

110
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DETECCION DE *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*
COMO MICROBIOTA DE SERPIENTES EN
CAUTIVERIO MEDIANTE METODOS
MICROBIOLOGICOS CONVENCIONALES E
HIBRIDACION DE ADN UTILIZANDO COMO SONDA
EL GENE *ompC* DE *Salmonella enterica* subsp.
enterica serovar *typhi*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
OLIVIA RODRIGUEZ MORALES

ASESORES: M.V.Z. ROSA ELENA MIRANDA MORALES
M.V.Z. Ph D. FRANCISCO SUAREZ GUEMES
BIOL. MONICA SALMERON ESTRADA
Q.F.B. M. EN C. MIRIAM BOBADILLA DEL VALLE
M.V.Z. Ph. D. ALFREDO SAHAGUN RUIZ



MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

A Dios con amor y gratitud, por la sabiduría y valor que he recibido de Él en situaciones adversas.

A mis padres con profundo cariño, agradecimiento y respeto por haber hecho de mí y de mis hermanos lo que somos ahora. Los quiero mucho.

A mi hermano Ernesto y su esposa por habernos dado la risa del pequeño Ernesto en nuestro hogar.

A mi consentida Gaby por ser una excelente hermana y una amiga como ninguna. ¡Te quiero!

A mis inseparables compañeras de generación por esos increíbles desvelos de estudio, con mucho cariño: Gaby, Lorelei, Rosalva e Ixchel. ¡COLEGAS Y AMIGAS!

Al recuerdo de una amistad excepcional.

A todos mis amigos, que sin nombrarlos están presentes en mi mente y en mi corazón.

A mis pequeños "gremlins": Rodrigo y Netito.

A mi esposo, con todo mi amor, por su comprensión, apoyo y confianza, pero sobre todo por ser para mí la prueba fehaciente de que el amor existe. ¡TE AMO!

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por tener el orgullo de formar parte de ella; especialmente a mi querida Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por haberme formado.

A mis asesores:

MVZ. Rosa Elena Miranda Morales

MVZ. Francisco Suárez Gríemes

Biol. Mónica Salmerón Estrada

Q.F.B. Miriam Bobadilla del Valle

MVZ. Alfredo Sahagún Ruiz

por compartir conmigo sus conocimientos, su tiempo y su amistad.

A mi H. Jurado:

MVZ. Alejandro de la Peña Moctezuma

MVZ. Marcela Figueras Ochoa

MVZ. Rosa Elena Miranda Morales

MVZ. Edgar Alfonseca Silva

por el tiempo dedicado y las aportaciones recibidas en la elaboración de este trabajo.

A la gran familia que constituye el Depto. de Microbiología e Inmunología de la FMVZ, por la colaboración y apoyo de todos y cada uno de sus miembros; con mención especial a mis compañeros y amigos del laboratorio de Microbiología Molecular.

Al personal del Herpetario de la Facultad de Ciencias, por su ayuda en la colección de las muestras para este trabajo.

A los doctores e investigadores del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" por su colaboración en este trabajo y por hacerme sentir en familia mientras conviví con ellos.

A toda la gente que de alguna u otra manera colaboraron en la realización del presente trabajo.

**Qué difícil se me hace seguir pagando peaje
de esta ruta de locura y ambición.**

**Un amigo en la carrera,
una luz y una escalera**

Y LAS GANAS DE HACER TODO A PULMÓN.

M.R.

CONTENIDO

| | <u>Página</u> |
|-------------------------------------|---------------|
| RESUMEN | 01 |
| INTRODUCCIÓN | 02 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 11 |
| RESULTADOS | 21 |
| DISCUSIÓN | 26 |
| CONCLUSIONES | 32 |
| LITERATURA CITADA | 33 |
| FIGURAS | 36 |
| APÉNDICE DE SOLUCIONES | 38 |

RESUMEN

RODRÍGUEZ MORALES OLIVIA. Detección de *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* como microbiota de serpientes en cautiverio mediante métodos microbiológicos convencionales e hibridación de ADN utilizando como sonda el gene *ompC* de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar. *typhi* (bajo la dirección de MVZ. Rosa Elena Miranda Morales, MVZ. Ph. D. Francisco Suárez Güemes, Biol. Mónica Salmicrón Estrada, QFB. M. en C. Miriam Bobadilla del Valle y MVZ. Ph. D. Alfredo Sahagún Ruiz).

Se colectaron muestras de hisopos cloacales, heces, agua y alimento de 29 serpientes endémicas de México que se encuentran en cautiverio en el Herpetario de la Facultad de Ciencias de la UNAM, para detectar la presencia de *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*. Se utilizaron dos métodos convencionales de identificación: el procedimiento bacteriológico con pruebas bioquímicas según Carter (1984) a dos temperaturas de incubación (25°C y 37°C) y la identificación serológica parcial mediante el empleo de un antisuero polivalente comercial contra el antígeno "O" (grupos A-I) y "Vi"; y un método molecular: el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) mediante hibridación tipo "Southern blot" a partir de ADN digerido con *EcoRV* utilizando como sonda el gene *ompC* de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *typhi*. Como controles en la hibridación se utilizó ADN de *S. enterica* subsp. *enterica* serovar *typhi* (cepa IMSS-1), *S. enterica* subsp. *enterica* serovar *gallinarum*, *S. enterica* subsp. *arizonae* y *Escherichia coli* (cepa HB101). La identificación bioquímica de *S. enterica* subsp. *arizonae* o *Salmonella* spp., o ambas fue en un 45% de la población total de ejemplares muestreados, el 77% de los 30 aislados obtenidos correspondió a *S. enterica* subsp. *arizonae*. La temperatura óptima de crecimiento del género *Salmonella* a partir de muestras de serpientes fue de 25°C. Se comprobó la estrecha asociación que existe entre estos reptiles y *S. enterica* subsp. *arizonae*. El 13% de los aislados mostró una aglutinación positiva con el antisuero polivalente. El análisis de RFLP con hibridación del gene *ompC* corroboró la identificación bioquímica y serológica, y excluyó los aislamientos obtenidos por errores en la identificación debido a la inespecificidad de las pruebas bioquímicas y a las limitaciones de la serología con antisueros polivalentes. El 13% de los aislados tuvo un comportamiento sin señal de hibridación, el 7% mostró una banda de 4.4 kb que podría corresponder a un serotipo de *S. enterica* subsp. *arizonae* con un patrón de RFLP diferente a la mayoría de las *S. enterica* subsp. *arizonae*. Se comprobó que, al igual que el resto de salmonelas, las subespecies de *arizonae* identificadas en este estudio poseen el gene *ompC* y sólo difieren de aquellas por carecer de uno de los sitios *EcoRV* que limita al gene. Se estableció que dentro de los serotipos que incluyen a *S. enterica* subsp. *arizonae* existen algunos con un patrón definido de RFLP de 6.5 kb ó 4.4 kb estrechamente relacionados con las serpientes, por lo que este método molecular resulta una herramienta útil para realizar estudios epidemiológicos tanto en reptiles como en pacientes humanos inmunocomprometidos con salmonelosis atípica por consumo de carne de víbora de cascabel o de sus derivados.

INTRODUCCIÓN

México es uno de los seis países con la diversidad biológica más rica del mundo. Una proporción muy alta de especies de las cuatro clases de vertebrados terrestres (mamíferos, aves, reptiles y anfibios) que lo habitan son endémicas del país, entre éstos el 53.7% corresponde a la de los reptiles. Esto hace que la herpetofauna de México sea una de las más abundantes a nivel mundial, ya que su biodiversidad herpetofaunística no es igualada por otra región del mundo (10, 14).

El orden Squamata de la clase Reptilia incluye a los lagartos y ofidios, con más de 5,900 especies (23, 41). Se han registrado 1,210 especies de reptiles en México, entre las cuales específicamente 583 corresponden a serpientes (10). De acuerdo con la clasificación de Mc Dowell (1987) (29) nuestro país cuenta con 10 de las 16 familias de serpientes del mundo (Typhlopidae, Tropidopneustidae, Loxocemidae, Leptotyphlopidae, Colubridae, Viperidae, Boidae, Elaphidae, Hydrophiidae y Crotalidae) (21). Además es importante mencionar que en México habitan tres familias de serpientes venenosas y es considerado el país de las serpientes de cascabel (familia Crotalidae), ya que cuenta con 25 especies de las 31 ubicadas en el continente americano (1 en Canadá, 15 en Estados Unidos de Norteamérica, 25 en México, 1 en Centroamérica y 3 en Sudamérica) (10).

En los últimos años se ha incrementado la moda de poseer reptiles y anfibios como mascotas, así como la creación de centros de investigación y colecciones herpetológicas privadas o de exhibición, por lo que el Médico Veterinario Zootecnista y otros profesionistas o particulares interesados en esta área deben tener presente tres aspectos importantes: 1) los ofidios mantenidos en cautiverio rara vez se conservan bajo condiciones ambientales adecuadas, 2) muchas de las especies de serpientes se encuentran en grave peligro de extinción, 3) la gran importancia que representan en salud pública, dado que son portadores importantes de agentes infecciosos que ocasionan trastornos clínicos en el hombre, como lo demuestran los abscesos ocasionados después de mordeduras (9, 10, 22), o bien la salmonelosis asociada con el manejo de las serpientes y otros reptiles (tortugas y lagartijas) (31).

ESTUDIOS MICROBIOLÓGICOS EN REPTILES:

Entre las afecciones que con mayor frecuencia llegan a ocasionar mermas importantes en las colecciones herpetológicas se encuentran las de origen bacteriano (19) causadas por microorganismos aerobios y anaerobios asociados principalmente a estomatitis, abscesos, infecciones cutáneas, pulmonares, peritoneales, entéricas y septicemias (8, 17, 23, 40); sin embargo, no está bien establecido si los microorganismos aislados de las serpientes a partir de cavidad oral, cavidad nasal, conjuntiva, cloaca, piel e intestino son patógenos primarios o forman parte de su microbiota, de tal manera que pudieran comportarse como oportunistas (8).

A pesar de los estudios que se han realizado en gran parte del mundo, es poco lo que se conoce con respecto a la microbiota de las serpientes, ya que ésta varía geográficamente debido a los diversos hábitats, a las diferentes especies de serpientes que existen y a la salud oral de los ejemplares (8).

La microbiota, también llamada flora normal, comprende una población permanente de microorganismos que varía tanto en número como en clase de un sitio a otro en las diferentes especies animales y es capaz de verse modificada por la alimentación y la edad del individuo, el clima y la ubicación geográfica; sin embargo, se dispone de escasa información con relación a la microbiota de los animales domésticos y más aún de los silvestres (7, 25).

La presencia de organismos de la microbiota y el estado de portador son dos conceptos con acepciones distintas en el contexto médico. Portador implica que un individuo alberga un patógeno potencial y por tanto puede ser fuente de infección para otros. Su uso más frecuente es referente a infecciones asintomáticas o a un paciente que se ha recuperado de una enfermedad, pero que continúa albergando al microorganismo y puede propagarlo por un tiempo prolongado (25).

Los principales factores que influyen negativamente en la caracterización de la microbiota de estos animales son el material de los hisopos utilizados en la colección de las muestras que puede afectar la viabilidad de los microorganismos, la sensibilidad de las técnicas microbiológicas empleadas para el desarrollo bacteriano tanto aerobio como anaerobio y en especial las condiciones de cultivo de estos últimos (8, 9, 43).

Entre los géneros bacterianos que se han reportado en serpientes, tanto en cautiverio como en vida libre tenemos: en cavidad oral: *Corynebacterium* spp., estafilococos coagulasa negativos (8), *Streptococcus* spp. del grupo D, *Morganella morganii*, *Clostridium* spp., *Micrococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Moraxella* spp., bacilos anaerobios Gram negativos (5, 22, 43), *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*, *Bacteroides fragilis* (41, 43) y *Citrobacter* spp.; en piel: *Edwardsiella tarda*, *Salmonella* spp. y *S. enterica* subsp. *arizonae*, *Achromobacter* spp., *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratus*, *Bacillus* spp., *Citrobacter amalonaticus*, *C. freundii*, *Streptococcus* spp. del grupo D, *Klebsiella oxytoca*, *Micrococcus luteus*, *M. roseus*, *Pseudomonas alcaligenes*, *P. fluorescens*, *P. maltophilia*, *P. stutzeri*, *Serratia liquefaciens*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. hominis*, *S. saprophyticus* y *Streptococcus viridans* (39); en muestras de heces y cloaca: *Pseudomonas* spp., *Providencia* spp., *Edwardsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp. y *Salmonella* spp. (12, 35).

SALMONELOSIS EN REPTILES

El género *Salmonella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae, son cocobacilos Gram negativos de 0.4-1.5 por 2.0-5.0 μm , aerobios o anaerobios facultativos, usualmente móviles, oxidasa negativos, catalasa positivos, reducen los nitratos a nitritos y fermentan la glucosa. Su morfología microscópica es muy similar a la del resto de las enterobacterias y solo se puede distinguir entre ellas mediante los productos de su metabolismo. Las colonias miden de 2 a 4 mm de diámetro y casi siempre producen gas a partir de la glucosa y ácido sulfhídrico en agar triple azúcar hierro

(TSI). Todas las cepas son indol y urea negativas y las reacciones de lisina y ornitina descarboxilasa son generalmente positivas (24).

Existe una subdivisión del género *Salmonella* dentro de los llamados "subgéneros" de Kauffman basada en sus características bioquímicas. En el esquema de Kauffman-White donde los organismos son representados por números y letras que corresponden a los diferentes antígenos O (somáticos), Vi (capsular) y H (flagelar), se consideran sólo a aquellos antígenos de importancia primaria diagnóstica. De esta manera existe un esquema que incluye cinco "subgéneros": I, II, III, IIIa y IV, éste ubica a *Salmonella arizonae* en el subgénero III (24).

Los tipos serológicos clasificados de acuerdo a la composición antigénica de *Salmonella* suman más de 2,200 que resultan de las más variadas combinaciones de sus componentes antigénicos. Actualmente se utiliza la fórmula serológica para definir, sin señalar por nombres, los nuevos tipos que se van agregando a la numerosa lista existente (11).

En años recientes han habido varias modificaciones al esquema de clasificación de estos microorganismos, la proporcionada por LeMinor y Popoff en 1987, que Gyles (1993) (18), Quinn, *et. al.* (1994) (34) y otros autores utilizan como nomenclatura actual, establece que el género *Salmonella* incluye dos especies: *S. enterica* con seis subespecies: 1) *enterica*, 2) *salamae*, 3) *arizonae*, 4) *diarizonae*, 5) *indica* y 6) *houtenae*; y *S. bongori*. La mayoría de las salmonelas pertenecen a *S. enterica* subsp. *enterica*, cuyos miembros son serovariedades que generalmente se denominan con el nombre del lugar donde fueron aisladas por primera vez. Otros aislados son nombrados sólo por la subespecie, seguida de su fórmula antigénica. Aunque la nueva nomenclatura indica que una serovariedad de *S. enterica* subsp. *enterica* debería ser nombrada por el género, la especie, la subespecie y la serovariedad (ej. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar. *typhi*), algunos investigadores usan la forma común y simplificada que nombra únicamente el género seguido de la serovariedad (ej. *Salmonella typhi*) (18, 34).

Salmonella enterica subsp. *arizonae* ha sido aislada de la microbiota intestinal de los reptiles, por lo que se considera a éstos como los principales reservorios y como la fuente más importante de infección en humanos (21, 23, 29, 30, 44). Esto se ha reportado desde 1939, fecha en la que se realizó la primera caracterización de cepas de *S. enterica* subsp. *arizonae* (31) y en la que aún no estaban consideradas como parte del género *Salmonella*, sino que recibían la denominación de *Arizona hinshawii* (20). Actualmente existen más de 400 serotipos en el subgénero de *S. arizonae* según el esquema de Kauffman-White (24, 34).

Además de presentar las características de metabolismo descritas para el género *Salmonella*, las diferencias que presenta la subespecie *arizonae* con el resto de las salmonelas son: la descarboxilación de la lisina, la arginina y la ornitina, la utilización del malonato de sodio, la licuefacción lenta de la gelatina en un medio nutritivo y la fermentación de la lactosa tardía o incluso rápida en medios selectivos y diferenciales (24, 6, 34).

Salmonella enterica subsp. *arizonae* es un microorganismo oportunista, que ha sido implicado en enfermedades graves en humanos, especialmente cuando los pacientes se encuentran inmunocomprometidos (31) por enfermedades tales como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), donde la bacteremia por *S. enterica* subsp. *arizonae* es la primera manifestación clínica en más de un tercio de los individuos clasificados en las categorías de alto riesgo; lupus eritematoso sistémico, neoplasias, enfermedad colágena vascular, enfermedades cardíacas, diabetes y artritis. Se han reportado pacientes que han ingerido como "remedio" preparados de carne de vibora de cascabel como son: pulverizados, cápsulas de pulverizados y piezas desecadas, existiendo el riesgo de graves infecciones y padecimientos (1, 30, 44). Debido a que *S. enterica* subsp. *arizonae* no es un patógeno común en humanos, su presencia puede estar relacionada con el manejo de reptiles o con el consumo de carne de vibora de cascabel, tanto en México como en la población de habla hispana que radica en los Estados Unidos de Norteamérica (27, 30).

Por esta razón se deben realizar cultivos seriados de heces y cloaca de cualquier reptil que se tenga como mascota, así como del alimento y agua de su albergue, para determinar si es reservorio del microorganismo. Se recomienda que sean 3 cultivos a intervalos de 15 días², ya que un cultivo único negativo no se considera significativo, debido a que el rango de excreción de *Salmonella* spp. es variable, además de que su presentación puede ser mayor en algunas especies que en otras (29).

Sin embargo, no es común realizar estudios detallados sobre los agentes infecciosos asociados a las enfermedades de los reptiles, ya que son el grupo de vertebrados menos estudiados entre las poblaciones silvestres (21, 23). Esto se debe a la falta de interés, de apoyo económico y de conocimientos de las condiciones adecuadas de manejo en cautiverio (23).

DIAGNÓSTICO DE LA SALMONELOSIS

El diagnóstico de la salmonelosis está basado en el aislamiento e identificación del microorganismo en medios de enriquecimiento, selectivos y diferenciales. La identificación bioquímica a menudo resulta insuficiente debido a la semejanza en los resultados de las reacciones que existen entre *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*, por lo que puede recurrirse a la identificación serológica por medio del empleo de antisueros conocidos, realizando así la identificación total o parcial de los serotipos. Sin embargo, la asignación de un microorganismo aislado a un serotipo es una cuestión compleja, ya que no hay en el mercado antisueros que incluyan a todos los grupos existentes y, además, los miembros de la familia Enterobacteriaceae están antigénicamente relacionados entre sí, por lo que pueden ocurrir reacciones cruzadas, especialmente entre *Salmonella* spp. y *Citrobacter* spp. (13). De esta manera, los métodos bacteriológico, bioquímico y serológico para el diagnóstico de la salmonelosis resultan poco específicos y con muchas limitaciones.

Recientemente se han desarrollado técnicas moleculares que han sido aplicadas a la investigación de especies de una gran variedad de microorganismos, entre ellos *Salmonella* spp., basadas en la

² Comunicación personal de MVZ. Enrique Yario J.

detección de secuencias específicas de los ácidos nucleicos por medio de la utilización de sondas de ADN marcadas con diferentes métodos; para la diferenciación de géneros y especies de microorganismos ha sido útil el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) digiriendo ADN cromosomal con endonucleasas de restricción y observando los patrones electroforéticos, o bien mediante la amplificación de un segmento de ADN específico de algún microorganismo por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (4).

Las sondas de ADN para la identificación de *Salmonella* han sido utilizadas en la industria alimentaria (15, 16) y en el diagnóstico clínico de la fiebre tifoidea (FT) (36). Sin embargo, en la industria pecuaria todavía no se han desarrollado métodos moleculares que permitan la identificación de *Salmonella* spp. para el diagnóstico clínico de la salmonelosis en las diferentes especies animales.

El análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) se ha utilizado para tipificar microorganismos y determinar si éstos están relacionados o son parecidos, asociando directamente el genoma a una sonda para detectar la presencia o ausencia de sitios para las enzimas de restricción (26, 37).

Puente, *et. al.*, en 1987 (32) desarrolló una sonda genética gracias al aislamiento y secuenciación del gene *ompC* de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar. *typhi* que codifica para la proteína de membrana externa *OmpC* que posteriormente se utilizó para determinar la variabilidad genética de diversos aislados clínicos de *Salmonella* spp., mediante análisis de RFLP. En este estudio se encontró que dicho gene se encuentra altamente conservado dentro de 11 serotipos diferentes de *Salmonella* en una banda de 2.1 kb; sin embargo, el gene no hibridó con un aislado clínico de *S. enterica* subsp. *arizonae*, pero presentó un patrón polimórfico con 9 cepas de *S. enterica* subsp. *arizonae* aisladas de cápsulas de víbora de cascabel (4, 33).

Los estudios realizados de *Salmonella* han demostrado que todas las salmonelas presentan variabilidad en sus pruebas bioquímicas, diversidad antigénica y diferencias en la adaptabilidad al hospedero (13, 18).

Tomando en consideración que la identificación de *Salmonella* spp. por métodos microbiológicos convencionales es muy limitada y la facilidad de que se nos donara el gene *ompC* de *S. enterica* subsp. *enterica* serovar. *typhi*, surgió el interés de probar éste contra ADN de cepas de *S. enterica* subsp. *arizonae* aisladas de serpientes para determinar si dicho gene puede ser útil en la tipificación de los organismos, como una herramienta de identificación adicional a los métodos convencionales y así determinar la presencia de *S. enterica* subsp. *arizonae* como microbiota en estos animales.

En este trabajo se analizaron muestras de hisopos cloacales, heces, agua y alimento de serpientes del Herpetario de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Se aislaron cepas de *Salmonella* spp. y *S. enterica* subsp. *arizonae*, se identificaron por análisis bacteriológico convencional y con métodos serológicos y se analizaron con RFLP mediante hibridación tipo "Southern blot" utilizando como sonda el gene *ompC* de *S. enterica* subsp. *enterica* serovar. *typhi*.

HIPÓTESIS

Salmonella enterica subsp. *arizonae* forma parte de la microbiota de las serpientes en cautiverio.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- Determinación de la presencia de *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* como microbiota en las serpientes en cautiverio que posee el Herpetario de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Aislamiento bacteriológico e identificación bioquímica de *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* de hisopos cloacales, heces, agua y alimento de las serpientes.
- Identificación serológica parcial de *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* mediante el empleo de un antisuero polivalente comercial¹ contra el antígeno "O" (grupos A-I) y "VI".
- Análisis del RFLP mediante hibridación tipo "Southern blot" con el gene *ompC* de *S. enterica* subsp. *enterica* serovar. *typhi* de los aislados de *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*.

¹ BACTO *Salmonella* "O" de DIFCO.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las serpientes con las que se realizó esta investigación fueron 29 individuos de 10 géneros endémicos de México (Tabla No. 1) que se mantienen en cautiverio en el Herpetario de la Facultad de Ciencias de la UNAM y que no son sometidos a algún tipo de manejo adicional a la alimentación y limpieza de los terrarios una vez por semana.

TABLA No. 1
RELACIÓN DE LAS SERPIENTES MUESTREADAS

| GÉNERO Y ESPECIE | EJEMPLAR | SEXO | EDAD | PROCEDENCIA |
|-----------------------------------|----------|--------|---------|--------------------------|
| 1) <i>Crotalus molossus</i> | 1 | macho | 4 años | externa (C.U.) |
| 2) <i>C. atrox</i> | 2 | hembra | 10 años | externa (Querétaro) |
| 3) <i>C. atrox</i> | 3 | macho | 14 años | externa (Sonora) |
| 4) <i>C. scutulatus</i> | 4 | ND | 5 años | externa (Aguascalientes) |
| 5) <i>C. salvini</i> | 5 | ND | 12 años | externa (Veracruz) |
| 6) <i>C. durissus durissus</i> | 7 | hembra | 12 años | externa (Chiapas) |
| 7) <i>C. molossus molossus</i> | 8 | macho | 7 años | interna |
| 8) <i>C. molossus molossus</i> | 9 | macho | 7 años | interna |
| 9) <i>C. scutulatus</i> | 10 | macho | 2 años | externa (Aguascalientes) |
| 10) <i>C. lepidus</i> | 11 | hembra | 3 años | externa (Inst. Higiene) |
| 11) <i>C. triseriatus</i> | 12 | hembra | 1 año | externa (Ajuasco) |
| 12) <i>C. triseriatus</i> | 12' | hembra | 1 año | externa (Ajuasco) |
| 13) <i>Bothrops asper</i> | 13 | hembra | 3 años | externa (Inst. Higiene) |
| 14) <i>B. asper</i> | 14 | macho | 3 años | externa (Inst. Higiene) |
| 15) <i>Pituophis deppoi</i> | 17 | ND | 1 año | externa (Pedregal) |
| 16) <i>Thamnophis</i> sp. | 19 | ND | 2 años | interna |
| 17) <i>Elaphe guttata</i> | 21 | ND | 15 años | externa (Chihuahua) |
| 18) <i>Masticophis flagellum</i> | 22 | macho | 13 años | externa (Sonora) |
| 19) <i>M. mentovarius</i> | 23 | macho | 6 años | interna |
| 20) <i>Drymarchon corais</i> | 25 | hembra | 13 años | externa (Guerrero) |
| 21) <i>Boa constrictor</i> | 26 | hembra | 5 años | externa (Veracruz) |
| 22) <i>Agkistrodon bilineatus</i> | 27 | macho | 3 años | interna |
| 23) <i>A. bilineatus</i> | 28 | hembra | 1 año | externa (Inst. Higiene) |
| 24) <i>A. bilineatus</i> | 29 | macho | 1 año | externa (Inst. Higiene) |
| 25) <i>Drymarchon corais</i> | 30 | hembra | 2 años | externa (Tamaulipas) |
| 26) <i>Crotalus polystictus</i> | 31 | hembra | ND | externa (Cuernavaca) |
| 27) <i>C. polystictus</i> | 32 | hembra | ND | externa (Cuernavaca) |
| 28) <i>Sistrurus erivus</i> | 33 | ND | 1 año | externa (Xochimilco) |
| 29) <i>Pituophis deppoi</i> | 34 | ND | ND | externa (Pedregal) |

ND = No determinado (a)

COLECCIÓN DE LAS MUESTRAS:

Se realizaron tres muestreos a intervalos de 15 días para la colección de hisopos cloacales y heces de las serpientes, así como del agua y alimento (vesícula biliar, intestino y excretas de ratones) el día en que se hace la limpieza de los terrarios y se les proporciona el alimento a los ejemplares. Las muestras de cada ejemplar se colectaron por duplicado.

Se utilizaron hisopos flexibles con punta de algodón natural para coleccionar las muestras de cloaca realizando movimientos giratorios en el interior de la cloaca y depositando el hisopo en tubos con caldo selenito¹.

Las heces se colectaron al momento en que el animal defecaba al ser manipulado y se depositó 1 g de muestra en cada tubo con caldo selenito.

Se recolectaron 15 ml de agua de bebida directamente del grifo en tubos estériles.

Se eligieron al azar dos ratones que les provee el bioterio de la Facultad de Medicina, se sacrificaron y se tomó un centímetro cúbico de vesícula biliar, intestino y heces. Cada muestra se depositó en tubos con caldo selenito.

Las muestras se llevaron al laboratorio para que fueran procesadas de inmediato.

a) ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO:

El procesamiento bacteriológico se realizó en el Depto. de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Un juego de tubos con caldo selenito se incubó a 37°C (temperatura óptima de crecimiento del género *Salmonella*) y otro a 25°C (temperatura del hábitat de las serpientes) durante 18 horas, se hicieron resiembras en placas de agar MacConkey², se incubaron a ambas temperaturas y se observó el desarrollo de colonias pequeñas, brillantes, lactosa negativas para *Salmonella* spp. y lactosa positivas tardías (reacción positiva en más de 48 horas) e incluso rápidas (reacción positiva en menos de 24 horas) para

¹MERCK

²MERCK

Salmonella enterica subsp. *arizonae*. Se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: oxidasas; triple azúcar hierro (TSI); urea; producción de ácido sulfhídrico, indol y motilidad (SIM); citrato; malonato de sodio; agar lisina hierro (LIA); l-lisina; l-orнитina y l-arginina.

b) ANÁLISIS SEROLÓGICO:

Después de haber identificado los organismos como *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* y otros como *Salmonella* spp. por pruebas bioquímicas, se realizó la identificación serológica parcial con el antisuero polivalente comercial de *Salmonella* spp.³ para la detección del antígeno somático "O" que incluye los serogrupos A al I (factores del I al 16, 19, 22 al 25 y 34) y del antígeno capsular "Vi".

En una placa de vidrio se colocó una gota (30 µl) del antisuero polivalente y en el cuadro contiguo una gota de solución salina fisiológica al 0.85% como control negativo, inmediatamente después se tomó con el asa microbiológica una colonia del cultivo de 24 horas y se colocó sobre cada una de las gotas depositadas. Se realizaron movimientos giratorios con palillos de madera estériles para homogeneizar la muestra y se hizo la interpretación basada en la formación de aglutinación.

ANÁLISIS DE RFLP

a) EXTRACCIÓN DE ADN:

Los aislados a probar se crecieron en 40 ml de caldo infusión cerebro corazón⁴ (BHI) a 37°C durante 18 horas en agitación a 250 rpm. El ADN cromosomal se obtuvo con el procedimiento reportado por Betlach y col. (1976) (4): la cosecha de la bacteria se lavó con TE⁵ 10-1 mM dos veces y se resuspendió en 10 ml de TE 50-20 mM. Se adicionó proteinasa K⁶ a una concentración de 100 µg/ml y 1% de SDS⁶ (dodecil sulfato de sodio) dejando incubar durante una hora a 65°C.

³BACTO *Salmonella* "O" de DIFCO

⁴MERCK

⁵Ver apéndice de soluciones

⁶BOEHRINGER MANNHEIM

⁶BIOXON

Se separó el ADN de las proteínas con un volumen igual de fenol⁷, se mezcló durante 15 minutos, se centrifugó a 27,000 g/10 minutos y se separó la fase acuosa en un tubo limpio⁸. Se agregó un volumen igual de fenol : cloroformo⁹: alcohol isoamílico¹⁰ (25:24:1) y se repitió el procedimiento. A la fase acuosa se le agregó 50 µg/ml de ARNasa¹¹, se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y se extrajo el ADN con un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló durante 15 minutos, se centrifugó a 27,000 g/10 minutos y se separó la fase acuosa en un tubo limpio. Se agregó un volumen igual de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se repitió el procedimiento. Se precipitó el ADN con acetato de amonio¹² 0.3 M y dos volúmenes de etanol¹³ al 100% frío durante toda la noche a temperatura ambiente, se lavó dos veces con etanol al 70% centrifugando a 27,000 g/15 minutos y se disolvió en 1 ml de TE (10:1 mM, pH 8). Los extractos se conservaron en refrigeración.

b) ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL ADN

En un gel de agarosa¹⁴ al 1% teñido con bromuro de etidio se comparó la intensidad del ADN genómico con la primer banda del marcador de peso molecular: λ -Hind III¹⁵ correspondiente a 23,130 bp. Teniendo en consideración que el marcador tiene una concentración total de 250 ng/µl y que la primer banda corresponde al 47.81% de esa cantidad, la concentración de esta banda corresponde a 120 ng/µl. Se consideró la intensidad y la migración electroforética del ADN genómico y se estimó el número de veces que excedía en relación con la banda de 120 ng/µl, se multiplicó por esa cantidad y se dividió entre el número de microlitros de cada muestra que se colocó en los pozos del gel.

⁷MERCK

⁸Tubos de centrifuga NALGENE

⁹MERCK

¹⁰SIGMA

¹¹BOEHRINGER MANNHEIM

¹²BAKER

¹³MERCK

¹⁴GIBCO

¹⁵BOEHRINGER MANNHEIM

c) DIGESTIÓN CON LA ENZIMA DE RESTRICCIÓN *EcoRV*:

Se digirieron 0.5-1.5 µg de ADN de los aislados de las serpientes y de las cepas control: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar. *gallinarum*¹⁶, *S. enterica* subsp. *arizonae*¹⁷, *E. coli* cepa HB101¹⁸ y *S. enterica* subsp. *enterica* serovar. *typhi* cepa IMSS-1¹⁹ con la endonucleasa de restricción *EcoRV*²⁰ según las recomendaciones del fabricante. Los ADN's digeridos se corrieron en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio en solución de TBE* 0.5X en una cámara de electroforesis²¹ a 70 volts durante aproximadamente 3 horas (42), se observaron en transituminador²², se les tomó una fotografía²³ y se procedió a realizar la transferencia tipo "Southern blot" a membranas de nylon²⁴.

d) PREPARACIÓN DE LA SONDA:

El plásmido pVF27** , que sirvió de vector de clonación para el gene *ompC* de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar. *typhi* (36) fue transformado a la cepa de *E. coli* HB101 mediante el siguiente procedimiento:

Se prepararon células competentes inoculando *E. coli* HB101 (resistente a estreptomycin) en 5 ml de caldo LB* (Luria-Bertani) adicionado con 100 µg/ml de estreptomycin, se incubó a 37°C con agitación a 200 rpm durante toda la noche. Se tomaron 200 µl de este cultivo y se inocularon en 40 ml de caldo LB con estreptomycin durante 3 horas. El cultivo se centrifugó a 12,500 g/10 minutos, se desechó el sobrenadante, se lavó la pastilla con 20 ml de la solución de

¹⁶ Cepa del Depto. de Microbiología e Inmunología de la FMVZ, UNAM.

¹⁷ Cepa donada por el Depto. de Infectología del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán", obtenida a partir de cápsulas de víbora de cascabel del estado de Puebla.

¹⁸ Cepa donada por el Depto. de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología UNAM, Cuernavaca Mor.

¹⁹ Cepa donada por el Depto. de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología UNAM, Cuernavaca Mor.

²⁰ BOEHRINGER MANNHEIM

* Ver apéndice de soluciones

²¹ HORIZON (GIBCO-BRL)

²² FOTODYNE

²³ FOTODYNE

²⁴ GIBCO-BRL

** Donado por el Dr. José Luis Puente, del Lab. de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología UNAM, Cuernavaca, Mor.

transformación fría¹ y se agitó vigorosamente en el vórtex. Se centrifugó nuevamente a 12,500 g/10 minutos, se resuspendió en 20 ml de la solución de transformación fría, se incubó en hielo por 30 minutos y se centrifugó a 5,200 g/10 minutos a 4°C. La pastilla obtenida se resuspendió en 2 ml de la solución de transformación. Las células se utilizaron de inmediato.

En un tubo de microcentrifuga se colocaron 200 µl de células competentes, 100 ng de ADN del plásmido pVF27 (con marcador de resistencia a ampicilina), se incubó en hielo 45 minutos agitando cada 10 minutos y posteriormente se les sometió a choque térmico a 42°C durante 5 minutos para su transformación.

Después se agregó 1 ml de caldo LB recién preparado y fresco a cada tubo, se incubaron a 37°C durante 60 minutos con agitación a 200 rpm y se sembraron 100 µl en cajas de agar LB con estreptomicina (100 µg/ml) y con ampicilina (500 µg/ml), las cajas se incubaron a 37°C durante toda la noche y se desarrollaron las colonias recombinantes.

EXTRACCIÓN DEL PLÁSMIDO:

Las colonias recombinantes se inocularon en 40 ml de caldo LB con estreptomicina y ampicilina, se incubaron a 37°C durante toda la noche con agitación a 200 rpm. El cultivo se centrifugó a 7,000 g/10 minutos a 4°C y se decantó el sobrenadante.

El plásmido se obtuvo con lisis alcalina de la siguiente manera: la pastilla se resuspendió en 10 ml de la solución SET² fría, se centrifugó a 7,000 g/10 minutos a 4°C y el sobrenadante se decantó. Posteriormente la pastilla se resuspendió en 200 µl de la solución SET fría, se agitó vigorosamente en el vórtex durante 30 segundos y se transfirió a tubos de microcentrifuga; se agregaron 20 µg/ml de ARNasa y se agitó en el vórtex durante 30 segundos. Se agregaron 400 µl de la solución de mezcla lítica³ preparada al momento, se mezcló suavemente por inversión y se incubó en hielo por 10 minutos.

¹ Ver apéndice de soluciones

² GIBCO-BRL

Se agregaron 300 μ l de acetato de sodio²⁵ 3M, el tubo se agitó suavemente en posición invertida en el vórtex durante 10 segundos, se incubó en hielo por 60 minutos, se centrifugó a 13,000 g/15 minutos a 4°C y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. Se agregó un volumen igual de fenol:cloroformo (24:1), se agitó en el vórtex, se centrifugó a 13,000 g/2 minutos a 4°C y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. Se precipitó el ADN con 600 μ l de isopropanol²⁶, se mezcló suavemente y se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos. Posteriormente se centrifugó a 13,000 g/5 minutos a 4°C, el sobrenadante se decantó y se secó la pastilla con un fragmento de papel absorbente pasándolo por las paredes del tubo. La pastilla seca se lavó dos veces con 1 ml de etanol al 70% a 4°C, el sobrenadante se decantó, se centrifugó a 13,000 g/ 5 minutos a 4°C y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente. La pastilla se resuspendió en 50 μ l de TE 10:1 mM y se revisaron 2 μ l de la suspensión en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio; el resto se almacenó en congelación a -20°C hasta su uso.

PURIFICACIÓN DEL GENE *ompC* DE *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar. *typhi*

Se digirieron 0.35 μ g de ADN del plásmido pVF27 con *EcoRV* siguiendo las indicaciones del fabricante. La digestión se revisó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Se observó la banda de 2.1 kb y se cortó del gel, se purificó por electroelución y se determinó la concentración.

MARCAJE DE LA SONDA GENÉTICA

Se marcaron 100 ng del gene *ompC* de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar. *typhi* por el método de iniciadores al azar (random primer) con un equipo comercial²⁷, siguiendo las recomendaciones del fabricante y se almacenó a -20°C hasta su uso. Se probó la especificidad de la sonda marcada realizando hibridación tipo "dot blot" con ADN de *S. enterica* subsp. *enterica* serovar. *typhi*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *Escherichia coli*, *Leptospira interrogans*, *Brucella melitensis* y el bacteriófago λ ZAP Express (FIG. 1'). Las señales de hibridación se detectaron

²⁶ MERCK

²⁷ BIOPRIME ADN Labeling System, GIBCO-BRL
Ver apéndice de figuras

por un sistema no radiactivo de quimiluminiscencia con un equipo comercial²⁸, siguiendo las instrucciones del fabricante.

e) TRANSFERENCIA TIPO "SOUTHERN BLOT":

El gel de las digestiones se procesó de la siguiente manera para realizar la transferencia a membranas de nylon: se sumergió en varios volúmenes de HCl²⁹ 0.25N durante 15 minutos, se lavó con agua desionizada y el ADN se desnaturalizó sumergiendo el gel en una solución de desnaturalización/transferencia³ con agitación suave y constante dos veces durante 20 minutos.

Aparte se cortó la membrana de nylon del tamaño del gel y se activó sumergiéndola en agua desionizada y luego en la solución de desnaturalización/transferencia durante 5 minutos.

Se preparó el sistema de capilaridad como se muestra en la figura No. 2 : sobre un recipiente que contenía solución de transferencia SSC³ 10X se colocó una placa de vidrio como soporte (perpendicular al recipiente). Sobre la placa de vidrio y a manera de puente se colocó un papel filtro mojado con la solución de transferencia y de tamaño mayor que el gel. Sobre el papel filtro se colocó el gel de manera invertida, es decir, con los pozos hacia abajo y evitando la formación de burbujas. El gel se rodeó con un plástico autoadherible para evitar el flujo directo de la solución de transferencia a través del área no ocupada por el gel; la membrana de nylon se colocó encima del gel y sobre ésta dos piezas de papel filtro mojadas con una solución de SSC 2X y una capa de 10 cm de altura de toallas de papel absorbente. Finalmente se colocó otra placa de vidrio y se presionó con un peso de 500 g. Se permitió que se llevara a cabo la transferencia por capilaridad de los fragmentos de ADN digeridos sobre la membrana de nylon durante 24 horas aproximadamente, cambiando continuamente las toallas de papel absorbente.

²⁸PHOTOGENE, GIBCO-BRL

²⁹BAKER

³ Ver apéndice de soluciones

Después de remover las toallas y los papeles filtro, se invirtió la membrana y se marcó con un lápiz suave para referenciarla. La membrana se sumergió en una solución de neutralización* durante 15 minutos a temperatura ambiente y se dejó secar colocándola sobre una toalla de papel durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los fragmentos de ADN transferidos se fijaron a la membrana exponiéndola a una fuente de luz ultravioleta a 254 nm³⁰.

g) HIBRIDACIÓN TIPO "SOUTHERN BLOT"

Las membranas de nylon se humedecieron con SSC 6X durante 2 minutos, se colocaron en bolsas de plástico limpias, se les agregó la solución de prehibridación* y se incubaron a 42°C durante 2 horas.

Por otra parte, en la solución de hibridación* se agregó la sonda previamente desnaturalizada a 100°C durante 5 minutos y enfriada en hielo. Las membranas se colocaron en una bolsa nueva con esta solución y se incubaron a 42°C durante 24 horas. Después de la hibridación las membranas se lavaron dos veces con una solución de SSC 5X, 0.5% de SDS a 65°C durante 5 minutos; y con una solución de SSC 0.1X, 1% de SDS a 50°C durante 30 minutos. Finalmente, las membranas se lavaron con SSC 2X por 5 minutos a temperatura ambiente. Las señales de hibridación se detectaron con el equipo comercial no radiactivo de quimiluminiscencia³¹, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las membranas se colocaron en un cassette para películas radiográficas³², se incubaron a 37°C por 45 minutos y se expusieron a una película radiográfica³³ durante 5 a 10 minutos.

³⁰UV Stratalinker 1800 STRATAGENE

* Ver apéndice de soluciones

* Ver apéndice de soluciones

³¹PHOTOGENE, GIBCO-BRL

³²KODAK

³³KODAK X-OMAT

Las películas se revelaron en un cuarto oscuro sumergiéndolas en una solución reveladora³⁴ durante 5 minutos, en ácido acético³⁵ al 3% durante 1 minuto, en solución fijadora³⁶ durante 5 minutos y se enjuagaron con agua corriente durante 15 minutos (42).

³⁴KODAK
³⁵BAKER
³⁶KODAK

RESULTADOS

De las 29 serpientes muestreadas en el Herpetario de la Facultad de Ciencias de la UNAM se logró el aislamiento y la identificación de *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* o *Salmonella* spp. o ambas, en 13 individuos de 9 especies diferentes (Tabla No. 2), correspondiendo al 45% del total de los ejemplares muestreados.

1. ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO

Se obtuvo un total de 30 aislados, a los cuales se les practicó identificación bioquímica y cuyos resultados se muestran en la tabla No. 3. Puede observarse que 22 (73%) correspondieron a *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* y 8 (27%) a *Salmonella* spp. Del total de los aislados, 19 (63%) fueron recuperados a 25°C y 11 (37%) a 37°C (Tablas No. 2 y 3).

TABLA No. 2
AISLADOS IDENTIFICADOS BIOQUÍMICAMENTE COMO
Salmonella enterica subsp. *arizonae* Y *Salmonella* spp.

| GÉNERO Y ESPECIE (ejemplar) | | TEMPERATURA DE INCUBACIÓN | | | | | |
|--------------------------------|------|---------------------------|------|--------------|------|---------------|------|
| | | 1er. MUESTREO | | 2o. MUESTREO | | 3er. MUESTREO | |
| | | 25°C | 37°C | 25°C | 37°C | 25°C | 37°C |
| <i>Crotalus s. scutulatus</i> | (10) | f* | | | j** | i** | |
| <i>C. s. salvini</i> | (5) | a* | | | | q* | |
| <i>C. polystictus</i> | (31) | e** | | | | v** | x** |
| <i>C. polystictus</i> | (32) | | | i** | | w** | |
| <i>C. atrox</i> | (3) | | | p** | | r** | s** |
| <i>Aphistrodon bilineatus</i> | (27) | | | | k** | | u* |
| <i>A. bilineatus</i> | (28) | ch* | d* | a** | | | |
| <i>A. bilineatus</i> | (29) | g** | | | | | |
| <i>Pituophis doppel</i> | (34) | | i** | n** | | a** | |
| <i>P. doppel</i> | (17) | | b** | | | | |
| <i>Sistrurus ravus</i> | (33) | | h** | l** | m** | y* | z** |
| <i>Elaphe guttata</i> | (31) | c* | | | | | |
| <i>Boa constrictor</i> | (26) | | | g** | | | |

** POSITIVO a *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*

* POSITIVO a *Salmonella* spp.

Se utilizaron letras para identificar los diferentes aislados obtenidos.

TABLA No. 3

Resultados de las pruebas utilizadas para la identificación bioquímica de las colonias de salmonelas desarrolladas en agar MacConkey

| Ejemplar | 1er. muestreo | | | | | | | | | | 2o. muestreo | | | | | | | | 3er. Muestreo | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| | 5 | 17 | 21 | 28 | 28 | 31 | 10 | 29 | 33 | 34 | 10 | 27 | 32 | 33 | 33 | 34 | 26 | 28 | 3 | 5 | 3 | 3 | 10 | 27 | 31 | 32 | 31 | 33 | 33 | 34 |
| Aislado | a | b | c | ch | d | e | f | g | h | i | j | k | l | ll | m | n | ñ | o | p | q | r | s | t | u | v | w | x | y | z | α |
| T° de incub. | 25 | 37 | 25 | 25 | 37 | 25 | 25 | 25 | 37 | 37 | 37 | 37 | 25 | 25 | 37 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 37 | 25 | 37 | 25 | 25 | 37 | 25 | 37 | 25 |
| Superficie (TSI) | K | K | K | K | A | K | A | K | A | A | K | K | A | A | K | K | K | K | K | A | K | K | K | K | A | A | K | K | K | K |
| Fondo (TSI) | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A |
| Prod. de H ₂ S (TSI) | - | + | + | - | + | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + |
| Urea | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Citrato | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + |
| Prod. de H ₂ S (SIM) | - | + | + | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + |
| Indol (SIM) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Motilidad (SIM) | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + |
| Superficie (LIA) | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K |
| Fondo (LIA) | K | K | K | A | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | A | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K |
| Prod. De H ₂ S (LIA) | + | + | + | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + |
| Malonato | - | + | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | - | + | + | + | - | + | + |
| L - lisina | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + |
| L - arginina | - | - | - | - | - | - | - | NR | NR | NR | - | - | - | - | - | - | NR | NR | NR | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L - ornitina | - | - | A | A | A | - | NR | NR | NR | NR | + | - | A | - | + | - | NR | NR | NR | - | - | + | A | + | - | - | + | A | + | - |
| IDENTIFICACIÓN | spp | ari | spp | spp | spp | spp | spp | ari | ari | ari | ari | ari | ari | ari | ari | ari | ari | ari | spp | ari | ari | ari | spp | ari | ari | ari | spp | ari | ari | |

K = alcalino

A = ácido

NR = no realizada

spp = *Salmonella* spp.

ari = *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*

Las especies de serpientes que resultaron negativas al aislamiento de *Salmonella* spp. fueron:

| | |
|-----------------------------------|-----------------------------|
| <i>Crotalus molossus m.</i> | <i>Thamnophis</i> spp. |
| <i>Crotalus durissus durissus</i> | <i>Crotalus lepidus</i> |
| <i>Crotalus triseriatus</i> | <i>Bothrops asper</i> |
| <i>Thamnophis</i> spp. | <i>Masticophis flagelum</i> |
| <i>Masticophis mentovarius</i> | <i>Drymarchon corais</i> |

No se obtuvo ningún aislado positivo a *Salmonella* spp. a partir de las muestras del agua de bebida, ni del alimento (vesícula biliar, intestino y excretas de los ratones).

2. ANÁLISIS SEROLÓGICO

Los resultados de la identificación serológica parcial mostraron sólo 4 aglutinaciones positivas (13%); de las cuales 2 corresponden a aislados identificados bioquímicamente como *Salmonella* spp., correspondientes a ejemplares de las especies *Akistrodon bilineatus* y *Elaphe guttata*; y dos como *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* provenientes de ejemplares de las especies *Crotalus s. scutulatus* y *Sistrurus ravus*.

3. ANÁLISIS MOLECULAR

Como resultado de la hibridación se encontró que 20 aislados (67%) mostraron bandas de 6.5 kb; siete (23%) no hibridaron; uno (3%) hibridó con una banda de 2.1 kb al igual que *S. enterica* subsp. *enterica* serovar. *typhi* y *S. enterica* subsp. *enterica* serovar. *gallinarum* y dos (7%) mostraron una banda de aproximadamente 4.4 kb (Figs. 3 y 4).

Los resultados obtenidos mediante la identificación bioquímica, serológica y el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) se muestran en la tabla No. 4, donde puede observarse que de los 22 aislados identificados bioquímicamente como *S. enterica* subsp. *arizonae*, 16 presentaron la señal de hibridación con una banda de 6.5 kb, presentando uno de ellos identificación serológica positiva; dos hibridaron con la de 4.4 kb y cuatro no hibridaron, teniendo uno de estos últimos identificación serológica positiva.

De los ocho aislados identificados bioquímicamente como *Salmonella* spp., cuatro presentaron señal de hibridación con una banda de 6.5 kb. Uno de estos últimos tuvo identificación serológica positiva. Otro aislado de *Salmonella* spp. hibridó con una banda de 2.1 kb, presentando identificación serológica positiva, y los 3 aislados restantes no hibridaron.

Los resultados de la prueba de especificidad de la sonda en el "dot blot" fueron que el gene *ompC* mostró una marcada señal de hibridación con el ADN de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar. *typhi* y con el ADN de *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*, una señal de hibridación débil con el ADN de *E. coli* (cepa HB101) y no mostró señal de hibridación con el ADN de *Leptospira interrogans*, *Brucella melitensis* ni con el bacteriófago λ ZAP Express (Fig. 2).

TABLA No. 4

RESULTADOS DE LA IDENTIFICACIÓN DE *Salmonella* POR MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS Y POR HIBRIDACIÓN CON EL GENE *ompC* DE *S. enterica* subsp. *enterica* serovar. *typhi*

| ABSLADO | I. BIOTIPI. | I. SEROT. con antisuero polivalente | HIBRIDACION | | | |
|---------|------------------------------|-------------------------------------|-------------|--------|--------|----|
| | | | SI | | | NO |
| | | | 6.5 kb | 2.1 kb | 4.4 kb | |
| s | <i>S. e. subsp. arizonae</i> | | + | | | |
| z | <i>S. e. subsp. arizonae</i> | | + | | | |
| ll | <i>S. e. subsp. arizonae</i> | | + | | | |
| p | <i>S. e. subsp. arizonae</i> | | + | | | |
| o | <i>S. e. subsp. arizonae</i> | | + | | | |
| m | <i>S. e. subsp. arizonae</i> | + | + | | | |
| l | <i>S. e. subsp. arizonae</i> | | + | | | |
| r | <i>S. e. subsp. arizonae</i> | | + | | | |
| v | <i>S. e. subsp. arizonae</i> | | + | | | |
| x | <i>S. e. subsp. arizonae</i> | | + | | | |
| α | <i>S. e. subsp. arizonae</i> | | + | | | |
| j | <i>S. e. subsp. arizonae</i> | | + | | | |
| b | <i>S. e. subsp. arizonae</i> | | + | | | |
| e | <i>S. e. subsp. arizonae</i> | | + | | | |
| h | <i>S. e. subsp. arizonae</i> | | + | | | |
| g | <i>S. e. subsp. arizonae</i> | | + | | | |
| c | <i>Salmonella</i> spp. | + | + | | | |
| u | <i>Salmonella</i> spp. | | + | | | |
| e | <i>Salmonella</i> spp. | | + | | | |
| ca | <i>Salmonella</i> spp. | | + | | | |
| d | <i>Salmonella</i> spp. | + | | + | | |
| i | <i>S. e. subsp. arizonae</i> | | | | + | |
| k | <i>S. e. subsp. arizonae</i> | | | | + | |
| w | <i>S. e. subsp. arizonae</i> | | | | | + |
| k | <i>S. e. subsp. arizonae</i> | | | | | + |
| n | <i>S. e. subsp. arizonae</i> | | | | | + |
| l | <i>S. e. subsp. arizonae</i> | + | | | | + |
| q | <i>Salmonella</i> spp. | | | | | + |
| f | <i>Salmonella</i> spp. | | | | | + |
| y | <i>Salmonella</i> spp. | | | | | + |

DISCUSIÓN

Se encontró que en 13 individuos, correspondientes al 45% de la muestra total analizada se aisló *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* o *Salmonella* spp., o ambas. Esto se debe posiblemente a que el rango de excreción de *Salmonella* spp. es variable y a que su presentación puede ser mayor en algunas especies que en otras (30). Cabe mencionar que los ejemplares de este herpetario nunca han presentado manifestaciones clínicas relacionadas con salmonelosis, aunque también es importante destacar que no son sometidos a algún tipo de manejo que pueda causarles estrés. Aun cuando los muestreos realizados durante este trabajo de investigación pudieron representar un factor de estrés predisponente a la presentación de algún cuadro patológico, no se observaron alteraciones clínicas ni muertes posteriores a la obtención de las muestras en los animales, que pudieran atribuirse a una infección por *Salmonella*.

Lo anterior difiere de las observaciones realizadas por Grajales, *et al.*⁶, quien menciona que en su colección herpetológica son frecuentes las muertes de los ejemplares debido a salmonelosis, enfermedad que cursa con cuadros graves de diarrea, con lesiones intestinales y que se presenta después de algún factor de estrés que comprometa el sistema inmunocompetente del individuo. Frye, por su parte, reportó en 1995 (17) que algunos serotipos de *Salmonella* que habían sido considerados como organismos comensales en reptiles, podían llegar a causar infecciones subclínicas leves y hasta severas o mortales, especialmente en iguanas. Se ha observado que las iguanas de vida libre que han sido capturadas y que son reservorios de *Salmonella* spp. rara vez cursan con infecciones de origen endógeno como resultado de una colonización de su propia microbiota; sin embargo, cuando estos individuos sufren una situación de estrés lo suficientemente grave como para disminuir su capacidad inmunológica (p.e. disputas territoriales a causa del hacinamiento) puede presentarse un cuadro de salmonelosis, que en estos animales cursa con afecciones del sistema tegumentario asociadas a mordeduras tales como: celulitis subcuticular, abscesos, piogranulomatosis y necrosis del tejido; si son afectados los tejidos

⁶ Comunicación personal de MVZ. Luis Grajales Tamm, en el Curso de Manejo de Anfibios y Reptiles en Cautiverio. Laboratorio de Herpetología Vivario de la ENEP. Iztacala; UNAM

periarticulares puede desarrollarse una artritis séptica, lo que da lugar a una septicemia con infecciones en las válvulas atrioventriculares y aórtica y consecuentemente a tromboembolismo y otros disturbios sistémicos (17).

Del total de los aislados obtenidos, *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* fue la especie que presentó mayor frecuencia (73%), lo que sugiere la estrecha relación que existe entre las serpientes y este microorganismo.

De los 19 aislados obtenidos a partir de cultivos incubados a 25°C, el 68% fueron identificados como *S. enterica* subsp. *arizonae*, lo que sugiere que esta especie está adaptada a la temperatura corporal de los reptiles (menor de 37°C), ya que fue posible aislarla con mayor frecuencia a partir de cultivos incubados a 25°C que a 37°C.

Considerando que la subespecie *arizonae* fue la de mayor prevalencia en los reptiles muestreados y que su temperatura óptima de desarrollo fue de 25°C, se sugiere que para estudios posteriores se considere este parámetro de aislamiento. Por otra parte, las diferencias metabólicas que presenta, tales como la fermentación tardía e incluso rápida de la lactosa en medios selectivos y diferenciales, la reacción de TSI con acidificación tanto de la superficie como del fondo del tubo con producción de gas y la utilización del malonato de sodio en la mayoría de los casos, son otros datos que deben considerarse en los procedimientos de identificación del microorganismo.

Se comprobó que los aislados provienen directamente de los ejemplares muestreados y que no se trata de contaminaciones externas, como podrían ser el agua de bebida y el alimento que les provee el bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM, debido a que se realizó el análisis bacteriológico de estas muestras y no se detectó la presencia del microorganismo en ninguna de ellas y a que hubo aislamientos repetidos en algunos de los ejemplares.

Cabe mencionar que en el primer muestreo se probaron otros medios de cultivo para el desarrollo de *Salmonella* spp. como agar verde brillante y agar sulfito bismuto; sin embargo, las colonias se desarrollaron mejor en agar MacConkey, por lo que se optó por utilizar exclusivamente este medio en los dos muestreos posteriores.

El hecho de que sólo haya sido posible identificar serológicamente en forma parcial el 13% del total de los aislados se debe a que el antisuero que se empleó únicamente incluye los serogrupos A al I del antígeno somático "O", factores 1 al 16, 19, 22 al 25 y 34; y el capsular "Vi", excluyendo en su identificación a los serogrupos J al Z y a los factores 51 al 65, siendo en varios de éstos donde se coloca a *S. enterica* subsp. *arizonae* de acuerdo a la clasificación de Kauffman-White (24).

Una posible alternativa en la identificación serológica parcial puede ser la elaboración en el laboratorio de antisueros específicos utilizando las mismas cepas aisladas de los reptiles, con lo que se eliminaría la necesidad de adquirir numerosos antisueros comerciales que incluyan a la mayor parte de los serogrupos de la subespecie *arizonae*.

Por otro lado, en el análisis de RFLP de los fragmentos generados se observó que *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* presentó una señal de hibridación con *ompC* en una banda de 6.5 kb o en una de 4.4 kb, lo que difiere con lo reportado por Puente *et.al.* (1995) (38), quienes no observaron la presencia del gene *ompC* en una cepa de *S. enterica* subsp. *arizonae*, posiblemente debido a que el aislado probado fue una sola cepa de esta subespecie obtenida de un paciente humano con artritis séptica. La hibridación con el fragmento de 6.5 kb y 4.4 kb en 18 aislados de *S. enterica* subsp. *arizonae* en este estudio sugiere la presencia del gene *ompC* en esta subespecie y que en lo único que difiere con *Salmonella* spp. es en que carece de uno de los sitios *EcoRV* que limitan al gene.

Los 16 aislados identificados bioquímica y molecularmente como *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* (uno de ellos además con identificación serológica positiva) demuestran que es posible diferenciar *Salmonella* spp. y *S. enterica* subsp. *arizonae* mediante el análisis de RFLP e hibridación con el gene *ompC*, considerando el perfil definido y constante de una señal de hibridación de 6.5 kb.

Con base en lo anterior se demuestra que la hibridación representa una herramienta más precisa para diferenciar la *S. enterica* subsp. *arizonae* de otras salmonelas, lo que puede ser de utilidad

en estudios epidemiológicos tanto en humanos como en animales (reptiles), que permitan el tratamiento adecuado de la infección en los primeros y, en los segundos, establecer el papel real de *S. enterica* subsp. *arizonae* como parte de la microbiota o como patógeno específico de estos animales.

La existencia de cuatro aislados identificados bioquímicamente como *S. enterica* subsp. *arizonae*, uno de ellos además con identificación serológica positiva con el antisero polivalente, que no mostraron señal de hibridación, sugiere que se trata de cepas de *S. enterica* subsp. *arizonae* que carecen del gene *ompC*, lo cual coincide con lo reportado por Puente, *et. al.* (1995) (38). Al respecto sería conveniente e importante analizar un mayor número de aislados de diferentes orígenes para observar la variación en la presencia de este gene y su relación con la fuente del aislamiento.

Asimismo, el hallazgo de dos muestras identificadas bioquímicamente como *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* que mostraron una señal de hibridación de 4.4 kb también sugiere que se trata de cepas de la subespecie *arizonae* con un sitio *EcoRV* adicional, ya que Puente, *et.al.* (1995) (38) mencionan que en otros 9 aislados de *S. enterica* subsp. *arizonae* obtenidos a partir de cápsulas de vibora de cascabel que fueron analizados por RFLP con el gene *ompC* presentaron patrones polimórficos. En este sentido es necesario realizar estudios de secuenciación para determinar algún posible reordenamiento del gene *ompC* en esta subespecie.

Con relación a los aislados identificados bioquímicamente como *Salmonella* spp. sólo uno de ellos (d) mostró hibridación con el fragmento de 2.1 kb, tal como ha sido reportado para otras cepas de *Salmonella enterica* (38); además, resultó positivo a la aglutinación con el antisero polivalente, lo que sugiere que este aislado posiblemente sea una serovariedad de *S. enterica* subsp. *enterica*. Sin embargo, cuatro aislados presentaron el patrón de 6.5 kb en la hibridación, aun cuando sólo uno de ellos resultó positivo a la identificación serológica y los cuatro resultaron negativos al malonato de sodio en la identificación bioquímica, lo que los identificó como *Salmonella* spp. Al respecto, se consideraron prioritarios los resultados obtenidos por técnicas

moleculares. En este caso, los resultados de la identificación bioquímica confirman que la utilización del malonato de sodio por cepas de *S. enterica* subsp. *arizonae* no es positiva en el 100% de los casos, tal como lo indica Bergey (24), de ahí que el análisis de RFLP constituyó en este estudio la herramienta más certera para la identificación de las cepas de la subespecie *arizonae* que corresponden al 10% de los microorganismos que este autor señala como malonato negativos.

Tres de las muestras que bioquímicamente se identificaron como *Salmonella* spp. resultaron negativas a la identificación serológica con el antisuero polivalente y no presentaron ninguna banda de hibridación, en más de dos ensayos realizados. Esto sugiere la inespecificidad de las pruebas bioquímicas para la familia Enterobacteriaceae, tratándose posiblemente de aislados identificados erróneamente como *Salmonella* spp.

Considerando que *S. enterica* subsp. *arizonae* muestra un marcado polimorfismo en el análisis de RFLP, de acuerdo con las investigaciones realizadas por Bobadilla (1992) (5) y Puente, *et. al.* (1995) (38), el patrón constante observado en este estudio en 22 de las muestras analizadas se debe posiblemente a que estos reptiles son reservorios de serotipos específicos de la subespecie *arizonae* que presentan el gene *ompC* en un fragmento de ADN de 6.5 kb ó 4.4 kb.

Ocho de los ejemplares que resultaron positivos al aislamiento de *S. enterica* subsp. *arizonae* son individuos de procedencia externa con menos de dos años de ingreso al herpetario de la Facultad de Ciencias, tres con más de diez años de ingreso y uno de los ejemplares es de procedencia interna, nacido bajo condiciones de cautiverio en este herpetario hace tres años. La procedencia de los individuos positivos al aislamiento corresponde a diversos estados de la República Mexicana: Sonora, Veracruz, Aguascalientes, Chihuahua y D.F. de las regiones de Xochimilco, Ciudad Universitaria y Cuernavaca y son individuos que estaban tanto en vida libre como en cautiverio.

A pesar de que se tiene conocimiento de los antecedentes de cada ejemplar en cuanto a sus hábitos de alimentación, región geográfica y hábitat anteriores a su cautiverio en este herpetario,

no es posible generalizar si todas las serpientes son reservorios de los serotipos específicos de *S. enterica* subsp. *arizonae* que presentan el gene *ompC* en un fragmento de ADN de 6.5 kb ó 4.4 kb, ya que estas condiciones son difíciles de evaluar si se considera que el microorganismo puede permanecer viable en el ambiente por periodos largos y de esta manera ser adquirido por los ejemplares.

Se sugiere profundizar este estudio realizando un mayor número de muestreos en colecciones herpetológicas de origen diverso, de ejemplares en vida libre de diferentes regiones geográficas del país, de los productos comerciales naturistas elaborados a partir de serpientes y de muestras clínicas de pacientes con padecimientos relacionados con salmonelosis por el consumo de productos elaborados a base de serpientes o de reptiles en general. Se sugiere caracterizar los aislados obtenidos bioquímica y serológicamente y comparar el "finger printing" entre ellos y contra *Salmonella enterica*, así como determinar si existen otros tipos de *S. enterica* subsp. *arizonae* con diferencias en su RFLP, además de los encontrados en este estudio.

CONCLUSIONES

Se determinó la presencia de *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* o *Salmonella* spp. o ambas en el 45% de la población de serpientes endémicas del país que posee el Herpetario de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

La presencia de *S. enterica* subsp. *arizonae* o *Salmonella* spp. o ambas detectada en las serpientes mantenidas bajo condiciones de cautiverio del Herpetario de la Facultad de Ciencias sugiere la posibilidad de que los ejemplares hayan padecido infecciones subclínicas adquiridas de diversas fuentes y se mantengan en un estado de portador; o bien la posibilidad de que se trate de serovariedades apatógenas para las serpientes, altamente adaptadas a estos hospederos y que pudieran considerarse como microbiota de estos reptiles.

La temperatura óptima para el desarrollo de las salmonelas a partir de muestras provenientes de serpientes es de 25°C.

Se señala la conveniencia de incluir el análisis de RFLP con hibridación tipo "Southern blot" utilizando como sonda el gene *ompC* de *S. enterica* subsp. *enterica* serovar. *typhi* como una alternativa útil para la diferenciación entre las diferentes salmonelas aisladas a partir de serpientes y otros reptiles.

Se estableció que dentro de los serotipos que incluyen a *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* existen algunos que presentan un patrón definido de RFLP al ser hibridado contra el gene *ompC* estrechamente relacionado con las serpientes, especialmente en una banda de 6.5 kb, por lo que la identificación molecular constituye la herramienta más precisa, misma que podría ser empleada en estudios epidemiológicos en reptiles e incluso en casos clínicos de pacientes humanos inmunocomprometidos con salmonelosis atípica por el consumo de carne de vibora de cascabel o de sus derivados.

LITERATURA CITADA

1. Babu, K., Sonnenberg, M., Kathpalia, S., Ortega, P., Swiatlo, A.L. and Kocka, F.E.: Isolation of *Salmonellae* from dried rattlesnake preparations. *Jour. Clin. Micr.*, 28: 361-362, (1990).
2. Bernardini, M.L., Sanna, M.G., Fontaine, A. and Sansonetti, P.J.: OmpC is involved in invasive of epithelial cells by *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.*, 61:3625-3635, (1993).
3. Betlach, M.C., Hershfield, V., Chow, L., Brown, W., Goodman, H.M., and Boyer, H.W.: A restriction endonuclease analysis of the bacterial plasmid controlling the *EcoRI* restriction modification of DNA. *Fed. Proc.* 35: 2037-2043 (1976).
4. Bobadilla, V.M.: Análisis molecular del gene *ompC* de *Salmonella typhi*, Tesis de Maestría en Biotecnología. *Unidad Académica de los Ciclos Profesionales y de Posgrado del C.C.H. Universidad Nacional Autónoma de México.* México, 1992.
5. Burke, T.J., Rosenberg, D. and Smith, A.R.: Infectious Stomatitis: A perspective study of normal flora and report of an unusual case. *Annual Proceedings. Am. Assoc. of Zoo Vet.*, 190-196, (1979).
6. Carter, G.R.: Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology, *Charles C. Thomas Publisher, Illinois*, 1984.
7. Carter, G.R., Chengappa, M.M.: Bacteriología y Micología Veterinarias. Aspectos esenciales, 2a. ed., *Manual Moderno*, México, D.F., 1994.
8. Cooper, J.E.: Bacteriological studies on snakes. *Trans. of The Roy. Soc. of Trop. Med. and Hyg.*, 86: 109-110 (1992).
9. De Andrade, J.G., Pinto, R.N., De Andrade, A.L., Martelli, C.M. and Zicker, F.: Bacteriologic study of abscesses caused by bites of snakes of the Genus *Bothrops*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 31: 363-367 (1989).
10. Delgado del Olmo, J.A.: Medicina y Manejo de los Ofidios. IV Seminario de Titulación de Fauna Silvestre. *Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México.* México, 1993.
11. Divo, A.: Microbiología Médica. 4a. Ed. *Ed. Panamericana*, México, 1990.
12. Draper, C.S., Walker, R.D. and Lawler, H.E.: Patterns of oral bacterial infection in captive snakes. *Jour. of the Am. Vet. Med. Assoc.*, 179: 1223-1226 (1981).
13. Ewin, W.H.: *Edward's and Ewing's identification of enterobacteriaceae.* 4a. Ed. *Eisevier Science Publishing Co. Inc, U.S.A.*, 1986.
14. Flores, V.O.: *Herpetofauna Mexicana. Carregie Museum of Natural History. Special publication.* U.S.A., 1993.
15. Fitts, R., Diamond, M., Hamilton, C., y Neri, M.: DNA-DNA hybridization assay for detection of *Salmonella* spp. in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:1146-1151 (1983).
16. Fitts, R.: Development of a DNA-DNA hybridization test for the presence of *Salmonella* in foods. *Food technol.*, 39:95-103 (1985).
17. Frye, F.L.: Salmonellosis in pet reptiles and their owners. *Reptiles.* 3:26-42 (1995).

18. Gyles, C.L., Thoen, C.O.: Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. 2a. ed. *Iowa State University Press, Ames, Iowa, U.S.A.*, 1993.
19. Grajales, T.L.J., León, M.M.G., Cortez, J.M. y Godínez, C.E.: Afecciones de Origen Microbiológico Detectadas en la Colección de Anfibios y Reptiles del Laboratorio de Herpetología Vivario de la UNAM-Iztacala. *Coloquio de Investigación, México*, 1992.
20. Guckian, M.D., Byers, E.H., and Perry, J.E.: Arizona infection of man. *Arch. Intern. Med.*, 119: 170-175 (1967).
21. Jacobson, E.R.: Snakes. En: Memorias-Diplomado en Medicina y Manejo de Fauna Silvestre. Mód. III-Reptiles y Aves corredoras, *División de Educación Continua. FMVZ, UNAM*, 1993.
22. Jorge, M.T., de Mendonca, J.S., Ribeiro, L.A., da Silva M.L., Kusano, E.J. and Cordeiro, C.L.: Bacterial flora of the oral cavity, fangs and venom of *Bothrops jararaca*: Possible source of infection at the site of bite. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.*, 32: 6-10 (1990).
23. Kirk, R.W.: Terapéutica Veterinaria. Práctica Clínica en Pequeñas Especies. *Cla. Editorial Continental, S.A., México*, 1981.
24. Krieg, N.R., Holt J.G.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol.I. Williams & Wilkins, London*, 1984.
25. Levinson, W.E., Jawetz, E.: Microbiología e Inmunología. Evaluación y Repaso. *Manual Moderno, México, D.F.*, 1992.
26. Lewin, B. : *Genes V, Oxford University Press Inc. New York, U.S.A.*, 1994.
27. Márquez, D.G., Martínez, B.C., y Suárez, R.I.: Cápsulas de Víbora Desecadas. Una Fuente Potencial de Infección por Bacterias Gram-negativas. *Rev. Invest. Clin.*, 43: 315-317 (1991).
28. Murphy, J.B. and Collins, J.T.: Reproductive Biology and Diseases of Captive Reptiles. *Society for the Study of Amphibians and Reptiles, U.S.A.*, 1980.
29. McDowell, S.B.: Systematics. In: Snakes, Ecology and Evolutionary Biology. Edited by: Seigel, R.A., Collins, J.T. and Novak, S.S., 3-50, *Macmillan Publishing Co., New York*, 1987.
30. Noskin, G.A. and Clarke, J.T.: *Salmonella arizonae* bacteremia as the presenting manifestation of Human Immunodeficiency Virus infection following rattlesnake meat ingestion. *Rev. of Infect. Dis.*, 12: 515-517 (1990).
31. Plummer, R.A.S., Blissett, S.J. and Dodd, C.E.R.: *Salmonellae* from a pet snake and its bedding. *The Lancet*, 33: 440 (1992).
32. Puente, J.L., Flores, V., Fernández, M., Fuchs, Y., and Calva, E.: Isolation of an *ompC*-like outer membrane protein gene from *Salmonella typhi*. *Gene*, :75-83 (1987).
33. Puente, J.L., Juárez, D., Bobadilla, M., Arias, C.F., y Calva, E.: The *Salmonella ompC* gene: Structure and use as a carrier for heterologous sequences. *Gene*, 156: 1-9 (1993).
34. Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B., and Carter, G.R.: *Clinical Veterinary Microbiology, Wolfe Publishing, London*, 1994.
35. Roggendorf, M. and Muller, H.E.: Enterobacteria of reptiles. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Erste Abteilung Originale.*, 236A: 22-35 (1976).

36. Rubin, F.; McWhirter, P., Punjabi, N., Lane E., Sudarmono, P., Pulungsih, S, Lesmana, M., Kumala, S., Kopecko, D. and Hoffman, S.: Use of a DNA probe to detect *Salmonella typhi* in the blood of patients with typhoid fever. *Jour.Clin.Microbiol.*, 27: 1112-1114 (1989).
37. Russell, p.j : Genetics, 2nd de., *Scott, Foresman and Company*, City, State, U.S.A., 1990.
38. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. Molecular Cloning a Laboratory Manual. 2nd edition. *Cold Spring Harbor Laboratory*, New York, 1989.
39. Sheridan, B.S., Wilson, G.R. and Weldon, P.J.: Aerobic bacteria from the skin of the rattlesnake *Crotalus atrox*. *Jour. of Herpetol.*, 23: 200-202 (1989).
40. Stewart, J.S.: Anaerobic bacterial infections in reptiles. *Jour. of Zoo and Wildlife Med.*, 21: 180-184 (1990).
41. Talan, D.A., Citron, D.M., Overturf, G.D., Singer, B., Froman, P. and Goldstein, E.J.C.: Antibacterial activity of crotalid venoms against oral snake flora and other clinical bacteria. *Jour. Infect. Dis.*, 164: 195-198 (1991).
42. The Merk Veterinary Manual. 7a. ed. *Ed. Board*, U.S.A., 1991.
43. Theakston, R.D.G., Phillips, R.E., Looareesuwan, S., Echeverria, P., Makin, T. and Warrell, D.A.: Bacteriological studies of the venom and mouth cavities of wild malayan pit vipers (*Calloselasma rhodostoma*) in Southern Thailand. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 84 : 875-879 (1990).
44. Waterman, S.H., Juárez, G., Carr, S.J. and Kilman, L.: *Salmonella arizonae* infections in latinos associated with rattlesnake folk medicine. *Am. Jour. Pub. Hea.*, 80: 286-289, (1990).

APÉNDICE DE FIGURAS

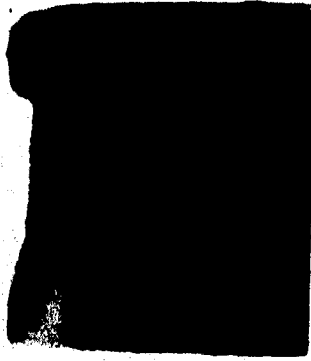


FIGURA No. 1

Hibridación tipo "Dot blot" de la sonda biotinilada contra ADN de diferentes microorganismos

Señal de hibridación muy marcada en *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *typhi* y *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*; señal de hibridación leve en *Escherichia coli* HB-101; sin señal de hibridación en *Leptospira interrogans*, *Brucella mellitensis* y virus λ ZAP-Express

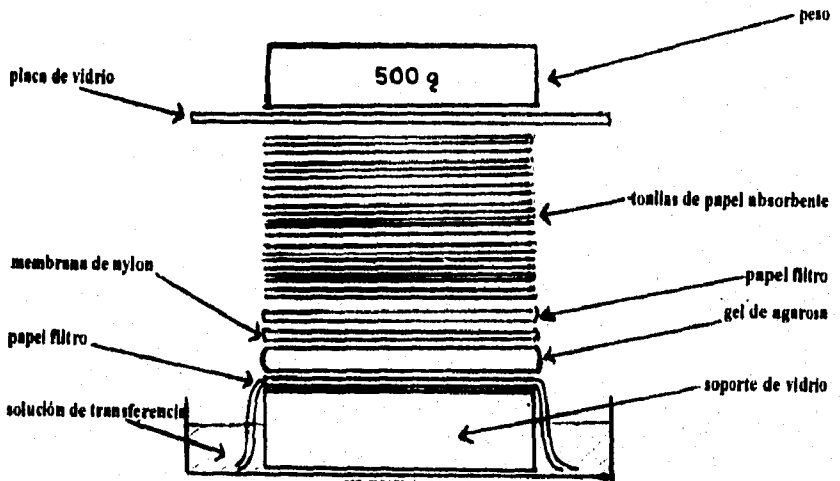


FIGURA No. 2

Transferencia de ADN por capilaridad a partir de geles de agarosa

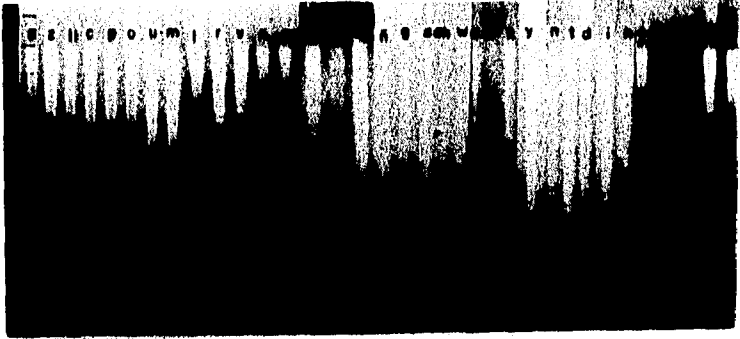


FIGURA No. 3

Digestiones con *EcoRV* de los aislados obtenidos de las serpientes y de los controles
CONTROLES: 1. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar. *typhi*, 2. *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*, 3. *Escherichia coli* HB101, 4. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar. *gallinarum*



FIGURA No. 4

Hibridación tipo "Southern blot" con el gene *ompC* de los aislados de las serpientes y de los controles digeridos con *EcoRV*

CONTROLES: 1. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar. *typhi* (banda de 2.1 kb), 2. *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* (banda de 6.5 kb), 3. *Escherichia coli* HB101 (banda no señalada), 4. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar. *gallinarum* (banda de 2.1 kb)

APÉNDICE DE SOLUCIONES:

- **TE 10-1 mM** Tris-HCl 10 mM, pH 8
Na-EDTA¹ 1 mM, pH 8
- **solución de TBE 0.5X** Tris²-Ácido bórico³ 4.5 mM
Na-EDTA 1 mM
- **medio LB (Luria-Bertani)** A 950 ml de H₂O desionizada, agregar :
10 g de bacto-triptona⁴
5 g de bacto-extracto de levadura⁵
10 g de NaCl⁶
Agitar hasta disolver, ajustar el pH a 7.0, ajustar a 1 litro, esterilizar por autoclave a 121°C/ 15 lb / 20 minutos
- **solución de transformación** CaCl₂⁷ 100 mM
Tris-HCl 5mM pH 7.5
Mg Cl₂⁸ 5 mM)
- **solución SET** sacarosa⁹ al 20%
Tris-HCl 50 mM pH 7.6
Na-EDTA 50 mM pH 8)
- **solución de mezcla lítica** SDS¹⁰ 1%, NaOH¹¹ 0.2 N
- **solución de desnaturalización/transferencia** NaCl 1.5M, NaOH 0.5N
- **SSC 10X** NaCl 1.5M
citrato de sodio dihidratado¹², 0.05M
- **solución de neutralización** Tris-HCl 0.5M
NaCl 1M

¹ SIGMA² SIGMA³ GIBCO-BRL⁴ DIFCO⁵ MERCK⁶ MERCK⁷ MERCK⁸ BAKER⁹ BIOXON¹⁰ BIOXON¹¹ BAKER¹² BAKER

- solución de prehibridación

SSC 6X

Reactivo de Denhardt 5X:

Ficoll¹³

polivinilpirrolidona¹⁴

albúmina sérica bovina¹⁵

SDS 0.5%

100 µg de esperma de salmón¹⁶

50% de formamida¹⁷

- solución de hibridación

SSC 6X

SDS 0.5%

100 µg de esperma de salmón

50% de formamida

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

¹³ PHARMACIA

¹⁴ MERCK

¹⁵ BOEHRINGER

¹⁶ GIBCO-BRL

¹⁷ CALBIOCHEM