



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

TÍTULO DE LA TESIS

**Búsqueda de Reservorios Animales Emergentes para
Brucella spp en dos Axalapascos del eje Neovolcánico
de Puebla.**

Tesis que para obtener el título de

BIÓLOGO (A)

PRESENTA:

Rosa Erika Cacho Escamilla

TUTOR (A): D. cn C. Elsa Iracena Castañeda Roldán

Junio 2015



CONTENIDO GENERAL

- PORTADA
- AGRADECIMIENTOS (LABORATORIO, INSTITUCIÓN EXTERNA DONDE REALIZARON SU TESIS, ETC..)
- DEDICATORIA (OPCIONAL)
- INDICE
- RESUMEN
- INTRODUCCIÓN (QUE INCLUYA DE MANERA IMPLÍCITA O EXPLÍCITA ANTECEDENTES Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA)
- HIPOTESIS, OBJETIVOS.
- MATERIAL Y METODOS (DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES O MODELO DE ESTUDIO, DISEÑO DE MUESTREO, ANÁLISIS EXPERIMENTAL, ANÁLISIS ESTADÍSTICO, ETC.)
- RESULTADOS
- DISCUSIÓN
- CONCLUSIONES
- BIBLIOGRAFÍA
- ANEXOS: DESCRIPCIÓN DE TÉCNICAS, SOLUCIONES, ABREVIATURAS, ETC.... (OPCIONAL)

FORMATO:

- Tipo de letra: Arial
- Tamaño de letra: 12
- Espacio: 1.5

ÍNDICE

	Página
Agradecimientos	
Índice	<i>i</i>
Índice de figuras	<i>ii</i>
Índice de tablas	<i>iii</i>
Resumen	
Introducción	1
Antecedentes	
Generalidades de <i>Brucella</i>	2
Gen bp26/IS711	3
<i>Brucella</i> en el Mundo	4
Prevalencia de <i>Brucella</i> en México	5
Prevalencia de <i>Brucella</i> en Puebla	6
Concepto de Reservorio Emergente	6
Justificación	8
Objetivos	
Objetivo General	9
Objetivos particulares	9
Hipótesis	9
Métodos	
Zona de Estudio	10
Generalidades del género <i>Sceloporus</i>	12
<i>Sceloporus megalepidurus</i>	12
<i>Sceloporus spinosus</i>	13
Etiquetado	14
Extracción de Órganos	14
Siembra directa en placa	15
Tinción de Gram	15
Pruebas de Actividad metabólica	16
Agglutinación con suero específico anti- <i>Brucella</i>	16

Extracción de ADN	16
Muestras en tejido solido	17
Suspensiones celulares y muestras digeridas por proteínas K	17
Detección de <i>Brucella</i> por PCR	19
Electroforesis y Revelado	20
Identificación de cepas aisladas <i>Brucella</i> negativo en órganos de <i>Sceloporus</i> spp	20
Resultados y Discusión	24
Conclusiones	34
Bibliografía	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Distribución epidemiológica de <i>Brucella</i> en México	5
2	Mapa Zona de Estudio	11
3	Lagartija <i>Sceloporus</i>	12
4	Disección, procesamiento y conservación de tejidos	15
5	Cámara de electroforesis	19
6	Diagrama General de Trabajo	21
7	Pruebas de Actividad Metabólica	22
8	Técnica de PCR	23
9	Disección y Gravidéz de <i>Sceloporus</i>	25
10	Tinción de Gram	25
11	Crecimiento Fúngico	26
12	Observación macro y microscopica de Aglutinación	27
13	Electroforesis de obtención de ADN	28
14	Revelado PCR	28
15	Anuncio para evitar el contagio de brucelosis en Guadalupe Victoria, Puebla	31
16	<i>Staphylococcus aureus</i>	32
17	<i>Apis</i> spp en Atexcac	32

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Página
1	Reactivos para Tinción de Gram	16
2	Mezcla de Reacción	19
3	Programa PCR	20
4	Identificación de Sceloporus	24
5	Resultados Pruebas de actividad metabólica	26

AGRADECIMIENTOS

A las primeras personas que tengo que agradecer son a mis Padres JORGE CACHO VILLAGOMEZ y GABRIELA ESCAMILLA V. por todo lo que me han apoyado, motivado y enseñado a lo largo de mi vida, por que sin ellos yo no sería quien soy, esto es por y para ustedes porque no me pudieron dar mejor herencia que mi carrera. Gracias Papá ya que escogí esta hermosa carrera por ti, y aunque te adelantaste en el camino LO LOGRE!!! Y este logro te lo dedico a ti, así que sígueme cuidando desde el cielo. Mamá eres un roble te admiro por tu enorme dedicación y paciencia y porque siempre estás conmigo gracias por todo tu amor y paciencia te adoro.

A mis hermanas Karla y Nancy por ser mis amigas incondicionales y hacer mi vida una aventura, gracias por divertirme, apoyarme y presionarme todos los días para ser una mejor persona y profesionalista, también las aprecio..... (Broma, las quiero con todo el corazón).

A la Dra. Elsa Castañeda, por todo su tiempo, su amistad, paciencia y por compartir conmigo un poquito de sus conocimientos, por creer en mí y ser un soporte increíble en el momento más difícil en mi vida, mil gracias por TODO.

A las hermanas de la vida y amigas incondicionales, Lupita Valencia, Analy González por todo el apoyo, la presión y la sana competencia durante estos años de carrera, la diversión en las salidas de campo, los laboratorios y las vacaciones que vivimos juntas... y lo que nos falta, la quiero mucho, mucho.

A otra hermana de la vida Natalia Solís, también por el apoyo y la presión para lograr todos nuestros objetivos y metas, te admiro y te quiero mucho.

A mis amigos Daniel, Wanda, Erika, Miriam, Nancy, Bricia, Ilse, Eduardo y los que se me olvidaron por hacer esta aventura, la más loca de mi vida.

A la Dra. Edith Chávez por todos sus consejos, me fueron de gran utilidad y a la Dra. Fabiola por compartir sus conocimientos conmigo.

A mis compañeros del laboratorio al Dr., Carlos Hernández por ayudarme con la identificación de los organismos, al Mtro., Ricardo Cruz por su apoyo durante el experimento, a Cristina y Yazmin por ayudarme con las técnicas y hacer que fuera muy divertido ir al laboratorio, son grandes chicas. A Eduardo, Karen, las gemelas Mary, Katherine, Erika, Maggy por hacer que el laboratorio fuera como mi segunda casa.

A mi abuela Rosa Villagomez, mi tía Beatriz Cacho por apoyarme con la idea de entrar a buceo, a mi tía Patricia Cacho por las porras, son unas guerreras, las quiero mucho.

RESUMEN

La Brucelosis es una zoonosis, producida por el género *Brucella*. Este patógeno no solo afecta a animales de consumo, sino que también ha afectado a diversos organismos de fauna silvestre, incluidos anfibios, peces y mamíferos marinos. En la zona del eje Neovolcánico del Estado de Puebla, en el municipio de Guadalupe Victoria, la brucelosis tiene una endemicidad de más de 90 años y se ha logrado aislar a *Brucella* no solo de las cabras (principal actividad comercial) sino que también de suelo y de agua de los Axalapascos Atexcac y La Preciosa. La fauna silvestre que vive aledaña a la zona de los lagos cráter, se encuentra permanentemente expuesta a este patógeno, por lo que, este estudio nos permitió conocer si algún organismo de dicha fauna se encuentra infectada. El género *Sceloporus* cuenta con una distribución muy amplia en la zona, además, tiene contacto directo con los lagos cráter y las cabras, las características propias del género lo hacen un potencial portador, ya que las condiciones reproductivas del lacertilio son muy favorecedoras para contagiarse. Los resultados corroboran la presencia de *Brucella sp* en lagarrijas *Sceloporus megalepidurus* siendo este el primer reporte de *Brucella* en reptiles, además se logró aislar otros patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas spp* y *Aspergillus fumigatus*. Por lo tanto el estudio realizado nos da a conocer solo algunos de los muchos patógenos que están afectando a la fauna silvestre, en la zona del eje Neovolcánico del Estado de Puebla.

Palabras Clave: Zoonosis, Reservorio emergente, *Brucella*, Brucelosis, *Sceloporus sp*, Axalapascos.



INTRODUCCIÓN

Una zoonosis es una enfermedad infecciosa que puede transmitirse entre los animales y de éstos al humano, los animales pueden ser tanto silvestres como domésticos. La Brucelosis es una zoonosis, producida por bacterias del género *Brucella*, la cual infecta principalmente a células fagocíticas y no fagocíticas, además de úteros grávidos de sus hospederos animales, generando aborto y esterilidad, de ahí, la importancia económica por pérdidas en leche y carne de los animales, aunado al problema de salud pública por los casos en humanos (OMS, 2011). Al igual que en otras partes del mundo, es posible que en México gran parte de la diversidad biológica se pierda como consecuencia de las enfermedades que afectan la fauna silvestre. Actualmente *Brucella* cuenta con 10 especies y se siguen descubriendo más (Papas, 2010; Whatmore *et al*, 2015), lo que sugiere que éste género es una bacteria que está evolucionando.

En el estado de Puebla, esta enfermedad se detectó hace 92 años en cabras murcianas (Pláceres, 1921 en Ruiz Castañeda, 1986), y a la fecha no se ha logrado controlar ni erradicar de la zona oriente de los Llanos de San Juan en Eje Neovolcánico. Cabe mencionar que estos reportes solo contemplan casos de infección en humanos y ganado. Por su parte Castañeda, *et al*, en 2005, reporta el aislamiento y sobrevivencia de *Brucella melitensis* en diversos ecosistemas como: suelo, agua estancada y de lluvia en la Comunidad de Emilio Portes Gil del Municipio de San Nicolás Buenos Aires, Puebla, mismo que constituyó el primer estudio ambiental en donde se observa al género *Brucella* en un hábitat diferente al animal y humano. En 2010, se reporta la diseminación de *Brucella* spp hacia reservorios emergentes como la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), el bagre del Nilo (*Clarias gariepinus*), y la rana toro (*Lithobates catesbeianus*) (Gelev *et al*. 2010; El-Tras, 2010; O'Callagan, 2011; Whatmore *et al* 2015); Esto comprobó la evolución constante del patógeno y su migración hacia nuevos nichos, compartimientos taxonómicos o ecosistemas. Por su parte Cruz en 2013, aisló e identificó a *Brucella* en el agua de los Axalapascos de Alchichica, Quechulac,



Atexcac y La Preciosa, correspondientes a los municipios de Tepeyahualco y Guadalupe Victoria, en Puebla.

ANTECEDENTES

Generalidades de *Brucella*

El género *Brucella* pertenece al grupo de las alfa-proteobacterias y a la clase Rhizobiales. Por lo que evolutivamente derivan de antepasados que infectan y parasitan suelo y plantas (OMS, 2011). Actualmente cuenta con 11 especies (Whatmore *et al*, 2015), las cuales se han diferenciado con base en sus características antigénicas y a su hospedero animal.

Los *microorganismos de Brucella* son bacterias Gram negativas, este género es conocido principalmente por ser responsable de la enfermedad llamada brucelosis o fiebre de Malta (Maves *et al*, 2011). Las especies de *Brucella* son cocobacilos de 0,5 a 0,7 μm de diámetro por 0.6-1.5 μm de largo, intracelulares facultativos, ácido-alcohol resistentes que carecen de cápsula, flagelos o plásmidos nativos; tampoco generan esporas (Mantur *et al*, 2007). Poseen una envoltura celular característica: la membrana externa (ME), la membrana interna y el periplasma entre ambas. En el periplasma hay proteínas y un gel glucopeptídico denominado peptidoglucano (PG) responsable de la forma e integridad osmótica de la bacteria. El citoplasma es rico en ADN, ARN, y proteínas (Ortega *et al*, 2013). Las especies denominadas “brucelas clásicas” se han subdividido a su vez en biovares, que se distinguen por diferentes características bioquímicas, de comportamiento, o ambas, frente a los sueros monoespecíficos *Brucella abortus* y *Brucella melitensis*. De esta manera, *B. melitensis* se subdivide en tres biovares (1-3); *B. abortus*, en siete (1-9) ya que se suprimieron los biovares 7 y 8, y el actual biovar 7 corresponde al 9 de la clasificación anterior, y *Brucella suis*, en 5 (García *et al*, 2014; Ortega *et al*, 2013). La tipificación en biovares constituye una herramienta útil en la investigación en ese campo. *B. abortus* tiene una gran plasticidad entre los caracteres que se determinan por los métodos convencionales, tales como el requerimiento de CO_2 , para el crecimiento, la sensibilidad o tolerancia a los colorantes de anilina, la producción de H_2S y otros (Acha y Szyfres, 2003). Menos plasticidad demuestran *B. melitensis* y *B. suis* (Meyer, 1984). El genoma del género *Brucella*, sin embargo; es muy homogéneo, (Verger *et al*, 1985), en un estudio de hibridación de ADN-ADN. Estos investigadores proponen mantener una sola especie *B. melitensis* subdividida en

seis biogrupos, que corresponderían a seis especies. Sin embargo, para efectos prácticos, y de alcance de este trabajo se seguirá el criterio que divide el género en especies y biovares (OMS, 2012).

La falta de polimorfismo genético de las especies de *Brucella* (Gandara *et al*, 2001) dificulta su identificación, ya sea por Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico o Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). A diferencia de lo que sucede con otras bacterias patógenas, la identificación de las distintas especies de *Brucella* no se logra mediante la secuenciación del ARNr 16S ni con la amplificación de la región del ADN ribosómico situada entre el 16S y el 23S (Ortega *et al*, 2013).

Una de las técnicas más eficientes para la diferenciación entre las distintas especies de *Brucella* consiste en aprovechar la variabilidad en una secuencia de inserción en el cromosoma, IS711, generándose diferentes tamaños de ampliación según la especie, diferenciando de esta forma *B.abortus*, *B.melitensis*, *B.ovis* y *B. suis* (Ortega *et al*, 2013; Bricker y Halling, 1994). La utilización de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple de nueva generación, con 8 parejas de primarios específicos, que amplifican 7 productos con diferencias en número y tamaño, se han logrado identificar *B.abortus*, *B. melitensis*, *B.suis*, *B.ovis*, *B.canis*, *B.neotomae*, *B. pinnipedalis* y *B. ceti* (Whatmore *et al*, 2007).

GEN *bp26/IS711*

El Gen *bp26/IS711* es un gen altamente conservado y específico del género *Brucella* que codifica a la proteína Omp28 que se encuentra en el periplasma, ha sido identificada como un importante antígeno diagnóstico de brucelosis. Esta proteína es altamente conservada entre *B. abortus*, *B. suis*, *B.ovis*, *B. canis*, *B. neotomae* y *B. melitensis* además de que dicha proteína es utilizada ampliamente como un marcador de diagnóstico y de vacunación contra la brucelosis. La proteína omp28 es un antígeno protector e inductor de respuestas celulares, no solo eleva IgG, sino que también, la respuesta celular de IFN e IL4-6 (Qui *et al*, 2012).

Brucella en el Mundo

El primer caso de brucelosis humana reportado a nivel mundial fue en un *Australopithecus africanus* encontrado en Sudáfrica, estos antepasados convivieron con cabras infectadas y desde ese entonces a la fecha se documentan los datos epidemiológicos de esta enfermedad zoonótica (D´Anastasio *et ál.*, 2010). La brucelosis se encuentra en todo el mundo pero está controlada en la mayoría de los países desarrollados. La enfermedad clínica todavía es común en el Medio Oriente, Asia, África, América Central y del Sur, Cuenca Mediterránea y el Caribe. Las especies de *Brucella* varían en su distribución geográfica. *B. abortus* se encuentra en todo el mundo, en las regiones ganaderas, se ha logrado aislar en animales silvestres de los que no se tenían registro como son: camellos en Africa, focas (*Phoca vitulina*) en Noruega, delfines (*Delphinus delphis*) en Escocia, delfines nariz de botella (*Tursiops truncatus*) en California, este último aislado de un feto abortado de un organismo en cautiverio (Godfroid *et al*, 2005 ; Kasooa, 2009; CFSPH, 2009). En Países como Canadá, Japón, Australia, Nueva Zelanda y países del centro de Europa se consideran libres de *Brucella*, en 2008 12 países de la unión Europea fueron declarados libres de Brucelosis en el ganado Bovino, Caprino y Porcino (García *et al* 2014,). Sin embargo, se ha reportado la presencia de *B. melitensis* es ranas blancas en Alemania, país que se consideraba un país libre de *Brucella* (Whatmore *et al*, 2015). Los reservorios de la fauna silvestre, tales como los cerdos salvajes, el bisón, el alce y las liebres europeas complican los esfuerzos de erradicación para *B. abortus* y *B. suis*.

En América Latina los primeros estudios se realizaron en Argentina y en México desde 1920, desde entonces está catalogada como una de las zoonosis bacterianas más importantes en el país alcanzando incidencias anuales de hasta un 10% (OMS, 2009).

Prevalencia de *Brucella* en México

En el territorio nacional, la mayor incidencia de brucelosis bovina se observa en el ganado de establo y en áreas de alta densidad animal, como son las zonas centro, sureste y costeras. La brucelosis caprina tiene una distribución más amplia; se le

puede encontrar en todo el territorio nacional. La mayor frecuencia se registra en aquellas entidades con gran concentración de ganado caprino: Coahuila, Chihuahua, Nuevo León, Tamaulipas, Guanajuato, Michoacán, Estado de México, Querétaro y San Luis Potosí y Puebla (Hernández *et al*, 1996; SAGARPA, 2015) Fig 1. La brucelosis en la zona del Eje Neovolcanico del Estado de Puebla ha prevalecido por más de 90 años. El Estado Puebla cuenta con el 15.4 % de la población total nacional de ganado caprino, le siguen: Oaxaca con el 12%, San Luís Potosí con el 10.5, Guerrero con el 7.9 y Zacatecas con el 6.1 % (Arechiga *et al*, 2008).



Figura 1. Distribución epidemiológica de brucelosis en México, los Estados con mayor incidencia se encuentran en rojo, incluido Puebla, los Estados marcados en amarillo son los que han erradicado y los Estados marcados en verde son los que están libre de Brucella, Tomado de SAGARPA, 2015.

Concepto de Reservorio Silvestre

El concepto de reservorio silvestre emergente en las zoonosis incluye también el concepto de biotopo. Un biotopo corresponde a una comunidad de animales y plantas coexistiendo en una región geográfica con un paisaje y clima determinado y cuya estructura social asegura la persistencia del patógeno en la comunidad. Las

zoonosis son, entonces, enfermedades infecciosas que tienen nidalidad, esto es, la habilidad de mantener un foco dinámico y permanente de circulación del patógeno en animales en un ambiente geográfico determinado. Implícito en estos conceptos está el hecho que cualquier factor que tenga la capacidad de alterar el biotopo conteniendo el reservorio silvestre de una zoonosis, tiene el potencial de alterar su nidalidad, modificando de esta manera la epidemiología de la zoonosis.

La mayor parte de los cambios que modifican los equilibrios dinámicos de los animales silvestres de patógenos o reservorios con potencial zoonótico son antropogénicos, e incluyen una serie de cambios ambientales como el aumento de la población y la migración de ésta a lugares previamente inhabitados. Estos cambios poblacionales se acompañan además de degradación ambiental, contaminación y cambios climáticos (OMS, 2011). Por ejemplo, la resurgencia de varias fiebres hemorrágicas en América del Sur ha sido el resultado de la fragmentación y la destrucción de hábitats boscosos en Argentina (virus Junín), Bolivia (virus Machupo) y Venezuela (virus Guanarito), (Acha y Szyfres, 2001; OMS, 2012;).

Algunas actividades humanas, como el aumento del comercio y de los viajes, diseminan estos patógenos, sus vectores e incluso a sus mismos reservorios animales a través del planeta (Makita *et al*, 2011). El principal reservorio de *Brucella* es el ganado Bovino y los países más afectados son los que tienen un gran actividad ganadera como lo es América Latina (Garcia *et al*, 2014). Cerca de 1 billón de personas en el mundo dependen del sector Ganadero (FAO, 2015).

Generalidades del género *Sceloporus* .

Pertenece a la familia *Phrynosomatidae*, la cual cuenta con las lagartijas morfológica y ecológicamente más diversas. Tienen una gran variedad de hábitos, hay lagartijas terrestres, arborícolas y saxícolas. Se distribuyen desde el sur de Canadá hasta Panamá. Esta familia cuenta con nueve géneros y con más de 136 especies (Canseco-Gutiérrez, 2008). En México *Sceloporus* se distribuye desde Baja California Norte hasta Yucatán, el Estado de Puebla cuenta con 14 especies tan solo en Valle de Tehuacán, Fig 2.



Figura 2. Lagartija del género *Sceloporus* mimetizándose en una nopalera donde toma el sol a las orillas del Axalapasco La Preciosa.

JUSTIFICACIÓN

La brucelosis en la zona de los Axalapascos ha sido endémica desde 1921. Los nuevos reportes donde se aisló e identificó a *Brucella* en agua y suelo de la zona nos sugieren que tiene la capacidad de infectar a nuevo hospederos. Por lo anterior, en esta investigación se pretende demostrar que *Brucella* puede permanecer en reservorios animales emergentes como *Sceloporus spp.* Ya que es un organismo de amplia distribución en la zona, que tiene contacto directo, tanto con los lagos cráter, así como con los animales domésticos (cabras), que posiblemente se encuentren infectados. Por eso la importancia de este estudio, ya que nos permitirá tener un panorama más amplio acerca de la fauna silvestre que se puede infectar debido que está expuesta permanentemente al patógeno.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de *Brucella spp* en la fauna silvestre (*Sceloporus spp*) aledaña a los Axalapascos “Atexcac” y “La Preciosa” en la zona del eje Neovolcánico de Puebla.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Aislar e identificar a bacterias del género *Brucella* en *Sceloporus spp* en la zona aledaña a dos lagos cráter del eje neovolcánico de Puebla.
2. Determinar *Brucella* mediante diagnóstico molecular de las cepas aisladas de *Sceloporus spp*.

HIPÓTESIS

Brucella spp se encuentra en la fauna silvestre (*Sceloporus spp*) en la zona aledaña a los Axalapascos “Atexcac” y “La Preciosa”

METODOS

Este estudio es de tipo transversal observacional.

Las muestras de *Sceloporus spp* (42) que se utilizaron así como las cepas de control *B.abortus* (S19) y *B.melitensis* (M16) fueron proporcionadas por el Laboratorio de Patogenicidad Microbiana del Centro de Investigación de Ciencias Microbiológicas (CIMC) del Instituto de Ciencias de la Universidad Autónoma de Puebla (ICUAP).

Zona de estudio

El municipio de Guadalupe Victoria se localiza en la parte centro-este, del Estado de Puebla. Sus coordenadas geográficas son: los paralelos 19° 14'54" y 19° 25'42" de latitud norte. Y los meridianos 97° 15'54" y 97° 31'06" de longitud occidental. Colinda al norte con el municipio de Tepeyahualco, al sur con Tlachichuca, al este con Lafragua y al oeste con San Nicolás Buenos Aires. Tiene una superficie de 239.83 kilómetros cuadrados. Al centro se extiende una vasta llanura con un promedio de 2,380msnm. Al suroeste y oeste se levantan algunos complejos montañosos, así como las lagunas de Atexcac, La Preciosa y Quechulac. La sierra de más de 7 kilómetros de largo que va de la laguna La Preciosa, hasta el norte de la laguna de Atexcac, se alza más de 200 metros sobre el nivel del valle, y destaca el cerro Siete Cuevas, el complejo montañoso del cerro Pinto Ancho y Alto, formación que se levanta a 600 metros sobre el nivel del valle; lo cubre vegetación que se desarrolla entre las rocas calizas de sus pendientes lo que le da un matiz verdiblanco, moteado que da origen al nombre que lleva.

El municipio presenta tres climas diferentes:

- Clima semifrío subhúmedo con lluvias en verano. Se localiza en las zonas más altas del municipio, en las primeras estribaciones de la sierra de Quimixtlán.
- Clima templado subhúmedo, con lluvias en verano. Se presenta en el sureste y en la parte central del municipio.

- Clima semiseco templado con lluvias en verano y escasas a lo largo del año, éste prodomina en la parte norte del municipio (EMDM,2014).

Atexcac es el lago cráter que tiene agua salubre además de que contiene azufre, su profundidad aproximada es de 39 metros y su diámetro de 985 metros. La fauna asociada son aves y reptiles lacustres. La denominación de La Preciosa se debe a unas minas de oro abandonadas que se hallan en la región sureste. Las tonalidades cambiantes del rojo al azul dan un aspecto característico al cono. Abundan las aves, anfibios y reptiles lacustres. También hay peces, por lo que se practica la pesca. El diámetro de la laguna es de unos mil 750 metros y su profundidad máxima es de 45.5 metros (INECC, 2015) Fig 3.

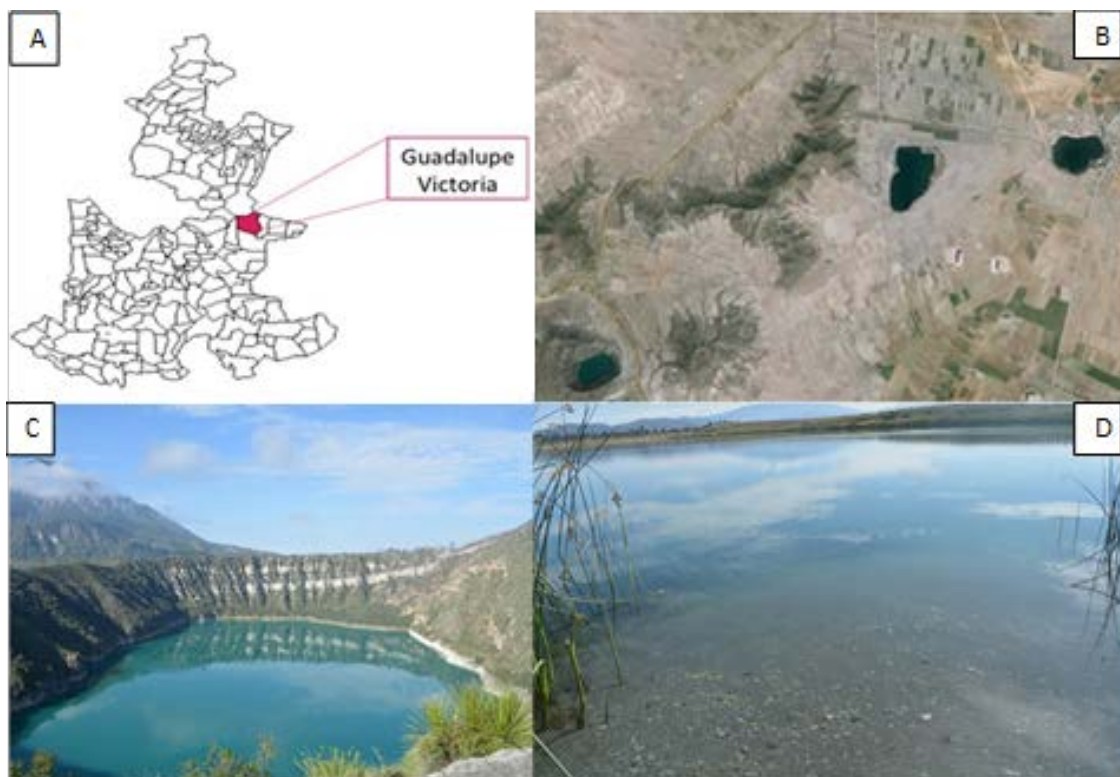


Figura 3: Zona de Estudio. A) Ubicación del municipio Guadalupe Victoria en el Estado de Puebla, B) Vista satelital de los lagos cráter o Axalapascos ubicados en Guadalupe Victoria (Tomada de google Earth), C) Atexcac lago cráter con bajada vertical de 50 m., D) La Preciosa lago cráter a nivel del suelo.

Identificación de *Sceloporus*

Sceloporus megalepidurus

Es una lagartija de talla pequeña, alcanza una longitud de hocico-cloaca de 50 – 60 mm, la longitud de la cola es de 1.4 a 1.7 veces mayor que la longitud del cuerpo. Las escamas del cuerpo son pequeñas y quilladas, las escamas ventrales son ligeramente más pequeñas que las dorsales y son lisas. El número de escamas dorsales es de 42 a 47. La cola es delgada con escamas quilladas. El número de poros femorales varía de 15 a 19 separados medialmente por cuatro escamas. La coloración dorsal es café claro con varias manchas azules; una banda dorso-lateral clara se origina por atrás del ojo finalizando al nivel de la ingle, y otra también clara se origina al nivel del nostrilo, para por la región supralabial, por el tímpano y finaliza por arriba del brazo, aunque en algunos ejemplares se continua muy tenue hacia la ingle; barras transversales oscuras se presentan e los lados del cuerpo; la cabeza es de color canela. Los machos presentan un par de manchas azul rey en el vientre, y en hembras la coloración es verde grisáceo. La garganta es azul con manchas claras. Manchas oscuras se encuentran en la inserción anterior del brazo. La cola presenta barras azules. Esta especie es endémica de México su distribución abarca los Estados de Puebla, oeste de Veracruz y Oaxaca. Esta especie es común en el valle, la temporada reproductiva es de abril a julio. Es una especie vivípara, suele encontrarse en los encinares, o en regiones con izotes, palmas, así como algunas zonas del cultivo. Se encuentra a altitudes que van desde los 1,650 a los 2,703 m. Es de hábitos terrestres y es común encontrarla en las pencas de los magueyes o nopales, ocultándose en estos cuando se sienten amenazadas. Son insectívoras, época reproductiva de los meses de abril a julio, con mayor actividad en Mayo, son viviparas (Smith 1973, Canseco y Gutiérrez, 2010).

Scelopours Spinosus

Lagartija de talla grande y cuerpo robusto, llega a alcanzar una longitud hocico-cloaca de 100 mm, la longitud de la cola es de 1.2 a 1.3 veces mayor que la longitud del cuerpo. Las escamas del cuerpo son grandes, quilladas y mucronadas, las

ventrales son lisas y más pequeñas que las dorsales. El número de escamas dorsales es de 25-26. La cola es robusta y las escamas están quilladas, ventralmente son lisas únicamente cerca de la base de la cola, posteriormente son quilladas. El número de poros femorales varía de 8 a 10 separados medialmente por 10 escamas. La coloración dorsal se modifica de café a grisáceo, presentándose bandas claras difusas en cada lado de la región dorso-lateral, entre estas líneas se observan escamas café oscuro formando bandas transversales, en algunos ejemplares se pueden apreciar manchas azules en la región dorsal. En la región ventral, los machos presentan un par de manchas azules bordeadas por negro, la garganta también presenta tonos azules y barras negras, el vientre en las hembras es crema inmaculado. La cola presenta bandas tenues. Esta especie es endémica de México, se distribuye ampliamente por el Altiplano Mexicano desde el Suroeste de Durango hasta el sur de Oaxaca. Esta lagartija vive en regiones semiáridas y en algunas regiones templadas del Valle a altitudes de 1,915 a 2,530. Es de hábitos arborícolas y terrestres, se encuentran entre los cactus pequeños que forman colonias y sobre los nopales. Es una especie generalista y su dieta se conforma por una gran variedad de artrópodos y una mínima cantidad de material vegetal, es una especie ovípara. No presenta dimorfismo sexual en la longitud hocico cloaca de machos (87.5 mm) y hembras (88.8 mm). La masa gonadal varía mensualmente y se correlaciona con la longitud hocico cloaca; los dos sexos tienen un ciclo reproductor sincrónico con una máxima actividad a fines del invierno y principios de la primavera. El tamaño de la puesta es de entre 6 a 17 huevos y se correlaciona con la longitud hocico cloaca. Sólo una puesta es producida por estación reproductora. La actividad reproductora en ambos sexos es diferente de la actividad de primavera-verano de sceloporinos tropicales de elevaciones altas (Weigmann, 1828; Canseco y Gutiérrez, 2010).

Etiquetado

Los organismos fueron sacrificados mediante refrigeración disminuyendo gradualmente el metabolismo. La identificación de la especie de *Sceloporus* la llevo a cabo el Mtro Carlos Hernandez, Herpetólogo de la Escuela de Biología BUAP. Se

etiquetaron post mortem de acuerdo al género, especie, sexo, número de muestra y área de colecta. Ejemplo: *Sceloporus megalepidurus*, hembra, La Preciosa, No de muestra 10 (**S.m.H.10.LP.**). Al etiquetado se le adiciono una sigla más correspondiente a la inicial del órgano del cual se obtuvo el crecimiento. Ejemplo: *Sceloporus megalepidurus*, hembra, No de muestra 10, La preciosa, Hígado (**S.m.H.10.LP.H.**).

2.3 Extracción de Órganos

Se realizó un corte ventral, garganta-cloaca exponiendo los órganos. Se extrajo corazón, pulmones, hígado, riñones y huevos, todo esto bajo condiciones de esterilidad utilizando una campana de flujo laminar, además una hoja de bisturí nueva y estéril para cada órgano y colocándolos en cajas Petri estériles para cada organismo Fig 4. Solo la mitad de los tejidos se maceraron y se sembraron directamente en medio *Brucella* y *Brucella* Buap-violeta de Etilo. (El resto del tejidos se conservó a -70°C en tubos eppendorf de 1 ml con solución fisiológica) Se utilizó incubadora con 5% CO² a 36 °C. Se resembraron las colonias que tenían un crecimiento con morfología colonial similar a *Brucella* entre las siguientes 8-24 horas.

2.4 Tinción de Gram

Se hizo un frotis simple fijado a calor, se tiñó utilizando los reactivos que se muestran en la Tabla 1. Se dejó secar a temperatura ambiente y se llevó a un microscopio óptico para observar a 40x y 100x con aceite de inmersión. Una vez se obtuvieron Gram negativos, se realizaron pruebas metabólicas.

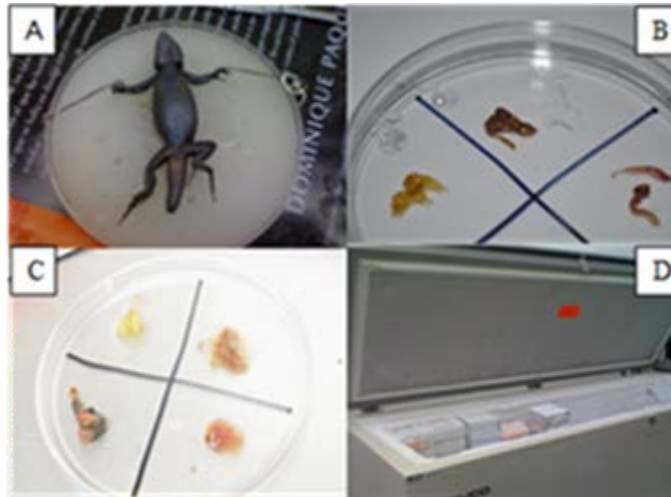


Figura 4: Disección, procesamiento y conservación de órganos de *Sceloporus sp.*
A) Disección de *Sceloporus sp.*, B) Extracción de Órganos, C) Macerado de Tejidos, D) Conservación de tejidos en Ultra congelador a -70 °C

Cuadro 1. Reactivos para Tinción de Gram

Cantidad	Reactivo	Tiempo
2 gotas	Cristal violeta	1 minuto
Enjuague	Agua destilada	
2 gotas	Lugol	30 segundos
Enjuague	Agua destilada	
2 gotas	Alcohol-cetona	30 segundos
Enjuague	Agua destilada	
2 gotas	Safranina	1 minuto

Pruebas de Actividad Metabólica

Para las pruebas de actividad metabólica se utilizaron los siguientes medios de cultivo: Agar triple azúcar hierro (TSI), Agar Hierro Lisina (LIA), citrato de Simmons, Movilidad, Indol, Ornitina (MIO), Urea de Christensen y, Rojo de Metilo-Vogues Proskauer (RM-VP).

Se tomó una colonia de posible *Brucella* y se sembró en el siguiente orden Citrato de Simmons, Urea, LIA, MIO, RM-VP y al final TSI. Se incubaron a 37°C por 24 horas y se interpretaron los resultados. Adicionalmente se realizaron pruebas de Oxidasa y Catalasa.

Aglutinación con suero específico Anti *Brucella*

En una placa de vidrio se colocaron 50 µl de suero anti-Brucella y 30 µl de solución salina fenolada al 5% (SSF), se colocó una colonia sospechosa y se mezcló suavemente con la ayuda de un agitador de madera, se observó la formación de Grumos para una aglutinación positiva en un minuto de reacción.

Pruebas de Biología Molecular

Esta prueba se llevó a cabo en tres fases: extracción de ADN (kit comercial Quick – gDNA™ MINI PREP, BIOSYS), reacción en cadena de la polimerasa (PCR), electroforesis y revelado.

Extracción de ADN

El ADN total se extrajo de tejidos y de colonias aisladas y crecidas en medio selectivo. Se utilizó el Kit Quick-gDNA MiniPrep de la marca Zymo Research. Las técnicas utilizadas para este proyecto están descritas a continuación.

Muestras de tejido sólido.

- 25mg de tejido macerado de manera manual con motero y pistilo dentro de campana de flujo laminar.
- La muestra se incorporó a un tubo eppendorf con 500 µl de Buffer de lisis se agita de 5 -10 min.
- La muestra lisada se centrifuga al máximo de velocidad 12,000 rpm/ 5 min Sin agitar el contenido, se transfiere el sobrenadante a una Columna Zymo-spin y a un tubo colector y se centrifuga nuevamente a 12,000 rpm /1 min. Se desecha el tubo colector con el contenido.
- Se transfiere la Columna Zymo-spin a un nuevo tubo colector. Se agregan 200 µl de Buffer de pre-lavado de ADN en la columna. Centrifugar a 11000 rpm / 1 min.
- Se agregan 500 µl de buffer de lavado g-ADN a la columna. Centrifugar a 11000 rpm / 1 min.

- Se transfiere la columna Zymo-spin a un microtubo eppendorf. Se agregan e 50 μ l de Agua estéril a la columna. Incubar durante 5 min a temperatura ambiente y después centrifugar al máximo de velocidad 12,00 rpm / 30 segundos para obtener el ADN.
- El ADN obtenido se puede usar para técnicas moleculares de manera inmediata o se guarda a -20°C para su posterior uso.

Suspensiones celulares y muestras digeridas con proteínas a K

- Barrido directo sobre crecimiento bacteriano de exactamente 48 horas con asa bacteriológica.
- La muestra se incorporó a un microtubo eppendorf con 800 μ l de Buffer de lisis, más 200 μ l de agua estéril se agita o vortexea de 5-10 min.
- La muestra lisada se centrifuga al máximo de velocidad 11,000 rpm / 5 min. Sin agitar el contenido se transfiere el sobrenadante de 1 ml a una columna Zymo-spin y a un tubo colector y se centrifuga nuevamente a 11,000 rpm / 1 min. Se desecha el tubo colector con el contenido.
- Se transfiere la columna Zymo-spin a un nuevo tubo colector. Se agregan 200 μ l de Buffer de pre-lavado ADN a la columna. Centrifugar a 11,000 rpm / 1 min.
- Se agregan 500 μ l de Buffer de lavado g-ADN a la columna. Centrifugar a 11,000 rpm / 1 min.
- Se transfiere la columna Zymo-spin a un microtubo eppendorf. Se agregan e 50 μ l de Agua estéril a la columna. Incubar durante 5 min a temperatura ambiente y después centrifugar al máximo de velocidad 12,000 rpm / 30 segundos para obtener el ADN.
- El ADN obtenido se puede usar para técnicas moleculares de manera inmediata o se guarda a -20°C para su posterior uso.

Para corroborar que se extrajo ADN de la muestra, se hizo una electroforesis con gel de agarosa al 1%. A la cámara de electroforesis se le agrega el buffer de corrida (TAE) y una vez con el gel adentro, se procede a cargar los pozos , utilizando solo

5 μ l del ADN y 2.5 μ l del buffer de carga. Se colocan los parámetros para el corrimiento, 2 amperes, 90 volts por 60 minutos. Pasada la hora se saca el gel y se sumerge en una solución de Bromuro de etidio durante 15 min después se enjuga en agua destilada 1 min y se coloca en el transiluminador para visualizar las bandas correspondientes al ADN Fig 5.

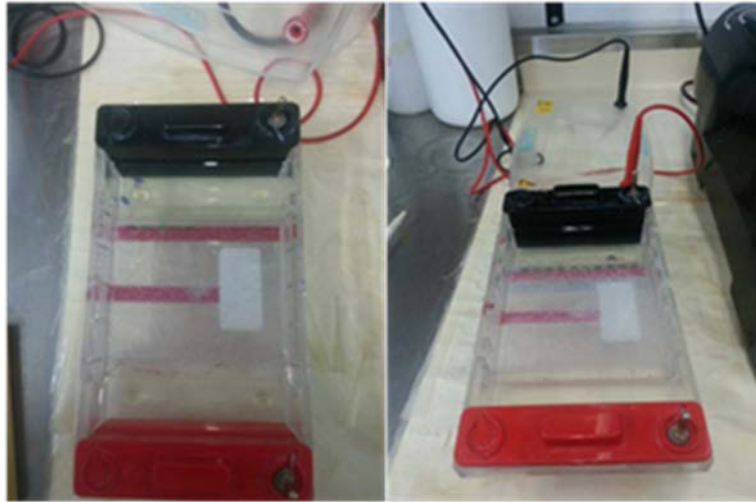


Figura 5. Cámara de electroforesis con gel agarosa al 1% con pozos cargados para iniciar el corrimiento a 90 Volts por 60 minutos

Detección de *Brucella* por PCR

El PCR es una de las técnicas más eficientes para la detección de muchos patógenos. Su alta especificidad la hacen una herramienta muy útil para el estudio de dichos microorganismos. El género *Brucella* tiene una región ampliamente conservada, el gen *bp26/IS711* que cuenta con 1,029 pb. Para esta técnica la mezcla se preparó en un tubo eppendorf de 250 μ l con las cantidades que se muestran en la Tabla 3. El programa de amplificación se muestra en la Tabla 4, repitiendo 33 veces el ciclo, finalmente se mantiene a 4 °C por tiempo indefinido, sólo si no se utiliza de inmediato para el revelado. Como control negativo se utilizó ADN de *Escherichia coli*.

Cuadro 2: Mezcla de Reacción

Cantidad	Reactivos
1 µl	R <i>bp26</i> /IS711
1 µl	F <i>bp26</i> /IS711
8 µl	Muestra (ADN)
12.5 µl	Taq Polimerasa
2.5 µl	Agua Estéril

Cuadro 3: Programa de PCR para la amplificación del gen *bp26* en *Brucella*

	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95 °C	7 min
Desnaturalización	95 °C	35 seg
Alineación de primers	64 °C	45 seg
Extensión	72 °C	3 min
Repetición 3-35 ciclos	---	---
Extensión final	7 °C	6 min
Resguardo	4 °C	indefinido

Electroforesis y Revelado

Se preparó un gel de agarosa al 1.5%, se colocó el gel dentro de la cámara con buffer TAE y se corrió a 2 amperes durante 60 minutos. Posteriormente se tiñe con bromuro de etidio al 1% por 15 minutos, se enjuaga con agua por 1 minuto y se coloca en un transiluminador de luz ultravioleta donde se pueden observar la banda de amplificación del gen *bp26* de 1,029 pb.

Identificación de cepas aisladas *Brucella* negativo en órganos de *Sceloporus spp*

Al crecimiento bacteriano que fue negativo a *Brucella*, se le realizaron pruebas bioquímicas para identificar el tipo de bacteria. En el caso de los microorganismos Gram (+) se realizaron resiembras en medio Mc Conckey y se hicieron pruebas bioquímicas específicas para *Staphylococcus* como pruebas de, DNAsa, sal y manitol, catalasa y cuagulasa.

Las colonias de crecimiento fúngico se enviaron al Laboratorio de Micología a cargo del D en C. Ricardo Munguía Pérez, CICM, ICUAP, BUAP, para su identificación.

Diagrama General de Trabajo

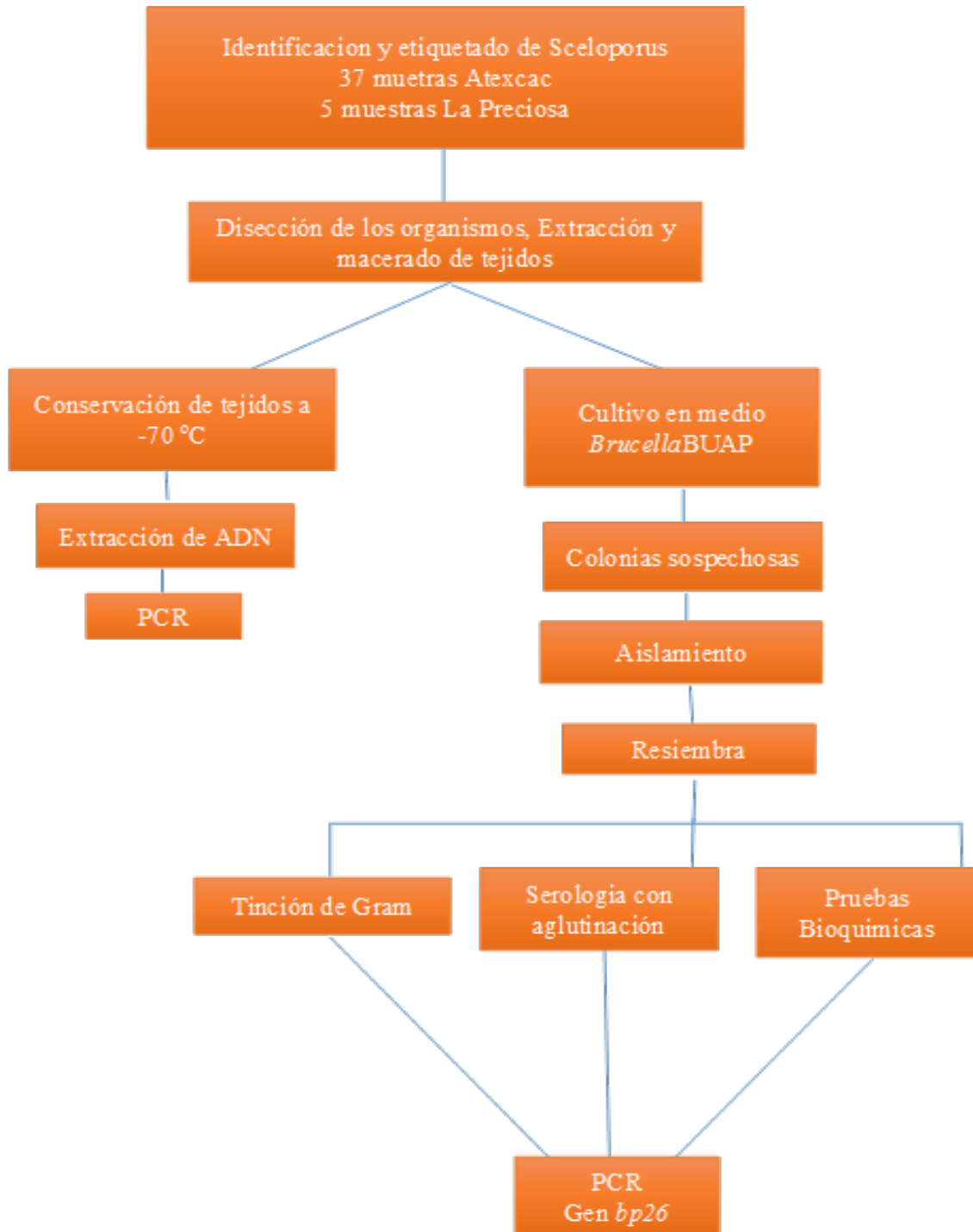


Figura 6: Diagrama de la metodología general de trabajo

Pruebas de Actividad Metabólica

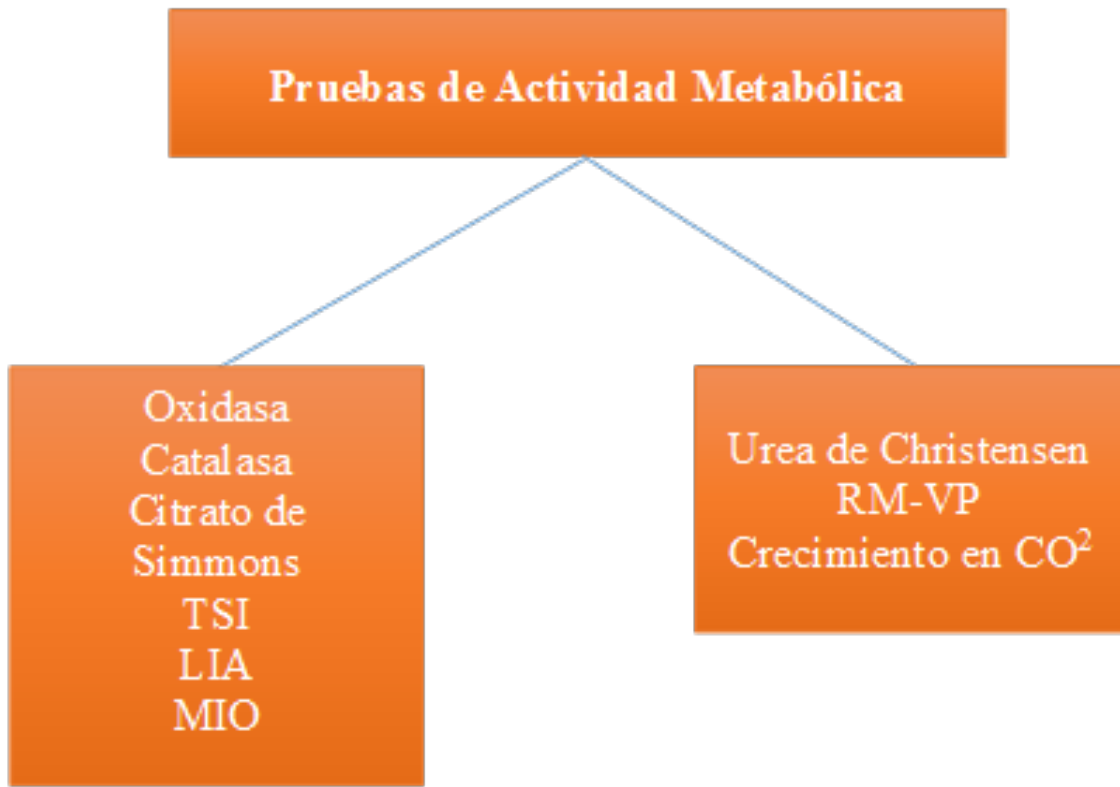


Figura 7: Diagrama de pruebas de actividad metabólica

Técnica de PCR

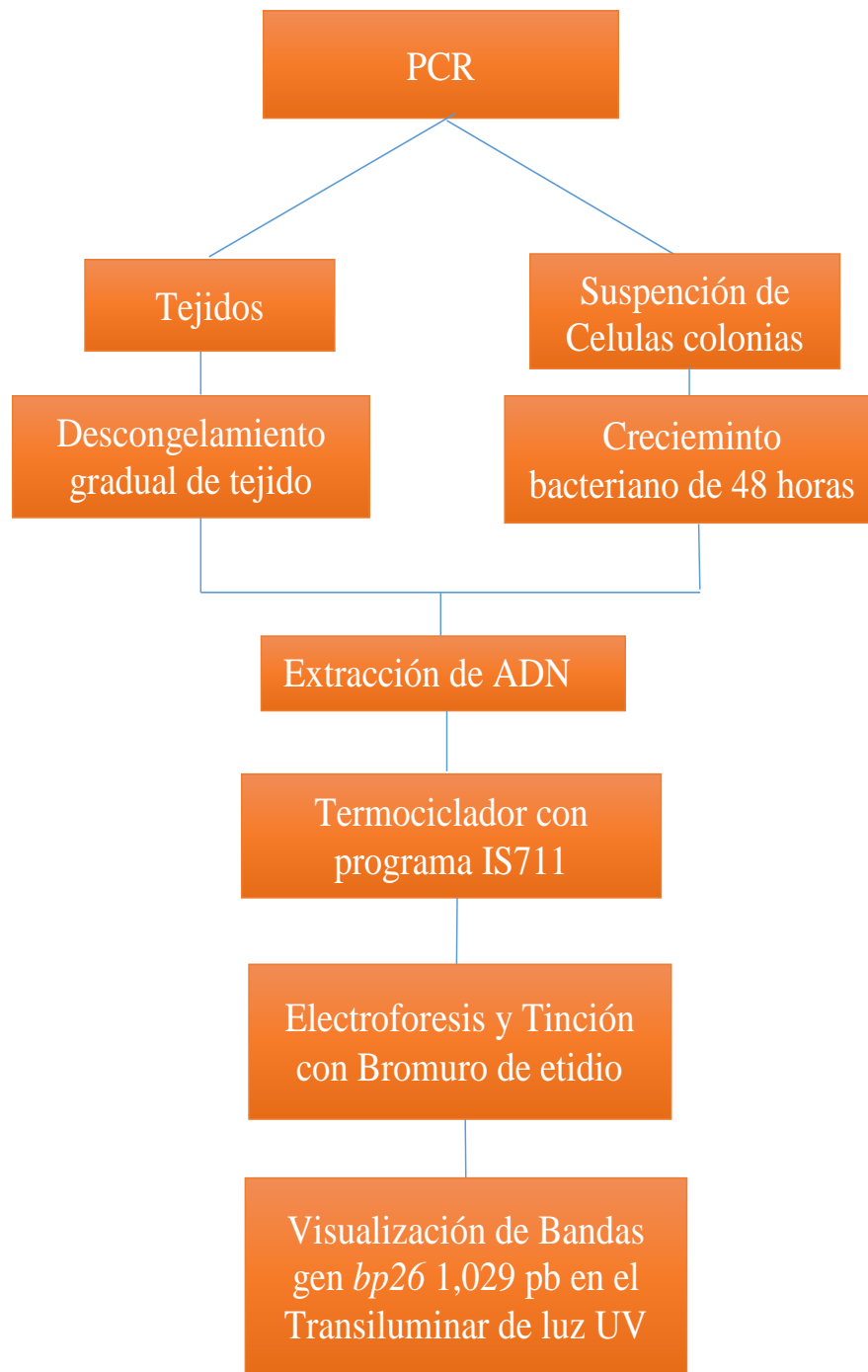


Figura 8: Diagrama técnica de Racción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Resultados y Discusión

En la región de los Axalapascos encontramos gran diversidad de fauna silvestre, en este estudio solo trabajamos con *Sceloporus*, ya que es uno de los organismos que cuenta con una amplia distribución en esa zona. En el Cuadro 4 se muestra la identificación de la especie *S. megalepidurus* (S. m) y *S. spinosus* (S. s), así como el número de muestras de cada lago cráter y el sexo hembra (H) y macho (M) de los organismos que fueron recolectados de los Axalapascos Atexcac y La Preciosa.

Cuadro 4. Identificación de *Sceloporus*

Axalapasco	No de Muestras	Especie de <i>Sceloporus</i>		Sexo	
		S.m	S.s	H	M
Atexcac	37	3	2	5	0
La Preciosa	5	37	0	30	7

Las características geográficas de cada uno de los Lagos son la principal diferencia del número de organismos recolectados en los Axalapascos. Así también la flora en los lagos y los hábitos propios de cada una de las especies.

La época donde se realizó la colecta corresponde al periodo de reproducción de los lacertilios (Smith et al, 1973; Weigmann, 1828; Canseco y Gutiérrez, 2010), esto nos permite tener acceso a los organismos que pudieran haber estado expuestos a *Brucella* y ver si los afecta en ese periodo de mayor susceptibilidad. Como hallazgo se encontraron tres hembras *S. megalepidurus* grávidas con dos crías cada una, además de 1 hembra con dos huevos Fig 9.

El crecimiento bacteriano a partir de los tejidos fue a las 24 horas, el medio utilizado (*BRUCCELLABUAP*) favoreció dicho proceso por ser un medio selectivo. El órgano con mayor incidencia fue el hígado con 16 muestras. Durante el proceso de identificación microscópica de *Brucella* encontramos un cultivo mixto de Gram (-) y Gram (+) Fig 10.



Figura 9: Disección y gravidez de *Sceloporus*. A) *S. megalepidurus* grávida de dos crías, B) *S. megalepidurus* con dos huevos.

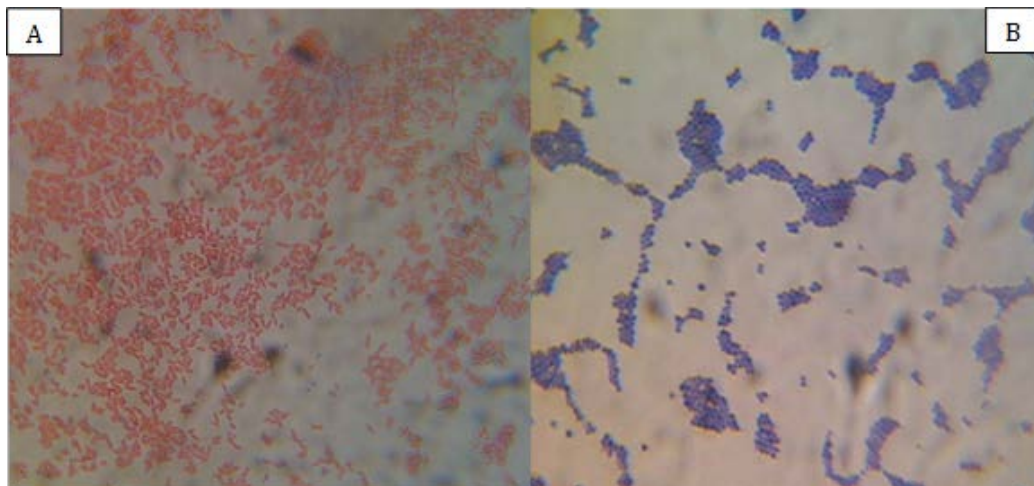


Figura 10: Tinción de Gram. A) cocobacilo Gram (-) *Brucella* spp, B) cocos Gram (+) *Staphylococcus* spp observados en microscopio óptico a 100x.

El crecimiento en los 23 organismos se dividió de la siguiente forma 16 crecimiento bacteriano, 13 de ellos fueron Gram negativo y 3 Gram positivo además 7 presentaron crecimiento fúngico Fig 11.

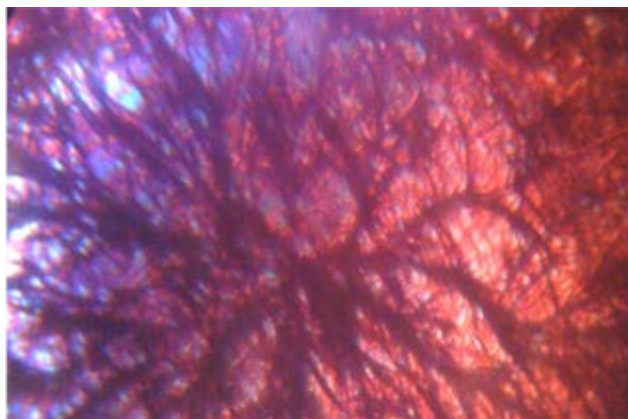


Figura 11: Crecimiento fúngico. Observación en microscopio óptico a 40x.

Las pruebas de actividad metabólica se muestran en el cuadro 5, y la prueba de aglutinación con suero anti-*Brucella* dieron positivas para la muestra S.m.H.22.H.A Fig 12.

Cuadro 5: Resultados de las pruebas de Actividad Metabólica

Prueba/ Cepa	<i>B. abortus</i> (S19)	<i>B. melitensis</i> (M16)	Muestra S.m.H.22.H.A
Tinción de Gram	(-)	(-)	(-)
TSI	(-)	(-)	(-)
LIA	(-)	(-)	(-)
CIT	(-)	(-)	(-)
M	(-)	(-)	(-)
I	(-)	(-)	(-)
O	(-)	(-)	(-)
UREA	(++)	(+)	(+)
RM	(-)	(-)	(-)
VP	(-)	(-)	(-)
Ox	(+)	(+)	(+)
Cat	(+)	(+)	(+)
Anti-suero	(+)	(+)	(+)

El ADN del tejido y de las colonias sospechosas de *Brucella*, así como el control (+) *B. abortus* y *B. melitensis*, y el control (-) *E. coli* se corroboró mediante una electroforesis en gel de agarosa Fig 13.

El DNA de *Brucella sp* en la muestra S.m.H.22.H.A se confirmó gracias al PCR Fig 14.

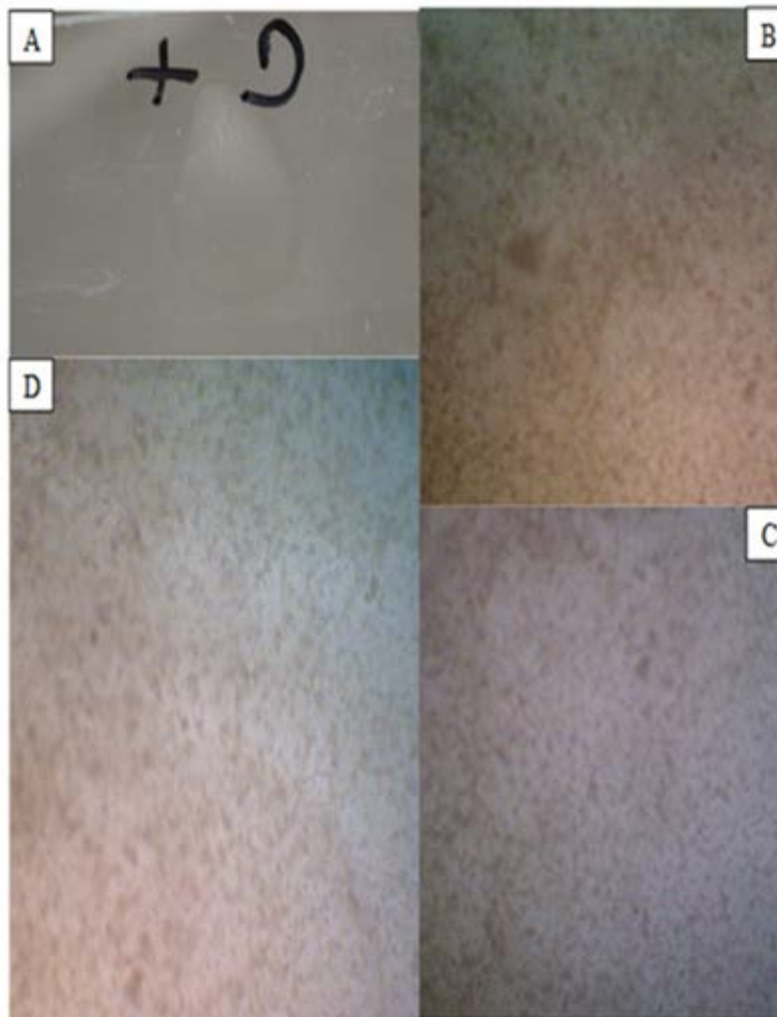
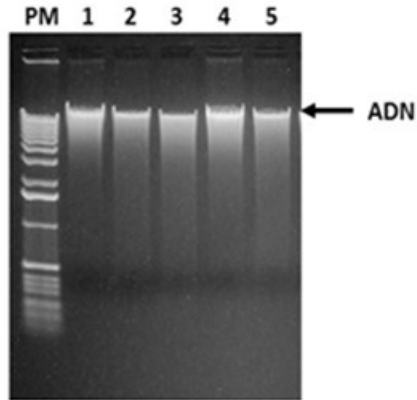
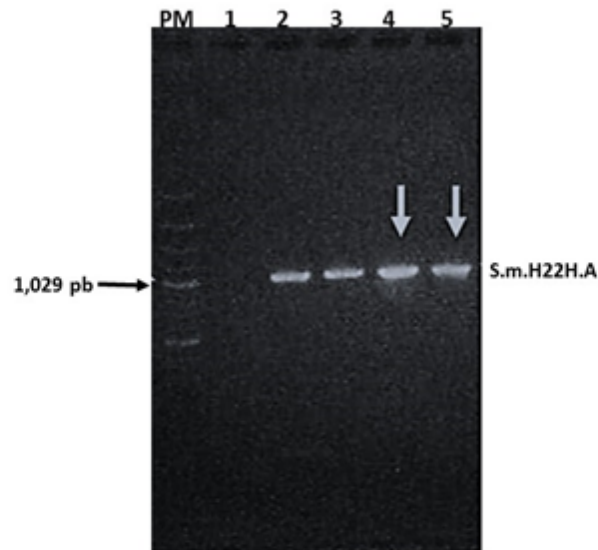


Figura 12: vista de aglutinación macroscópica y microscópica. A) Aglutinación control (+) *B. melitensis* en placa con suero anti-*Brucella*, B) Aglutinación de *B. melitensis*, C) Aglutinación *B. abortus*, D) Aglutinación muestra S.m.H.22.H.A



PM= 1 KB Marcador de peso molecular
 1.- *B. abortus* S19
 2.- *B. melitensis* M16
 3.- Muestra de ADN de hígado de *Sceloporus megalepidurus*
 4.- Muestra de ADN de la cepa recuperada de hígado
 5.- Muestra de ADN de *E. coli*

Figura 13: Electroforesis para verificar la obtencion de ADN. PM) Marcador de peso molecular, 1) *B. abortus*, B) *B. melitensis*, 3) S.m.H.22.H.A tejido, 4) S.m.H.22.H.A colonia aislada, 5) *E. coli*



PM= 1 KB Marcador de peso molecular
 1.- ADN de *E. coli*
 2.- ADN de *B. abortus* S19
 3.- ADN de *B. melitensis* M16
 4.- ADN de hígado de *Sceloporus megalepidurus*
 5.- ADN de la cepa recuperada de hígado

Figura 14: Resultado de la amplificacion del gen bp26/IS711. PM) Marcador de peso molecular, 1) Control (-) *E. coli*, 2) Control (+) *B. abortus* S19, 3) Control (+) *B. melitensis* M16, 4) S.m.H.22.H.A tejido, 5) S.m.H.22.H.A colonia aislada

Los hallazgos de *Brucella* en nuevos reservorios animales, como mamíferos marinos, peces (trucha arcoíris) y anfibios (rana toro) son indicadores de que *Brucella* tiene la capacidad de adaptarse y evolucionar para infectar a nuevos hospederos (Godfroid *et al*, 2005; Whatmore, 2007; Papas *et al*, 2010; Eisenberg *et al*, 2012; Whatmore *et al*, 2015). En el caso de *Sceloporus megalepidurus* especie de donde se aisló *Brucella spp*, las características reproductivas de este lacertilio son una sospecha potencial, ya que estos organismos son vivíparos, la muestra de la cual se aisló fue de una de las hembras grávidas. Sin embargo las crías ya estaban perfectamente formadas por lo que no se sabe si *S. megalepidurus* es solo un portador de *Brucella*, ya que este patógeno imposibilita la capacidad de reproducirse, generando abortos y esterilidad. Sin embargo, hasta la fecha esto solo se ha observado en mamíferos. La falta de estudio relacionado a los efectos de *Brucella* en los grupos de peces y anfibios nos deja la pregunta sin respuesta.

La zona de los Axalapascos es un lugar de convergencia de especies domésticas y de fauna silvestre, ya que los ovejeros llevan a beber a sus cabras, generando así contacto con los animales silvestres. El mal manejo de los residuos de animales infectados aumenta de manera exponencial la probabilidad de contagiarse con este patógeno. Aunque en la zona la principal actividad económica es el manejo de ganado caprino (SAGARPA, 2015), cerca del Lago La Preciosa hay una granja porcina, donde crían y sacrifican animales eliminando sus desechos en el Lago. El contagio de brucelosis en la zona es muy común, ya que los alimentos que se consumen como leche y queso, no son productos pasteurizados por lo que la comunidad está alerta a prevenir la enfermedad Fig 16.

En este estudio se confirma la presencia de *Brucella* en fauna silvestre de la zona, en donde la prevalencia de este patógeno en suelo (Castañeda *et al* , 2005), lagos cráter (Cruz , 2013) y ganado, crean el ambiente ideal para mantener un ciclo no controlado de endemicidad de *Brucella*. El hecho de que este microorganismo tenga la capacidad de sobrevivir y hasta proliferar en suelo y agua, quizá se deba a que conserve ciertas características de sus ancestros, ya que pertenece al grupo de las alfa-proteobacterias de la clase rizobiales. Los estudios donde se indica que la

brucelosis esta siendo controlada o erradicada tanto en México como en otros países, solo se refieren a *B. abortus*, ya que es la especie que tiene mayor influencia en las pérdidas económicas debido a las cantidades de productos animales derivadas de los bovinos, hospedero natural de *B. abortus* (FAO, 2014; SAGARPA, 2015).

B. melitensis en cambio es la especie más patógena de las 11 existentes, esta especie es la que se ha logrado aislar e identificar en muchos de los nuevos reservorios animales emergentes como lo es el delfín nariz de botella y la rana blanca (Godfroid *et al*, 2005, Whatmore *et al*, 2015), la falta de medidas preventivas como vacunas, educación respecto al manejo de residuos contaminados, así como el procesamiento de los derivados lácteos y cárnicos, pueden ayudar a prevenir que esta zoonosis se siga manteniendo y propagando, como una de las enfermedades infecciosas más importantes a nivel mundial (CFSPH, 2009).



Figura 15: Anuncio para evitar contagiarse de Brucelosis en el municipio de Guadalupe Victoria.

El resto del crecimiento bacteriano negativo a *Brucella* se logró identificar hasta género, en el caso de las bacterias Gram (-), 12 *Pseudomonas spp* y las Bacterias Gram (+) hasta especie, 3 *Staphylococcus aureus* Fig 16.

El resultado para el crecimiento fúngico se determinó mediante fenotipificación en el laboratorio de Micología del CICM, ICUAP y se determinó que *Aspergillus fumigatus*. Este hongo se encuentra de forma libre en la materia orgánica del suelo y en material en descomposición, ya que desempeña un papel esencial en el reciclaje de nitrógeno (Suzan *et al* 2000). Este hongo, es el agente causal de Aspergilosis en abejas, sin embargo, no hay reporte de esta enfermedad ya que las abejas son de vida silvestre y son una de las principales fuentes de alimento de *Sceloporus* de la zona Fig 17.



Figura 16: Morfología microscópica de Staphylococcus aureus, cocos Gram (+), B) prueba metabólica, cambio de coloración medio sal y manitol



Figura 17: Abeja Apis sp sobre flor a las orillas de Atexcac

Sin duda, mucha de la fauna silvestre en nuestro país se pierde debido a la falta de estudios que identifiquen las enfermedades y a los patógenos que las producen,

nos encontramos en un medio de constante cambio y esto hace que muchos microorganismos se adapten y evolucionen con estos cambios. En la región de los Axalapascos, Atexcac y La Preciosa, *Brucella* ha sobrevivido por más de 90 años adaptándose a los cambios y conquistando nuevos nichos. Si no se logra controlar y posteriormente erradicar a *Brucella* de la zona seguirá este ciclo de constante enfermedad en el ganado-humano-fauna silvestre y seguirá generando pérdidas de miles de pesos anuales a los propietarios. De esta manera también amenaza el equilibrio ecológico del hábitat, ya que si bien no sabemos los efectos de este patógeno en *Sceloporus* creemos que puede ser un portador que puede afectar a nuevos hospederos.

Conclusiones

- Se determinó la presencia de *Brucella* en una hembra de *Sceloporus megalepidurus* perteneciente a la fauna silvestre aledaña a los lagos cráter del eje Neovolcánico del Estado de Puebla.
- Otro patógeno encontrado en doce *Sceloporus* fue *Pseudomona spp.*
- En dos *S. megalepidurus* y en un *S. spinosus* se aisló e identificó a *Shaphylococcus aureus*.
- *Aspergillus fumigatus*, fue aislado en organismos de *S. megalepidurus* proveniente de los lagos Atexcac y La preciosa.

Los objetivos planteados en este proyecto se cumplieron, dejando como antecedente la presencia de *Brucella* en especies del género *Sceloporus*, siendo este el primer reporte de *Brucella* en reptiles, por lo tanto podemos decir que *S. megalepidurus* es un nuevo reservorio emergente de *Brucella*, además se obtuvo como hallazgo la presencia de otros patógenos dentro de la flora microbiana estudiada de estos organismos. De esta manera se concluye que el estudio realizado nos permitió conocer solo algunos de los muchos patógenos que están afectando a la fauna silvestre, sin embargo, se deben realizar más estudios para determinar el efecto de los mismos, ya que la sola presencia del patógeno no nos indicó el efecto en el estado físico del *Sceloporus*.

BIBLIOGRAFÍA

- Acha N. P.; Szyfres B. 2003. Zoonoses and communicable diseases common to man and animals: Parasitic zoonoses.
- Alton G. G. 1988. Techniques for Brucellosis laboratory. Institut National de la Recherche Agronomic. Paris.
- Aréchiga, C.F.; Aguilera, J.I.; Rincón, R.M.; Méndez de Lara, S.; Bañuelos, V.R.; Meza-Herrera, C. A. 2008. Situación actual y perspectivas de la producción caprina ante el reto de la globalización. Tropical and Subtropical Agroecosystems, Sin mes, 1-14.
- Bolívar A.M 2013 Reacción en cadena de la polimerasa como alternativa diagnóstica para *Brucella abortus*, *Leptospira spp.*, *Mycobacterium bovis* Y *Mycobacterium paratuberculosis*, Redvet. Vol 14 1:14.
- Bricker, BJ; Halling, SM 1994. «Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR» J Clin Microbiol **32** (11): pp. 2660–2666.
- Canseco Márquez L.; Gutiérrez Mayen M. G. 2010. Anfibios y Reptiles del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Pp 133. 154-156
- Castañeda Roldán E.I.; Avelino Flores F.; Espinosa Taxis A.; Chávez Bravo E.; Morales Tepatl E. 2005. Determinación de la sobrevivencia de *B. melitensis* en agua de la red municipal, agua residual, agua de lluvia y suelo de una comunidad de alta morbilidad de brucelosis en el estado de Puebla. “Revista Enfermedades infecciosas y microbiología, 25 (4): Octubre-Diciembre, pp 1-7. México. Medicaweb S.A de C.V ISSN 1870 1388

- Castro H.A., González S.R. y Prat, M.I. 2005. Brucelosis: una revisión práctica. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 39(2), 203-216.
- CFSPH. 2009. The Center Food Security and Public Health,
- D'Anastasio R.; Staniscia T.; Milia M. L.; Manzoli L.; Capasso L. 2010. Origin, evolution and paleoepidemiology of brucellosis. *Epidemiology and Infection*, Cambridge Journal. Pp 149-156.
- El-Tras W.; Tayel A.A.; Eltholth M.M.; Guitian J. 2010. *Brucella* infection in fresh water fish: Evidence for natural infection of Nile catfish, *Clarias gariepinus*, with *Brucella melitensis*. *Veterinary Microbiology*; 141-5, Pp. 321–325.
- Eisenberg T.; Hamann Hans P.; Kaim U.; Schlez K.; Seeger H.; Schauerte N.; Melzer F.; Tomaso H.; Scholz C.H.; Koylass S. M.; Whatmore M. A.; Zschock M. 2012. Isolation of Potentially Novel *Brucella* spp from frogs. *Appl. Environ. Microbiol.* Pp. 3753-3755
- EMDM. Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México.
- FAO. Food and Agriculture Organization 2012.
- Gándara, Benjamín; López Merino, Ahidé; Rogel, Marco Antonio; Martínez-Romero, Esperanza 2001. Limited Genetic Diversity of *Brucella* spp. *Journal of clinical microbiology*

- García Juárez G.; Ramírez Bribiesca E.; Hernández Vázquez M.; Hernández Calva L. M.; Díaz Aparicio E.; Orozco Bolaños H. 2014. Análisis de riesgos de la brucelosis en el estado de Tlaxcala. *Salud Publica Mex* No 4
- Gelev I, Gelev E, 2010. A new species of fish-pathogenic bacterium antigenically related to classical *Brucellae*. *Veterinary Institute, Plovdiv, Bulgaria*. pag 465-482.
- Godfroid J.; Cloeckert A.; Liautard J. P.; Kohler S.; Fretin D.; Walravens K.; Grain Bastuji B.; Letesson J. J. 2005. From the Discovery of the malta fever's agent to the Discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet. Rest.*, 36 3 313-326.
- Gomes Cardoso, Patrícia; Costa Macedo, Gilson; Azevedo, Vasco; Costa Oliveira, Sergio (2006). *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microbial Cell Factories* 5 (13).
- Hernández M I, Peña F. PG, Betancourt M X. 1996. Manual de procedimientos de laboratorio. INDRE/SAGAR. Secretaría de Salud. Secretaría de Agricultura, ganadería y desarrollo rural. OPS.
- INECC. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. 2015
- Kasooha, I. 2009. Uganda Cattle disease hist Kibaale. *All Africa. Vet rec* 134:359
- Makita K.; Fèvre M.E.; Waiswa Ch.; Eisler M. C.; Thrusfield M.; Welburn C. S. 2011. Herd prevalence of bovine brucellosis and analysis of risk factors in cattle in urban and peri-urban areas of the Kampala economic zone, Uganda. *Veterinari Research. BMC* 1746-6148/7/60

- Mantur, BG; Amarnath, SK; Shinde, RS 2007. Review of clinical and laboratory features of human Brucellosis». *Indian Journal of Medical Microbiology*: pp. 188-202.
- Maves C. R.; Castillo R.; Guillen A.; Espinosa B.; Meza R.; Espinoza N.; Nuñez G.; Sánchez L.; Chacaltana J.; Cepeda D.; González S.; Hall R. E. 2011. Antimicrobial Suceptibility of *Brucella melitensis* Isolates in Peru. American Society for Microbiology. ASM 1279-1281
- Jiabo D., Yuanlong, P., Hai J., Junsheng C., Taotao L., Nan Q ., Yi Y., Buyun C., Chen C., Cuihua L., Kairong M., Baoli Z. 2011. Whole genome sequences of four *Brucella* Strains. *Journal of Bacteriology* 193:14:3674-3675
- López M., A., Migranas O., R., Pérez M., A., Magos, C., Salvatierra I., B., Tapia C., R., Valdespino, J.L. y Sepúlveda, J. 1992. Seroepidemiología de la brucelosis en México. *Salud Pública de México*, 34, 230-240.
- O'Callaghan D. y A. Whatmore. 2011. *Brucella* genomics as we enter the multi-genome era. *Revista Briefings in functional genomics*, Oxford, England, 8 pp.
- Ortega, M.; Valdezate, S.; Sáez-Nieto J. A. 2013. Diversidad Genética de *Brucella* en España (55): pp. 38-44.
- Organización Mundial de la Salud. OMS. Brucelosis 2009, 2011, 2012.

- Papas Georgios. 2010. The changing *Brucella* ecology: novel reservoirs, new threats, International Journal of Antimicrobial Agents S8:S11
- Qui J.; Wang W.; Wu J.; Zhang H.; Wang Y.; Qiao J.; Chen Ch.; Gao F. G.; Allain J. P.; Li Ch. 2012. Characterization of periplasmic protein bp26 epitopes of *Brucella melitensis* reacting with murine monoclonal and sheep antibodies. PLoS ONE 7(3): e34246. doi:10.1371/journal.pone.0034246.
- SAGARPA. 2015. Control de la brucellosis
- Scholz C. H., Hubalek Z., Sedlacek I., Vergnaud G., Tomaso H., Al Dahouk S., Melzer F., Kampf P., Neubauer H., Cloeckert A., Maquart M., Zygmunt S. M., Whatmore M. A., Falsen E., Bahn P., Gollner C., Pfeffer M., Huber B., Busse HJ., Nockler K. 2008. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58,375-382
- Suzan G., Ceballos G., Galindo F. 2000. La importancia del estudio de enfermedades en la conservación de Fauna silvestre, Redalyc, vol 31:223-230.
- Verger J. M.; Grimont F.; Grimont P. A. D.; Grayon M. 1985. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. IJSEM Pp. 292-295.
- Wattam A. 2009. Analysis of Ten *Brucella* Genomes Reveals Evidence for Evidence for Horizontal Gene Transfer Despite a Preferred Intracellular Lifestyle. Journal of Bacteriology. pp. 3569-3579.

- Whatmore, A. M; Perret, L. L; MacMillan, A. P. 2007. Characterisation of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing. *BMC Microbiology* (Surrey, Reino Unido) **7**(34).

- Whatmore A. M, E. J. Dale, E. Stubberfield, J. Muchowski, M. Koylass, C. Dawson, K. K. Gopaul, L. L. Perrett, M. Jones and A. Lawrie. 2015. Isolation of *Brucella* from a White's tree frog (*Litoria caerulea*). *JMM Case reports*. Published online.