus*, también pueden asociarse con infecciones en el tracto reproductor. En el ganado, todas estas cepas se pueden asociar con aborto. En ovejas hasta el 20 por ciento de los abortos asociados a *Campylobacter* se deben a *Campylobacter jejuni* o *C. coli*. [55]

Debido a los conflictos en los esquemas de clasificación y las dificultades bioquímicas y serológicas encontradas en los aislamientos se han presentado confusiones epidemiológicas. El primer aislamiento de este género se realizó en 1909 y fue clasificado como *Vibrio fetus*. El nuevo género *Campylobacter* fue creado para incluir a *Vibrio fetus* cuando se identificó que éste no podía relacionarse con la familia Vibrionaceae con base en sus diferencias en la composición de sus nucleótidos, así como el uso de los azúcares para la fermentación. En 1947 fue identificada la primera infección humana, presentándose posteriormente aislamientos subsecuentes de *C. fetus* y otros tipos de *Campylobacter* a partir de muestras de sangre, líquido cefalorraquídeo y heces. La Taxonomía reconoce cuatro especies de *Campylobacter* patógenos para el humano. *C. jejuni, C. coli, C. lari y C. fetus*.[46]

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN

El aislamiento de *C. jejuni* proveniente de muestras rectales de varios especímenes, se ha facilitado por el desarrollo de medios selectivos, sin los cuales su aislamiento seria poco probable. Los medios selectivos apropiados para su cultivo son: Butzler, Skirrows y CAMPY-BAP. Estos medios contienen varios antibióticos para inhibir un sobrecrecimiento por competencia de bacterias de la flora rectal. Los medios deben ser incubados a 42 °C en una atmósfera con el 5 % de oxígeno, 10 % de CO_2 y 85 % N_2, sin embargo *C. jejuni* puede crecer a 37°C. El crecimiento colonial se desarrolla entre 24 y 48 h. [46]

Las especies de *Campylobacter* comúnmente asociadas a infecciones en el humano son catalasa positivas. *C. fetus* es un patógeno oportunista y se encuentra relacionado mayormente en las infecciones extraintestinales. Los cultivos de sangre o de líquidos corporales estériles pueden realizarse en medios no selectivos como agar sangre. En estos casos son requeridas condiciones microaerofílicas de incubación. En caso de que

los pacientes presenten signos de diarrea, el cultivo debe de realizarse sobre medios selectivos sin cefalosporinas. [46]

El aislamiento de *Campylobacter* de muestras fecales o intestinales se lleva cabo, generalmente, mediante colocación directa sobre el medio selectivo o utilizando el método de filtración sobre agar no selectivo. Se recomienda el enriquecimiento para aumentar la sensibilidad del cultivo de microorganismos potencialmente estresados por las condiciones ambientales o en caso de bajos niveles de organismos en las heces. Sin embargo, el enriquecimiento de estas muestras no se lleva a cabo rutinariamente.[47]

Los microorganismos del género *Campylobacter* son muy sensibles a las condiciones ambientales, incluyendo deshidratación, oxígeno atmosférico, luz solar y temperatura elevada. Por tanto, el transporte al laboratorio y posterior procesado deben hacerse tan rápido como sea posible (preferiblemente el mismo día, y si no dentro de los dos días siguientes). Un medio de transporte adecuado aumenta la probabilidad de mantener organismos cultivables, además de que las muestras se deben proteger de la luz.[47] El medio de transporte más empleado en el aislamiento de *Campylobacter* sp es el medio Cary-Blair. [56, 57]

Se deben evitar temperaturas altas (>20°C), temperaturas bajas (<0°C) y fluctuaciones en la temperatura. Durante el procesamiento en el laboratorio, las muestras deben mantenerse a temperatura ambiente durante periodos cortos (para evitar choques térmicos innecesarios). Cuando el tiempo transcurrido entre la toma de la muestra y el procesado es largo, se aconseja un almacenamiento a 4(±2) °C.[47]

FACTORES DE VIRULENCIA

Las secuencias genómicas y los datos de microarreglos de ADN han demostrado que el genoma de *C. jejuni* contiene 22 regiones variables en su cromosoma. Las regiones cromosómicas más variables están involucradas en la biosíntesis de carbohidratos estructurales de superficie que desempeñan un papel en la virulencia: los lipooligosacaridos, los polisacáridos capsulares y los locus de glicosilación de flagelina.[58]

En el caso de la adherencia e invasión *Campylobacter* utiliza diversos mecanismos que aún no se han definido completamente, existen lipoproteínas de superficie como la JlpA que se une a proteínas de choque calórico Hsp90α expuestas en la superficie, de células epiteliales Hep-2 ocasionando la activación de NF-kB y la cinasa proteica p38. Existe además la proteína CadF que es un mecanismo de adhesión a la matríz proteica de fibronectina y recientemente se ha mostrado que es fundamental para la activación de Rac1 y Cdc43 en células intestinales. Otra adhesina reportada es Peb1 una proteína de unión que liga aspartato con glutamato y que es necesaria para la colonización intestinal en ratones.[59]

Campylobacter jejuni se considera generalmente invasiva, aunque el mecanismo de invasión a las células epiteliales continua esclareciéndose. En el caso de la invasión a células, no se considera un enteropatógeno especializado en el sistema de secreción Tipo III, sin embargo el filamento flagelar parece que funciona como organelo de este sistema y secreta varias proteínas reportadas durante el proceso de invasión como las proteínas Cia (antígenos de invasión de *Campylobacter*) que son secretadas a través del filamento flagelar al entrar en contacto con la célula eucariótica, una de éstas proteínas la CiaB funciona para internalizar a *Campylobacter* en células epiteliales, sin embargo su función para mediar la invasión no está completamente descrita, aún así, numerosos reportes muestran que después de la internalización *C. jejuni* puede replicarse intracelularmente en macrófagos e inducir apoptosis.[60]

Las interacciones de *C. jejuni* con las células epiteliales, células dendríticas y macrófagos pueden desencadenar la activación de factores de transcripción nuclear, así como la liberación de quimosinas y citocinas que probablemente contribuyan a los procesos de inflamación, diarreas e infecciones, sin embargo los marcadores bacterianos responsables de la inducción de citocinas proinflamatorias aún no se encuentran bien definidos.[60]

El flagelo de *Campylobacter* es uno de los antígenos de superficie más importantes ya que le provee de movilidad que le permite una óptima adhesión e invasión en células del huésped y aunque no ha sido revelado el papel del flagelo en la adherencia, su movimiento en espiral característico le permite la entrada al intestino y la penetración de la capa de moco para colonizar o invadir la mucosa intestinal.[50] Los arreglos de la flagelina de *C. jejuni* sobre los diferentes serogrupos termolábiles son estructuralmente similares y difieren de los de la flagelina de *C. fetus*. El análisis inmunoquímico de estas flagelinas revela la presencia de dos epítopes de superficie uno interno y uno externo, los cuales presentan reacciones cruzadas, [46] FlaA es una proteína capaz de unirse a la células del hospedador, se ha reportado que la motilidad conferida por el producto del gen *flaA* juega un papel importante en el contacto de *C. jejuni* con las células del hospedador, así como la internalización y diseminación en el epitelio intestinal. FlaC es una proteína ligada a la flagelina que no es parte del aparato flagelar, ésta proteína ha sido encontrada en el sobrenadante de los cultivos uniéndose a las células eucarióticas, regulando la invasión de algunas cepas de *C. jejuni*. Otra proteína denominada FspA (Proteína secretada por flagelo) que parecía ser una proteína específica de *Campylobacter jejuni* es también secretada a través del flagelo. Parece que hay dos formas de FspA encontradas en diferentes cepas de *Campylobacter jejuni*. la FspA1 que no parece tener un efecto en células epiteliales y una forma recombinante denominada FspA2 que cuando es agregada a células epiteliales se logra inducir una apoptosis acelerada, sin embargo el rol de éstas proteínas en los procesos diarreicos no está bien determinada.[58]

También hay evidencia de que los factores de virulencia se regulan con el flagelo. Esto originalmente se basó en los estudios de microarreglos que reportan una corregulación de varios genes desconocidos con genes flagelares. Evidencia experimental reciente, muestra que dos de estos genes desconocidos son factores de virulencia. Cj0977 y

FSpA son regulados por el promotor tardío de flagelina σ^{28}, una mutación de Cj0977 ocasiona la disminución en la invasión de células epiteliales. La función de la proteína codificada por Cj0977 que no es secretada a través del flagelo es aún desconocida.[61]

Se han reportado toxinas similares a las toxinas CT de *Vibrio cholerae*, a la (LT) toxina termolábil de *E. coli* y a la toxina (STX) de *Shigella dysenteriae*, los mecanismos de acción y su participación en la enfermedad aún no está bien definida. En algunos estudios se compara las toxinas de *Campylobacter* con toxinas conocidas de otras enterobacterias patógenas. Las toxinas pueden ser clasificadass por su actividad en dos clases: enterotoxinas y citotoxinas.[62] En el caso de las enterotoxinas CJT ésta ha sido neutralizada con anticuerpos anti-LT y anti CT por lo que se sugiere que son similares inmunológicamente a la CT de *Vibrio cholerae* y a la LT de *E. coli*. En México se han encontrado cepas en donde se demuestran anticuerpos contra CJT[63]

La producción de citotoxinas por *Campylobacter* es confusa, sin embargo se propone la existencia de seis citotoxinas. La citotoxina de 70 kDa con actividad en células HeLa, CHO e inactiva en células Vero, las citotoxinas activas en células Vero y HeLa, toxina de distención citoletal (CDT), la citotoxina neutralizada por antitoxina Shiga-like de *E. coli*, la citotoxina de actividad hemolítica y la citotoxina hepatotóxica.[64]

El factor de virulencia mejor descrito, presente en el centro del genoma de *C. jejuni* es la toxina CDT. CDT es una toxina tripartita, en la que CdtA y CdtC comprenden los componentes de unión y CdtB es la subunidad activa. Una vez que la holotoxina es vinculada a la célula, CdtB es transportado al núcleo donde provoca rupturas de la doble cadena de ADN y detiene la fase G2 del ciclo celular. La función de CDT en la enfermedad diarreica ocasionada por *C. jejuni* esta clara, pero se ha postulado que la detención del ciclo celular en las células de la mucosa intestinal aumentarían el tiempo de contacto entre el hospedador y el patógeno. CDT provenientes de otros patógenos han mostrado que inducen el arresto de linfocitos y el CDT de *C. jejuni* induce la apoptosis de macrófagos, sugiriendo una posible participación en la inmunosupresión. En algunas ocasiones se ha evidenciado que CDT induce secreción de IL-8 proveniente de células epiteliales, que pueden contribuir a la inflamación en los procesos diarreicos. El hecho de que CdtB induzca la ruptura del ADN sugiere una posible participación en la transformación de células malignas, relacionadas con el linfoma.[65]

Los lipopolisacaridos externos codificados en las cepas de *C. jejuni* son hipervariables debido a diferencias en los enlaces y composición de monosacáridos. Los estudios sobre estructura antigénica de *Campylobacter* se han enfocado sobre las estructuras de superficie de *C. jejuni*. Las especies de este género parecen antigénicamente diversas ya que se han descrito 50 especies termoestables, propiedad que parece brinda su LPS que es de bajo peso molecular, lo que puede explicar el gran número de serotipos y más de 36 especies basadas en el antígeno flagelar. En *C. fetus* el polisacárido o cadena O son de peso intermedio y en contraste con la gran heterogenicidad de cadenas de la familia Enterobacteriaceae, son más homogéneas. La característica del LPS puede determinar en parte si los aislamientos son sensibles a los bactericidas del suero humano normal. La resistencia sérica es usualmente asociada con las especies

lisas del LPS.[46] La porción del lípido A del LPS es química y antigénicamente similar a otras bacterias Gram negativas. El LPS de algunas cepas contienen ácido N-acetílneuraminico que es un componente encontrado en procariontes, pero también encontrado en glicolípidos y glicoproteínas de mamíferos.[62]

En el caso de *Campylobacter fetus* se mencionan otros factores de virulencia como las proteínas de superficie (capa "S") que son una capa de subunidades de proteína que forman un componente exterior de su envoltura celular. El locus capsular es uno de los locus mas variables por lo menos en las cepas de *C. jejuni* involucran entre 11 y 30 genes; estas proteínas están sujetadas fuertemente a esta capa jugando un papel importante en la interacción de huésped-patógeno; cepas mutantes con deficiente producción de cápsula son afectadas en los procesos de adherencia, resistencia en suero y colonización. La capa "S" representa menos del 10% del total de las proteínas celulares que son de múltiples formas y tamaños moleculares (90-140 kDa), estudios bioquímicos recientes muestran que la capa "S" de *Campylobacter fetus* está compuesta en su mayoría por ácidos y proteínas hidrofóbicas con una secuencia única en estas especies amino terminal. Por otro lado se ha propuesto que el aborto generado por *Campylobacter* se debe a una respuesta alérgica a las endotoxinas termoestables. El choque anafiláctico subletal o fatal ha sido demostrado cuando los animales son inyectados con células frescas de *C. fetus* subsp *venerealis*.[46]

El hierro es un factor esencial en los procesos biológicos, es vital para los organismos. Muchas bacterias producen y secretan sideróforos y quelan el hierro férrico de los sistemas biológicos como es el caso de *Campylobacter*. Cepas de *Campylobacter jejuni* pueden utilizar sideróforos producidas por otras bacterias en el intestino. Por lo tanto la enterobactina producida por *E. coli* puede unirse al receptor de membrana externa CfrA en algunas cepas de *C. jejuni*. Las cepas de *Campylobacter* son capaces de adquirir hierro a través de compuestos como la hemoglobina, se ha demostrado que el hierro ferroso es tomado por *C. jejuni* a través de la proteína FeoB como lo hacen otras bacterias. Cepas mutantes de *feoB* presentaron alteraciones en la sobrevivencia dentro de líneas celulares de intestino humanas y porcinas, del mismo modo se vio afectado el proceso de colonización al intestino de lechones y pollos; en conjunto estos datos sugieren que tanto la adquisición de hierro ferroso y férrico es fundamental para la colonización del epitelio intestinal por *Campylobacter jejuni*.[66-68]

PATOGENIA

La presentación puede variar considerablemente en los individuos susceptibles a infección. Estudios epidemiológicos han mostrado que la ingestión de alrededor de 500 microorganismos puede ocasionar diarrea. La variación en la virulencia relativa de las diferentes cepas está asociada además a la dosis infectante. [46]

La enteroinfección con *C. jejuni* resulta en una invasión a la mucosa, caracterizada por la ulceración de ésta, enteritis y necrosis hemorrágica del íleon y yeyuno, lo que ocasiona diarrea sanguinolenta en la mayoría de los casos, además de la presencia de leucocitos en heces e invadir la lámina propia, resultando en la infección de linfonodos regionales y ocasionalmente septicemia.[46]

Tres propiedades patogénicas han sido identificadas en *C. jejuni*: invasinas, producción de enterotoxinas y producción de citotoxinas. La colonización de la mucosa del tracto gastrointestinal es importante para producir enfermedad. Para la colonización además es crucial el flagelo que provee motilidad a los microorganismos para penetrar a la capa mucoide que recubre el intestino. Las toxinas causan diarreas hipersecretoras por la estimulación de la actividad de la adenilato ciclasa en la mucosa intestinal e interrumpen el transporte de iones de manera normal al enterocito. La enterotoxina es producida por algunos aislamientos de *C. jejuni* y *C. coli* que afectan a varias células de mamíferos, pero su rol en la diarrea del humano no es del todo conocida. [46]

Campylobacter jejuni puede sobrevivir a la ingestión de macrófagos por varios días, lo cual puede ser un mecanismo usado por el microorganismo para su sobrevivencia y persistencia. [46]

La infección por *C. jejuni* puede ser manifestada en diversas formas. La enteritis aguda es la presentación más frecuente, con síntomas que duran de un día a una semana o más. El periodo de incubación es variable entre uno a siete días, cursando con fiebre, cefalea, mialgia, los cuales ocurren entre las primeras 12-24 horas antes de los síntomas intestinales. La diarrea es acuosa conteniendo sangre y células inflamatorias. El dolor abdominal es un síntoma común, la infección puede manifestarse en colitis aguda con fiebre. La bacteremia ocurre en menos del 1% de los individuos afectados con *C jejuni* y las infecciones extraintestinales como las meningitis, colecistitis, artritis e infecciones en tracto urinario son raras. [46]

El zoológico de Chapultepec "Alfonso L. Herrera" es albergue de alrededor de 800 aves en 17 ordenes dentro de las cuales se encuentran un gran número de especies nacionales y exóticas[3], sin embargo no existe un monitoreo formal acerca de la presencia de diversos microorganismos incluyendo *Salmonella* y *Campylobacter*, los cuales son dos de las principales enfermedades bacterianas de diseminación acelerada y zoonoticas. Un brote ocasionado por aves importadas o al movimiento geográfico de las mismas, pueden ser un factor de riesgo para las aves silvestres en peligro de extinción allí albergadas, al fungir las primeras como posibles vectores de *Salmonella* y *Campylobacter*. En este trabajo se realizó un monitoreo de la presencia de *Salmonella* y

Campylobacter por medio de técnicas de diagnóstico bacteriológico tradicionales como el cultivo, además de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que es altamente sensible y específica,[45, 69-71] con la finalidad de contribuir en la conservación de especies en peligro de extinción, al monitorear individuos provenientes de criaderos nacionales, internacionales y decomisados que son albergados en el Zoológico de Chapultepec.

HIPÓTESIS

Dado el contacto con aves silvestres del bosque de Chapultepec y con aquellas provenientes de decomisos, donaciones, compras e intercambios, en la población de aves pertenecientes a la colección del Zoológico de Chapultepec "Alfonso L. Herrera" existirán ejemplares infectados con *Salmonella* sp. y *Campylobacter* sp. que no muestren signos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de *Salmonella* sp. y *Campylobacter* sp., en aves pertenecientes a la colección del Zoológico de Chapultepec "Alfonso L. Herrera" por medio de pruebas de bacteriología tradicional y molecular.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. ORIGEN Y CARACTERÌSTICAS DE LAS MUESTRAS

ZOOLÓGICO DE CHAPULTEPEC "ALFONSO L. HERRERA"

El Zoológico de Chapultepec "Alfonso L. Herrera" se ubica en las coordenadas Geográficas: 19°25´ de latitud Norte y a 99°12´ de longitud Oeste, de la Delegación Miguel Hidalgo, México D.F., con una latitud de 2250 msnm.[37] La población en estudio para este trabajo está conformada por 780 aves en cautiverio de 17 órdenes distintas, Struhioniformes, Casuariformes, Sphenisciformes, Pelecaniformes, Ciconiiformes, Phoenicopteriphormes, Anseriformes, Falconifornes, Galliformes, Gruiformes, Columbiformes, Psittaciformes, Cuculiformes, Strigiformes, Coraciiformes, Piciformes y Passeriformes.

II. DETERMINACIÓN DE MUESTRA REPRESENTATIVA

La determinación del número de individuos necesarios para nuestro estudio en esta población, se realizó mediante la siguiente fórmula:

$n= (Z_{1-\alpha/2}^2 + P * (1 - P)) / \Delta$ [72]

III. CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE LAS AVES SELECCIONADAS

Se seleccionaron aves clínicamente sanas de las órdenes Anseriformes, Falconiformes, Galliformes, Gruiformes, Piciformes, Psittaciformes, Sphenisciformes y Strigiformes en las cuales, el estrés del manejo no pusiera en riesgo su vida, además de no tener tratamiento de antibióticos por lo menos dos semanas antes del muestreo.

IV. COLECCIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS

De cada individuo se colectaron dos muestras de heces a partir de cloaca, utilizando hisopos de algodón estéril. Para la toma de las muestras, las aves fueron contenidas por métodos físicos, posteriormente un hisopo fue introducido en agua peptonada para el aislamiento de *Salmonella* spp. y otro hisopo fue colocado en medio Cary Blair para el aislamiento de *Campylobacter* spp. Después de esto, las muestras fueron trasladadas de inmediato a temperatura ambiente, al Laboratorio de Microbiología Agropecuaria de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

V. DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO TRADICIONAL

Salmonella

El material colectado, se homogenizó en un volumen de 10 ml. de agua peptonada y se incubó durante 18 h. a una temperatura de 37°C. Al término de este tiempo, 1 ml de este medio fue inoculado en caldo selenito y en caldo tetrationato incubándose nuevamente a 37°C durante 24 horas. Posteriormente se sembraron 30 µl de cada caldo en agar MacConkey incubándose a 37 °C durante 24 h. El caldo selenito restante se congeló a -78°C para su posterior uso en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Transcurridas 24 h. de incubación, los cultivos fueron evaluados para determinar la presencia de colonias lactosa negativas y realizar su cultivo aislado. Una vez ya aisladas las colonias sugerentes a *Salmonella* se les realizaron pruebas bioquímicas utilizando la siguiente batería de pruebas: TSI, SIM, urea y citrato.[73, 74]

Campylobacter

El material colectado (Hisopo) transportado en medio Cary Blair fue colocado en 10 ml de caldo Tioglicolato e incubado a 37°C durante 72 h., después de este tiempo se evaluó la presencia de turbidez en los caldos, la cual indicaría crecimiento bacteriano. Posteriormente se tomaron 30 µl de la superficie del caldo y se colocaron en agar CCD (Charcoal, Casein, Desoxycolato) con suplemento selectivo SR1SSE (Cefoperazona 16 mg, Anfotericina B 5 mg) OXOID, para su posterior incubación en jarra de anaerobiosis a 5- 10 % de oxígeno generado con Gas-pack Campy-Gen OXOID a 37 °C durante 72 h. Después de este tiempo los medios fueron evaluados para determinar la presencia de colonias sugerentes a *Campylobacter* sp las cuales en este medio son grisáceas, planas y húmedas, con tendencia a extenderse, y pueden tener brillo metálico. Estas colonias se sometieron a procesos de confirmación obteniendo una muestra colonial sospechosa mediante asa bacteriológica y realizando un examen microscópico directo del material mediante la tinción de Gram ya que su morfología de sacacorchos es característica de esta bacteria.

VI. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

EXTRACCIÓN DE ADN PARA *Salmonella*

Para extraer el ADN bacteriano se colocaron 1.5 ml de caldo selenito, previamente inoculado con agua peptonada con las muestras cloacales, en tubos eppendorf y se centrifugó a 10 000 rpm/10 min (HERMLE® Z160M, Alemania), se eliminó el sobrenadante y

la pastilla se resuspendió en 100 µl de amortiguador T:E (Tris 10 mM, EDTA 1mM pH 8.0) y se le agregaron 550 µl de solución de lisis (Proteinasa K 10 µg, EDTA 25 mM pH 8.0, RNAasa 2 µg y 2% Sarcosine). Posteriormente las muestras se incubaron a 56°C/ 10 min, transcurrido este tiempo se agregaron 450 µl de acetato de amonio 7.5 M, incubándose en hielo durante 10 min. Al término de este tiempo se añadió un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, mezclándose durante 30 segundos, después de esto se centrifugaron las muestras a 10 000 rpm/4 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se adicionarán 0.8 volúmenes de isopropanol, para después centrifugar nuevamente a 12 000 rpm/15 min. a 4°C, después de ésta centrifugación se decantó el sobrenadante y se agregaron 300 µl de etanol frío al 70% y se centrifugó a 13 000 rpm/3 min, se decantó el sobrenadante y el ADN se suspendió en 50 µl de amortiguador T:E (Tris 10 mM, EDTA 1mM pH 8.0) congelándose hasta su uso. Para comprobar la presencia del ADN, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% utilizando solución de tris, ácido acético y EDTA (TAE 1X) como solución de corrida, para cada extracción se cargaron 3 µl de muestra con ADN en cada pozo, mezclado con 3 µl de solución de carga (sacarosa 20%, 0.01% azul de bromofenol, 0.01% cianol), las condiciones de la electroforesis en una cámara Cleaver Scientific® itd MSMINI, UK fueron 40 min a 80 Volts, finalmente el gel fue visualizado en un fotodocumentador (BIO-RAD® Universal Hood II. Milán, Italia) utilizando bromuro de etidio como colorante.

CUANTIFICACIÓN DE ADN

Para la cuantificación de ADN de los controles positivos (*Salmonella typhimurium* y *Campylobacter jejuni*) éstas muestras fueron analizadas por medio de espectrofotometría (BIO-RAD® SmartSpec Plus Spectrophotometer, USA) a una absorbancia de 260 nm, utilizando 1 µl de ADN, suspendido en 999 µl de solución de elusión (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8), calculando una concentración de 23 µg/ml en el caso de *Salmonella typhimurium* y 38 µg/ml para *Campylobacter jejuni*

DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD MÍNIMA DETECTABLE

Para la determinación de la cantidad mínima detectable en la PCR, después de cuantificar la concentración de ADN de los controles positivos (*Salmonella typhimurium* y *Campylobacter jejuni*) se realizó una dilución inicial de cada uno de los controles para obtener una concentración del ADN de 100 ng/µl y a partir de esta, realizar diluciones décuples seriadas para obtener concentraciones de 10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 ng/µl, las cuales fueron probadas en la PCR para cada uno de los iniciadores a utilizar.

SELECCIÓN DE INICIADORES PARA *Salmonella*

En la identificación de *Salmonella* sp en muestras de heces se utilizaron dos pares de iniciadores para los genes *invA* que codifica para una invasina del sistema de secreción tipo III y *sopE* proteína efectora de la traslocación, los cuales son altamente conservados en éste género. La secuencia para los iniciadores del gen *invA*-F 5'-GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA-3' *invA*-R 5'-TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C-3' y para el caso de *sopE*- F 5' - GTG ACA AAA ATA ACT TTA TCT -3' *sopE*-R 5' - GGG AGT GTA TTG TAT ATA TTT - 3'

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA *Salmonella*

El ADN extraído del control positivo (*Salmonella typhimurium*) y el extraído a partir de las muestras clínicas fueron analizados empleando los iniciadores que amplifican un segmento de los genes *invA* y *sopE* respectivamente. Para ambos iniciadores cada reacción consistió en 8.5 µl de agua libre de nucleasas, 12.5 µl de mezcla para PCR Master-Mix, 1.5 µl de cada iniciador a una concentración de 10 µM, 1 µl de la muestra con ADN del control positivo a 0.1 ng/µl y 5 µl de ADN en el caso de las muestras clínicas. Las condiciones del ciclo en el termiciclador (Corbett Research® CG1-96, USA) para *invA* fueron: un ciclo inicial de desnaturalización de 94° C por 5 min., 33 ciclos de 94°C por 30 s, 55°C por 30 s para la alineación de iniciadores, 72°C por 30 s, para la extensión y un último ciclo de 72°C por 7 min. Para el caso de *sopE* las condiciones del ciclo en el termociclador fueron: un ciclo inicial de desnaturalización de 94°C por 5 min., 33 ciclos de 94°C por 1:15 min, 43.5°C por 1:30 min para la alineación de iniciadores, 72°C por 1:45 min para la extensión y un ciclo final de 72°C por 5 min para la desnaturalización final.

EXTRACCIÓN DE ADN PARA *Campylobacter*

Para la extracción de ADN de las cepas compatibles morfológicamente con *Campylobacter* sp y de las muestras clínicas, a partir de caldo tioglicolato se les realizó el procedimiento descrito por Cremonesi et al., con modificaciones: cada muestra de 1.5 ml se centrifugó a 10 000 rpm/10 min (HERMLE® Z160M, Alemania), el sobrenadante fue descartado y la pastilla suspendida en 500 µl de solución salina estéril (NaCl al 0.9 %) para centrifugarse nuevamente a 13 000 rpm/15 min a 4°C eliminando el sobrenadante, este paso se repitió una vez más. La pastilla se disolvió en 50 µl de solución salina y se agregaron 300 µl de solución de lisis (3 M isotiocianato de guanidina, 20 mM EDTA pH 8, 10 mM Tris-HCl pH 6.8, tritón 40 mg/ml, ditiotreitol 10 mg/ml) y 200 µl de solución de unión (40 mg/ml de silica resuspendida en solución de lisis). Todos los elementos se homogenizaron 30 s en vórtex y se dejaron reposar 5 min a temperatura ambiente, para centrifugarse posteriormente a 13 000 rpm/30 s eliminando el sobrenadante, se realizaron dos lavados añadiendo 200 µl de solución de lisis homogenizando perfectamente y se centrifugó a 13 000 rpm/30 s eliminando el sobrenadante. Se

realizaron dos lavados más con 200 µl de solución de lavado (25% etanol absoluto, 25% isopropanol, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8) centrifugando a 13 000 rpm/30 s. Se realizó un último lavado con 200 µl de etanol absoluto centrifugando nuevamente a 13 000 rpm/30 s, se eliminó el sobrenadante y se secó la pastilla durante 10 min a 37°C. Se añadieron 65 µl de solución de elusión (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8) y se incubó en baño María durante 15 min a 65 °C. Por último se centrifugó a 10 000 rpm/5 min y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio.

Para observar el ADN obtenido se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % utilizando TAE 1X como solución de corrida. De cada muestra de ADN se colocaron 5 µl de ADN mezclados con 5 µl de solución de carga, por pozo. Las condiciones de electroforesis fueron 40 min a 80 volts, finalmente el gel fue visualizado en un fotodocumentador utilizando bromuro de etidio como colorante. (Figura 2)

SELECCIÓN DE INICIADORES PARA *Campylobacter*

Para la identificación de *Campylobacter jejuni* y *C. coli* se utilizaron un par de iniciadores diseñados por Oyofo et al. Pg50, 5'-ATG GGA TTT CGT ATT AAC-3' Pg3,5' -AA CTT GAA CCG ATT TG-3' estos iniciadores corresponden a una región del gen *flaA*, involucrado en la adhesión e invasión de *Campylobacter jejuni* o *C. coli* a las células huésped; presentan una sensibilidad del 98.5 % y no detectan otras especies de *Campylobacter*.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA *Campylobacter jejuni-coli*

El ADN extraído del control positivo y el extraído a partir de las muestras clínicas fueron analizados mediante PCR empleando los iniciadores antes descritos. Cada reacción consistió en 6.5 µl de agua libre de nucleasas, 12.5 µl de Master-Mix, 2 µl de cada iniciador a una concentración de 10 µM, 1.5 µl de ADN del control positivo a una concentración de 0.1 ng/µl y 5 µl de ADN en el caso de las muestras clínicas. Las condiciones del ciclo en el termociclador (Corbett Research® CG1-96, USA) para *flaA* fueron: un ciclo inicial de desnaturalización de 94°C por 3 min y 30 ciclos de 94°C por 1 min, 50°C por 2 min para la alineación de iniciadores, 72°C por 1min, para la extensión y un último ciclo de 74°C por 5 min, para la desnaturalización final.[64]

RESULTADOS

NÚMERO DE MUESTRAS

El número de aves a muestrear, las cuales representan al total de nuestra población (718 individuos) se determinó con base a la fórmula anteriormente mencionada en donde sustituyéndola obtenemos:

$Z_{1-\alpha/2}^{2}$: Coeficiente de confianza
P: Prevalencia esperada
Δ : Precisión 0.05

Para construir el intervalo de confianza de 95% $Z_{1-\alpha/2}$ =1.96. La prevalencia esperada de *Salmonella* sp. y de *Campylobacter* sp. será alrededor de 0.1. Se decidió estimar con una precisión de ± 5%. Por tanto,

$n= (1.96^2 + 0.1*0.9) / 0.05$
$n= 70.9$

No obstante que el número requerido para este estudio fue de 71 muestras, se obtuvieron muestras cloacales a partir de 103 individuos adultos. Las muestras tuvieron la siguiente distribución: 34 individuos del orden de los Anátidos que corresponden al 33% siendo ésta el orden más representada durante nuestro muestreo, 26 individuos del orden Galliforme (25.24 %), 17 individuos del orden Psittaciforme (16.50 %), 12 individuos del orden Falconiforme (11.65 %), 6 individuos del orden Piciforme (5.82%), 4 individuos del orden Sphenisciforme (3.88 %), además de 2 Strigiformes y 2 Gruiformes que corresponden al 1.94 % cada una, siendo estas dos ordenes las que tuvieron menor representación durante el muestreo. (Cuadro 1)

CUADRO 1. NÚMERO DE INDIVIDUOS MUESTREADOS CLASIFICADOS POR ORDEN AVIAR

ORDEN	NÚMERO DE INDIVIDUOS	PORCENTAJE
Anseriformes	34	33 %
Falconiformes	12	11.65 %
Galliformes	26	25.24 %
Gruiformes	2	1.94 %
Piciformes	6	5.82 %
Psittaciformes	17	16.50 %
Sphenisciformes	4	3.88 %
Strigiformes	2	1.94 %
TOTAL	**103**	

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO TRADICIONAL

Salmonella

De un total de 103 muestras se recuperaron 28 aislamientos de colonias lactosa negativas a las que se les realizaron las pruebas bioquímicas de TSI, Citrato, Urea y SIM, no existiendo aislamientos compatibles con *Salmonella* sp mediante estas pruebas en ninguno de los ordenes aviares muestreados (0% de 103 muestras). Los géneros bacterianos identificados a partir de estos aislamientos fueron *Citrobacter*, *E. coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus* y *Serratia*.

Campylobacter

De un total de 103 muestras se recuperaron 9 aislamientos compatibles morfológicamente con *Campylobacter* sp. en la tinción de Gram de los cuales 5 individuos fueron anátidos que corresponden al 14.70% del total de esta orden y 4 del orden Galliforme que corresponde al 15.38% del total de aves muestreados en esta orden. Las ordenes Falconiforme, Gruiforme, Piciforme, Psittaciforme, Sphenisciforme y Strigiforme no presentaron aislamientos compatibles morfológicamente compatibles con *Campylobacter* sp. Las aves con mayor número de individuos muestreados fueron las que presentaron los aislamientos compatibles morfológicamente con *Campylobacter* sp. (Cuadro 2)

CUADRO 2. AISLAMIENTOS MORFOLOGICAMENTE COMPATIBLES CON *Campylobacter*

ORDEN	AISLAMIENTOS/ INDIVIDUOS	PORCENTAJE
Anseriformes	5 (34)	14.70 %
Falconiformes	0 (12)	0
Galliformes	4 (26)	15.38 %
Gruiformes	0 (2)	0
Piciformes	0 (6)	0
Psittaciformes	0 (17)	0
Sphenisciformes	0 (4)	0
Strigiformes	0 (2)	0
TOTAL	**9 (103)**	

DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Salmonella

EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE CALDO SELENITO

A partir de las extracciones de muestras de aves en caldo selenito, con el protocolo de Proteinasa K se obtuvieron muestras de ADN. Estas muestras al observarse en geles de agarosa al 1% teñidas con bromuro de etidio, mostraron bandas bien definidas, limpias y con escasa cantidad de ARN (Figura 1), por lo cual se consideraron óptimas para su utilización en la PCR para la determinación de la presencia de los genes *invA* y *sopE*.

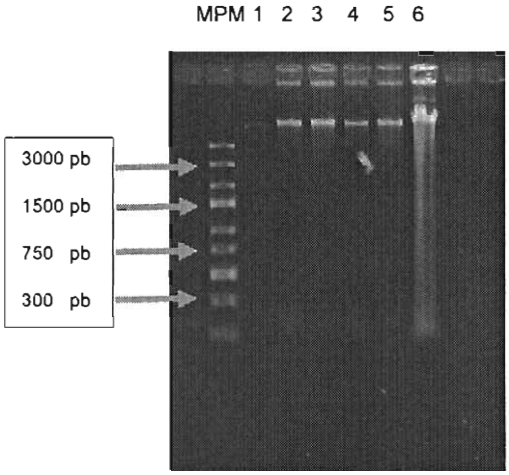

Figura 1. Fotografía de un gel de agarosa al 1% en TAE teñido con bromuro de etidio donde se muestra: MPM= Marcador de peso molecular Gene Ruler Express. Carriles 1-6 ADN de muestras clínicas extraídas a partir de Caldo Selenito.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA *Salmonella*

Para evaluar la capacidad mínima de detección de la PCR y confirmar el tamaño del producto esperado para cada par de iniciadores se utilizaron diluciones de las muestras con ADN proveniente de una cepa de *Salmonella typhimurium* a concentraciones de 100, 10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 ng/µl. En el caso del gen *invA* los iniciadores fueron capaces de detectar hasta 0.01 ng/µl de ADN testigo con un producto de amplificación de ± 280 pb (Figura 2). Para el caso de *sopE* los iniciadores detectaron hasta 0.1 ng/µl de ADN testigo con un producto de amplificación de ± 700 pb (Figura 3).

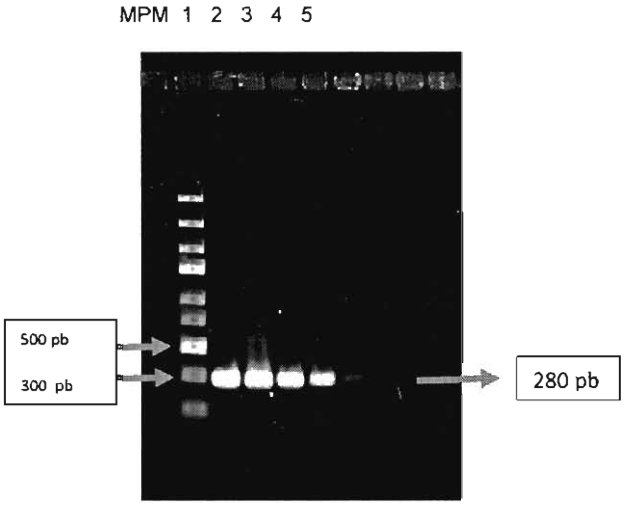

Figura 2. Fotografía de un gel de agarosa al 1% en TAE teñido con bromuro de etidio donde se muestra: MPM= Marcador de peso molecular Gene Ruler Express. Carriles 1-5= Fragmento del gen *invA* para *Salmonella* sp amplificado a partir del ADN control positivo de *Salmonella typhimurium* extraído de Caldo Selenito a concentraciones 100, 10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 ng/µl

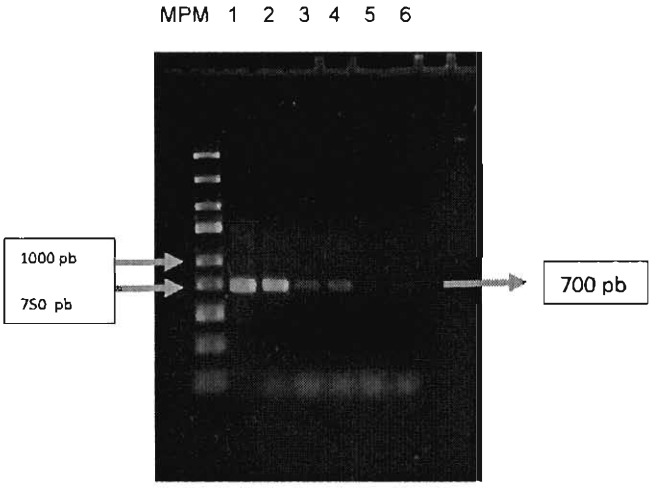

Figura 3. Fotografía de un gel de agarosa al 1% en TAE teñido con bromuro de etidio donde se muestra: MPM= Marcador de peso molecular Gene Ruler Express. Carriles1-6= Productos amplificados por PCR correspondiente a un fragmento del gen *sopE* para *Salmonella* sp a partir del ADN control positivo de *Salmonella typhimurium* extraído de Caldo Selenito a concentraciones 100, 10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 ng/µl.

Una vez establecida la eficacia de la técnica, se realizó la PCR a partir del ADN extraído de caldo selenito, inoculado previamente con las muestras cloacales, para la detección de los genes *invA* y *sopE*. De 103 muestras, 73 muestras (70.87%) presentaron producto de amplificación para el gen *invA* (Figura 4). Los ordenes Piciformes, Sphenisciformes, Gruiformes y Strigiformes, presentaron un 100 % de individuos positivos, siendo éstas ordenes las menos representadas durante el muestreo con 6, 4 y 2 individuos totales respectivamente. Las ordenes Psittaciformes y Falconiformes, mostraron un 88.2 % (15/17 individuos) y un 83.3 % (10/12 individuos). La orden Anseriforme presentó un 61.7 % (21/34 individuos) con productos de amplificación y las Galliformes obtuvieron el 50 % (13/26 individuos) siendo éstas órdenes las más representadas durante el muestreo; por otro lado 30 muestras correspondientes al 29.12 % de 103 individuos muestreados no presentaron producto de amplificación.

En el caso de las muestras evaluadas mediante la PCR para el gen *sopE* 58 muestras (56.3%) presentaron productos de amplificación (Figura 5) de los cuales las ordenes Piciformes, Sphenisciformes y Strigiformes presentaron un 100% de individuos positivos, con 6, 4 y 2 individuos totales respectivamente, seguidas por las ordenes Psittaciforme con un 76.4% (13 individuos de 17 totales) y Anseriforme con 61.7 % (21 individuos de 34). Las ordenes Falconiforme y Gruiforme mostraron un 50% de muestras positivas con 6 y 1 individuos positivos de 12 y 2 individuos totales respectivamente. El porcentaje más bajo de presentación para el gen *sopE* lo tuvo el orden Galliforme con 5 individuos positivos de un total de 26 que corresponden al 19.2 %; 45 muestras totales (43.6%) no presentaron productos de amplificación para este gen.

Las muestras que tuvieron productos de amplificación para ambos genes (*invA* y *sopE*) fueron 52 muestras (50.4%). Las ordenes Piciformes, Sphenisciformes y Strigiformes presentaron un 100% de individuos positivos, con 6, 4 y 2 individuos totales respectivamente. Los Psittaciformes y Falconiformes presentaron un 70.5% (12 individuos de 17 totales) y 58.3% (7 individuos de 12 totales) respectivamente. Los Anseriformes y Gruiformes obtuvieron un 50% de positividad con 17 y 1 individuos respectivamente de 34 y 2 individuos totales. El menor porcentaje de amplificación lo obtuvieron las Galliformes con un 11.5% (3 individuos de 26 totales). Veintidós muestras (21.35%) no presentaron ningún producto de amplificación considerándose negativas. (Cuadro 3).

CUADRO 3. MUESTRAS CLÍNICAS POSITIVAS A *Salmonella* sp MEDIANTE LA PCR PARA FRAGMENTOS DE LOS GENES *invA* y *sopE*

ORDEN	PCR *invA* + / (INDIVIDUOS)	(%)	PCR *sopE* + / (INDIVIDUOS)	(%)	PCR *invA* y *sopE* + / (INDIVIDUOS)	(%)
Anseriformes	21 (34)	61.7 %	21 (34)	61.7 %	17 (34)	50 %
Falconiformes	10 (12)	83.3 %	6 (12)	50 %	7 (12)	58.3 %
Galliformes	13 (26)	50 %	5 (26)	19.2 %	3 (26)	11.5 %
Gruiformes	2 (2)	100 %	1 (2)	50 %	1 (2)	50 %
Piciformes	6 (6)	100 %	6 (6)	100 %	6 (6)	100 %
Psittaciformes	15 (17)	88.2 %	13 (17)	76.4 %	12 (17)	70.5 %
Sphenisciformes	4 (4)	100 %	4 (4)	100 %	4 (4)	100 %
Strigiformes	2 (2)	100 %	2 (2)	100 %	2 (2)	100 %
TOTAL	**73 (103)**	**70.87%**	**58 (103)**	**56.3 %**	**52 (103)**	**50.4 %**

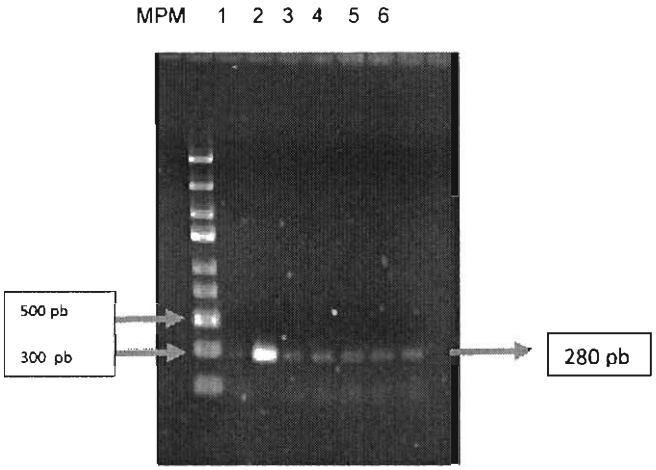

Figura 4. Fotografía de un gel de agarosa al 1% en TAE teñido con bromuro de etidio para un fragmento del gen *invA* donde se muestra: MPM = Marcador de peso molecular Gene Ruler Express. Carril 1 = Control positivo ADN de *Salmonella typhimurium* carriles 2 -6 = Productos amplificados por PCR correspondiente a un fragmento del gen *invA* para *Salmonella* sp a partir de muestras de ADN extraídas de Caldo Selenito.

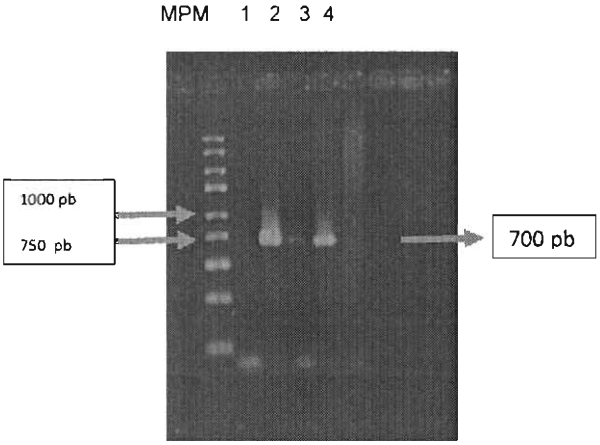

Figura 5. Fotografía de un gel de agarosa al 1% en TAE teñido con bromuro de etidio para un fragmento del gen *sopE* donde se muestra: MPM = Marcador de peso molecular Gene Ruler Express 1 = Control positivo ADN de *Salmonella typhimurium*. Carriles 2 -4 = Productos amplificados por PCR correspondientes a un fragmento del gen *sopE* para *Salmonella sp.* a partir de muestras de ADN extraídas de Caldo Selenito.

EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE CALDO TIOGLICOLATO

A partir de los cultivos en caldo tioglicolato, utilizando el protocolo de Isotiocianato de guanidina, descrito en este trabajo se obtuvieron muestras de ADN que al observarse en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio, mostraron bandas bien definidas y con abundante cantidad de ARN (Figura 6), por lo cual fue necesario agregar 2 µl de RNAsa (20 µg/ml) de antes de su análisis para evitar factores inhibitorios en la PCR.

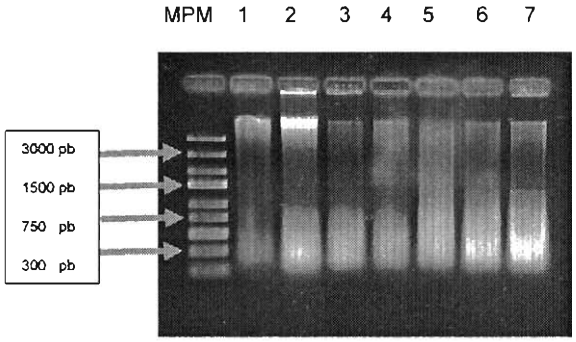

Figura 6. Fotografía de un gel de agarosa al 1% en TAE teñido con bromuro de etidio donde se muestra: MPM= Marcador de peso molecular Gene Ruler Express. Carriles 1-7 ADN de muestras clínicas extraídas a partir de Caldo Tioglicolato.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA *Campylobacter*

Se realizó la PCR para la detección del gen *flaA* a partir del ADN extraído de caldo tioglicolato, inoculado previamente con las muestras cloacales y con los aislamientos compatibles morfológicamente con *Campylobacter* sp. Para probar la capacidad de detección y confirmar el tamaño de producto esperado ± 450 pb se utilizaron diluciones de las muestras con ADN proveniente de una cepa de *Campylobacter jejuni* a concentraciones de 100, 10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 ng/µl, los iniciadores fueron capaces de detectar hasta 0.01 ng/µl. (Figura 7)

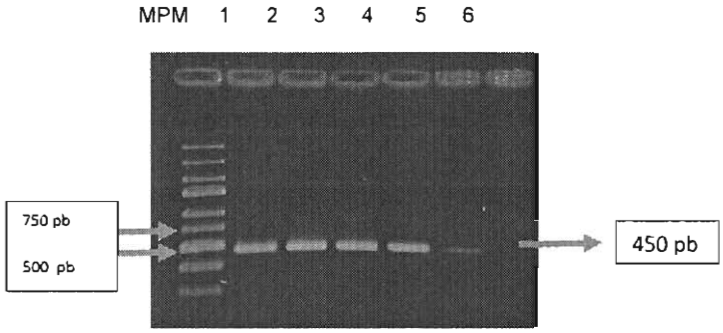

Figura 7. Fotografía de un gel de agarosa al 1% en TAE teñido con bromuro de etidio para un fragmento del gen *flaA* donde se muestra: MPM= Marcador de peso molecular Gene Ruler Express. Carriles 1-6= Productos amplificados por PCR correspondientes a un fragmento del gen *flaA* para *Campylobacter jejuni-coli* a partir del ADN control positivo de *Campylobacter jejuni* extraído de Caldo Tioglicolato a concentraciones 100, 10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 ng/µl.

Una vez establecidos los valores de detección mínima de ADN de *Campylobacter* sp. se procedió a realizar la PCR a partir del ADN extraído de caldo tioglicolato, inoculado previamente con las muestras cloacales, para la detección del gen *flaA*. Se analizó el ADN extraído de 103 muestras aviares obteniendo como resultado 19 muestras positivas correspondientes al 18.44 % del total de individuos muestreados, de las cuales 2 individuos Strigiformes que corresponden al 100% de éste orden presentaron productos de amplificación, seguidas del 50% de Gruiformes (1 individuo de 2), 5 Psittaciformes de un total de 17 individuos que corresponden al 29.41% para este orden, 7 individuos de 26 correspondientes al 26.92% del orden Galliforme y 4 individuos (11.76%) de un total de 34 Anseriformes, siendo ésta el orden más representada durante nuestro muestreo. Ochenta y cuatro muestras correspondientes al 81.55 % no presentaron productos de amplificación para este gen considerándose negativas de las cuales los ordenes Falconiformes, Piciformes y Sphenisciformes con un total de 12, 6 y 4 individuos respectivamente no presentaron ningún producto de amplificación. (Figura 8 y Cuadro 4)

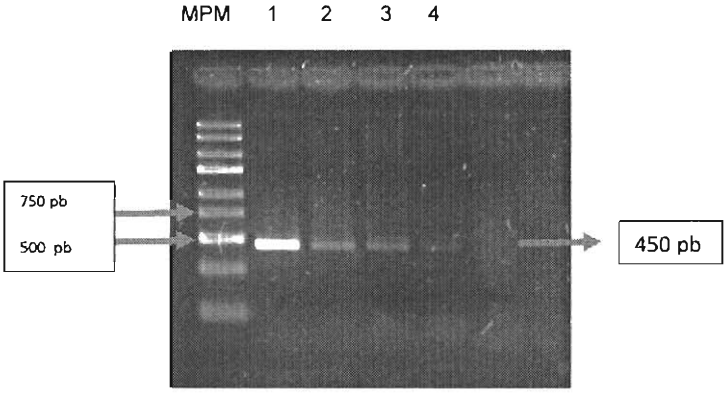

Figura 8. Fotografía de un gel de agarosa al 1% en TAE teñido con bromuro de etidio donde se muestra: MPM = Marcador de peso molecular Gene Ruler Express. Carril 1 = Control positivo ADN de *Campylobacter jejuni* carriles 2- 4 = Productos amplificados por PCR correspondientes a un fragmento del gen *flaA* para *Campylobacter jejuni-coli* a partir de muestras de ADN, extraídas de Caldo Tioglicolato.

CUADRO 4. MUESTRAS CLÍNICAS POSITIVAS A *Campylobacter jejuni- Campylobacter coli* **MEDIANTE LA PCR PARA UN FRAGMENTO DEL GEN *flaA***

ORDEN	INDIVIDUOS + a *flaA*	PORCENTAJE
Anseriformes	4 (34)	11.76 %
Falconiformes	0 (12)	0 %
Galliformes	7 (26)	26.92 %
Gruiformes	1 (2)	50 %
Piciformes	0 (6)	0 %
Psittaciformes	5 (17)	29.41 %
Sphenisciformes	0 (4)	0 %
Strigiformes	2 (2)	100 %
TOTAL	**19 (103)**	

DISCUSIÓN

Con la finalidad de determinar la presencia de *Salmonella* sp. y *Campylobacter* sp. se utilizaron pruebas diagnósticas de bacteriología tradicional y molecular útiles para la vigilancia epidemiológica de aves en peligro de extinción.

En esta investigación, el uso de iniciador para el gen *invA*, fue capaz de amplificar en una primera PCR, 73 de 103 muestras, correspondiente al 70.87 %, lo que coincide con lo reportado en el año 2000 en la población de aves silvestres de los E.U.A. donde, se logró la identificación de este gen en 15 de 22 aislamientos (68.18%) de serotipos *S. alabama*, *S. anatum* y *S. typhimurium*, provenientes de Casuariformes, Columbiformes, Galliformes, Passeriformes, Psittaciformes y Strigiformes[75], En Inglaterra entre los años 2005 – 2006, se identificó este gen en el 100 % de aislamientos de *S. typhimurium*, *S. newport* y *S. seftenberg* provenientes de Columbiformes y Passeriformes.[76]

En una segunda PCR, se obtuvieron productos de amplificación para un fragmento del gen *sopE,* en 58 de 103 muestras, lo que corresponde a un 56.31% de individuos positivos. El gen *sopE*, de igual manera es altamente conservado en este género y ha sido probado para determinar la presencia de *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis* y *S. gallinarum* en aves domésticas.[77] Entre 2005 y 2006 en E.U.A., este gen fue buscado en aislamientos de *S. typhymurium* en aves silvestres sin encontrarlo.[76]

Como resultado de ambas PCR, 52 de 103 muestras, correspondientes al 50.48 %, se consideraron como positivas a la presencia de *Salmonella* sp, al presentar productos de amplificación para ambos *invA* y *sopE*, genes asociados a patogenicidad tanto en animales como en humanos.[77-79]

Se consideraron negativas a la presencia de *Salmonella* sp. a 22 de 103 muestras, correspondientes al 21.35 % al no presentar productos de amplificación en ninguno de los dos genes. En otras investigaciones en aves silvestres, los productos de amplificación del gen *invA* han sido asociados a aislamientos de cepas de *Salmonella*, las cuales no presentaron correlación con cepas provenientes del ambiente, ni con las aisladas de humanos.[76, 80] En el caso de los productos de amplificación correspondientes al gen *sopE*, éstos se han relacionado con aislamientos obtenidos en seis brotes epidémicos ocasionados por *Salmonella typhimurium* en humanos.[81]

Los resultados obtenidos sugieren que la presencia de éstos dos genes en la población de aves en cautiverio en el Zoológico de Chapultepec poseen características de invasividad que podrían afectar aves, reptiles, mamíferos y humanos.

No se lograron aislamientos en ninguna de las 103 muestras, compatibles con *Salmonella* sp mediante el uso de técnicas bacteriológicas tradicionales. En otros reportes, se han obtenido aislamientos de diversas especies de *Salmonella* sp. provenientes de anátidos silvestres, Columbiformes y Paseriformes. En Inglaterra se logró un 5.79 % de aislamientos positivos en 1970, un 0.17 % en 1977 y un 35 % entre 2005 y 2006 principalmente de los serotipos *S. typhimurium*, *S. paratyphi* y *S.*

anatum.[78, 82, 83] En el caso de Trinidad y Tobago, entre 1993 y 1996 se obtuvo un 3 % de aislamientos provenientes de Anatidos, Falconiformes, Piciformes, Psittaciformes y Strigiformes.[84] En Noruega entre los años 1969 y 2000, se logró el aislamiento de serotipos *S. typhimurium* y *S. paratyphi* a partir de un 88.34 % de aves silvestres como Ciconiformes, Columbiformes, Falconiformes, Gruiformes y Passeriformes.[85] Para 2003 en Colorado E.U.A. reportan un 3.2% de aislamientos de *S. newport*, *S. senftenber*, *S. typhimurium* y *S. montevideo* en palomas (*Columbia livia*)[8] y entre los años 2003 y 2006 en la bahía de Tokyo Japón se reporta un 5.79 % de aislamientos de *S. typhimurium* en Anatidos, Charadriiformes, Ciconiformes, Cuculiformes, Galliformes, Gruiformes, Passeriformes, Pelecaniformes y Procellariformes.[82]

En nuestro país, en 1989, se reporta el aislamiento de *Salmonella* sp en 33.33 % de flamencos en estado agónico después de un proceso de intoxicación muestreados en Yucatán.[10] Algo que hay que considerar es que en los trabajos antes mencionados utilizaron protocolos de incubación en diversos medios selectivos para salmonella a temperaturas entre 37 y 42°C, lográndose obtener aislamientos en todos los medios utilizados y en todos protocolos de incubación.[17, 86] Además en casi todos, el mayor número de aislamientos se obtuvieron a partir de aves enfermas o cadáveres encontrados en la zona de muestreo. Es importante considerar que los procesos de inmunosupresión, pueden promover la proliferación de microorganismos patógenos en tracto digestivo como lo es *Salmonella* sp. facilitando el cultivo de enteropatógenos.[20, 21, 46]

Una probable causa del resultado negativo en los cultivos bacteriológicos puede deberse a que las aves utilizadas para el muestreo se encontraban clínicamente sanas, lo que favoreció la estabilidad de la microbiota intestinal normal, además de existir factores microambientales *in vivo* e *in vitro* que pudieron promover el desarrollo de formas bacterianas viables no cultivables.[87-90]

Con respecto a *Campylobacter* sp se obtuvieron 9 aislamientos morfológicamente compatibles con este microorganismo que corresponden al 8.73 % de las aves muestreadas, obtenidas principalmente de Anseriformes y Galliformes. Este porcentaje fue bajo en comparación con otros estudios como el de Colorado E.U.A. donde se obtuvo un 35% de aislamientos de *Campylobacter jejuni* a partir de muestras de patos silvestres los cuales no presentaban signología de enfermedad[91] o en el caso de Japón donde entre los años 1981 a 1982 se logró un 14.05% de aislamientos de *Campylobacter jejuni* a partir de Columbiformes, Galliformes, Gruiformes y Passeriformes.[15] En el 2002 en Suecia se reportaron altas prevalencias de *Campylobacter jejuni, C. coli* y *C.lari* a partir de 14 órdenes de aves silvestres, observando una presentación menor en las aves de hábitos alimenticios granívoros e insectívoros.[13] Entre 1990 – 2003 en un zoológico de Londres, se reportaron prevalencias entre 0 al 44 % entre 12 ordenes aviares distintas y para 2009, se reportó una prevalencia del 1.4% de *C. jejuni, C. Coli* y *C. lari* a partir de 17 órdenes de aves silvestres.[80, 92]

En la presente investigación, los aislamientos compatibles con *Campylobacter* sp. se sometieron a la técnica de reacción en cadena de la polimerasa, con los iniciadores

para amplificar un fragmento del gen *flaA*. Dicho gen, que codifica para una proteína que permite la adhesión e invasión a células huésped, ya se había utilizado para el diagnóstico de este agente en aves silvestres, debido a que es altamente conservado en *Campylobacter jejuni* y *C. coli*.[16]

Se obtuvieron amplificaciones del fragmento de este gen en 19 de 103 muestras, correspondientes al 18.44 %. De los 9 aislamientos bacteriológicos compatibles morfológicamente con *Campylobacter* sp. 8 presentaron productos de amplificación correspondiente a *flaA*. Los géneros aviares con amplificaciones positivas fueron Anseriformes, Galliformes, Gruiformes, Psitaciformes y Strigiformes

Estos resultados, tuvieron correlación con los hallazgos del Zoológico de Londres. Esta investigación encontró un 0% de presentación en Falconiformes y Piciformes, y un 50% en Gruifomes, mientras que en Londres se obtuvieron un 0% y 44%, respectivamente, para los mismos órdenes.[92] La baja correlación de los hallazgos de *Campylobacter* sp. entre aves silvestres y colecciones zoológicas puede deberse a que la presencia de éste microorganismo, depende de los hábitos alimenticios de las diferentes ordenes aviares y sus sitios de alimentación, ya que se ha observado que las aves silvestres que consumen alimento cerca de fuentes de agua contaminada por comunidades humanas o que se alimentan en basureros municipales, tienden a presentar mayores prevalencias de Campylobacter. Estas cepas, además, comparten características entre aves silvestres y humanos.[6, 15-17, 91-97]

Las aves silvestres debido a sus características migratorias son consideradas tanto como acarreadores biológicos, mecánicos o diseminadores de múltiples agentes potencialmente infecciosos, como ectoparásitos, pudiendo ser causantes de zoonosis.[98]

Los datos epidemiológicos obtenidos de aislamientos o estudios moleculares, evidencian la diseminación de estos agentes en el ambiente, en poblaciones de animales silvestres, domésticos e incluso en humanos; sin embargo algunas investigaciones muestran distintas panorámicas en el flujo de diseminación de *Salmonella* sp. y *Campylobacter* sp entre aves silvestres – humanos ó humanos-aves silvestres, esto debido a la presencia de aislamientos genotípicamente idénticos entre poblaciones de aves silvestres y poblaciones humanas ó aislamientos bacterianos provenientes de aves silvestres con resistencia antimicrobiana y genotípicamente idénticas a las obtenidas de poblaciones humanas o de sitios en donde se acumulan los desechos de las mismas.[16, 18, 93-96, 99-103]

Los resultados del trabajo, demostraron la presencia de *Salmonella* sp y *Campylobacter* sp en aves del Zoológico de Chapultepec "Alfonso L. Herrera". Dos posibles causas de que dichos microorganismos se encuentren en la población aviar cautiva son:

Vía ave – ave. Al no existir un monitoreo cuarentenario rutinario, no es posible determinar, el flujo de microorganismos entre las aves. No se puede confirmar si los ejemplares de la colección zoológica, ingresaron como portadores o si adquirieron a

dichas bacterias estando ya en el Zoológico, mediante el contacto con aves de vida libre, que habitan en el Bosque de Chapultepec y que posiblemente también sean portadores.

Vía humano –ave. Gran parte de la dieta ofrecida a las aves son productos para consumo humano, además de ser seleccionados y preparados por personal de la institución. Es posible que en algún punto de estos procedimientos, se realice la contaminación.

Durante las labores de alimentación, limpieza, y demás manejos que impliquen el contacto directo con las aves, sus desechos y secreciones, pueden ser vías de contaminación para el personal. Es importante tener presente que los microorganismos identificados en este trabajo poseen características de invasividad y de patogenicidad, con potencial zoonótico

CONCLUSIONES

I. Se demostró la presencia de ADN de *Salmonella* sp., mediante PCR en la colección de aves exhibidas en el Zoológico de Chapultepec "Alfonso L. Herrera".

II. Los iniciadores para la amplificación de fragmentos de los genes *invA* y *sopE* a partir de heces, fueron útiles para la detección de ADN de *Salmonella* sp. en aves.

III. Se demostró la presencia de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* mediante métodos de bacteriología tradicional y molecular en la colección de aves exhibidas en el Zoológico de Chapultepec "Alfonso L. Herrera".

IV. Los iniciadores para la amplificación de un fragmento del gen *flaA* a partir de heces, fueron útiles para la detección de ADN de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* en aves.

PROSPECTIVA

La utilización de métodos de diagnóstico tradicional y molecular para la determinación de la presencia *Salmonella* sp y *Campylobacter* sp. son de suma importancia para establecer un panorama epidemiológico de las poblaciones animales y humanas, facilitando el monitoreo de potenciales patógenos que puedan ocasionar brotes y pongan en riesgo la estabilidad de las poblaciones, situación prioritaria en el caso de animales silvestres en peligro de extinción.

Este trabajo provee de técnicas de monitoreo altamente específicas, sensibles, rápidas y de bajo costo, las cuales son de gran ayuda en los zoológicos para mantener su invaluable diversidad de especies, además de reafirmar sus compromisos y objetivos institucionales al fomentar de una manera activa, el desarrollo de avances tecnológicos que pueden utilizarse en beneficio de la conservación de especies en vida libre.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguirre A A, Ostfeld.R.S., Tabor G M, House C, Pearl M C., ed. *Conservation Medicine. Ecological health in Practice*. 2002, Oxford University Press. New York.

2. Tabor G.M., R.S.Ostfeld., M. Poss, A.P. Dobson, A.A. Aguirre., *Conservation Biology and the Health Sciences: Defining the Research Priorities of Conservation Medicine*. 2da ed. 2001, ed Orians. Washington D.C. 155-173.

3. Dirección General de Zoológicos de la Ciudad de México, *Los Zoológicos de la Ciudad de México. Centros de Conservación del Siglo XXI.*, G.D.F,2001-2006, ed. Secretaría del Medio Ambiente: México.

4. Altman Robert, C.S., Gerry Dorrestein, Quesenberry Katherin. *Avian Medicine and Sugery*. 1997, ed. WB. Saunders Company: Pennsylvania Philadelphia, USA.

5. Lillehaug A., J.M., Bersjo B., Hofshagen M., Tharaldsen J., Nesse L.L., Handeland K, *Screening of Feral Pigeon (Colomba livia), Mallard (Anas plathyrhynchos), Graylag Goose (Anser anser) Populations for Campylobacter spp., Salmonella spp., Avian Influenza Virus and Avian Paramyxovirus.* Act. Scand., 2005. **46**: p. 193-202.

6. Reed Kurt D. *Birds, Migration and Emerging Zoonoses: West Nile Virus, Lyme Disease, Influenza A and Enteropathogens*. Clinical Medicine and Reserch, 2003. 1(1): p. 5-12.

7. Daoust Pierre-Yves, B.G.D., Lyn Ferns, James Goltz, Scott Mc Burney, Poppe Cornelius, Whitney Hugh, *Salmonellosis in Songbirds in the Canadian Atlantic provinces during winter-summer 1997-1998*. Canadian Veterinary Journal, 2000. **41**: p. 54-59.

8. Pedersen K., C.I., Andelt W., Salman M., *Prevalence of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli and Salmonella enterica in Rock Pigeons Captured in Fort Collins, Colorado*. Journal of Wildlife Diseases, 2006. **42**(1): p. 46-53.

9. Brittingham Margaret Clarck, T.S.A., Duncan Ruth, *A Survey of the Prevelence of Selected Bacteria In Wild Birds*. Journal of Wildlife Diseases, 1988. **24**(2): p. 299-307.

10. Aguirre A., C.R., MacLean R., Quan J., Spraker T., *Occurrence of Potential Pathogens in Wild Caribbean Flamingos (Phoenicopterus ruber ruber) During A Lead Poisoning Die off in Yucatan; Mexico*. Journal of Zoo and Wildlife Medicine, 1991. **22**(4): p. 470-475.

11. Arguelles A., Hernández N., Rodríguez F., Maldonado j., Rodríguez J., Gutierréz G., *Seroprevalence of Antibodies Against Salmonella enterica subsp. enterica serovar Gallinarum-Pullorum in Wild Doves (Zenaida asiatica and Zenaida macroura) from the Northeast of Mexico.* Jourbal Preventive Veterinary Medicine, 2010. **93**: p. 77-79.

12. SAGARPA. NOM-005-ZOO-1993, *Campaña Nacional Contra la Salmonelosis Aviar.*

13. Waldesntrom J., Broman T., Carlsson I., Hasselquist D., Achterberg P., Wagenaar J., Olsen B., *Prevalence of Campylobacter jejuni, Campylobacter lari, and Campylobacter coli in Different Ecological Guilds and Taxa of Migrating Birds.* Applied and Enviromental Microbiology, 2002. **68**(12): p. 5911-5917.

14. Adesiyun A., Seepersadsingh N., Inder L., Caesar K., *Some Bacterial Enteropathogens in Wildlife and Racing Pigeons from Trinidad.* Journal of Wildlife Diseases, 1998. **34**(1): p. 73-80.

15. Kimito Ito, Yoko Kubokura, Ken-ichi Kaneko, Yukitoshi Totake, Masuo Ogawa, *Occurrence of Campylobacter jejuni in Free-Living Wild Birds Fron Japan.* Journal of Wildlife Diseases, 1988. **24**(3): p. 467-470.

16. Petersen L., Nielsen M., Engberg J., On W., Dietz H., *Comparison of Genotypes and Serotypes of Campylobacter jejuni Isolated from Danish Wild mammals and Birds and Broilers Flocks and Humans.* Applied and Enviromental Microbiology, 2001. **67**(7): p. 3115-3121.

17. Kapperud G., Rosef O., *Avian Wildlife Reservoir of Campylobacter fetus subsp. jejuni, Yersinia spp., and Salmonella spp. in Norway.* Applied and Enviromental Microbiology, 1983. **45**(2): p. 375-380.

18. Horrocks S., Anderson R., Nisbet D., Ricke S., *Incidence and Ecology of Campylobacter jejuni and coli in Animals.* Anaerobe, 2008. **30**: p. 1-8.

19. Coetzer Jaw and Tustin R., ed. *Infectious Diseases of Livestock.* 2nd Edition ed. Vol. 3. 2004, Oxford University Press: Southern Africa.

20. Dwight C Hirsh, MacLahan James N., Walker Richard L., ed. *Veterinary Microbiology.* 2nd Edition ed. 2004, Black Well Publishing: Iowa USA.

21. Wray C. and Wray A., ed. *Salmonella in Domestic Animals.* 2000, CABI Publishing: New York, USA.

22. Buchholz, P.S., Fairbrother A., *Pathogenicity of Salmonella pullorum in Northern Bobwhite quail and Mallard ducks.* ***Avian Diseases***, 1992. **36**: p. 304-312.

23. Price, J.I., Dougherty, E., Bruner, D.J.W., *Salmonella infections in white pekin duck: a short summary of the years 1950-60.* Avian Diseases, 1962. **6**: p. 145-147.

24. *Eponimos médicos, Salmonella. Daniel Elmer Salmón.* Serial en Línea 2008; Available from: <http://www.historiadelamedicina.org/Salmon.html>.

25. World Health Organization, *Foodborne Disease Surveallance.* 2010. www.who.int/foodborne_disease

26. Center of Diseases Control and Prevention. *Estimates for foodborne illnesses.* 2011. www.cdc.gov/foodborneburden/2011

27. Secretaria de Salud. *Enfermedades Diarréicas.* 2011; www.cenavece.salud.gob.mx}.

28. Kilger, G., Grimont, P.A.D., *Differentiation of Salmonella phase 1 flagellar antigen types by restriction of the amplified fliC gene.* Jounal of Clinical Microbiology, 1993. **31**: p. 1108-1110.

29. Jones, C. Aizawa, S.-I., *The bacterial flagellum and flagellar motor: structure, assembly and function.* Advances in Microbiology Physiology, 1991. **32**: p. 110-172.

30. Selander, R.K., Beltran, P., Smith, N.H., Barker, R.M., Crichton, P.B., Old, D., Musser, J.M. and Whittam, T.S., *Genetic population structure, clonal phylogeny, and pathogenicity of Salmonella paratyphi B.* Infection and Immunity, 1990. **58**: p. 1891-1901.

31. Selander, R.K., Beltran, P., Smith, N.H., Helmuth, R., Rubin, F.A., Kopecko, D.J., Ferris, K., Tall, B.D., Cravioto, A. and Musser, J. M., *Evolutionary genetic relationships of clones of Salmonella serovars that cause human typhoid and other enteric fevers.* Infection and Immunity, 1990. **58**: p. 2262-2275.

32. Craigie, J. Yen C.H., *The demonstration of types of B. typhosus by means of preparations of type II Vi phage. II. The stability and epidemiological significance of V form types of B. typhosus.* Canadian Public Health Journal Medical Microbiology, 1938. **29**: p. 484-496.

33. Hueck CJ., *Type III Protein Secretion System in Bacterial Pathogens of Animals and Plants.* Microbiol. Mol Rev., 1998. **62**: p. 379-433.

34. Galán JE, Zhou D., *Stricking a balance: Modulation of the Actin Cytoskeleton by Salmonella.* Proc. Natl ACd Sci, 2001. **97**: p. 8754-8761.

35. Bliska J.B., Galán J., Falkow S., *Signal Transduction in the Mamalian Cell During Bacterial Attachment and Entry*. Cell, 1993. **73**: p. 903-920.

36. Groisman EA, Blanc-Potard A.B, Uchiya K., *Pathogenicity Islands and the Evolution of Salmonella Virulence*. American Society for Microbiology, 1999: p. 127-150.

37. Ochman H, Soncini F., Groisman EA., *Identification of a Pathogenicity Island Requiered for Salmonella Sirvival in Host Cells*. Proc. Natl ACd Sci, 1996. **93**: p. 7800-78804.

38. Murray PR, Rosenthal .K., Kobayashi GS, Pfaller MA., ed. *Salmonella In: Michael Brown*. 3 er ed., ed. M. Microbiology1998, Mosby Inc.: St. Louis. 237-239.

39. Darwin KH, Miller V., *Molecular Basis of the Interaction of Salmonella With the Intestinal Mucosa*. Mol. Microbiol. Rev., 1999. **12**: p. 405-428.

40. Bajaj VR., Lucas L., Hwang C., Lee CA., *Coordinate Regulation of Salmonella typhimurium Invasion Genes by Enviromental and Regulatory Factors is Mediated by Control of HilA Expresion*. Mol. Microbiol, 1996. **22**: p. 703-714.

41. Darwin KH, Miller V., *Inv F is Requiered for Expression of Genes Encoding Proteins Secreted by the SPI1 Type III Secretion Appparatus in Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol., 1999. **181**: p. 4949-4954.

42. Sánchez Jiménez M.M., Cardona Castro N., *Mecanismos de interacción de Salmonella con la Mucosa Intestinal*. Infectio, 2003. **7**(1): p. 22-29.

43. Xuan Guo. Jinru Chen, Beuchat Larry R. Brackett Robert E., *PCR Detection of Salmonella enteric Serotype Montevideo in and Raw Tomatoes Using Primers Derived from hilA*. Applied and Enviromental Microbiology, 2002. **66**(12): p. 1. 5248-5252.

44. Lagatolla Cristina, D.L., Tonin Enrico, Lavenia Annamaría, Michele Mirco, Tommasini Tiziana, Monti-Bragadin Carlo, *PCR Ribotyping for Characterizing Salmonella Isolates of Different Serotypes*. Journal of Clinical Microbilogy, 1996. **43**(10): p. 2440-2443.

45. Chiu C., Ou.J., *Rapid Identification of Salmonella Serovars in feces by Specific Detection of Virulence Genes, invA and spvC, by an Enrichment Broth Culture-Multiplex PCR Combination Assay*. Journal of Clinical Microbiology, 1996. **34**(10): p. 2619-2622.

46. Joklik W, Willet H., Amos B, Wilfert C. , ed. *Zinsser Microbiology*. 20th ed ed. 1992, Appleton and lange: Connecticut USA.

47. OIE, *Manual sobre animales terrestres C. jejuni y C. coli*, 2004, Ed. OIE E.U.

48. Skirrow M.B., Blaser M.J., ed. *Clinical aspects of Campylobacter infection.* Segunda edición ed. 2000, Nachamkin I. & M.J. Blaser, eds. ASM Press: Washington DC, E.U. . 69-88.

49. Tauxer R.V., ed. *Epidemiology of Campylobacter jejuni infections in the United States and other industrialized nations. Campylobacter jejuni:* current state and future trends1992, Blaser M.J. & Tompkins L.S., eds. ASM Press: Washington DC, USA,. 9-19.

50. Lastovica A.J., Skirrow M.B., ed. *Campylobacter.* Second Edition ed. Clinical significance of *Campylobacter* and related species other than *Campylobacter jejuni* and *C. coli.* 2000, Nachamkin I. & M.J. Blaser, eds. ASM Press: Washington DC, USA. 89-120.

51. Friedman C.R., Neimann J., Wegener H.C. & Tauxe R.V., ed. *Campylobacter.* Second Edition ed. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations.2000: Washington DC, USA. 121-138.

52. Fox J.G., Moore R., Ackerman J.I., *Campylobacter jejuni-associated diarrhea in dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc,* 1983. **183**: p. 1430-1433.

53. Torre E., *Factors influencing shedding of Campylobacter jejuni in dogs without diarrhea. Am. J. Vet. Res.*, 1993. **54**: p. 260-262.

54. Atabay H.I., Corry J.E.L., *The isolation and prevalence of campylobacters from dairy cattle using a variety of methods. J. Appl. Microbiol.*, 1998. **84**: p. 733-740.

55. Newell Duim B., Van Bergen M.A.P., Grogono-Thomas R. & Wagenaar J.A., *Speciation, subspeciation and subtyping of Campylobacter fetus associated with infertility within the UK. Cattle Practice,* 2000. **8**: p. 421-425.

56. Luechtefeld N.W., Wang .W.L., Blaser M.J. & Reller L.B., *Evaluation of transport and storage techniques for isolation of Campylobacter fetus subsp. jejuni from turkey cecal specimens. J. Clin. Microbiol.*, 1981. **13**: p. 438-443.

57. Sjogren E., Lindblom G., Kaijser B., *Comparison of different procedures, transport media, and enrichment media for isolation of Campylobacter species from healthy laying hens and humans with diarrhea.* Journal of Clinical Microbiology, 1987. **25**: p. 1966-1968.

58. Poly F, Guerry P., *Pathogenesis of Campylobacter.* Curr. Opin. Gastroenterol., 2008. **24**: p. 27-31.

59. Leon-Kempis MR, Guccione E., Mulholland F, *et al.*, *The Campylobacter jejuni PEB1 a Adhesin is an Aspartate/Glutamate-binding Protein of an ABC*

Transporter Essential for Microaerobic Growth on Dicarboxylic Amino Acids. Mol. Microbiol, 2006. **60**: p. 1262-1275.

60. Grant C.C., Konkei M., Cieplak W Jr, Tompkins LS. , *Role of Flagella in Adherence, Internationalization and Traslocation of Campylobacter jejuni in Non Polarized and Polarized Epithelial Cell Cultures.* Infect. Immun., 1993. **61**: p. 1764-1771.

61. Goon S, Ewing C.P., Lorenzo M, *et al.*, *A s^{28} Nonflagella Gene Contributes to Virulence of Campylobacter jejuni 81-176.* Infect. Immun., 2006. **74**: p. 769-772.

62. Wassenaar TM., *Toxin Production by Campylobacter spp.* Clinical Microbiol. Rev., 1997. **10**: p. 466-476.

63. Ruíz-Palacios GM, Torres J., Torres E., Escamilla B, Ruíz Palacios R., Tamayo J., *Cholera-like Enterotoxin Produced by Campylobacter jejeuni.* Lancet, 1983: p. 250-253.

64. Calderón Gómez L. I., *Detección de Campylobacter jejuni, C. coli, C. fetus en muestras clínicas mediante la reacción en cadena de la polimerasa*, in *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnia*2002, Universidad Nacional Autónoma de México: México D.F.

65. Lara-tejero M, Galán J., *Cytolethal Distending Toxin: Limited Damage as a Strategy to Modulate Cellular Functions.* Trends Microbiol., 2002. **10**: p. 147-152.

66. Palyada K, Threadgill D., Stintzi A. , *Iron Acquisition and Regulation in Campylobacter jejuni.* J. Bacteriol., 2004. **186**: p. 4714-4729.

67. Ridley KA, Rock J., Li Y, Ketley JM., *Heme Utilization in Campylobacter jejuni.* J. Bacteriol., 2006. **188**: p. 7862-7875.

68. Naikare H, Payalda K., Panciera R, *et al.*, *Major Role for FeoB in Campylobacter jejuni ferrous Iron Acquuisition, Gut Colonization, and Intracellular Survival.* Infect. Immun., 2006. **74**: p. 5433-5444.

69. Tankouo-Sandjong B., *Multilocus Secuence Typing Based on Virulence Genes, for Molecular Typing of Salmonella enteric subsp enterica serovars.* Journal of Microbiology Methods, 2007. **69**: p. 23-36.

70. Oyofo B., Thornton S., Burr D., Trust T., Pavloskis O., Guerry P., *Specific Detection of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli by Using Polimerase Chain Reaction.* Journal Of Clinical Microbiology, 1992. **30**(10): p. 2613-2619.

71. Hong Y., Berrang M., Lui T., Hofacre C., Sanchez S., Wang L., Maurer J., *Rapid Detection of Campylobacter coli, C. jejuni, and Salmonella enterica on Poultry*

carcasses by Using PCR-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Applied and Enviromental Microbiology, 2003. **69**(4): p. 3492-3499.

72. Wayne W. Daniel., *Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud.* 2da ed. Ed. Limusa 1985: p. 140-142. México.

73. OIE *Manual sobre animales terrestres Salmonelosis.* 2004. Capitulo 2.10.03.

74. OIE *Manual sobre animales terrestres pulorosis y tifosis aviar.* 2004.

75. Hudson C., Quist C., Lee M., Keyes K., Dodson S., Morales C., Sanchez S., White D., Maurer J., *Genetic Relatedness of Salmonella Isolates from Nondomestic Birds in Southeastern United States.* Journal of Clinical Microbiology, 2000. **38**(5): p. 1860-1865.

76. Hughes I., Shoplan S., Wigley P., Brandon H., Leatherbarrow H., Williams N., Bennet M., Pinna E., Laeson B., Cunningham A., Chantrey J., *Characterisation of Salmonella enterica serotype Typhimurium Isolates from Wild Birds in Northern England from 2005-2006.* BMC Veterinary Research, 2008.

77. Rahman H., Streckel W., Tschape P., *Presence of SopE gene and its Phenotypic Expression among different serovars of Salmonella Isolated from Man and Animals.* Indian Jounal Medical Research, 2004. **120**: p. 35-38.

78. Rudolph M., Weiser C., Mirold S., Hillenbrand B., bader B., Wittinghofer A., Hardt W., *Biochemical Analysis of SopE from Salmonella typhimurium, a Highly Efficient Guanosine Nucleotide Exchange Factor for RhoGTPases.* The Journal of Biological Chemestry, 1999. **274**(43): p. 30501-30509.

79. Bakshi C., Singh V., Wood M., Jones P., Wallis S., Galyov E., *Identification of SopE2, a Salmonella Secreted Protein Which Is Highly Homologous to SopE and Ivolved in Bacterial Invasion of Epithelial Cells.* Journal of Bacteriology, 2000. **182**(8): p. 2341-2344.

80. Hughes L., Bennet M., Coffey P., Elliot J., Jones R., Jones C., Lahuerta-Marin A., Leatherbarrow H., McNiffe K., Norman D., Williams N., Chantrey J., *Molecular Epidemiology and Characterization of Campylobacter spp. Isolated from Wild Bird in Northern England.* Applied and Enviromental Microbiology, 2009. **75**(10): p. 3007-3015.

81. Mirold S., Rabsch W., Rohde M., Stender S., Tschape H., Russman H., Igwe E., Hardt W., *Isolation of a Temperate Bacteriophage Encoding the Type III Effector protein sopE from an Epidemic Salmonella typhimurium Strain.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(17): p. 9845-9850.

82. Kobayashi H., Kanazaki M., Shimizu Y., Nakajimi H., Khatun M., Hata E., Kubo M., *Salmonella Isolates from Cloacal Swabs and Footpads of Wild Birds in the Immediate Enviroment of Tokyo Bay.* Journal Veterinary Medicine Science, 2007. **69**(3): p. 309-311.

83. Plant W., *Salmonelosis in Wild Birds Feeding at Sewage Tretment Works. J. Hyg., Camb*, 1978(81): p. 43-48.

84. Gopee N., Adesiyun A., Caesar K., *Retrospective and Longitudinal Study of Salmonellosis in Captive Wildlife in Trinidad.* Journal of Wildlife Diseases, 2000. **36**(2): p. 284-293.

85. Refsum T., Handeland K., Baggesen L., Holstad G., Kapperud G., *Salmonellae in Avian Wildlife in Norway from 1969 to 2000.* Applied and Enviromental Microbiology, 2002. **68**(11): p. 5595-5599.

86. Hall A., Saito E., *Avian Wildlife Mortality Events due to Salmonellosis in the United States, 1985-2004.* Journal of Wildlife Diseases, 2008. **44**(3): p. 585-593.

87. Thomas, N. *Nonculturable Bacteria: programmed Survival Forms or Cells at Death's Door?* BioEssays, 2003. **25**, 204-211 DOI: 10.1002/bies.10233.

88. Oliver James D., *The Viable but Nonculturable State in Bacteria.* The Journal of Microbiology, 2005. **43**(5): p. 93-100.

89. Klancnik A., Guzej B., Jamnik P., Vuckovoc D., Abram M., Mozina S.,, *Stress Response and Pathogenic Potential of Campylobacter jejuni Cells exposed to Starvation.* Research in Microbiology, 2009. **160**: p. 345-352.

90. Passerat J., Got P., Dukan S., Monfort P., *Respective Roles of Culturable and Viable-but-Nonculturable Cells in the Heterogeneity of Salmonella enterica Serovar Typhimurium Invasiveness.* Applied and Enviromental Microbiology, 2009. **75**(16): p. 5179-5185.

91. Luechtefeld W., Blaser M., Reller L., Wang L., *Isolation of Campylobacter fetus subsp. jejuni from Migratory Waterfowl.* Journal of Clinical Microbiology, 1980. **12**(3): p. 406-408.

92. Taema M., Bull J., Macgregor K., Flach E., Boardman S., Routh D., *Retrospective Study of Campylobacter Infection in Zoological Colletion.* Applied and Enviromental Microbiology, 2008. **74**(5): p. 1332-1338.

93. Whelan, D.M., Monaghan P., Girdwood A., Fricker R., *The Significance of Wild Birds (Larus sp.) in the Epidemiology of Campylobacter Infection in Humans.* Epidemilogy inf., 1988. **101**: p. 259-267.

94. Kwan P., Barrigas M., Bolton F., French N., Gowland P., Kemp R., Leatherbarrow H., Unpton M., Fox A., *Molecular Epidemiology of Campylobacter jejuni Populations in Dairy Cattle, Wildlife, and the Enviroment in Farmland Area.* Applied and Enviromental Microbiology, 2008. **74**(16): p. 5130-5138.

95. Colles F., Jones T., McCarthy N., Sheppard S., Cody A., Dingle K., Dawkins M., Maiden M., *Campylobacter Infection of Broiler Chickens in a Free-Range Enviroment.* Enviromental Microbiology, 2008|. **18**(8): p. 2042-2050.

96. Grieskpoor P., Olsen B., Waldestrom J., *Campylobacater jejuni in Penguins Antartica.* Emerging Infectious Diseases, 2009. **15**(5).

97. Ramos R., Cuellar M., Ramírez F., Jover L., Ruíz X., *Influence of Refuse Sites on the Prevalence of Campylobacter spp. and Salmonella Serrovars in Seagulls.* Applied and Enviromental Microbiology, 2010. **76**(9): p. 3052-3056.

98. Zdenek, H., *An Annotated Checklist of Pathogenic Microorganisms Associated With Migratory Birds.* Journal of Wildlife Diseases, 2004. **40**(4): p. 639-659.

99. Waldesntrom J., Mevius D., Veldman K., Broman T., Hassequist D., Olsen B., *Antimicrobial Resistence Profiles of Campylobacter jejuni Isolates from Wild Birds in Sweden.* Applied and Enviromental Microbiology, 2005. **71**(5): p. 2438-2441.

100. Damborg P., Olsen K., Nielsen E., Guardabassi L., *Occurrence of Campylobacter jejuni in Pets Living wicth Human patients Infected with C. jejuni.* Journal Of Clinical Microbiology, 2004. **42**(3): p. 1363-1364.

101. French N., Midwinter A., Holland B., Emerson C., Pattison R., Colles F., Carter P., *Molecular Epidemiology of Campylobacter jejuni Isolates from Wild-Bird Fecal material in Children´s Playgrounds.* Applied and Enviromental Microbiology, 2009. **75**(3): p. 779-783.

102. Nesse L., Refsum T., Heir E., Nordby K., vardund T., Holstad G., *Molecular Epidemiology of Salmonella spp. Isolates from Gulls, Fish-Meal Factories, feed factories, Animals and Humans in Norway Based on Pulsed-Field Gel Electrophoresis.* Epidemiology Infectious, 2005. **133**: p. 53-58.

103. Reche M., Ríos J., Jiménez P., Rojas A., Rotger R., *gyrA Mutations Associated with Nalidixic Acid-Resistant Salmonellae from Wild Birds.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2002. **46**(9): p. 3108-3109.