



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

IDENTIFICACIÓN DE *Salmonella* spp. EN MUESTRAS CLOACALES
DE QUELONIOS (TORTUGAS) MANTENIDAS COMO ANIMALES DE
COMPAÑÍA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

GABRIELA DE JESUS CONSTANTINO CORZO

ASESORES:

DR. DANIEL MARTÍNEZ GÓMEZ

DR. ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ

DRA. DULCE MARÍA BROUSSET HERNÁNDEZ JÁUREGUI



MÉXICO, D. F.

2011



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 C. Guadalupe Corzo Ruíz (mi mamá) y José A. Constantino Cordero (mi papá),

A mis hermanos Bernabé y José A.; a Alejandro CM y los abuelos.

Para: Pinky, Doggie, Siete, Ricky, Rito, Choncha, Plana, Ninja, Cookie, Puppy.

A todos con mucho cariño.

AGRADECIMIENTOS

A Dios que siempre está conmigo, manifestándose de hermosas y a veces incomprensibles maneras para mí.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y la Universidad Nacional Autónoma de México, por todo lo que estas instituciones ponen a nuestra disposición para el enriquecimiento cultural, intelectual, físico, etc., por ser parte de mi educación y formación.

A mis papás por su paciencia, comprensión, apoyo, cariño, etc., todo lo involucrado en el tiempo que duró este trabajo.

Antonio Verdugo R, por la oportunidad de vivir la experiencia de la investigación y realizarla en tu laboratorio, una gratificante e inolvidable etapa por las cosas aprendidas y las personas que se quedaron en mi vida. Gracias por tus enseñanzas, tu confianza, paciencia, tu enriquecedora plática, por escucharme, tu comprensión y el apoyo económico.

Daniel Martínez G, con tu enorme paciencia, entusiasmo, improvisaciones, tu tiempo, apoyo, enseñanzas, tus conocimientos, tu pasión por lo que haces, gracias a ti hice mi trabajo.

Dulce Brousset HJ, mi interés en este proyecto principalmente surgió por la oportunidad que me diste al enseñarme e involucrarme en una de tus áreas de conocimiento, la clínica de la fauna silvestre, sin imaginarme que me conllevaría a una de las vivencias más enriquecedoras y bonitas de mi vida, gracias porque desde que te conozco te pedí paciencia en todo sentido y siempre me la concediste y por tu amistad.

H. LMM: simplemente sin ustedes no habría disfrutado ni sufrido este trabajo de manera tan intensa.

Alfredo Castañeda R, mi asesor sin papel, siempre tuviste tiempo para enseñarme, para involucrarte en mi trabajo, para escucharme, para darme palabras de ánimo y confianza, sobre todo cuando quise desistir, para ser mi amigo.

Edith MC, torito mi hermana, siempre confiaste en mí, siempre has sido un apoyo en todo sentido, gracias por recorrer parte del camino juntas, por explicarme y ayudarme cuando lo necesité en cualquier aspecto, en todo momento.

Ilane HM, amiga, hiciste de mi paso por el laboratorio horas de aprendizaje, que el cariño y la dedicación al trabajo tiene su recompensa, gracias por las horas de plática, trabajo, risas, ayuda y por tu amistad.

Luis AQM, sabes que colaboraste en una parte de este trabajo, gracias por eso y por contar contigo.

Mauricio AN, gracias por tu constante presión y ayuda en tratar de orientarme y hacer más ameno mi trabajo cuando ya no encontraba sentido a continuar, por tu amistad.

Mis amigos (LMM): Emilio, Julio, Adolfo, Zulema, Miriam, Larissa, Marcela FO, Elvia L, Jimena, por su apoyo en todo momento, en las risas, alegrías, lágrimas, tristezas, cansancio, desesperación, por sus abrazos y cariño. Y Julio García H por siempre contar contigo.

Francis por sus consejos y aun que sé que es su trabajo, la dedicación y perfeccionamiento para hacer lo que le corresponde fue una enseñanza que le agradezco.

Xóchitl VM, amiga gracias por querer orientarme laboral y personalmente durante todo este recorrido, por comprenderme y no dejarme pese a mi negatividad, por contribuir sobre todo en la etapa final, por no dejar de presionarme y por preocuparte y ocuparte de mí.

Departamento de Microbiología e Inmunología, principalmente al personal del área de preparación de medios y diagnóstico por todo el apoyo y facilidades brindadas, en especial a Raúl Segura C, siempre fuiste incondicional y te esmeraste en enseñarme a trabajar de la mejor manera y por quedarme con tu amistad, a Maritoña M, el trabajo en el laboratorio se hace con calma, con alegría y se disfruta.

Departamento de Etología, Fauna Silvestre y Animales de Laboratorio a todos los que en su momento en mi estadía con ustedes me dieron palabras de motivación y apoyo. (Sandra M, Bere P, Valeria A, Claudia E, Adriana C, Dr. Carlos G, Dra. Sisto, Gaby B, Claudia R, Luis FR, Karola A, Tere B.). Ricardo Czaplewski por los contactos con las personas que confiaron en mí para trabajar con sus tortugas y tu apoyo.

Hospital Veterinario de Especialidades por las facilidades prestadas en la toma de las muestras de los pacientes.

Karina FP, amiga gracias por todo lo que has hecho por mí, antes, durante y después de esta etapa, y en este ciclo compartir esos días escribiendo, por cuidarme este largo camino y procurar mi bienestar, sin tus palabras de motivación y confianza no habría dado el último paso.

Dr. Juan Arturo RR, Dr. Daniel Atilano, Dra. Dulce Brousset, Dr. Alfredo Castañeda, Dr. Daniel Martínez, Dr. Antonio Verdugo, Dr. José Ramírez, Dra. Xóchitl V, por las observaciones y aportaciones a mi escrito, tratando de hacerlo mejor, mil gracias.
Lupita Sánchez por orientarme en la parte estadística y ser paciente y Dra. Rebeca Aguirre Hernández (Fac. Medicina) por el apoyo en el análisis estadístico.

Fam. López Constantino, por el apoyo incondicional en todo sentido, mil gracias y Fam. Zamora Caballero, gracias por creer en mí, apoyarme y recargar fuerzas en mí para continuar.

A mi extensa familia mis tíos, primos, sobrinos, Jaime, Tere y Mario, Carmen y Manuel, Gil M, Amparo, Laura, Mariqueta, Ana MP, Chepa, Gil T, Olga, todos, que indirectamente participaron dándome palabras, energía y ánimo para regresar al trabajo.

Eduardo DR, te tocó vivir conmigo la esperanza y desesperanza de mi agonía para enfrentar lo último, gracias por tu paciencia, palabras y taladrante insistencia para concluir este ciclo, porque he aprendido mucho de ti y contigo, mi experiencia de vida a tu lado que coincidió con esta parte de este proceso, me hizo crecer en muchos aspectos y ser más fuerte.

Fam. Reyna Fabián y todas las personas que indirectamente me apoyaron en algún aspecto, y a todas las tortugas que involuntariamente participaron para hacer esto posible.

CONTENIDO

	PÁGINAS
RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
1.1 SALMONELOSIS	2
1.2 CLASIFICACION TAXONOMICA DE <i>Salmonella</i>	2
1.3 SALMONELOSIS Y SU TRANSMISIÓN	3
1.4 SIGNOLOGÍA	4
1.5 CARACTERÍSTICAS DE <i>Salmonella</i> spp.	4
1.6 PATOGENIA DE LA SALMONELOSIS	5
1.7 FACTORES DE VIRULENCIA DE <i>Salmonella</i>	6
1.8 GEN <i>invA</i>	8
1.9 GEN <i>ompC</i>	9
1.10 SALMONELOSIS EN MÉXICO	10
1.11 SALMONELOSIS EN MÉXICO RELACIONADA CON REPTILES	11
1.12 SALMONELOSIS EN REPTILES	12
1.12.1 ANTECEDENTES	12
1.12.2 SALMONELOSIS EN EL HUMANO TRANSMITIDA POR REPTILES	13
1.12.3 SALMONELOSIS EN REPTILES	17
1.12.4 PATOGENIA DE LA SALMONELOSIS EN TORTUGAS	19
1.12.5 LA TEMPERATURA AMBIENTAS COMO FACTOR LIMITANTE PARA LA INVASIVIDAD DE <i>Salmonella</i> EN LOS REPTILES	22
1.13 DIANÓSTICO DE SALMONELOSIS EN REPTILES	22
1.13.1 AISLAMIENTO	23
1.13.2 TÉCNICAS SEROLÓGICAS	24
1.13.3 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	24
1.14 SUSCEPTIBILIDAD DE <i>Salmonella</i> A ANTIBIÓTICOS	26
1.14.1 SUSCEPTIBILIDAD DE <i>Salmonella</i> A ANTIBIÓTICOS EN REPTILES	26
II. JUSTIFICACIÓN	28
III. HIPÓTESIS	29
IV. OBJETIVOS	30
4.1 OBJETIVO GENERAL	30
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	30
V. MATERIALES Y MÉTODOS	31
5.1 SUJETOS Y LOCALIDADES	31
5.2 TOMA DE MUESTRAS	31
5.3 AISLAMIENTO BACTERIOLÓGICO	32
5.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	33
5.4.1 EXTRACCIÓN DE ADN	33
5.4.2 CUANTIFICACIÓN DE ADN	34
5.4.3 INICIADORES	34
5.4.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	36

5.4.5 CONTROLES POSITIVO Y NEGATIVO	39
5.4.6 LÍMITE DE DETECCIÓN PARA EL GEN <i>invA</i>	39
5.4.7 LÍMITE DE DETECCIÓN PARA EL GEN <i>ompC</i>	39
5.5 SUSCEPTIBILIDAD A QUIMIOTERAPÉUTICOS	40
5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	40
VI. RESULTADOS	41
6.1 POBLACION DE ESTUDIO	41
6.2 AISLAMIENTO BACTERIOLÓGICO	44
6.3 RESULTADOS DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	49
6.3.1 LÍMITES DE DETECCIÓN POR PCR PARA EL GEN <i>invA</i> Y PARA EL GEN <i>ompC</i>	49
6.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	51
6.5 SUSCEPTIBILIDAD A QUIMIOTERAPÉUTICOS	56
6.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	57
6.7 VARIABLES ANALIZADAS	57
VII. DISCUSIÓN	59
VIII. CONCLUSIONES	71
ANEXO 1. Cuestionario	72
ANEXO 2. Medios de cultivo	73
ANEXO 3. Soluciones	74
REFERENCIAS	76

INDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1 Microfotografías de la invasión y estructura del SSTIII.	7
Figura 2 SSTIII y algunas proteínas que lo conforman.	8
Figura 3 Gráfico de las condiciones de la PCR para amplificar <i>invA</i> .	37
Figura 4 Gráfico de las condiciones de la PCR para amplificar <i>ompC</i> .	38
Figura 5 Fotografía de algunas pruebas bioquímicas realizadas a colonias sugerentes a <i>Salmonella</i> .	46
Figura 6 Fotografía de cultivo puro de <i>Salmonella</i> spp.	46
Figura 7 Fotografías de cultivos puros de <i>Salmonella</i> spp. en Agar Verde brillante y agar MacConkey.	46
Figura 8 Fotografía de un gel de agarosa con diluciones triples seriadas para estandarizar la mínima cantidad detectable para <i>invA</i> por PCR.	50
Figura 9 Fotografía de un gel de agarosa con diluciones triples seriadas para estandarizar la mínima cantidad detectable para <i>ompC</i> por PCR.	51
Figura 10 Fotografía de un gel de agarosa con una muestra positiva a <i>invA</i> por PCR.	52
Figura 11 Fotografía de un gel de agarosa con una muestras positivas a <i>ompC</i> por PCR.	53
Figura 12 Fotografía de un gel de agarosa con muestras positivas a <i>ompC</i> por PCR a partir de cultivos puros.	55

INDICE DE CUADROS

	PÁGINA
Cuadro 1 Serotipos de <i>Salmonella</i> involucrados en zoonosis.	17
Cuadro 2 Secuencia de iniciadores para amplificar una región del gen <i>invA</i> de <i>Salmonella</i> .	35
Cuadro 3 Parte del genoma de <i>S. Enteritidis</i> , se indican las secuencias de los iniciadores para amplificar una región de 284 pb del gen <i>invA</i> de <i>Salmonella</i> .	35
Cuadro 4 Secuencia de iniciadores para amplificar una región del gen <i>ompC</i> de <i>Salmonella</i> .	36
Cuadro 5 Parte del genoma de <i>S. Dublin</i> , se indican las secuencias de los iniciadores para amplificar una región de 159 pb del gen <i>ompC</i> de <i>Salmonella</i> .	36
Cuadro 6 Reactivos utilizados para la PCR de <i>invA</i> .	37
Cuadro 7 Reactivos utilizados para la PCR de <i>ompC</i> .	38
Cuadro 8 Especies de quelonios muestreados, sus características y condiciones de alojamiento.	42
Cuadro 9 Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a las colonias sugerentes a <i>Salmonella</i> .	45
Cuadro 8 Especies de quelonios y número de muestras positivas a <i>Salmonella</i> y <i>S. Arizonae</i> .	48
Cuadro 11 Otros géneros bacterianos identificados en las muestras de los quelonios.	49
Cuadro 12 Cuadro de las muestras positivas a <i>Salmonella</i> por aislamiento y PCR y factores de alojamiento de las tortugas que fueron positivas.	54
Cuadro 13 Cuadro comparativo de muestras positivas a <i>Salmonella</i> por PCR y aislamiento.	55
Cuadro 14 Cuadro de la distribución numérica y porcentual de la susceptibilidad a quimioterapéuticos de las muestras positivas a <i>Salmonella</i> .	56 Y 57

RESUMEN

CONSTANTINO CORZO GABRIELA DE JESÚS. Identificación de *Salmonella* spp. en muestras cloacales de quelonios (tortugas) mantenidas como animales de compañía (Asesores: Dra. Dulce Brousset H-J, Dr. Daniel Martínez Gómez y Dr. Antonio Verdugo Rodríguez).

Salmonella es el agente etiológico que produce la enfermedad bacteriana infecciosa de distribución mundial conocida como salmonelosis con sus diferentes presentaciones. La OPS la considera la segunda zoonosis bacteriana más importante. Comúnmente, se ha descrito a esta enfermedad como una infección asociada al consumo de alimentos contaminados, sin embargo; otra fuente de infección que se ha considerado en décadas recientes son los reptiles, dado el incremento en su popularidad como animales de compañía no convencionales y el contacto cotidiano con los humanos. En México son escasos los reportes donde se proponen a los reptiles como posibles reservorios de la bacteria, particularmente las tortugas en cautiverio. En este trabajo se analizaron 81 muestras cloacales de 14 especies distintas de quelonios para detectar *Salmonella* spp. en ellas, utilizando técnicas estándares de aislamiento bacteriológico y técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Para esta última se empleó un juego de iniciadores que amplifican un fragmento de 284 pb del gen *invA* y otro que amplifica un fragmento de 159 pb del gen *ompC* de *Salmonella*. Empleando las técnicas estándares de aislamiento se obtuvieron 11 cepas de *S. arizonae* y 6 cepas de *Salmonella* spp. y empleando la prueba de PCR, 22 muestras fueron positivas para el gen *ompC* y una para el gen *invA*. Los resultados de ambas pruebas coinciden en arrojar un resultado positivo en el 29.6% de las muestras. Al ajustar un modelo de regresión logística múltiple se encontró que la temperatura, la alimentación, el tamaño del animal y el mantenimiento de la calidad del agua por medio de un filtro no están relacionados con el aislamiento de *Salmonella* ni su detección por PCR. Este trabajo aporta los primeros datos sobre la presencia de *Salmonella* spp. en quelonios mantenidos en cautiverio como mascotas en México y describe un sistema para la detección de este microorganismo en cloaca basado en la técnica de PCR así como la determinación de la susceptibilidad a antibióticos de las cepas aisladas.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 SALMONELOSIS

La salmonelosis, es una enfermedad infecciosa producida por microorganismos patógenos del género *Salmonella*. Por la cantidad de personas afectadas se encuentra dentro de las enfermedades de mayor importancia en salud pública a nivel mundial.^{1,2} Se estima que, anualmente en todo el mundo se producen alrededor de 1300 millones de casos de salmonelosis no tifoideas y 16.6 millones de casos de fiebre tifoidea.³

1.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Salmonella*

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, la taxonomía aceptada para este género considera la existencia de 2 especies: *S. enterica* y *S. bongori*.^{1,4,5} *Salmonella enterica* se divide a su vez en 6 subespecies o subgrupos que pueden distinguirse por medio de estudios de homología de su ADN.⁵ Las subespecies descritas para esta especie son: *S. enterica* subsp. I (*S. enterica* subsp. *enterica*), *S. enterica* subsp. II (*S. enterica* subsp. *salamae*), *S. enterica* subsp. IIIa (*S. enterica* subsp. *arizonae*), *S. enterica* subsp. IIIb (*S. enterica* subsp. *diarizonae*), *S. enterica* subsp. IV (*S. enterica* subsp. *houtenae*), *S. enterica* subsp. VI (*S. enterica* subsp. *indica*). En el caso de *S. bongori* existen aproximadamente 20 serovariedades sin relevancia en salud pública.⁵

Para citar a *Salmonella* se puede emplear la nomenclatura basada en recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), ésta consiste en citar el género, especie, subespecie y la serovariedad, por ejemplo *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovariedad Typhimurium. Una vez citado de esa forma, se puede abreviar en el texto, mencionando el género en letra cursiva y la serovariedad en letra itálica.⁵

Actualmente se conocen 2577 serotipos de *Salmonella*,^{5,6} aproximadamente el 60%, pertenecen a la subespecie I. Se considera que cepas de los serogrupos A, B, C1 y C2, D y E, de acuerdo al antígeno O (somático) que conforman a la subespecie I, causan el 99% de las infecciones en el humano, animales domésticos y reptiles.^{4,6} Los serotipos pertenecientes a las subespecies II, IIIa, IIIb, IV, VI y *S. bongori* (V), son aislados de animales ectotermos o del medio ambiente y muy rara vez de humanos.^{4,7}

1.3 SALMONELOSIS Y SU TRANSMISION

La transmisión de la salmonelosis es por la vía oral-fecal, las principales fuentes de infección son el agua y alimentos contaminados con *Salmonella* spp.^{1,7,8,9} Una forma de diseminación de la enfermedad es a través del contacto con personas y animales portadores asintomáticos. Los humanos rara vez son portadores de especies no tifoideas, pero una vez infectados con *S. Typhi*, aproximadamente en el 1-4% de los casos la bacteria no es erradicada y los portadores crónicos pueden eliminar al microorganismo de por vida.⁹

Los individuos con mayor susceptibilidad a enfermarse de salmonelosis son niños,¹⁰⁻¹² personas inmunocomprometidas y ancianos.⁹ Además, aquellos individuos con hábitos alimenticios e higiénicos inadecuados, pueden considerarse una población en alto riesgo,⁹ aunque también se ha catalogado a esta enfermedad como de tipo ocupacional.¹³

Actualmente, *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* son las serovariedades más comúnmente aisladas tanto de humanos como de animales domésticos causando la mayoría de las infecciones,^{6,13,14} sin embargo; en las últimas tres décadas, se han reportado casos de salmonelosis en la población

humana por serovariedades poco comunes de *Salmonella*, en países como: Estados Unidos de Norteamérica (EUA), Canadá, Japón, Nueva Zelanda, Inglaterra, Alemania, Turquía y Yugoslavia, entre otros. Cabe señalar que de forma paralela se ha registrado el aumento de fauna silvestre como animales de compañía no tradicionales y de ellos, principalmente han sido reptiles.¹⁵⁻²⁵

Un estudio realizado en Canadá de 1994 a 1996, mostró que de un estimado de 627,200 casos anuales por salmonelosis en humanos, 37 estaban vinculados al contacto con reptiles, siendo las tortugas e iguanas la principal fuente de infección.¹⁷ Cabe mencionar en este caso que aún y cuando el número de personas afectadas es relativamente bajo, sobre sale el hecho de que los reptiles figuren como una fuente de infección hacia el humano y las personas que poseen este tipo de animales como compañía, son considerados como una población con mayor riesgo de adquirir la zoonosis.^{19,21,23}

1.4 SIGNOLOGIA

La salmonelosis en humanos y animales tiene dos presentaciones: una gastroentérica, donde pueden presentarse signos como: diarrea, dolor abdominal, vómito, náuseas, pérdida del apetito; así como un cuadro sistémico, donde se cursa principalmente con fiebre y se puede presentar dolor articular, peritonitis, artritis, sepsis, dolor de cabeza, en casos crónicos y en casos graves meningitis, incluso la muerte,¹ en esta última presentación puede manifestarse también la signología gastrointestinal.²

1.5 CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO *Salmonella*

Las bacterias del género *Salmonella* son bacilos Gram negativos, en su mayoría desprovistos de

cápsula, no producen esporas y son móviles por flagelos peritricos. Son oxidasa negativos, catalasa positivos, no fermentan la lactosa, reducen los nitratos a nitritos, tienen la capacidad de fermentar la glucosa con producción de gas, no hidrolizan la urea, son indol negativos, descarboxilan la lisina, no desaminan la fenilalanina, producen ácido sulfhídrico (con excepción de *S. Cholerasuis* y *S. Typhimurium*), utilizan generalmente el citrato como única fuente de carbono. La mayoría de las serovariedades crecen a temperatura de 37 °C, pero cuando las muestras clínicas provienen de reptiles, es importante considerar las particularidades metabólicas propias de los serotipos que se reportan como los más comúnmente aislados en este tipo de fauna, como lo son los serotipos IIIa y IIIb de *Salmonella*,^{26,27} porque éstos aún siendo miembros del género *Salmonella*, difieren en algunas reacciones bioquímicas como: fermentar lentamente la lactosa, la producción de nitrophenil-beta galactosidasa y la licuefacción de la gelatina.^{28,29}

1.6 PATOGENIA DE LA SALMONELOSIS

Para el establecimiento de una infección se requiere que el microorganismo se encuentre en un ambiente favorable o adecuado en el cual pueda multiplicarse y expresar sus factores de virulencia.^{9,14} La expresión de estos factores permite a los microorganismos patógenos: adherirse, invadir, multiplicarse en los tejidos o evadir la respuesta inmune y, de esa forma, causar daño en el hospedador. Por otro lado, cuando *Salmonella* es eliminada por las heces, se transmite de un animal infectado a otro susceptible.⁴ La patogenia de las salmonelosis en mamíferos y aves podría resumirse de la forma siguiente:

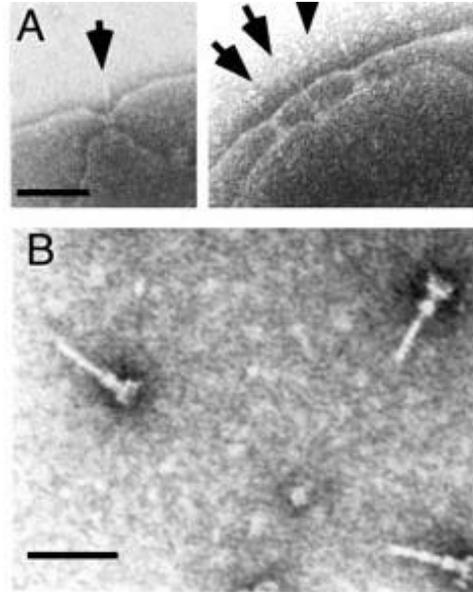
- 1) La bacteria ingresa vía oral al huésped por medio del alimento o del agua contaminados.

- 2) Evade mecanismos de resistencia del hospedador como: el pH ácido estomacal,³⁰ el peristaltismo, la producción de moco, las células fagocíticas y compite con la microbiota residente.
- 3) Posteriormente por medio de adhesinas como las fimbrias, el flagelo o cápsula, se adhieren al epitelio intestinal (principalmente en el ileon) por medio de las células M³¹ e invade los enterocitos^{32,33} causando enfermedad gastroentérica.
- 4) En algunos casos la bacteria puede migrar a la lámina propia del intestino para llegar al torrente sanguíneo (bacteremia).
- 5) En el trayecto, invade macrófagos los cuales a su vez migran a tejido linfoide.
- 6) A través de los macrófagos o los polimorfonucleares, se disemina a tejidos como hígado y bazo, que son sus sitios ideales de multiplicación y así también a otros tejidos como intestino grueso, articulaciones, entre otros; originando una infección sistémica.^{9,32,33}

1.7 FACTORES DE VIRULENCIA DE *Salmonella*

En la patogenia de la salmonelosis intervienen diversos factores de virulencia de *Salmonella* que constituyen y permiten la acción de todos los mecanismos de patogenicidad por los cuales la bacteria puede invadir e infectar a su hospedero.^{9,14} Entre los cuales se encuentra el Lipopolisacarido (LPS), adhesinas como los pilis y fimbrias, la cápsula en aquellas especies que sí la producen como *S. Typhi* y *S. Dublin*, plásmidos que contienen genes que codifican para la expresión de proteínas que permiten la resistencia o evasión a mecanismos de defensa por parte del huésped; o bien, algunos de los factores de virulencia también están codificados en diversos genes que en ocasiones forman bloques que se conocen como “islas de patogenicidad” (IP),^{9,14} mismas que se encuentran en genomas de bacterias patógenas.⁹ Una de estas islas: la isla de patogenicidad uno

(IP-1) de *Salmonella* localizada en el centisoma 63, se encuentra un grupo de aproximadamente 31 genes conocido como *inv-spa*,^{34,35} el cual tiene un tamaño de 40 kb, éste codifica tanto para proteínas que forman una estructura en forma de aguja conocido como sistema de secreción tipo III (SSTIII) **Figura 1** y para proteínas efectoras secretadas por este aparato, que le proporcionan a la bacteria la capacidad de invadir tanto



células fagocíticas como no fagocíticas.^{9,33,34-39} La invasión se inicia por un estímulo contacto-dependiente con la célula eucariota, las proteínas efectoras del SSTIII, tales como SopE, SopE2, SopB³⁹ inducen un cambio en la conformación del citoesqueleto por activación de la actina en la célula huésped que resulta

Figura 1. Sistema de Secreción tipo III de *S. Typhimurium*. **(A)** Micrografía electrónica de *S. Typhimurium* con el complejo de aguja en la envoltura bacteriana (flechas). **(B)** Micrografía electrónica del inyectisoma purificado. Tomado de Galán, J. E. and C. Collmer (1999) *Science* 284: 1322-1328 ⁴⁸ Kubori T, et al. 2000 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(18): 10225-10230 ⁴⁰.

del paso de dichas proteínas efectoras desde el citosol procarionte al citoplasma eucariote **Figura 1**. La expresión de estas proteínas efectoras se ve favorecida a una temperatura de 37 °C, pH neutro y en la fase tardía de crecimiento logarítmico de *Salmonella*.³²

La secuencia de aminoácidos de las proteínas que componen el SSTIII está altamente conservado entre las enterobacterias patógenas Gram negativas,⁴ pero las proteínas efectoras secretadas difieren completamente generando enfermedades diferentes. En el SSTIII las proteínas efectoras no presentan una secuencia señal amino-terminal, para ser secretadas, por lo que se conoce como una vía sec independiente pues no se necesita un péptido señal para ser translocadas.^{4,35}

1.8 GEN *invA*

Una de las proteínas que forman estructuralmente el SSTIII es *InvA*, la cual está codificada por el gen *invA*.

Dicha proteína forma parte de la base del aparato de secreción, la cual es cilíndrica y hueca, por donde pasan las proteínas efectoras del citosol procarionte al eucariote

Figura 2. Tiene un peso molecular de 75,974 kDa, es una proteína integral de la membrana interna de la bacteria, la cual es homóloga a proteínas pertenecientes a otros géneros de enterobacterias que también permiten

el ingreso de las bacterias a las células eucariotas (invasión).^{37,38} En estudios *in vitro* se demostró que la presencia del operón *invABC* le confiere a una cepa fenotípicamente no invasiva de *S. Typhimurium* la capacidad de infectar células Henle-407, pero al realizarse una mutación en el gen *invA* a dicho operón, la bacteria redujo su habilidad de invasión hasta 100 veces; complementando el estudio en este mismo sentido, cuando cepas de *S. Typhimurium* con mutación en *inv* se administraron oralmente a ratones BALB/c, redujeron su virulencia, por lo que se necesitó 50% más de la dosis letal y, consecuentemente se redujo su eficiencia de invasividad. La presencia del operón *invABC* ha sido comprobada en 37 serovariedades de *Salmonella*,³⁸ sin embargo; el patrón de hibridación por Southern blot resultó ser diferente en *S. arizonae*, esto es consistente con el hecho de que fue la única cepa no invasiva en cultivo celular, lo cual sugiere que este operón no es funcional^{34,38} en esta subespecie de *Salmonella* que es la más común en reptiles.

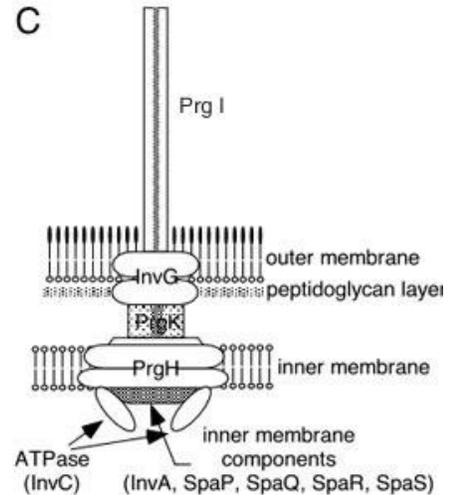


Figura 2. Representación esquemática del complejo de aguja de *S. Typhimurium*. Escala 100 nm. Kubori, T. *et al.*, 1998. *Science* 280: 602-605⁴¹

1.9 GEN *ompC*

Las bacterias poseen diferentes envolturas celulares y sus componentes varían dependiendo del tipo de bacteria que se trate. Las bacterias Gram negativas, tienen una característica única y particular en su envoltura, esto es, que poseen una membrana externa. Dicha membrana es una bicapa lipídica compuesta por lípidos, fosfolípidos, lipopolisacárido y proteínas. Los genes que codifican para las proteínas de membrana externa (PME) se hayan altamente conservados y éstas proteínas representan un 2% del total de proteínas de la célula.⁴²

Las PME son triméricas y forman poros o canales inespecíficos que permiten el paso rápido de pequeñas moléculas hidrofílicas a través de la membrana externa, lo que la hace una barrera semipermeable. El gen *ompC* codifica para una proteína de membrana externa de *Salmonella* llamada OmpC, correspondiente a una porina, que tiene un peso molecular de 37,083 kDa en *S. Typhimurium*.⁴² Esta porina tiene una conformación de 16 plegamientos transmembranales. El canal de OmpC es de un diámetro reducido y solo permite el paso de moléculas de un tamaño pequeño. El centro de la porina es hidrofílico, por lo cual tendrá afinidad por aquellas partículas hidrofílicas. La proteína se expresa bajo condiciones de alta osmolaridad, temperaturas de 37 °C y su expresión es más abundante en anaerobiosis y a un pH de 5.2, además tiene afinidad por moléculas cargadas positivamente.⁴²

Ambos genes *invA* y *ompC* al ser específicos y conservados dentro del genoma de *Salmonella* son blancos ideales para la detección de *Salmonella* de muestras clínicas⁴³⁻⁴⁵ de cualquier procedencia.

Como anteriormente se ha mencionado, al ser los reptiles una fuente de infección de donde se aísla gran cantidad de serovariedades del género *Salmonella*, es importante contar con una herramienta diagnóstica rápida y confiable para detectar a este microorganismo, sobre todo cuando no se presentan signos clínicos de salmonelosis.

1.10 SALMONELOSIS EN MEXICO

En México los casos de salmonelosis registrados en las estadísticas de salud pública ocurren, en su mayor parte, por las formas comunes de transmisión.¹³ Los casos de salmonelosis en humanos reportados por el sector salud de nuestro país hasta diciembre de 2010, son de 44,421 casos de fiebre tifoidea y 118,211 casos de fiebre paratifoidea y otras salmonelosis.⁵² En un estudio realizado en centros de salud pública en México de 1972 a 1999 por Gutiérrez *et al.*,¹³ las notificaciones de casos por salmonelosis en humanos registraron un incremento, de 100,342 casos en 1994 a 215,155 en 1998, los serotipos aislados con mayor frecuencia tanto en humanos como en animales domésticos fueron: *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Derby*, *S. Agona* y *S. Anatum*. En humanos la mayor incidencia se presentó en los grupos de 15 a 24 años, de 25 a 44 años y de 45 a 64 años, siendo el segundo grupo el más afectado.¹³ Estos datos difieren de estudios hechos en EUA donde se reporta que las personas más susceptibles y afectadas son los niños, ancianos y las personas inmunocomprometidas.^{13,17} En este mismo estudio las infecciones se asociaron al consumo de alimentos contaminados, al contacto con persona infectadas o al contacto con heces de animales domésticos infectados con *Salmonella* spp.,¹³ sin embargo; no existe información oficial del sector salud que reporte a los reptiles como una posible fuente de transmisión de salmonelosis.

1.11 SALMONELOSIS EN MÉXICO RELACIONADA CON REPTILES

Aparentemente solo hay dos únicos estudios realizados en nuestro país sobre la presencia de *Salmonella* en reptiles, uno de ellos con animales de vida libre⁴⁶ y el otro estudio con serpientes en cautiverio de una colección herpetológica.²⁶ El primer trabajo fue realizado en un parque ecológico en el estado de Nuevo León, dentro del cual se muestrearon reptiles y anfibios, sin embargo; un estudio poblacional de la zona reveló la ausencia del orden chelonia, por lo tanto, no se incluyeron tortugas. En este estudio la prueba realizada para identificar la microbiota de los ejemplares fue el sistema de identificación bacteriológica de Vitek^{®A}, el objetivo de este estudio fue demostrar la presencia de *Salmonella* en los reptiles muestreados y observaron que la bacteria estuvo presente en el 44% de 54 animales, aislándose principalmente de lagartijas (46.6%).⁴⁶ El segundo estudio específicamente consistió en identificar *Salmonella* en muestras cloacales, heces, agua y alimento de 29 serpientes en cautiverio en un herpetario, las técnicas empleadas fueron el aislamiento bacteriológico, probando dos temperaturas de incubación 25 °C y 37 °C y, por otro lado, se realizó un análisis del polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RLFP) por hibridación tipo Southern blot empleando una sonda del gen *ompC* de *S. Typhi*. Los resultados fueron que se detectó la presencia de *Salmonella* en el 45% de los animales, aunque *S. arizonae* fue el microorganismo más comúnmente identificado (77% de los 30 aislamientos, principalmente a una temperatura de 25 °C). Por medio de RLFP se comprobó que el gen *ompC* está presente en *S. arizonae* y que presenta un patrón definido de RLFP.²⁶ Es importante mencionar que en ninguno de los estudios citados se incluyó a tortugas mantenidas como animales de compañía, consideradas en estudios de otros países como una de las fuentes más importantes de infección hacia el humano con respecto a la transmisión por reptiles, pues esta clase de animales tienen una alta demanda como mascota y se comportan como portadores asintomáticos.^{47,48}

^A Biomerieux

México es uno de los países donde no se tienen datos estadísticos del número de animales de compañía no tradicionales. Galindo en 2005,⁴⁹ menciona que en México cada vez es mayor el número de reptiles en cautiverio en colecciones privadas o públicas y como mascotas, los cuales son presentados como pacientes en la práctica de la clínica privada, lo cual podría ser entre otras cosas un indicativo relacionado a que los reptiles como mascota han ido en aumento.⁴⁹

Así como en otros países un porcentaje de los casos de salmonelosis en humanos se le atribuye a la transmisión por reptiles como animales de compañía,²⁰ lo mismo podría suceder en la población mexicana, pero esto se desconoce. En México existen algunos trabajos donde mencionan a los reptiles como un reservorio de la bacteria pudiendo éstos ser una posible fuente de infección^{26,46} y sobre el consumo de productos elaborados específicamente a base de órganos de serpientes y usados en la medicina alternativa.^{50,51} No obstante; cabe mencionar que ninguno de estos estudios se enfoca a animales mantenidos como mascotas, incluyendo las tortugas, considerando que éstas podrían ser uno de los mayores factores de riesgo, al tener una alta demanda como mascotas.^{47,48}

1.12 SALMONELOSIS EN REPTILES

1.12.1 ANTECEDENTES

La presencia de *Salmonella* en reptiles se reportó por primera vez en un *Heloderma suspectum* en EUA en 1939⁵³ y el primer reporte del aislamiento de *Salmonella* spp. a partir del orden chelonía fue en 1946; específicamente de 2 tortugas Galápagos (*Geochelone elephantopus*) mantenidas en cautiverio en un zoológico.⁵³ Dichas tortugas no presentaban ningún signo gastroentérico, aún y cuando la bacteria se aisló por cultivo bacteriológico de muestras de hígado, bazo, pulmones, intestino, líquido abdominal y vejiga. Las cepas aisladas en este caso fueron tipificadas serológicamente como *S. Newport* y *S. San Diego*.⁵³ Posteriormente, cuando se aislaron

serovariedades que podrían afectar al humano, se comenzó a suponer que las tortugas podrían ser una fuente potencial en la transmisión de la salmonelosis.^{25,54,55}

Existen múltiples reportes del aislamiento de *Salmonella* del tracto gastrointestinal de diversas especies de reptiles como tortugas: *Trachemys scripta scripta*, *Trachemys scripta elegans*, *Gopherus agassizii*, *Testudo spp*, *Macrochlemys caspica leprosa*, lagartos: *Iguana iguana*, *Agkistrodon bilineatus*, y serpientes: *Elaphe guttata*, *Crotalus scutulatus scutulatus*, *Sistrurus ravus*; entre muchos otros,^{10,16,17,19,20,27,53,56,57} a partir de muestras de heces o hisopos cloacales, infectados por la vía oral; o aislamientos a partir de huevos, bazo, ovario, hígado, vesícula biliar cuando se infectan por otras vías como la intracelómica o intracardiaca,^{58,59} sin causarles signología sugerente a una infección, por esta razón los reptiles son considerados como portadores asintomáticos.^{25,53,54,57,58,59}

1.12.2 SALMONELOSIS EN EL HUMANO TRANSMITIDA POR RESPITLES

En 1963 se reportó el primer caso de salmonelosis en EUA. Un niño de siete meses de edad fue infectado por *S. Hartford*, transmitida por una *Trachemys scripta elegans* o tortuga de orejas rojas que se mantenía como mascota.^{10,58} De esa tortuga se aislaron otras 2 serovariedades. Así mismo se reportó el aislamiento de *Salmonella* de otras 25 muestras de tortugas alojadas en el mismo estanque que la tortuga transmisora del niño, lo cual reafirmaba el origen de la zoonosis.⁵⁹

Durante los años sesenta hubo un aumento en la popularidad de los reptiles como animales de compañía en EUA y paralelamente se presentó un incremento de casos de salmonelosis en el humano por serovariedades que hasta ese momento no eran comunes.^{20,21} A partir de 1971 en EUA se asoció el contacto con tortugas con la incidencia de salmonelosis en niños. En un estudio

realizado en 7 estados diferentes, se observó que el 18% de los casos de salmonelosis estaban relacionados con las mascotas, asumiendo que, si el 4.2% de los hogares estadounidenses mantenían tortugas como mascotas, 280 mil casos de salmonelosis en humanos estarían asociados al contacto con reptiles, de los 2 millones presentados en ese entonces en EUA. La probabilidad de adquirir salmonelosis por contacto con una tortuga correspondía a un 2%.^{20,58}

Esto provocó que en 1972 en EUA se tomaran medidas al respecto, el Departamento de Salud, Educación y Bienestar de la *Food and Drug Administration* por sus siglas en inglés (FDA), prohibió la venta e importación de aquellas tortugas y sus huevos, en los cuales fuera detectada la presencia de *Salmonella* spp. y, que se certificaran como “libres” aquellos animales que en el momento de realizarles un cultivo bacteriológico a partir de heces, no excretaran la bacteria.^{55,58,60,61} Para dicho procedimiento, se decidió tomar muestras de 60 ejemplares de cada lote para importación a EUA y del agua donde previamente éstos hubieran estado 72 h, posteriormente se realizaba la metodología recomendada por la FDA para el aislamiento de la bacteria. Sin embargo; Siebeling *et al.*,^{60,61} demostraron la falta de confiabilidad en este diagnóstico, debido a que empleando la misma metodología bacteriológica, aislaron *Salmonella* en el agua, órganos y homogenizados de tortugas de la especie *T. scripta elegans* de recién eclosión, 3 días después de haberles dado tratamiento con antibióticos por 14 días.^{60,61}

Posteriormente, Duponte *et al.*, 1978,⁶² realizaron un experimento también con *T. scripta elegans* de recién eclosión provenientes de dos criaderos diferentes; los animales habían sido mantenidos en tanques con agua a temperatura ambiente durante 6 meses y habían sido alimentados con pelletizado comercial. Durante ese tiempo, tanto las heces, como el agua y alimento utilizados para las tortugas fueron analizados bacteriológicamente. Posteriormente se dividió a la población de tortugas en dos grupos, uno con 12 ejemplares, mantenidos bajo las mismas condiciones de manejo (grupo control) y los 65 individuos del segundo grupo, fueron separados individualmente en

contenedores con papel húmedo durante 10 a 14 días (condiciones de deshidratación), después se realizó la eutanasia y se hizo una mezcla de sus hígados, intestinos, vesícula biliar y estómago. Se aislaron 3 serovariedades de *Salmonella* de 16 tortugas mantenidas bajo condiciones de deshidratación, pero no aislaron nada del grupo control. Por lo observado, propusieron que *Salmonella* se mantenía en estado latente en el tracto gastrointestinal de las tortugas y cuando los animales eran expuestos a condiciones de estrés como el transporte, cambio de ambiente y alimentación, la bacteria era activada y eliminada.⁶² A partir de estos hallazgos se propuso que los reptiles eliminan al microorganismo de forma intermitente y dado que no se puede establecer con certeza el momento en que el microorganismo es eliminado por heces, no es confiable certificar tortugas “libres” de *Salmonella*.

Hasta ese momento, en EUA el número de casos por salmonelosis seguía en aumento, por consiguiente, en 1975 se determinó prohibir la venta de tortugas juveniles cuyo largo del caparazón midiera menos de 4 pulgadas (< 10.2 cm), excepto ejemplares empleados en educación, investigación o tortugas marinas.^{55,60} Kaufman *et al.*,⁶³ realizaron una investigación durante tres años, para conocer si las tortugas son portadoras de *Salmonella* spp. desde que eclosionan. El estudio se llevó a cabo en un criadero donde *T. scripta elegans* era la especie más común y constituía la especie de tortuga más vendida en el mercado.^{47,48,63} Kaufman *et al.*,⁶³ eligieron tortugas de recién eclosión, dividiéndolas en 6 grupos, cada uno con diferente número de individuos y colocados en recipientes individuales con agua estéril. Cada grupo fue monitoreado desde su eclosión hasta los tres años de edad, aleatoriamente se escogía un grupo por semana y se recolectaba el agua acumulada durante la misma, ésta se cultivaba en caldo tetrionato-verde brillante; la tasa de excreción varió de 0.0% a 66.7%.⁶³ Previamente, Kaufman *et al.*,⁶⁴ habían reportado que las tortugas juveniles podían excretar la bacteria por periodos de más de un año,

éstas por su pequeño tamaño son más atractivas y fáciles de manejar para los niños^{11,58}, siendo un riesgo de contaminación y transmisión de salmonelosis⁶⁴.

A pesar de esto, desde la década de los noventa, se dio un nuevo auge en la demanda de tortugas como animales de compañía en EUA, Japón, Italia, Canadá, Nueva Zelanda entre otros países.^{15-17, 19,21-23,28,33,56} Por ejemplo, en Italia las tortugas acuáticas y terrestres son las mascotas más populares.⁴⁷ En EUA se estima que el 3% de los hogares poseen al menos un reptil como mascota¹⁸ y como anteriormente se comentó, en esos países se reconoce que la salmonelosis asociada a reptiles representa un problema de salud pública.

Dentro del género *Salmonella*, pocas serovariedades y subespecies están adaptadas a las condiciones y factores que un hospedero le proporciona, tal es el caso de *S. arizonae* en reptiles.⁶⁵ Sin embargo, la mayoría de las serovariedades y subespecies, no tienen una adaptación específica; por lo que se pueden aislar en hospederos no convencionales y se pueden observar infecciones por serovariedades atípicas de la especie, las cuales causan enfermedad principalmente en individuos jóvenes.⁶⁵ En el **Cuadro 1** se muestran serovariedades de *Salmonella enterica* transmitidas por reptiles sanos a humanos, aun que algunas de estas serovariedades también se han aislado de reptiles enfermos, indicando que no se excluye a los reptiles de padecer la enfermedad .lo que se puede relacionar a un mal funcionamiento del sistema inmune del reptil y falta en el control de la temperatura ambiental.^{59,66,67}

Algunos serotipos de <i>Salmonella</i> implicados en la salmonelosis en humanos transmitida por reptiles			
S. Abaetetuba	S. Give	S. Montevideo	S. Schwarzengrund
S. Agona	S. Hartford	S. Muenchen	S. San diego
S. Anatum	S. Heidelberg	S. Muenster	S. Saint paul
S. Berta	S. Houten	S. Newport	S. Stanley
S. Braenderup	S. Infantis	S. Oranienburg	S. Thompson
S. Brandenburg	S. Iome	S. Overschie	S. Typhimurium
S. Cerro	S. Java	S. Panama	S. Urbana
S. Chester	S. Javiana	S. Paratyphi B	S. Wassenaar
S. Ealing	S. Kralendyk	S. Phoenix	
S. Enteritidis	S. Litchfield	S. Poana	
S. Florida	S. Miami	S. Pomona	
S. Fluntern	S. Monschau	S. Rubislaw	

Cuadro 1. Serotipos de *Salmonella* involucrados en zoonosis. Tomado de Mader DR.⁶⁸

1.12.3 SALMONELOSIS EN REPTILES

La infección por *Salmonella* en ectotermos generalmente no produce signología clínica, se limita al tracto gastrointestinal (TGI), sin invasión de otros tejidos, cuando se presenta signología como se mencionó, se asocia a factores predisponentes.⁶² La no invasividad de *Salmonella* en los reptiles la relacionan a la fagocitosis rápida de una cantidad de células bacterianas por parte de los macrófagos presentes en tejido linfoide del esófago^{59,69} aún y cuando hayan microorganismos que logren pasar esa barrera, se ha reportado la ausencia de tejido linfoide como folículos asociados al epitelio intestinal para montar una respuesta inmunológica adecuada, además la incapacidad de la bacteria de adherirse a la mucosa y células intestinales de los reptiles⁶⁹ debido a la temperatura optima preferida por los reptiles a la cual la bacteria no es capaz de poder expresar factores de virulencia para invadir células de reptiles,⁶⁹ todo esto en conjunto probablemente esté limitando la diseminación y proliferación de la bacteria hacia otros órganos, cuando el antígeno ingresa vía oral.⁶⁵ Otro factor a considerar es también la falta de receptores específicos por parte de las células epiteliales que evitan que la bacteria pueda ser fagocitada y diseminada, por otro lado el sistema

inmunológico en reptiles aún no se ha descrito con certeza^{65,66} y se considera que es poco evolucionado, Bäumlér menciona que en las inmunoglobulinas no ocurre un cambio en su isotipo durante la infección con este patógeno y con esto su respuesta inmune hacia este microorganismo sea pobre. Conjuntamente los reptiles carecen de centros germinales de selección de células B y en consecuencia, durante una respuesta inmunológica la afinidad de los anticuerpos no se incrementa, aunado a que también tienen memoria inmunológica pobre, se ha demostrado que solamente producen IgM.⁶⁵

Chiodini,⁷⁰ inoculó con *Salmonella* a serpientes a las que previamente se les midió el título de anticuerpos contra esta bacteria, el título de anticuerpos fue escaso o nulo. Posteriormente a la infección por vía oral, tanto de serpientes grávidas y no grávidas, tampoco se produjeron anticuerpos, pero sí lo hicieron las serpientes inoculadas por la ruta intracelómica e intracardiaca.⁷⁰ En el mismo modo, Pasmans⁵⁹ reportó que no había producción de anticuerpos en las tortugas en que la bacteria había sido inoculada oralmente, pero sí en aquellas infectadas intraperitonealmente, observando esplenomegalia y heterofilia, lo cual sugiere una respuesta inflamatoria por parte de los quelonios.⁶⁶

En reptiles en caso de establecerse una infección por *Salmonella* con signología por ésta, sería: septicemia aguda, con neumonía, choque hipovolémico y celomitis, que pueden llegar a ocasionar la muerte. En su forma crónica se observan abscesos y granulomas en algunos órganos.⁷¹

Entre reptiles la transmisión se da de igual manera que en el humano, además Chiodini reportó la transmisión vertical de *Salmonella* vía transovárica en ofidios, en la que se aisló *Salmonella* a partir de fetos y huevos de hembras grávidas infectadas experimentalmente.⁷⁰

La transmisión de *Salmonella* de reptiles a humanos es a través del contacto directo con agua, heces, alimento o utensilios empleados para el cuidado de los reptiles, incluso se considera la transmisión indirecta, al tener contacto directo con personas que poseen este tipo de animales que carecen de una higiene adecuada^{19,70} o, a partir de superficies, enceres de cocina, comida, artículos que sean utilizados para el reptil y a su vez se compartan con el humano y no se desinfectan apropiadamente.¹⁸

Los niños se consideran la población más susceptible de adquirir la infección, proviniendo de un reptil, debido a la poca precaución que los mismos tienen al manejo de estos animales.¹¹ En EUA el Centro de Control de Enfermedades (CDC) publicó una guía de prevención de la salmonelosis transmitida por reptiles, donde se señala que el grupo de personas con mayor riesgo son embarazadas, niños menores a cinco años y personas inmunocomprometidas, a quienes se recomienda no tener reptiles como animales de compañía.

1.12.4 PATOGENIA DE LA SALMONELOSIS EN TORTUGAS

En el caso de los reptiles, la patogenia no se ha determinado con precisión. Solo en algunos estudios como los realizados en serpientes por Chiodini⁷⁰ y en tortugas por Pasmans⁷², entre otros, se ha investigado el tránsito de *Salmonella* en el organismo del reptil. Chiodini en 1982,⁷⁰ analizó bacteriológicamente fetos de serpientes infectadas con *Salmonella* y demostró que en ellos se aislaba la bacteria y a su vez en una ocasión identificó a *S. arizonae* del feto y no así de la madre, sugiriendo una infección transovárica. En el mismo estudio, por otro lado, realizó la eutanasia a 10 serpientes capturadas en un área común, mismas que habían sido infectadas por la vía oral con *S. Muenchen* y *S. Carrau*. Los animales además de que no mostraron signología por salmonelosis no

produjeron anticuerpos específicos de la infección. De estas serpientes se aisló *Salmonella* a partir de varios órganos enterales y parenterales, siendo el hígado y los uréteres los sitios de mayor migración de *Salmonella*, indicando la presencia de una infección subclínica. Chiodini a su vez también realizó infecciones experimentales en serpientes con *S. Typhimurium* y *S. arizonae* por la vía oral, intracardiaca e intracelómica. Encontrando que aquellos animales infectados vía oral, excretaban la bacteria por heces, también aisló *S. arizonae* de un ejemplar y de otro *S. Muenchen* a partir de hígado, pero éste fue el único órgano parenteral en donde se detectó *Salmonella*. De las serpientes inoculadas por la vía intracardiaca, se aislaron las serovariedades inoculadas experimentalmente y se detectaron anticuerpos, aun que algunas serpientes presentaron signos por la infección, en otros casos no hubo signología.⁷⁰ En el caso de los ofidios que no presentaron signos, *Salmonella* fue aislada de todos los órganos, pero no de heces. Por último, en las serpientes infectadas por la vía intracelómica, no se observaron signos, no hubo producción de anticuerpos ni se detectó a *Salmonella* en heces. Con sus resultados Chiodini concluyó que, los animales infectados por la vía sistémica o intracelómica no excretan la bacteria por heces y la producción de anticuerpos es en títulos bajos.⁷⁰

Pasmans en 2002,⁷² demostró resultados similares en un estudio de la patogenicidad de *S. Muenchen* en tortugas de la especie *T. scripta scripta*, mismas que separó en cuatro grupos, las mantuvo a dos temperaturas distintas y comparó dos vías de infección. En el primer experimento por medio de cultivo bacteriológico a partir de hisopos cloacales de tortugas infectadas por la vía oral, encontró que éstas eliminaron más microorganismos a 37 °C que a 26 °C y aisló a la bacteria principalmente de íleon y colon y, solamente aisló al microorganismo de órganos internos como bazo e hígado en los animales mantenidos a 37 °C. Por otra parte, de las tortugas mantenidas a 37 °C inoculadas por la vía intraperitoneal, se aisló *Salmonella* en mayor cantidad de duodeno, yeyuno, íleon y colon, pero

también de bazo, hígado y sangre. En ambos experimentos, ninguno de los autores observaron signos compatibles con salmonelosis ni lesiones histopatológicas asociadas a la infección bacteriana cuando se inocularon por la vía oral, y solamente observaron una baja producción de anticuerpos con la infección por la vía intracardiaca,⁷⁰ intracelómica o intraperitoneal.^{70,72} En resumen, la patogenia de *Salmonella* por la vía oral en las tortugas podría describirse de la siguiente forma:

- 1) La bacteria ingresa a las tortugas por vía oral a través del agua y alimentos contaminados ⁹ o, podría ingresar vía transovárica.⁷⁰
- 2) Se reporta la presencia de tejido linfoide en forma de agregados en el esófago, donde se encuentran presentes macrófagos y células parecidas a las M de los mamíferos, podría ocurrir fagocitosis de las bacterias ^{69,72}.
- 3) Sin embargo; en el huésped se encuentran algunos mecanismos de defensa como: el pH estomacal ácido, la producción de moco epitelial y el peristaltismo continuo, que dificultan a las bacterias adherirse a la superficie celular y la bacteria se excreta continuamente,⁶⁹ la competencia con la microbiota presente en el intestino, la temperatura del reptil, la cual no favorece la expresión de genes que codifican para que los factores de virulencia de la bacteria puedan actuar y así invadir, pero aquellos microorganismos que logren evadir estas barreras podrán colonizar el intestino a través de las células M.⁶⁹

1.12.5 LA TEMPERATURA AMBIENTAL COMO FACTOR LIMITANTE PARA LA INVASIÓN DE *Salmonella* EN LOS REPTILES

Los reptiles son ectotermos, necesitan de fuentes externas de energía calórica para poder termorregular su temperatura corporal y así realizar sus funciones metabólicas. Se le conoce como zona de temperatura óptima preferida (POTZ) a aquella que el reptil elige según sus necesidades fisiológicas.⁷³ Al estar en cautiverio necesitan un ambiente controlado que les proporcione diferentes microambientes o gradientes de temperatura dentro de su alojamiento^{73,74} para responder ante diferentes necesidades fisiológicas independientemente del tipo de hábitat que requieran,⁷⁴ por lo tanto, es necesario un termómetro para medir la temperatura del agua o bien, para la medición de la temperatura de los terrarios. Dependiendo del tipo de alojamiento se emplean diferentes fuentes de calor, en el caso de tortugas de hábitos acuáticos se emplea un calentador para el agua o, se pueden utilizar focos para los terrarios.⁷³ La temperatura es uno de los factores más importantes que afectan la respuesta inmune.^{10,69,72} Se ha observado por ejemplo, en el caso de la tortuga *Testudo hermanni* y *Dipsosaurus dorsalis* (iguana de desierto), a temperaturas de 28 a 40 °C generan más anticuerpos, que a temperaturas más bajas de 4 a 21 °C,^{66,69} pese a esto, aún no se conoce bien como funciona la respuesta humoral o celular en la clase reptilia. En el caso de *Salmonella* la temperatura a 37 °C favorece la expresión de sus factores de virulencia,³² que le permiten invadir células e infectar al hospedador, por lo cual la temperatura más baja de los reptiles es una limitante.

1.13 DIAGNÓSTICO DE SALMONELOSIS EN REPTILES

Para la detección de *Salmonella* en reptiles se emplean los mismos métodos que en otras especies, los cuales consisten en el aislamiento del agente infeccioso, pruebas serológicas como ELISA y pruebas moleculares como la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).⁷⁵

1.13.1 AISLAMIENTO

El cultivo *in vitro* es la técnica más ampliamente utilizada para el diagnóstico en microbiología clínica e investigación. Permite identificar al agente infeccioso por género y especie, es de “relativa” simplicidad para la persona familiarizada en la interpretación de los resultados. Además al proporcionar nutrientes a los microorganismos en los medios de cultivo, pueden proliferar aún estando en poca cantidad. Sin embargo; también se debe considerar el empleo de mucho material, como medios de cultivo para el transporte de las muestras más el aislamiento, se requiere trabajar bajo esterilidad para evitar contaminación con otros microorganismos medio ambientales. El tiempo también es un factor importante, ya que se estiman de 3 a 7 días para obtener un resultado, lo cual es una desventaja cuando se necesita obtener un diagnóstico rápido y conocer el patógeno causante de una enfermedad o descartar el sospechoso y con esto actuar de manera rápida y oportuna.^{76,77} Así mismo, se debe tomar en cuenta que no todos los microorganismos pueden ser aislados fácilmente, ya sea por estar en escasa cantidad en la muestra o baja viabilidad del microorganismo, el cual puede ser inhibido por una acelerada replicación del mismo en el medio o de otro género, lo cual provoca la escasez temprana de los nutrientes, también se requiere de personal con la capacidad de dar un resultado confiable.^{76,77} Los estudios realizados en nuestro país para el diagnóstico de la presencia de *Salmonella* en las muestras clínicas de reptiles, se basan en esta prueba.^{26,46}

Las bacterias del género *Salmonella* spp. pueden crecer en medios básicos, sin embargo, debido a que en las muestras remitidas se encuentran una gran cantidad de microorganismos de otros géneros bacterianos pertenecientes a la microbiota del intestino, en el primoaislamiento, se deben emplear medios de enriquecimiento como caldo selenito, caldo Rappaport y tetracionato, los cuales

dificultan el crecimiento de microorganismos de la microbiota y favorecen el crecimiento de *Salmonella*.^{75,78,79}.

1.13.2 TECNICAS SEROLOGICAS

Las técnicas serológicas como ELISA, se pueden emplear para detectar microorganismos a partir de muestras biológicas y ambientales o anticuerpos producidos contra estos antígenos. Algunas ventajas a destacar son: la interpretación es relativamente sencilla, no requiere mucho material, además el tiempo de obtención de un resultado es rápido, se considera altamente sensible por la capacidad de detectar microorganismos que ya no son viables o bacterias muertas y en pequeña cantidad. Sin embargo; tiene sus limitantes, por ejemplo, las ELISA de tipo indirecto, detectan anticuerpos contra *Salmonella*, sin especificar la serovariedad implicada, tampoco se conoce si se trata de una infección activa o es causa de una exposición reciente con el agente infeccioso. Así también una ELISA directa, puede darnos resultados falsos positivos, debido a reacciones cruzadas, no es práctica, por la interminable cantidad de serotipos que conforman al género *Salmonella* spp. y que se tendrían que probar, el material empleado es muy costoso o muchas veces no se cuenta con todos los antisueros requeridos.⁷⁵ En el caso de reptiles se tiene la desventaja de que éstos no generan anticuerpos específicos contra dicho microorganismo^{65,70,72} y tampoco existen antisueros comerciales producidos en reptiles.

1.13.3 REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La PCR es una herramienta diagnóstica tanto en la clínica como en investigaciones epidemiológicas. Tiene la ventaja sobre el cultivo de ser más rápida, ya que la muestra se puede procesar a partir cualquier tejido, órgano, secreción o fluido corporal, por ejemplo: raspados de superficies corporales

con hisopos, heces, saliva, lesiones, biopsias, sangre, etc. La extracción de ADN de la muestra se realiza con el protocolo más conveniente según el tipo de muestra a procesar, la emisión de un resultado puede darse en 24 h o en dos días como máximo.⁷⁸ La especificidad de la prueba dependerá de los iniciadores empleados, por lo cual tienen que ser únicos o específicos del microorganismo a identificar, los cuales se unirán a la secuencia blanco, siempre y cuando esté presente dentro del genoma del microorganismo que se desea identificar, que sea una secuencia conservada y que no tenga homología con otro microorganismo con el cual pueda generar amplificadores falsos positivos. En este trabajo se utilizaron 2 pares de iniciadores que amplifican fragmentos de secuencias nucleotídicas conservadas en *Salmonella*, una para el gen *invA*⁴³ y otra para el gen *ompC*⁴⁴ reportadas anteriormente.

Algunas ventajas de la PCR son, por una parte, realizar un monitoreo epidemiológico o de varios pacientes por el amplio número de muestras que se pueden procesar al mismo tiempo^{75,79} reduciendo los costos. Por otro lado, los cambios de temperatura durante el transporte, almacenamiento o procesamiento de las muestras no afectan a las células o su almacenamiento, así los resultados de la prueba no son alterados, como lo podría ser con el ELISA o el aislamiento.^{75,79}

Algunas de las desventajas son: se requiere de un laboratorio con las instalaciones y equipo con la tecnología adecuada que en un principio pudieran parecer más costosos, agentes inhibidores de la reacción, o contaminación de las reacciones o de la misma muestra.^{78,80} Por todo lo anterior, realizar pruebas pareadas es una alternativa recomendada, pudiendo así comparar y corroborar los resultados positivos y negativos, o emplear controles internos.

1.14 SUSCEPTIBILIDAD DE *Salmonella* A ANTIBIÓTICOS

Es importante que además de hacer un diagnóstico adecuado, rápido y oportuno, también se cuente con información sobre la sensibilidad de la bacteria a los antibióticos posibles a elegir en caso de necesitar combatir una infección. En cuanto a *Salmonella*, la resistencia a antibióticos por *S. enterica* es un problema emergente, cepas aisladas a partir de animales pueden ser una fuente de organismos resistentes y provocar una antibioterapia fallida en humanos.⁴⁷

1.14.1 SUSCEPTIBILIDAD DE *Salmonella* A ANTIBIOTICOS EN REPTILES

Se han publicado distintos trabajos sobre la impracticidad de un tratamiento antimicrobiano en los reptiles con el fin de eliminar *Salmonella* de su organismo.^{60,61} La investigación de Siebeling *et al.*,⁶⁰ es uno de ellos, él realizó un experimento con tortugas de recién eclosión provenientes de criaderos, mismas que fueron analizadas bacteriológicamente y portaban *Salmonella*. Los animales fueron colocados por 14 días en recipientes con agua que contenían diluciones de diferente concentración de neo terramicina, terramicina y tirosina, el agua era cambiada diariamente. Posterior al tratamiento, los animales eran colocados en agua estéril y monitoreados por 14 días más. Los resultados obtenidos mostraron que con un tratamiento de 200 µg/ml de las soluciones a partir del día 6 podían considerarse como libres de *Salmonella*. Sin embargo; en un segundo experimento colocó tortugas en recipientes con agua con 200 µg de neoterramicina por 14 días, en el agua en la que se alojaban éstas no se detectó *Salmonella* durante 72 h, sin embargo cuando las tortugas fueron analizadas, posteriormente al tratamiento, sí se aisló al microorganismo, por lo cual Siebeling *et al.*, concluyeron que una antibioterapia en animales infectados suprime la excreción de *Salmonella* a números no detectables, pero la bacteria no es erradicada del organismo.⁶⁰ Por esto no se recomienda tratar de eliminar la bacteria con antibióticos a menos que se trate de una infección con

signología clínica. Además ya habiendo explicado que los factores estresantes juegan un papel importante en la excreción de la bacteria, aquellos animales que han sido tratados con antibióticos, estos factores también pueden estar afectando en la presión selectiva de cepas resistentes.⁸¹

II. JUSTIFICACION

En México, las tortugas tienen una alta demanda como mascota. En el país no hay trabajos donde las tortugas se hayan reportado como una de las fuentes principales de transmisión de salmonelosis en salud pública; así mismo no existe una normatividad que regule la compra y venta de tortugas como animales de compañía, como existe en otros países. Por lo cual se requiere conocer si *Salmonella* puede ser aislada de tortugas mantenidas como animales de compañía, apoyándose de herramientas moleculares para el diagnóstico, ya que esto permitirá reducir el tiempo y los costos. Este trabajo también aportará información al médico veterinario clínico sobre algunas recomendaciones zootécnicas que les deben proporcionar a los propietarios de reptiles para mantenerlos en condiciones adecuadas. Además, estos mismos datos servirán como base para proponer una regulación en nuestro país para la compra y venta de tortugas siendo el objetivo evitar la transmisión de salmonelosis a la población humana, sobre todo a las personas más susceptibles.

III. HIPÓTESIS

Salmonella spp. está presente en muestras cloacales de tortugas clínicamente sanas, mantenidas en cautiverio como animales de compañía.

IV. OBJETIVO GENERAL

Identificar la presencia de *Salmonella* spp. en muestras cloacales de quelonios mediante el cultivo *in vitro* y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Obtener muestras de hisopos cloacales de quelonios clínicamente sanos mantenidos como animales de compañía en diferentes zonas del área Metropolitana del Distrito Federal (DF).
- 2.- Aislar e identificar microorganismos del género *Salmonella* spp a partir de hisopos cloacales de tortugas.
- 3.- Demostrar la presencia de ADN de *Salmonella* spp. en las muestras cultivadas en medios líquidos a partir de hisopos cloacales empleando la técnica de PCR.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 SUJETOS Y LOCALIDADES

De los meses de mayo a noviembre de 2006 se tomaron muestras de hisopos cloacales de reptiles del orden *Chelonia*, aparentemente sanas y que no estuvieran bajo antibioterapia^{60,61,81} y también exceptuando la superfamilia *Chelonioidea* (marinas). Los quelonios fueron sexados y se les tomó medida del largo del caparazón.

Las muestras fueron obtenidas aleatoriamente de tortugas de colecciones particulares de las zonas de Tecamachalco y Coyoacán y, de tortugas en calidad de pacientes del Hospital Veterinario de Especialidades FMVZ-UNAM en el DF. A los propietarios de los animales se les realizó un pequeño cuestionario sobre las condiciones de alojamiento, medidas de higiene y estado de salud de sus animales y del estado de salud de ellos mismos o de las personas que convivían con las tortugas, El cuestionario se adjunta en el apartado de anexos (**Anexo 1**).

5.2 TOMA DE MUESTRAS

Las muestras se tomaron introduciendo hisopos estériles de mango de aluminio y punta de algodón por el orificio de la cloaca realizando movimientos giratorios suaves y deslizándolos por las paredes. Esta técnica es recomendada para trabajar muestras clínicas de hisopos cloacales y heces, que posteriormente se depositan en medios de cultivo,^{75,76,77} la cual tiene las siguientes ventajas: no es invasiva, es fácil de realizar, requiere poco material. El diámetro de la cloaca de muchos de los ejemplares era pequeño (2 a 5 mm diámetro), debido al tamaño o a la edad del reptil, por lo tanto este tipo de hisopos facilitó la toma de la muestra.

5.3 AISLAMIENTO BACTERIOLÓGICO

Los hisopos cloacales fueron inoculados en tubos de vidrio^B de 12x150 mm, con tapón de rosca conteniendo 9 mL de agua peptonada^C como medio de preenriquecimiento, e incubados por 24 h, a 37 °C, transcurrido ese tiempo, se transfirió 1 mL del cultivo a 9 mL de caldo selenito^D y 9 mL de caldo Rappaport-Vassidialis (RV),^E respectivamente, como medios de enriquecimiento, encaminados al aislamiento de *Salmonella*; estos medios se incubaron a 37 °C por 18 a 24 h. A partir del crecimiento en los medios líquidos, se tomó 1 mL del cultivo, se colocó en un microtubo de plástico^F de 1.5 mL, y se centrifugó por 8 min a 12 000 rpm y se decantó el sobrenadante, la pastilla fue congelada a -70 °C hasta su uso.

Posteriormente se tomaron 100 µL de cada uno de los medios mencionados y se sembró por plaqueo por dispersión, en agar Verde brillante (VB)^C y agar MacConkey (MC)^C, los que fueron incubados de 24 a 48 h a una temperatura de 37 °C, se tomó una asada de cada medio y se resembró por aislamiento en cultivo puro (ACP) en agar MC y VB, nuevamente se incubaron a 37 °C por 24 a 48 h con el fin de detectar colonias sugerentes al género *Salmonella* hasta la obtención de cultivos puros, a los cuales se les realizó las pruebas de TSI, SIM, citrato, urea, descarboxilación de la lisina, desaminación de la fenilalanina, Ortonitrophenil galactosidasa (ONPG), licuefacción de la gelatina.

^B Kimax

^C Bioxon

^D Acumedia

^E Difco

^F Eppendorf

5.4 REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA

5.4.1 EXTRACCION DE ADN

Para la realización de la PCR, primeramente se hizo la extracción del Ácido desoxiribonucleico (ADN) de las 81 muestras, las pastillas obtenidas de los medios de cultivo fueron descongeladas a temperatura ambiente, y se les realizó la extracción de ADN genómico con el método de CTAB/NaCl⁸⁰ ajustando las cantidades de los reactivos al volumen de la muestra. Cada pastilla fue suspendida en 567 μ L de amortiguador 10 mM Tris^G pH 8.0: 1 mM EDTA^H pH 8.0 (10:1), se agregaron 30 μ L de SDS^I al 10% y 5 μ L de proteinasa K^J (20 mg/mL) para la lisis bacteriana, luego se colocó en baño María a 37 °C por 1 h. Pasado ese tiempo, se agregaron 100 μ L de NaCl^K 5M pH 8, y 80 μ L de CTAB/NaCl, se homogenizó por versión 7 ocasiones y se incubó 10 min en baño María a 65 °C. La extracción se realizó adicionando 800 μ L de cloroformo^L/ alcohol isoamílico^L en proporción (24:1), se mezcló vigorosamente y centrifugó por 2 minutos a 12 000 rpm. Se recuperó el sobrenadante y se agregó un volumen igual al recuperado de fenol^J/ cloroformo/ alcohol isoamílico en proporción (25:24:1), se homogenizó en vórtex y centrifugó por 2 minutos a 12 000 rpm, esta extracción fenólica se realizó 2 veces, al sobrenadante colectado se le agregaron 5 μ L de acrilamida,⁸² se mezcló repetidas ocasiones con la pipeta, y se dejó reposar 7 min en hielo, inmediatamente se agregaron 0.6 volúmenes de isopropanol ^L. El sobrenadante se mezcló por inversión y se centrifugó por 10 min a 13 000 rpm, se recuperó la pastilla y se realizó 1 lavado con 1 mL de etanol^K frío al 70%, centrifugando a 13 000 rpm durante 5 min, el sobrenadante fue decantado y la pastilla resuspendida en 10 μ L de solución TE (Tris-HCl 10mM- EDTA 1mM) pH 7.6 y, se

^G usb
^H Gibco
^I Sigma
^J Invitrogen
^K Merck
^L JT Baker
^M ALDRICH

almacenó a -20 °C hasta su posterior uso.

Se tomaron 2µL de cada muestra y se mezcló con 2µL de solución de carga (sal de sodio azul de Bromofenol^M 0.25%, Xylen Cianol^I 0.25% y glicerol^I 30%), las mezclas se depositaron en los pozos del gel de agarosa^J al 1% para su separación y se realizó una electroforesis a 80 V por 60 minutos, el gel fue teñido con Bromuro de Etidio^I (Br-E) (100mg/mL) por 10 min. El ADN fue visualizado con transiluminador de luz UV, el resultado fue registrado en una fotografía por medio de un digitalizador de imágenes.

5.4.2 CUANTIFICACIÓN DEL ADN

Como segundo paso, mediante espectrofotometría se determinó la concentración de ADN en ng/µL de las pastillas extraídas de los medios de cultivo. Se tomó 1 mL de solución TE como blanco, en una cubeta de cuarzo de 1ml, se resuspendió 1µL de muestra y se homogenizó, la lectura se hizo a 260 nm, así se logró estandarizar la concentración óptima de ADN para la realización de la prueba de PCR.⁸³

5.4.3 INICIADORES

Para la detección de ADN de *Salmonella* en las muestras se emplearon 2 juegos de iniciadores, el primero corresponde a una secuencia del gen *invA*, que amplifica un fragmento de 284 pb, reportada por Rhan *et al.*, 1992,⁴³ con número de acceso [AM933172.1](#) **Cuadro 2**. El segundo juego de iniciadores amplifica un fragmento de 159 pb del gen *ompC*, la secuencia modificada es reportada por Puente *et al.*, 1989,⁴⁴ con número de acceso [CP001144](#) **Cuadro 4**. Ambos iniciadores reportados previamente para la identificación de *Salmonella* spp.

Orientación	Secuencia nucleotídica 5' 3'	Tamaño del producto	Región que amplifica	Localización dentro del gen <i>invA</i>
Sentido	GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA	284 pb	<i>invA</i>	287-312
Antisentido	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	284 pb	<i>invA</i>	517-550

Cuadro 2. Secuencia de los Iniciadores utilizados durante la PCR para la amplificación de un fragmento del gen *invA*. Se indica además de la orientación de cada iniciador, la secuencia nucleotídica, el tamaño del producto amplificado y la región que amplifica.

aacagtgctc	gtttacgacc	cgaattactg	atcctggtag	taatggtgat	gatcatttct
ttgtcacgag	caaatgctgg	gcttaatgac	taggaccatg	attaccacta	ctagtaaaga
70	80	90	100	110	120
atgttcgtca	ttccattacc	tacctatctg	gttgatttcc	tgatcgcgct	gaatatcgta
tacaagcagt	aaggtaatgg	atggatagac	caactaaagg	actagcgcga	cttatagcat
130	140	150	160	170	180
ctggcgatat	tgggtgttat	ggggtcgttc	tatattgaca	gaatcctcag	tttttcaacg
gaccgctata	accacaaata	cccagcaag	atataactgt	cttaggagtc	aaaaagtgc
190	200	210	220	230	240
tttctgctgc	tattgttaat	aacaacactc	tttctgctgc	cattatcgat	cagtaccagc
aaaggacgcc	ataacaatta	ttgttgtgag	aaagcagacc	gtaatagcta	gtcatggtcg
250	260	270	280	290	300
cgctcttatct	tgatcgaggc	cgatgccggg	gaaattatcg	ccacggtcgg	gcaa tttgtt
gcagaataga	actagctccg	gctacggccc	ctttaatagc	ggtgcaagcc	cgtaaaca
310	320	330	340	350	360
attggcgata	gctggcggt	gggttttgtt	gtcttctcta	ttgtcactgt	ggttcagttt
taaccgctat	cggaccgcca	ccaaaacaa	cagaagagat	aacagtgaca	ccaagtcaaa
370	380	390	400	410	420
atcgttatta	ccaaagggtc	agaacgcgtc	gcggaagtcg	cggcacggtt	ttctctggat
tagcaataat	ggtttccaag	tcttgccgag	gccttcagc	gccgtgcaaa	aagagaccta
430	440	450	460	470	480
ggtatgcccg	gtaaacaaat	gagtatagat	gccgatttga	aggccggtat	tattgatgcg
ccatacgggc	catttgttta	ctcatatcta	cggctaaact	tccggccata	ataactacgc
490	500	510	520	530	540
gatgccgcac	gcgaacggcg	aagcgtactg	gaaagggaaa	gtcagcttta	cggttccttt
ctacggcgtg	cgcttgccgc	ttcgcatgac	ctttcccttt	cagtcgaaat	gccaaggaaa
550	560	570	580	590	600
gacgggtgca	tgaagtttat	caaaggtgac	gccattgccg	gtatcattat	catctttgtg
ctgccacgct	act tcaata	gtttccactg	cggtaacggc	catagtaata	gtagaaacac

Cuadro 3. Gen *invA*. A continuación se muestra parte de la secuencia nucleotídica del genoma de *S. Enteritidis* obtenida del GenBank. Las letras en el recuadro gris indican la secuencia de los iniciadores.

Orientación	Secuencia nucleotídica 5'3'	Tamaño del producto	Región que amplifica
Sentido	ACCGCTAACGCTCGCCTGTAT	159 pb	<i>ompC</i>
Antisentido	AGAGGTGGACGGGTTGCTGC	159 pb	<i>ompC</i>

Cuadro 4. Secuencia de los iniciadores utilizados durante la PCR para la amplificación de un fragmento del gen *ompC*. Se indica la orientación de cada iniciador, la secuencia nucleotídica, el tamaño del producto amplificado y la región que amplifica.

10	20	30	40	50	60
ttagaactgg	taaaccagac	ccagcgctac	gatgtcgtcg	gtggtgatgc	ccgcatcgcg
aatcttgacc	atttggctctg	ggtcgcgatg	ctacagcagc	cacaactacg	ggcgtagcgc
70	80	90	100	110	120
ggtaaagtgc	tttttatcca	gcaggttgat	tttghtaatca	acataggtgg	acatgttttt
ccatttcagc	aaaaataggt	cgccaacta	aaacattagt	tgtatccacc	tgtacaaaaa
130	140	150	160	170	180
gttgaagtag	taagtcgctc	cgacatcaac	gtatttttacg	atgtcctggt	cgccatagct
caacttcac	attcagcgcg	gctgtagttg	cataaaatgc	tacaggacca	gcggtatcga
190	200	210	220	230	240
ggcgccgtaa	ccgttgctga	tgtccttacc	ttagactgc	agtaagcca	cagacggacg
ccgcggcatt	ggcaacgact	acaggaatgg	aaatctgacg	tccattcggt	gtctgctgctc
250	260	270	280	290	300
cagacaaaag	tcgaactggt	actgagcaac	cacttcaaag	ttctgcgctt	tgttggcaaa
gtctggtttc	agcttgacca	tgactcgttg	gtgaagtttc	aagacgcgaa	acaaccgttt
310	320	330	340	350	360
accgtaagag	gtggacgggt	tgctgctc	cggt	agaggtacca	aaacgggttg
tggtattctc	cacctgcca	acgacggcaa	tctccatggt	tttgccaac	gcaatatcca
370	380	390	400	410	420
ctgagaatac	tgcgctgcca	gatagatggt	gttcgcatcg	tatttcaggc	cgccggtgta
gactcttatg	acgcgacggt	ctatctacaa	caagcgtagc	ataaagtccg	gcgccacat
430	440	450	460	470	480
aaccgtggcg	cgatcgccgt	taccatacag	gcgagcgta	gcggtgttat	tctgatcggc
ttggcaccgc	gctagcggca	atggtatgtc	cgctcgcaat	cgcca	caata agactagccg

Cuadro 5. Gen *ompC*. A continuación se muestra parte de la secuencia nucleotídica del genoma de *S. Dublin* obtenida del GenBank. Las letras en el recuadro gris indican la secuencia de los iniciadores.

5.4.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Finalmente a las 81 muestras se les realizó la prueba de PCR. Los reactivos utilizados en dicha

prueba, así como su concentración se muestran en el **Cuadro 6**.

Reactivo	Concentración
Agua inyectable	
Buffer 10 X	50 mM
Magnesio	2.5 mM
ATP, GTP, CTP, TTP	Equimolar: 10 mM
<i>invA</i> F	10 μ M
<i>invA</i> R	10 μ M
Albúmina Sérica Bovina	1.0%
Tritón	0.1%
Taq polimerasa	2 U/ μ L
ADN	1 ng
Vol. Final	50 μ L

Cuadro 6. Reactivos utilizados para la PCR de *invA*. Se señalan las concentraciones utilizadas de cada uno de los reactivos^J.

Las condiciones establecidas en el termociclador para la PCR se muestran a continuación en la

Figura 3.

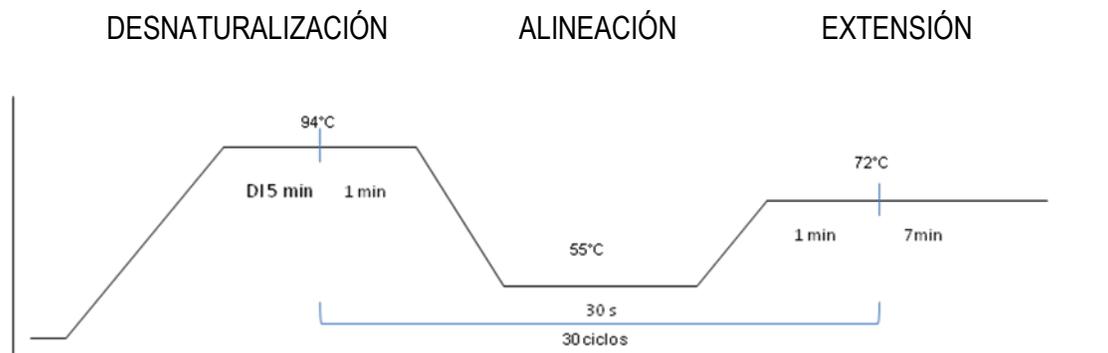


Figura 3. Condiciones de la PCR para el gen *invA*. Se muestra gráficamente las temperaturas y tiempos empleados en la PCR para la amplificación de un fragmento del gen *invA*.

En el **Cuadro 7**, se muestran los reactivos empleados para identificar el fragmento de ADN del gen *ompC* y sus concentraciones.

Reactivo	Concentración
Agua inyectable	
Buffer 10 X	50 mM
Magnesio	2.5 mM
ATP, GTP, CTP, TTP	Equimolar: 10 mM
<i>ompC</i> F	11.52 μ M
<i>ompC</i> R	11.52 μ M
Albúmina Sérica Bovina	1.0%
Tritón	0.1%
Taq polimerasa	2 U/ μ L
ADN	
Vol. Final	50 μ L

Cuadro 7. Reactivos utilizados para la PCR de *ompC*. Se señalan las concentraciones utilizadas de cada uno de los reactivos^J.

En la **Figura 4**, se señalan las condiciones establecidas en el termociclador ^{AA} para la amplificación de un fragmento del gen *ompC*.

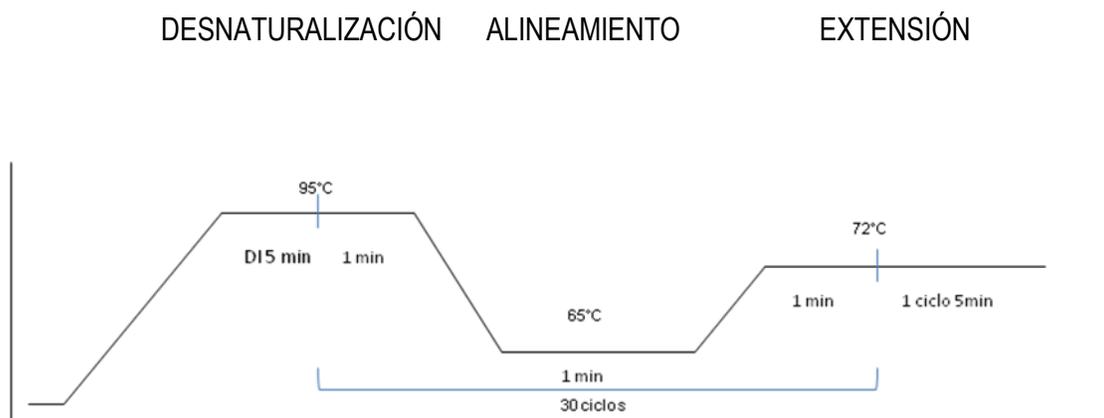


Figura 4. Condiciones de la PCR para el gen *ompC*. Se muestra gráficamente la temperatura tiempo y ciclos empleados en la PCR para la amplificación de un fragmento del gen *ompC*.

Los productos de PCR con un peso de 284 pb (gen *invA*) se visualizaron en un gel de agarosa al 1%, y los productos de PCR con un peso de 159 pb (gen *ompC*), se corrieron en un gel de agarosa al 2%. Los geles fueron teñidos con Br-E.

5.4.5 CONTROLES POSITIVOS Y NEGATIVOS

Se utilizó una cepa de *S. Enteritidis* donada por el Departamento de Microbiología e Inmunología (MEI) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la UNAM, como control positivo para la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación del segmento del gen *invA* y una cepa de *S. Typhimurium* aislada de un caso clínico en el Departamento de Microbiología e Inmunología (MEI) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la UNAM que el departamento facilitó para la PCR para la amplificación de un fragmento del gen *ompC*. Como control negativo se utilizó agua inyectable.

5.4.6 LÍMITE DE DETECCIÓN PARA EL GEN *invA*

Se empleó *S. Enteritidis* como control positivo para detectar la concentración mínima que amplificaría el fragmento de interés dentro del gen *invA*. En 20 mL de caldo nutritivo se sembraron 5 colonias de la cepa mencionada, incubándose por 24 h a 37 °C, a la cual se le realizó extracción de ADN por el método de CTAB/NaCl, posteriormente se cuantificó la cantidad de ADN presente en la extracción, como se mencionó anteriormente; se realizaron diluciones triples seriadas, para conocer la mínima concentración de ADN bajo las condiciones ya descritas en que se observan productos amplificados por PCR, éstos se visualizaron en un gel de agarosa al 1% teñido con Br-E por 10 min.

5.4.7 LÍMITE DE DETECCIÓN PARA EL GEN *ompC*

Se realizó el mismo procedimiento utilizando una cepa aislada de *S. Typhimurium*, como control positivo para la amplificación de un fragmento de 159 pb dentro del gen *ompC*. En este caso se hicieron diluciones triples seriadas y los amplicones se observaron en un gel de agarosa al 2% teñido con Br-E por 10 min.

5.5 SUSCEPTIBILIDAD DE LAS CEPAS DE *Salmonella* A QUIMIOTERAPÉUTICOS

Las cepas identificadas como *Salmonella* spp. o *S. arizonae* se crecieron en agar tripticaseína soya (TSA), posteriormente se tomaron una a 2 colonias para estandarizar una dilución que equivale al 0.5 de MacFarland, y se empleó el método cualitativo de Bauer⁸⁴ para medir la susceptibilidad a los quimioterapéuticos que a continuación se mencionan: Ácido nalidíxico 30 µg, cefuroxima 30 µg, sulfas 23.75 µg + trimetoprima 1.25 µg, norfloxacina 10 µg, gentamicina 10 µg, kanamicina 30 µg, carbenicilina 100 µg, cloramfenicol 30 µg, cefoxitina 10 µg, ceftiofur. Los aislamientos fueron clasificados como resistentes, intermedios o susceptibles según la medida del halo formado alrededor de los sensidiscos, se utilizó la tabla estandarizada publicada por Becton Dickinson Company.⁸⁵

5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se empleó el paquete estadístico SPSS v.15.0 para realizar el análisis estadístico de los datos. Lo que primero se hizo fue una selección aleatoria de las muestras, es decir, para que se cumpliera el supuesto de independencia entre las muestras, se seleccionó aleatoriamente una tortuga de aquellos propietarios con más de un animal incluido en el estudio. Posteriormente se calculó el índice Kappa para determinar si existe o no concordancia entre los resultados de las pruebas diagnósticas.⁸⁶

Así mismo, se utilizó un modelo logístico para determinar si existe asociación entre las variables: temperatura ambiental, tamaño del animal, utilización de un filtro para mantener la calidad del agua de las peceras o estanques, alimentación balanceada y el resultado de la prueba diagnóstica.

VI. RESULTADOS

6.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población de estudio consistió en 81 quelonios de los cuales se tomaron muestras cloacales, los datos de los animales se resumen y distribuyen como se muestra en el **Cuadro 8**.

Las muestras consistieron en hisopos cloacales obtenidos de 81 quelonios de 14 especies distintas: *Gopherus agassizi*, *Apalone spinifera*, *Trachemys scripta elegans*, *Kinosternon* spp., *Chelydra serpentina*, *Gratemys pseudogeographica kohni*, *Trachemys scripta scripta*, *Geochelone sulcata*, *Chelus fimbriatus*, *Macrolemys. temminckii*, *Staurotypus triporcatus*, *Pseudemys alabamensis*, *Chrysemys picta bellied* y *Geochelone carbonaria*. **Cuadro 8**.

De los 81 quelonios, diez especies son de hábitos semiacuáticos: *T. scripta elegans*, *T. scripta scripta*, *Kinosternon* spp., *C. serpentina*, *G. pseudogeographica kohnii*, *C. fimbriatus*, *M. temminckii*, *S. triporcatus*, *P. alabamensis* y *C. picta bellied*, tres especies son tortugas terrestres: *G. sulcata*, *G. carbonaria*, *G. agassizi* y, una especie es acuática: *A. spinifera*. **Cuadro 8**.

Siete especies de las tortugas son nativas de México: *G. agassizi*, *A. spinifera*, *Kinosternon* spp., *C. serpentina*, *M. temminckii*, *S. triporcatus*, *C. picta bellied* y, siete son exóticas: *T. scripta elegans*, *G. pseudogeographica kohnii*, *T. scripta scripta*, *G. sulcata*, *C. fimbriatus*, *P. alabamensis*, *G. carbonaria*, aun que algunas especies ya son criadas en cautiverio en el país. **Cuadro 8**.

Especie de quelonio	Número de ejemplares	%	Sexo		Tamaño		Temperatura		Filtro		Dieta	
			Hembra	Macho	Juveniles < 10.2 cm	Adultos > 10.2 cm	Controlada*	Sin control	Presencia**	Ausencia	Adecuada ***	No adecuada
<i>G. agassizi</i>	4	5	2	2	0	4	4	0	NA	4	2	2
<i>A. spinifera</i>	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1
<i>T. scripta elegans</i>	41	51	24	17	9	32	4	37	26	14	38	3
<i>Kinostemon</i> spp.	9	11	5	3	1	8	1	8	1	8	7	2
<i>C. serpentina</i>	5	6	2	3	0	5	0	5	3	2	5	0
<i>G. pседogeographica kohni</i>	4	5	1	3	4	0	0	4	1	3	4	0
<i>T. scripta scripta</i>	5	6	3	2	1	4	1	4	4	1	4	1
<i>G. sulcata</i>	3	4	2	1	2	1	3	0	NA	3	3	0
<i>C. fimbriatus</i>	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0
<i>M. temminckii</i>	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0
<i>S. triporcatus</i>	2	3	2	0	0	2	0	2	2	0	2	0
<i>P. alabamensis</i>	3	4	0	3	0	3	0	3	3	0	3	0
<i>C. picta bellied</i>	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0
<i>G. carbonaria</i>	1	1	1	0	0	1	0	1	NA	1	1	0
14 especies	n=81	100	44	36	19	62	13	68	43	30	72	9

Cuadro 8. Se muestran las especies de quelonios, número de ejemplares por especie, datos de género, tamaño y condiciones de alojamiento, de los que se obtuvieron las muestras para este estudio. Claves: NA: no aplica *Se emplea un calentador para mantener la temperatura del agua un termómetro para medir la temperatura

Se utiliza un filtro el cual funciona manteniendo el agua limpia * Recomendada por la literatura según la especie de quelonio ⁸⁷.

T. scripta elegans fue la especie de tortuga muestreada con más frecuencia muestreada con un total de 41 ejemplares, de la especie *Kinosternon* spp. se muestrearon 9 individuos; se contó con 5 ejemplares de las especies *C. serpentina* y 5 de *T. scripta scripta*; correspondieron 4 individuos por cada una de las especies *G. agassizi* y *G. pseudogeographica kohnii*; se muestrearon 3 ejemplares de la especie *G. sulcata* y 3 de la especie *P. alabamensis*; de la especie *S. triporcatus* se muestrearon 2 tortugas, de las siguientes especies solamente se muestreó un animal: *A. spinifera*, *G. carbonaria*, *C. picta bellied*, *M. temminckii* y *C. fimbriatus*. **Cuadro 8.**

La variable sexo o género se distribuyó de la siguiente forma: 44 hembras (54.3%) y 36 machos (44.4%). Un ejemplar del género *Kinosternon* no pudo ser sexada. **Cuadro 8.**

Basado en el código de regulaciones federales para tortugas en EUA, la medida del largo del caparazón es un parámetro para dividir las en dos grupos según su tamaño, entonces, aquellas tortugas con un largo del caparazón > 10.2 cm ó 4 pulgadas se consideran adultas y, juveniles las que midan < 10.2 cm.⁶⁸ Por lo tanto de las 81 tortugas muestreadas, se identificaron 63 (76.5%) como adultas y 19 (23.5%) como juveniles. **Cuadro 8.**

En la muestra obtenida, 68 ejemplares (84%) no contaban con calentador para el agua o foco en el terrario ni con control de la temperatura. **Cuadro 8.**

Para mantener una adecuada calidad del agua de los estanques o peceras donde se alojan tortugas de hábitos acuáticos, se recomienda la utilización de un filtro.⁷³ Dentro de la muestra, 73 de los quelonios se mantenían en condiciones acuáticas, de los cuales 43 (58.9 %) contaba con filtro en su pecera o estanque. **Cuadro 8.**

Según lo reportado en la literatura, el 97% de los animales (72) tenían una alimentación adecuada a su especie y tamaño.^{73,87} **Cuadro 8.**

Los resultados revelaron que habían diez propietarios con más de una tortuga. El 17% de la población de tortugas correspondía a un mismo propietario ubicado dentro del área de Coyoacán, el otro 20% pertenecía a otro propietario que habita en la zona de Tecamachalco y el resto de tortugas corresponden a diferentes dueños que llevaron sus quelonios a consulta médica al HVE-FMVZ-UNAM.

6.2 AISLAMIENTO BACTERIOLÓGICO

Para el aislamiento, las 81 muestras se trabajaron bajo las mismas condiciones, con los procedimientos mencionados en el capítulo de material y métodos, a las colonias sospechosas a *Salmonella* se les realizó las pruebas bioquímicas que la literatura recomienda para su identificación^{29,88-93} y, los resultados de las pruebas se muestran en el **Cuadro 9**. En la **Figura 5** se muestra una fotografía de los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a las colonias sugerentes a *Salmonella* y, en la **Figura 6** se observa una fotografía del agar MacConkey con colonias puras de *Salmonella* que son lentas fermentadoras de lactosa. La **Figura 7** es una fotografía de un cultivo puro de *Salmonella* spp. que no fermenta la lactosa.

Cuadro 9. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a las colonias sugerentes a *Salmonella*

Número de muestra	Pruebas bioquímicas		Tinción de Gram	KOH 3%	Lactosa	Oxidasa	TSI	Citrato	Urea	SIM	ONPG	DF	DL	Gelatina	Identificación
	Especie														
4 ^a	<i>T. scripta elegans</i>	-	+	-	-	2	d+ ó -	-	+/-/+	-	-	+	+	<i>Salmonella</i> spp	
4b	<i>T. scripta elegans</i>	-	+	+	-	4	+	-	+/-/+	+	-	+	+	<i>S. arizonae</i>	
7b	<i>T. scripta elegans</i>	-	+	+	-		+	-	-/-/+	-	-	+	+	<i>S. arizonae</i>	
7c	<i>T. scripta elegans</i>	-	+	Lenta	-		+	-	+/-/+	+	-	-	-	<i>Salmonella</i> spp	
8b	<i>Kinosternon</i> spp.	-	+	+	-	4	d+	-	+/-/+	+	-	+	+	<i>S. arizonae</i>	
8c	<i>Kinosternon</i> spp.	-	+	-	-	2	+	-	+/-/+	-	-	+	-	<i>Salmonella</i> spp	
10	<i>Kinosternon</i> spp.	-	+	-	-	2	+	-	+/-/+	-	-	+	+	<i>Salmonella</i> spp	
17 ^a	<i>Kinosternon</i> spp.	-	+	-	-	4	+	-	+/-/+	-	-	+	-	<i>Salmonella</i> spp	
19	<i>T. scripta elegans</i>	-	+	-	-	4	D+	-	-/-/+	+	-	+	+	<i>S. arizonae</i>	
20 ^a	<i>T. scripta elegans</i>	-	+	-	-	3	+	-	-/-/+	+	-	+	+	<i>S. arizonae</i>	
21 ^a	<i>T. scripta elegans</i>	-	+	-	-	4	+	-	+/-/+	-	-	-	-	<i>Salmonella</i> spp	
40	<i>T. scripta elegans</i>	-	+	Lenta	-	2	+	-	+/-/+	+	-	+	+	<i>S. arizonae</i>	
41	<i>G. sulcata</i>	-	+	+	-	4	+	-	+/-/+	+	-	-	+	<i>S. arizonae</i>	
51	<i>G. agassizi</i>	-	+	+	-	4	+	d+	+/-/+	+	-	-	-	<i>S. arizonae</i>	
52	<i>M. temminckii</i>	-	+	+	-	4	+	-	+/-/+	+	+	-	+	<i>S. arizonae</i>	
53 ^a	<i>C. serpentina</i>	-	+	+	-			-			-		+	<i>S. arizonae</i>	
65b	<i>T. scripta elegans</i>	-	+	-	-	1	d+	-	-/+	+	-	-	+	<i>S. arizonae</i>	

Cuadro 9. Se muestran las pruebas bioquímicas realizadas a las muestras sugerentes a *Salmonella* y resultados de cada prueba por muestra y según la especie de tortuga de la cual se aisló, así como la identificación bacteriológica.

Abreviaciones: TSI Triple azúcar hierro; LD Descarboxilación de la lisina; FD Desaminación de la fenilalanina; ONPG Ortonitrophenil beta galactosidasa; SIM Producción de H₂S, Producción de indol, Motilidad.



Figura 5. Fotografía donde se muestran de izquierda a derecha los siguientes medios: TSI, citrato, urea, SIM, Lisina- Descarboxilasa, gelatina. con los resultados esperados para la identificación de *Salmonella*



Figura 6. Fotografía del medio de cultivo MacConkey con colonias puras de *S. arizonae*, las cuales se observan como lentas fermentadoras de lactosa.

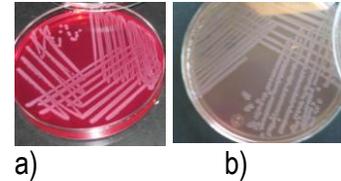


Figura 7. Fotografías de los medios a) Verde Brillante y b) MacConkey de izquierda a derecha, con colonias puras de *Salmonella* spp. no fermentadoras de lactosa.

De los 81 quelonios de la muestra, 14 fueron identificados como portadores de *Salmonella* por cultivo bacteriológico (17.2%), 7 animales (50%) de la especie *T. scripta elegans*, 3 de *Kinosternon* spp. y un ejemplar de la especie *M. temmincki*, una *G. sulcata*, una *G. agassizi* y una *C. serpentina*.

Cuadro 10 y 12.

Por aislamiento bacteriológico se identificaron 17 cepas del género *Salmonella*, de las cuales, 11 (65%) corresponden a la subespecie *arizonae* y 6 (35%) a *Salmonella* spp., distribuyéndose en 6 especies de quelonios diferentes: *T. scripta elegans* (con siete ejemplares), *Kinosternon* (3 ejemplares) y, una cepa por un ejemplar de las siguientes especies: *G. sulcata*, *G. agassizi*, *M. temmincki* y *C. serpentina*.

Del total de 17 cepas, 9 se aislaron de la especie *T. scripta elegans* (52.9%), 4 cepas (23.5%) de la especie *Kinosternon* spp., y una cepa (5.88%) de cada una de las siguientes especies: *C. serpentina*, *G. agassizi*, *G. sulcata* y *M. temminckii*. **Cuadro 9.**

De las seis cepas identificadas como *Salmonella* spp., tres fueron aisladas de la especie *Kinosternon* spp. y tres de la especie *T. scripta elegans*. De las 11 cepas identificadas como *S. arizonae*, seis se aislaron de la especie *T. scripta elegans* y las 5 cepas restantes de las demás especies como se muestra en el **Cuadro 9**.

La especie de quelonio con mayor número de muestras positivas por cultivo *in vitro* a *Salmonella* fue *T. scripta elegans* con 7, que equivale al 50%, considerando que fue la especie más frecuentemente muestreada con un total de 41 ejemplares. Se obtuvieron 9 cepas positivas (53%), seis correspondieron a *S. arizonae* y tres a *Salmonella* spp. **Cuadro 9 y 12**. Tres de las tortugas eran machos y cuatro eran hembras, cuatro de los ejemplares tenían una talla mayor a los 10.2 cm de largo de su caparazón (57%), por lo que se consideran adultas y tres juveniles (42.8%), de las juveniles todas tenían la alimentación adecuada, una tenía filtro y temperatura controlada y las otras no. **Cuadro 12**.

De la especie *Kinosternon* spp. se lograron aislar 4 cepas (23.5%), tres de *Salmonella* spp. y una de *S. arizonae*. Todos los ejemplares (4) eran del mismo propietario por lo que las condiciones en las que se encontraban eran las mismas: Sin control de la temperatura del estanque, ni filtro, su alimentación era la correspondiente a su especie y las cuatro eran adultas. Dos eran machos, una hembra y un individuo no pudo ser sexado. **Cuadro 12**.

De las especies *G. sulcata*, *G. agassizi*, *C. serpentina* y *M. temminckii* se obtuvieron el resto de aislamientos correspondientes a un aislamiento por especie de *S. arizonae*, representando un 1.2% cada una del total de la muestra de 81 quelonios. La especie *M. temminckii* y *C. serpentina* son tortugas de hábitos semiacuáticos, de tamaño adulto y machos. A ambas se les proveía el alimento

apto para la especie, sin embargo; el alojamiento no tenía filtro, termómetro ni calentador. Las otras dos especies mencionadas son terrestres por lo que no necesitan un filtro, pero sí tienen un termómetro para medir la temperatura del terrario, ambas tienen una alimentación adecuada. La especie *G. sulcata* era juvenil y *G. agassizi* era adulta y ambas hembras. **Cuadro 12.**

En el **Cuadro 10**, se muestra la relación de las especies de tortugas y el número de ejemplares por especie de las cuales se aisló *Salmonella*, así como el porcentaje correspondiente.

Cuadro 10. Especies de quelonios de los cuales se aisló *Salmonella*.

Especies de quelonios	Número de individuos positivos a <i>Salmonella</i> por aislamiento/ número de ejemplares por especie n= 81	Número de cepas aisladas Total= 17		Porcentaje de positivos respecto al total de ejemplares por especie (%)	Porcentaje de positivos con respecto al total de muestras n= 81(%)
		<i>Salmonella</i> spp.	<i>S. arizonae</i>		
<i>T. scripta elegans</i>	7/41	3	6	17.07	8.6
<i>Kinosternon</i> spp	3/9	3	1	33.33	3.7
<i>G. sulcata</i>	1/3	0	1	33.33	1.2
<i>G. agassizi</i>	1/4	0	1	25	1.2
<i>M. temminckii</i>	1/1	0	1	100	1.2
<i>C. serpentina</i>	1/5	0	1	20	1.2
TOTAL	6 especies 14 ejemplares	6	11	NA	17.2

Cuadro 10. Especies de quelonios y número de individuos positivos a *Salmonella* por aislamiento por especie. Columna 1, especies de quelonios de los cuales se aisló *Salmonella* y la n por especie; en la columna 2, número de ejemplares positivos a salmonella; columna 3 y 4, número de cepas de *Salmonella* spp. y *S. arizonae* por especie; columna 5, se muestra el porcentaje que representa el número de especies de tortugas identificadas con *Salmonella*; columna 6, porcentaje correspondiente por especie según el total de la muestra de 81 tortugas.

El medio de enriquecimiento más efectivo para el aislamiento de *Salmonella* fue el caldo selenito, a partir de éste se lograron el 100% de los aislamientos y ninguno a partir de caldo Rappaport-Vassidialis. También se observó que en el agar MacConkey se pudo diferenciar con mayor facilidad las colonias no fermentadoras de lactosa de las fermentadoras, así mismo la identificación de las colonias de *Salmonella*.

Aun que el objetivo de este trabajo era demostrar la presencia de *Salmonella* en distintas especies de quelonios como animales de compañía, en el **Cuadro 11**, se muestran otros géneros bacterianos identificados en las muestras analizadas.

Cuadro 11. Otros géneros bacterianos aerobios identificados por cultivo bacteriológico.

ESPECIES DE TORTUGAS	GÉNEROS BACTERIANOS IDENTIFICADOS
<i>G. agassizi</i>	<i>Enterobacter</i> spp <i>Citrobacter freundii</i> <i>Yersinia</i> spp <i>Serratia</i> spp
<i>T. scripta elegans</i>	<i>Enterobacter</i> spp <i>E. cloacae</i> <i>Serratia</i> <i>C. freundii</i> <i>Pseudomonas</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>Yersinia</i> spp <i>Proteus</i> spp
<i>M. temminckii</i>	<i>Enterobacter</i> spp
<i>P. alabamensis</i>	<i>Enterobacter</i> <i>Aeromonas hydrophila</i>
<i>T. scripta scripta</i>	<i>Citrobacter</i> spp
<i>Kinosternon</i> spp	<i>C. freundii</i> <i>P. aeruginosa</i>
<i>A. spinifera</i>	<i>C. freundii</i>
<i>C. fimbriatus</i>	<i>C. freundii</i>
<i>G. sulcata</i>	<i>C. freundii</i>

Cuadro 11. Especies de quelonios de los cuales fueron identificados otros géneros bacterianos aislamiento bacteriológico.

6.3 RESULTADOS DE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA

6.3.1 LÍMITES DE DETECCIÓN POR PCR PARA EL GEN *invA* Y PARA EL GEN *ompC*

Con los controles positivos de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* se realizaron diluciones para obtener el límite de detección de la extracción de ADN para correr la prueba de PCR, como se mencionó en el capítulo de materiales y metodologías. Los límites de detección de ADN para el gen *invA*, el cual fue de 3.6 pg/ML, como se muestra en la **Figura 8** y para el gen *ompC* fue de 17 pg/ML como se observa en la **Figura 9**.

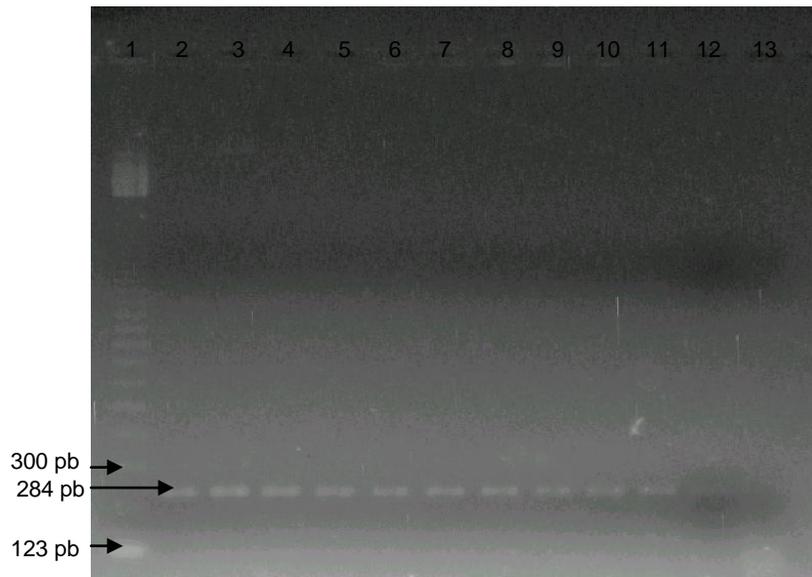


Figura 8. Fotografía de un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. Diluciones triples seriadas, ladder de 123 pb (carril 1), C+ *S. enteritidis* 215ng/ μ L (carril 2), 71.6ng/ μ L (carril 3), 23.8ng/ μ L (carril 4), 7.96ng/ μ L (carril 5), 2.65ng/ μ L (carril 6), 884pg/ μ L (carril 7), 294pg/ μ L (carril 8), 98.3pg/ μ L (carril 9), 32.7pg/ μ L (carril 10), 10.9pg/ μ L (carril 11), 3.6pg/ μ L (carril 12), C- (agua) (carril 13).



Figura 9. Fotografía de un gel de agarosa al 2%, teñido con Br-E. Diluciones triples seriadas, ladder de 100 pb (carril 1), C+ *S. Typhimurium* 4.12 ng/ μ L (carril 2), 1.37 ng/ μ L (carril 3), 458 pg/ μ L (carril 4), 153 pg/ μ L (carril 5), 51 pg/ μ L (carril 6), 17 pg/ μ L (carril 7), 5.6 pg/ μ L (carril 8), 1.8 pg/ μ L (carril 9), 628 fg/ μ L (carril 10), C- (agua) (carril 12).

6.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Por PCR, se obtuvieron 23 muestras positivas a *Salmonella* spp. distribuidas en diez tortugas de la especie *T. scripta elegans*, cuatro de la especie *Kinosternon* spp., una de la especie *G. sulcata*, dos de la especie *G. agassizi*, una de la especie *M. temminckii*, dos de la especie *T. scripta scripta*, una de la especie *C. picta bellied*, una de la especie *G. carbonaria* y una de la especie *P. alabamensis*. La distribución de las muestras positivas y las características de cada ejemplar positivo con algunas de sus condiciones de manejo son mostradas en el **Cuadro 12**.

En el **Cuadro 12** se muestra una tabla de los resultados de ambas pruebas diagnósticas. La primera columna corresponde al número de muestra, en la segunda columna se muestran las nueve especies de tortugas en las cuales se identificó *Salmonella*. En la tercera columna se pueden observar las muestras identificadas como positivas a la presencia de ADN de *Salmonella* por PCR (23 positivas); en la cuarta columna las muestras identificadas como positivas por aislamiento, con

un total de 17 cepas o 14 individuos positivos; en la siguiente columna, se muestra que de un total de 24 tortugas, cuatro individuos no necesitan filtro por ser de hábitos terrestres, pero 20 ejemplares son de hábitos acuáticos o semiacuáticos, de las cuales 11 tortugas sí contaban con un filtro funcionando y 9 no. En la sexta columna se observa que 20 tortugas eran adultas y 4 juveniles, siguiente columna describe el sexo, donde 12 ejemplares eran hembras y 11 machos y una que no se pudo identificar, en la octava columna se distinguen 23 quelonios que contaban con la alimentación adecuada y solamente un animal no, en la novena columna corresponde a la variable control de la temperatura donde se identifican a 4 animales que tenían un termómetro con el cual se pudiera tener un control de la temperatura y 20 no lo tenían. Esas variables analizadas en este estudio son algunas de las que principalmente se relacionan con la presencia de *Salmonella* en las tortugas según la literatura. La última columna muestra la identificación bacteriológica por aislamiento.

En la **Figura 10** se muestra una fotografía de un gel de agarosa donde se puede observar un amplicón correspondiente a la muestra número 21 con los iniciadores empleados para la amplificación de un fragmento del gen *invA*.

Fueron obtenidos 22 resultados positivos utilizando los iniciadores para amplificar un fragmento del gen *ompC*, algunos amplicones se muestran en la **Figura 11**.



Figura 10. Fotografía de gel de agarosa al 1%, teñido con Bromuro de etidio (Br-E), se muestra en el carril 1. ladder de 100pb y carril 2. Control negativo (agua), Carril 10 muestra positiva a partir de agua peptonada ([1ng/μl]), carril 11 y 12 productos de PCR como controles positivos [69pg/ μl] y [10ng/ μl], respectivamente.

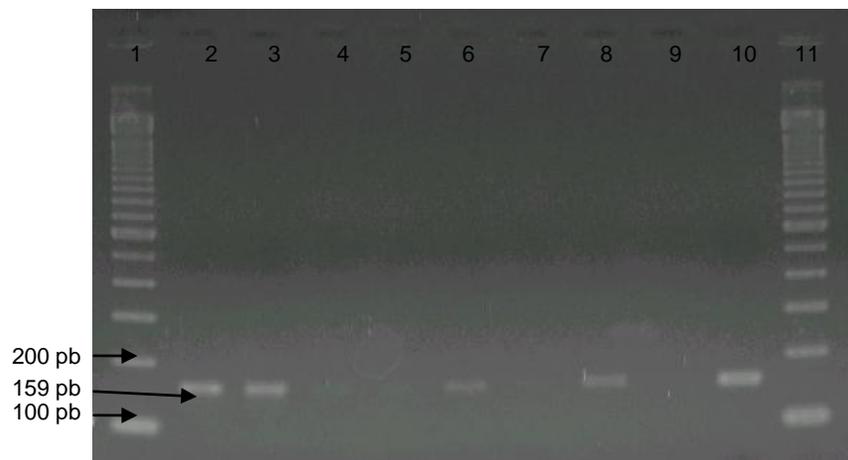


Figura 11. Fotografía de gel de agarosa al 2%, teñido con Bromuro de etidio (Br-E), muestras a partir de caldo selenito, carril 2 y 3 (controles positivos 4.12 ng/ μl y 17 pg/μl), carril 4 (muestra 14s negativa), carril 5 (muestra 15s negativa), carril 6 (muestra 16s positiva), carril 7 (muestra 17s negativa), carril 8 (muestra 19s positiva), carril 9 (muestra 20s negativa), carril 10 (muestra 21s positiva), Carril 1 y 11, ladder de 100pb, carril 12. Control negativo (agua).

Cuadro 12. Tabla de las muestras identificadas como positivas a *Salmonella* por aislamiento y PCR

Número de ejemplar	Especie de quelonio	Identificación por PCR		Identificación por aislamiento	Utilización de filtro	Tamaño	Sexo	Alimentación	Control de temperatura	Identificación bacteriológica
		<i>InvA</i>	<i>OmpC</i>							
4	<i>T. scripta elegans</i>	-	+	+	No	Adulta	Macho	NA	NC	<i>Salmonella</i> spp y <i>S. arizonae</i>
7	<i>T. scripta elegans</i>	-	+	+	No	Adulta	Macho	A	NC	<i>S. arizonae</i> (2)
8	<i>Kinosternon</i> spp.	-	+	+	No	Adulta	Macho	A	NC	<i>Salmonella</i> spp y <i>S. arizonae</i>
9	<i>Kinosternon</i> spp.	-	+	-	No	Adulta	Macho	A	NC	Ninguna
10	<i>Kinosternon</i> spp.	-	+	+	No	Adulta	Hembra	A	NC	<i>Salmonella</i> spp
17	<i>Kinosternon</i> spp.	-	+	+	No	Adulta	ND	A	NC	<i>Salmonella</i> spp
19	<i>T. scripta elegans</i>	-	+	+	No	Juvenil	Hembra	A	NC	<i>S. arizonae</i>
20	<i>T. scripta elegans</i>	-	+	+	No	Juvenil	Macho	A	NC	<i>S. arizonae</i>
21	<i>T. scripta elegans</i>	+	+	+	Si	Juvenil	Hembra	A	C	<i>Salmonella</i> spp
40	<i>T. scripta elegans</i>	-	+	+	Si	Adulta	Hembra	A	NC	<i>S. arizonae</i>
41	<i>G. sulcata</i>	-	+	+	No	Juvenil	Hembra	A	C	<i>S. arizonae</i>
48	<i>T. scripta elegans</i>	-	+	-	No	Adulta	Hembra	A	NC	Ninguna
50	<i>G. agassizi</i>	-	+	-	No	Adulta	Hembra	A	C	Ninguna
51	<i>G. agassizi</i>	-	+	+	No	Adulta	Hembra	A	C	<i>S. arizonae</i>
52	<i>M. temminckii</i>	-	+	+	Si	Adulta	Macho	A	NC	<i>S. arizonae</i>
53	<i>C. serpentina</i>	-	-	+	Si	Adulta	Macho	A	NC	<i>S. arizonae</i>
59	<i>T. scripta scripta</i>	-	+	-	Si	Adulta	Hembra	A	NC	Ninguna
60	<i>C. picta bellied</i>	-	+	-	Si	Adulta	Macho	A	NC	Ninguna
61	<i>G. carbonaria</i>	-	+	-	No	Adulta	Hembra	A	NC	Ninguna
62	<i>T. scripta elegans</i>	-	+	-	Si	Adulta	Macho	A	NC	Ninguna
63	<i>T. scripta elegans</i>	-	+	-	Si	Adulta	Macho	A	NC	Ninguna
64	<i>T. scripta scripta</i>	-	+	-	Si	Adulta	Hembra	A	NC	Ninguna
65	<i>T. scripta elegans</i>	-	-	+	Si	Adulta	Hembra	A	NC	<i>S. arizonae</i>
67	<i>P. alabamensis</i>	-	+	-	Si	Adulta	Macho	A	NC	Ninguna

Cuadro 12. Se muestran los resultados de las muestras positivas a *Salmonella* por PCR y aislamiento, por especie de quelonio y condiciones de alojamiento. A: adecuada NA: no adecuada ND: no determinada C: controlada NC: no controlada

Además las colonias puras identificadas como *S. arizonae* por cultivo bacteriológico, se les realizó PCR con los iniciadores del gen *ompC* para corroborar la identificación, estos resultados se muestran en la **Figura 12**.

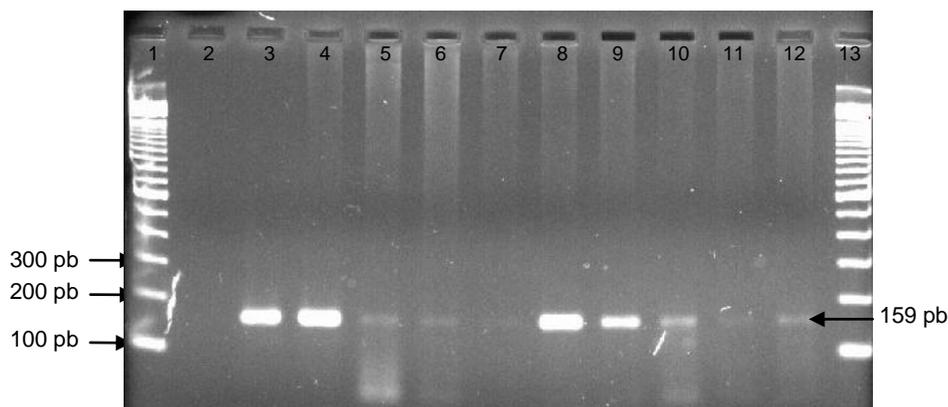


Figura 12. Fotografía de un de gel de agarosa al 2%, teñido con Bromuro de etidio (Br-E), se muestra en el carril 1 y 13 ladder de 100pb, carril 2 Control negativo (agua), carril 4-12 amplicones de muestras cloacales de tortugas cultivadas en agua peptonada.

Cuadro 13. Cuadro comparativo de los resultados positivos por ambas técnicas diagnósticas.

Especies de quelonios	Número de muestras positivas por técnica diagnóstica	
	Aislamiento	PCR
<i>T. scripta elegans</i>	7	11
<i>Kinosternon spp</i>	3	3
<i>G. sulcata</i>	1	1
<i>G. agassizi</i>	1	2
<i>M. temminckii</i>	1	1
<i>C. serpentina</i>	1	0
<i>C. picta bellied</i>	0	1
<i>G. carbonaria</i>	0	1
<i>C. scripta scripta</i>	0	2
<i>P. alabamensis</i>	0	1
	14	23

Cuadro 13. Se muestran las especies de quelonios y número de quelonios positivos a *Salmonella* por ambas pruebas diagnósticas y el número de ejemplares.

6.5 SUSCEPTIBILIDAD A QUIMIOTERAPÉUTICOS

Se obtuvieron los siguientes resultados de los análisis de susceptibilidad a los antimicrobianos, de 17 cepas, 11 fueron identificadas como *S. arizonae* y solamente a 9 se les realizó esta prueba así como a las 6 cepas identificadas como *Salmonella* spp. Todas las cepas (100%) fueron susceptibles a la cefuroxima, sulfas + trimetoprima, norfloxacino, gentamicina, kanamicina, carbenicilina, ceftiofur y al cloramfenicol.

En relación al ácido nalidíxico un aislamiento de *Salmonella* spp (16.6%) fue resistente, dos cepas (33.33%) fueron intermedias y tres (50%) cepas fueron sensibles. En el caso de *S. arizonae* dos cepas (22.22%) fueron resistentes, dos cepas (22.22%) fueron intermedias y cinco cepas (55.55%) fueron sensibles. En el caso de la cefoxitina una cepa (16.6%) de *Salmonella* spp fue resistente y cinco sensibles (83.3%); en cuanto a *S. arizonae* cuatro cepas (44.44%) fueron resistentes y cinco (55.55%) sensibles. **Cuadro 14.**

Cuadro 14. Distribución numérica y porcentual de la sensibilidad a quimioterapéuticos de las cepas de *Salmonella* spp. y *S. arizonae* aisladas de muestras cloacales de tortugas en cautiverio.

Nombre del antibiótico y concentración	Abreviatura	<i>Salmonella</i> spp. 6 cepas			<i>S. arizonae</i> 9 cepas		
		Resistente	Intermedia	Sensible	Resistente	Intermedia	Sensible
Ácido nalidíxico 30 µg	NA 30	1 16.6%	2 33.33%	3 50%	2 22.22%	2 22.22%	5 55.55%
Cefuroxima 30 µg	CXM 30	0	0	6 100%	0	0	9 100%
Sulfas trimetoprima 23.75 µg+1.25 µg	STX	0	0	6 100%	0	0	9 100%
Norfloxacino 10 µg	NOR 10	0	0	6 100%	0	0	9 100%

Gentamicina 10 µg	GM 10	0	0	6 100%	0	0	9 100%
Kanamicina 30 µg	K 30	0	0	6 100%	0	0	9 100%
Carbenicilina 100 µg	CB 100	0	0	6 100%	0	0	9 100%
Cloramfenicol 30 µg	C 30	0	0	6 100%	0	0	9
Cefoxitina 30 µg	FOX 30	1 16.6%	0	5 83.3%	4 44.44%	0	5 55.55%
Ceftiofur	XNL 30	0	0	6 100%	0	0	9 100%

6.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

6.6.1 VARIABLES ANALIZADAS

Con la selección aleatoria el número de muestras se redujo a 41.

El número total de muestras positivas obtenidas mediante la técnica de aislamiento de *Salmonella*, fue igual a 8, lo que equivale al 19.5% y la proporción de número de casos negativos por aislamiento fue de 33, esto es 80.5%.

Por el método de la PCR para el fragmento de *ompC*, 30 muestras fueron negativas, lo que equivale al 73.17% y 11 muestras fueron positivas que equivalen al 26.83%. La proporción de casos concordantes entre ambas pruebas es del 82.9%, lo que produce un índice Kappa $K= 0.524$ con una $p= 0.001$, por lo que se interpreta que, sí hay concordancia entre los resultados de ambas pruebas o que ambas pruebas producen el mismo diagnóstico.

La PCR para el fragmento de *invA* se eliminó del análisis estadístico ya que solamente se obtuvo una muestra positiva y no es significativa en términos estadísticos.

Como ya se mencionó, la población de estudio para fines estadísticos se redujo a 41 datos, donde se observó que el 17.1% (7) tenían una alimentación inadecuada, el 75.6% (31) no tenían un control de la temperatura, el 24.4% (10) eran juveniles y el 48.8% (20) carecían de un filtro. Al aplicar el modelo logístico para predecir el resultado de la prueba de aislamiento se obtuvo el cociente de verosimilitudes (CV), $CV=3.399$ con una $p=0.493$ lo cual significa que ninguna de las cuatro variables independientes es significativa. Análogamente el modelo logístico para predecir el resultado de la PCR arrojó un $CV=2.446$ con una $p=0.654$, interpretándose que no existe una relación entre detectar ADN de *Salmonella* en las tortugas, con alguna de las 4 variables analizadas que fueron temperatura, alimentación, tamaño del individuo y filtro.

VII. DISCUSIÓN

La presencia de *Salmonella* spp. en los reptiles, es un tema poco estudiado en México, los únicos reportes son los realizados por Rodríguez 1996²⁶ y Aguillón 2005⁴⁶, con ofidios en cautiverio como parte de una colección privada y reptiles en vida libre, respectivamente. La presente investigación aportó más información sobre el tema y además es la única realizada en México con quelonios mantenidos como animales de compañía.

En este trabajo se obtuvieron 81 muestras cloacales provenientes de tortugas mantenidas como mascotas, aislándose *Salmonella* en 14 quelonios, lo que equivale al 17.2%, estos datos confirman la presencia de *Salmonella* en las tortugas de este estudio, y no discrepan de lo ya reportado por otros investigadores en EUA, España y Canadá donde los porcentajes de aislamientos van de un 3 a un 15.4%.^{53,89-93} Dichas investigaciones se realizaron con tortugas en cautiverio de colecciones zoológicas, a diferencia de las muestreadas en este trabajo, pero es interesante contrastar que en EUA, Italia y Japón por ejemplo, donde se han hecho estudios sobre la presencia de *Salmonella* en reptiles en cautiverio como animales de compañía, han reportado que la frecuencia con que se aísla la bacteria es muy alta, donde de un 70 a 90% de los animales son portadores.^{16,55,77} Sin embargo; esta situación no es igual en todo el mundo, pues en cada país existen condiciones distintas que favorecen o no el desarrollo de esta problemática y también debe destacarse que los factores de alojamiento que proporcionan los propietarios a los animales varían fuertemente.

T. scripta elegans es la especie de quelonio más vendida en el mercado,^{48,63} en este muestreo se presentó como la de mayor moda (41 ejemplares). Esto sugiere que posiblemente entre los reptiles, también puede ser la más vendida en la ciudad de México y por consiguiente la más popular como

masкота. Así mismo, el 45.8% (11 individuos) de las muestras identificadas con *Salmonella*, se aislaron a partir de esta especie, lo cual se esperaba por una parte, por ser la especie más frecuente en el muestreo y porque así lo reportan varios autores.^{54,59-62,64,92,94}

La metodología utilizada para el diagnóstico de salmonelosis en animales domésticos está basada principalmente en el aislamiento y la identificación del microorganismo.⁷⁵⁻⁷⁷ Para los reptiles no es la excepción⁷⁵ y esas mismas técnicas fueron empleadas en esta investigación, logrando el objetivo de identificar *Salmonella* a partir de las muestras de los quelonios. El muestreo se realizó por medio de hisopo vía rectal, puesto que es la técnica más empleada ya que es sencillo de realizar por el manejo de los animales y su costo es mínimo.⁷⁷ Se sugiere que la colecta de las muestras se realice con mini hisopos de punta de algodón, los cuales por su tamaño resultaron ser menos invasivos para las tortugas pequeñas cuya cloaca tienen un diámetro reducido (2 a 5 mm), por lo cual se recomienda su utilización.

Se identificaron un total de once cepas como *S. arizonae*. Esta subespecie es la más aislada del género *Salmonella* en los reptiles desde que se reportaron por primera vez como portadores de la bacteria.⁵³ Aún y cuando esta subespecie tiene especificidad por el orden Reptilia y en estos animales generalmente no causa infecciones, el humano se ha visto afectado por el consumo de productos y subproductos derivados de reptiles.⁹⁶ Generalmente *S. arizonae* está involucrada en procesos infecciosos sistémicos afectando primordialmente a niños o personas inmunocomprometidas de cualquier edad, por ser más susceptibles a contraer infecciones, por lo que tener estos animales como compañía es un factor de riesgo para las personas con estas características.^{10,11,12,20,24,50,51,73,83,95-98} En el resto de la población las recomendaciones sobre las medidas higiénicas en el manejo de un reptil toman un papel crucial para evitar esta zoonosis.¹⁸

También se identificaron un total de seis cepas como *Salmonella* spp., éstas podrían corresponder a las serovariedades que afectan comúnmente a mamíferos y aves, colocando a las tortugas como una posible fuente de infección para el humano no considerada en México, pero sí en otros países donde se reportan casos de gastroenteritis e infecciones sistémicas por distintas serovariedades y subespecies de *Salmonella*.^{10,11,17,20,58,97} situando a los reptiles como un riesgo potencial de transmisión de la zoonosis.

Los estudios realizados para el aislamiento de *Salmonella* en los reptiles se hacen a partir de heces y cloaca principalmente.^{16,26,46,53,64,90,91} En nuestro caso, las muestras fueron principalmente de mucosa cloacal y en ocasiones de heces, ya que a pesar de estimular a los animales a defecar, la colecta de heces no siempre se logró, lo cual pudo haber reducido las posibilidades de obtener más aislamientos de la bacteria, sin embargo; en los estudios antes mencionados se logró el aislamiento de *Salmonella*, con muestras de hisopos cloacales y no especifican la recolección de heces necesariamente.^{26,46,53,90,91}

El caldo selenito, caldo Rappaport y caldo tetrionato son los medios de enriquecimiento más comúnmente usados para la recuperación y aislamiento de *Salmonella* de muestras clínicas.^{47,88} El caldo selenito y caldo Rappaport –Vassiliadis fueron los medios de enriquecimiento de elección en este trabajo, los cuales se incubaron por 18-24 h a 37 °C, donde a partir de caldo selenito se lograron los 17 aislamientos de *Salmonella*, a diferencia del Caldo RV, del cual no fue posible aislar cepa alguna, concordando con lo reportado por Onderka *et al.*,⁹³ y Ebani *et al.*, 2005⁴⁶ quienes no logran ningún aislamiento de *S. arizonae* a partir de tortugas con este mismo medio. Lo mismo cita Mitchel de Vassiliadis P, quien menciona que solamente pudo aislar cepas de la subespecie III en un

27% (3/11) de los casos,⁷⁵ tomando en consideración que hay medios que favorecen el crecimiento de ciertos serotipos, mientras que inhiben otros.

Cabe mencionar que en este trabajo a partir de caldo Rappaport-Vassiliadis tampoco se logró ningún amplificado por PCR. Al respecto se ha mencionado que este medio inhibe la PCR.¹⁰⁰

Pasmans^{90,91}, Ebani⁴⁷ y Nakadai¹⁶, han utilizado agua peptonada como medio de enriquecimiento en el aislamiento de *Salmonella* de reptiles, en esta investigación también se recurrió al agua peptonada como medio de preenriquecimiento tal como lo sugieren Thomason *et al.*, 1977¹⁰⁰ quienes emplearon agua peptonada como medio de preenriquecimiento para muestras ambientales y reportaron que con eso se incrementó la recuperación de *Salmonella* en aproximadamente un 25%, en comparación con caldo tetrionato y caldo lactosado.¹⁰⁰ Si bien no fue posible evaluar la eficiencia del agua peptonada en el aislamiento de *Salmonella*, sí fue el más efectivo en la identificación de los 23 casos positivos por PCR, tal como lo reportan Amavisit *et al.*,¹⁰¹ al utilizar el preenriquecimiento de muestras clínicas de heces de equino, con agua peptonada por 24 h a 37 °C. Sus resultados mencionan que si bien no se incrementó significativamente la detección de *Salmonella* en casos clínicos sí aumentó la detección en aquellas muestras previamente inoculadas con la bacteria.¹⁰¹

Para la identificación de *Salmonella* también se utilizan diversos medios de cultivo selectivos, para este estudio se empleó el agar Verde brillante y MacConkey; observándose que con el agar MacConkey se lograron todos los aislamientos de *Salmonella* (17) por lo que resultó ser el más efectivo tal como lo reporta Rodríguez con muestras de serpientes.²⁶

Generalmente, para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, se hace uso de pruebas pareadas.¹⁰⁰⁻¹⁰² En este trabajo se utilizaron la PCR, que es una prueba molecular y el cultivo

bacteriológico. Por PCR se demostró la presencia de *Salmonella* en un mayor número de muestras (23 positivos) comparado con el cultivo bacteriológico (17 identificaciones o cepas o 14 casos positivos). Es probable que aquellas muestras positivas por PCR en las que no se aisló *Salmonella*, las bacterias se encontraban en escasa cantidad⁷⁷ o los microorganismos ya no eran viables.

La capacidad de la PCR para detectar pequeñas cantidades de ADN por medio de síntesis de muchas copias de una secuencia específica a partir de una sola célula bacteriana que contiene el material genético,^{32,75} da a esta prueba una ventaja cuando las muestras son escasas en cantidad, o si el número de microorganismos en la muestra es muy pequeño, haciéndolo un método más sensible.^{75,79} Con la metodología empleada para la PCR, la cantidad mínima de ADN para detectar *Salmonella* spp. en cloaca y heces de quelonios, fue de 3.6 ng/mL (aproximadamente 857,143 células bacterianas)¹⁰³ para amplificar *invA* y 17 pg/ μ L (4,048 células bacterianas)¹⁰³ para amplificar *ompC*. Estos datos muestran una alta eficiencia en la identificación de *Salmonella* incluso en cantidades muy pequeñas, tal como lo revelan los trabajos de Amavisit *et al.*,¹⁰¹ y Stone *et al.*¹⁰²

Por los resultados arrojados, por medio de la PCR se pudieron confirmar como positivas las muestras en las que se aisló *Salmonella*, además por PCR se pudieron detectar más animales positivos a *Salmonella*, aun y cuando estadísticamente ambas pruebas produjeron el mismo diagnóstico. Se recomienda el uso de técnicas moleculares, que en diversos países son empleadas rutinariamente tanto en el diagnóstico de enfermedades de humanos como en medicina veterinaria para un gran número de agentes infecciosos.¹⁰⁴

El aislamiento permitió conocer que en las muestras se encontraba presente tanto *S. arizonae* como *Salmonella* spp., con el inconveniente de que los iniciadores empleados en la PCR solo identificaron

el género pero no la serovariedad.

A partir de la comparación de varios genomas de *Salmonella* spp., Puente *et al.*,²⁶ observaron que *ompC* es un gen que se encuentra altamente conservado en 11 serotipos de *Salmonella*, presentando un patrón polimórfico particular con cepas de *S. arizonae* aisladas de cápsulas de víbora de cascabel ²⁶. Kwang *et al.*,⁴⁴ demostró que el par de iniciadores diseñados por Puente *et al.*, que amplifican un fragmento de 159 pb del gen es un blanco útil para la detección específica de dicha bacteria, ya que pudo identificar 40 serovariedades de *Salmonella* incluyendo *S. arizonae* y los serotipos más frecuentes en animales domésticos y humanos, además de que no obtuvieron amplificadas en 24 géneros bacterianos distintos a *Salmonella*.⁴⁴ Esos mismos iniciadores, fueron empleados en esta investigación con una modificación en un par de nucleótidos, con los cuales se obtuvieron 22 amplicones (27%) de las 81 muestras, de las cuales 12 se identificaron como *Salmonella* por cultivo bacteriológico.

Por otro lado Rahn *et al.*,⁴³ utilizaron otra región del gen *invA* con la que amplifican un fragmento de 284 pb, el cual demuestra ser específico de *Salmonella* al identificar 630 cepas que comprenden 100 serovariedades, en su mayoría correspondientes a la subespecie I (enterica) y como controles negativos utilizaron 142 cepas de 20 géneros bacterianos diferentes a *Salmonella* en los cuales no obtuvieron ningún amplificado; cabe mencionar que *S. arizonae* no fue incluida en este estudio, no obstante, Galán *et.al.*, demostró en otra investigación una alteración e incluso la ausencia de algunos genes dentro del operón *inv* en *S. arizonae*;³⁸ debido a esto pudiera haber una relación con nuestros resultados al solamente obtener un amplicón para *invA*, dado que *S. arizonae* fue la cepa más frecuentemente aislada.

La inconsistencia con la que la bacteria es excretada, provoca dificultades en el aislamiento del microorganismo. Chiodini⁵⁵ ha demostrado variaciones en un mismo reptil, colectando sus heces diariamente y realizando pruebas bacteriológicas con resultados diferentes, detectando *Salmonella* en algunos días y en otros no.⁵⁵ Existen diversos factores que pueden causar estrés en las tortugas como el transporte, periodos largos de inanición, la falta de exposición al sol, cambio de alojamiento ó instalaciones no adecuadas, deshidratación, dolor, alteraciones en la dieta o una dieta desbalanceada, cambios de temperatura por arriba o debajo de la óptima y mala calidad del agua, los cuales son predisponentes e influyen en la eliminación de *Salmonella* por los reptiles.^{62,94,97} Esto se debe a que el funcionamiento de su sistema inmune es dependiente de la temperatura ambiental y al no estar el animal en su temperatura de confort, la respuesta no es adecuada.^{59,66,67} Por estos antecedentes, al momento de la toma de la muestra, también se recopilaron datos sobre las condiciones ambientales o de alojamiento bajo las cuales mantenían a las tortugas y así poder establecer una relación de esas variables con la posibilidad de detectar *Salmonella*.

En los setentas, como se mencionó, se consideraba que las tortugas cuya longitud del caparazón fuera menor a los 10.2 cm representaban las de mayor riesgo en de transmitir la salmonelosis⁵⁵ porque en un estudio previo comprobaron un mayor número de bacterias excretadas en heces de tortugas de ese tamaño o menor, esto podría deberse a algo similar como sucede en los mamíferos y aves, los animales jóvenes aún no tienen bien desarrollado su sistema de defensa y es un periodo crítico de cambios principalmente en la alimentación.⁷⁴ Se obtuvieron un total de 24 muestras positivas, de las cuales el 16.6% (4) eran juveniles y el 83.33% (20) eran adultas.

Los resultados en este estudio arrojaron en apariencia, que la población de tortugas adultas fue en la que más estuvo presente la bacteria, ya que, de las 14 tortugas positivas al aislamiento, 4 eran

juveniles (28.6%) y 10 eran adultas (71.4%). Por otro lado, a través de la PCR los resultados mostraron un patrón muy similar, donde de 23 positivos, 4 (17.4%) eran juveniles y 18 (78.3%) eran adultas.

Sin embargo, desde otro punto de vista, el número de positivos en relación al tamaño de la muestra, los resultados revelan que, como lo menciona la literatura, es más factible aislar *Salmonella* en tortugas juveniles que en adultas dado que de 63 animales adultos el 31.7% (20) fueron positivos y de 18 quelonios juveniles, el 22.22% (4) fue positivo, interpretándose que en relación al tamaño de la muestra, *Salmonella* fue aislada en su mayoría a partir de ejemplares juveniles .

Sin embargo, en este estudio se demostró que el tamaño de los animales no fue un factor que influyera en la detección de *Salmonella* en las tortugas contrastando con lo reportado en la literatura.¹⁰ Probablemente ésto se debe a que la mayoría de las muestras provenía de tortugas adultas o quizá los animales se encontraban bajo condiciones no estresantes.

La temperatura es uno de los factores que más influyen en la eliminación de *Salmonella*, como los reptiles son ectotermos, su metabolismo y su sistema inmune son dependientes de la temperatura ambiental;^{59,66,87} el intervalo de temperatura ambiental recomendada que abarca todas las especies incluidas en este estudio, oscila entre los 20 a 27 °C. Pasmans *et. al.*, demostraron que a 30 °C la adherencia de *S. Muenchen* a la capa de moco del epitelio del íleon de *T. scripta scripta* es mayor que a 37 °C. Se podría inferir que la producción de moco abundante en el intestino de las tortugas evita que la mayor cantidad de células bacterianas entren en contacto directo con el epitelio intestinal y es probable que sea removido constantemente por la descamación y el peristaltismo, promoviendo la eliminación constante de la bacteria, lo que modera la colonización tanto en el

intestino como su diseminación a otros tejidos.⁶⁹

Así mismo, Duponte *et al.*,⁶² observaron mayor eliminación de *Salmonella* por tortugas a las que sometían a cambios de temperatura por abajo o arriba de su temperatura óptima preferida. Por el contrario Pasmans *et al.*,⁷² demostraron que aquellas tortugas inoculadas con *S. Muenchen* por vía oral y mantenidas a una temperatura de 26 °C, eliminan *Salmonella* en menor cantidad que las mantenidas a 37 °C, quizá porque su sistema inmune no permite el desarrollo de una infección.⁷² De acuerdo a los datos recabados en el presente trabajo, el 78.6% (11) de tortugas positivas a *Salmonella* por aislamiento y el 78.2% (18) por PCR, carecían de calentadores que proporcionaran temperaturas cálidas en el agua y no contaban con termómetros para medir la temperatura del agua, lo que indica variaciones en la temperatura por cambios ambientales en los alojamientos tanto acuáticos como en terrarios, que no pudieron ser observados por los propietarios al no contar con termómetro.

Sin embargo, considerando los ajustes realizados para aplicar el modelo logístico, los datos de la población mostraron que la temperatura ambiental no fue un factor que influyera en la detección de *Salmonella* en los quelonios analizados en este estudio, esto se puede deber a que las fluctuaciones de temperatura en el agua de las peceras o estanques sí se encontraba dentro del POTZ de los quelonios o no eran fluctuaciones de temperaturas drásticas que les causaran estrés, aunque eso no fue posible registrarlo, quizá el ambiente dentro del cual se encontraba la pecera o el acuario era cálido y por lo mismo la temperatura del agua se mantenía de la misma forma.

Los datos del estudio mostraron que 75% de los aislamientos y 50% de identificación por PCR de *Salmonella* provenían de tortugas acuáticas que no tenían filtro en el estanque o pecera, aun y con los ajustes aplicados para realizar el análisis estadístico, aunque el porcentaje es alto el análisis

estadístico mostró que no existía relación entre la variable filtro y el aislamiento o detección por PCR de *Salmonella*, por lo tanto la carencia de un filtro que mantenga el agua limpia libre de detritus, no aumentó la posibilidad de detectar *Salmonella*, por ninguna de las técnicas diagnósticas empleadas. El resto de tortugas de las que también se identificó *Salmonella* correspondían a tortugas terrestres.

La mayor parte de las tortugas en las que se demostró la presencia de *Salmonella* por PCR y por aislamiento, tenían la dieta correspondiente a su especie según la literatura.^{48,87} Esto difiere con lo reportado por Duponte *et al.*,⁶² quienes planteaban que el estrés ocasionado por cambios repentinos en la alimentación o una alimentación inadecuada, según los requerimientos nutricionales, predispone a la excreción del microorganismo.⁶² En este trabajo no se detectó esta relación, probablemente porque su efecto es menor, mientras las condiciones ambientales sean de confort para el animal.

En ninguna de las investigaciones sobre *Salmonella* en reptiles hechas en el país, se ha incluido un estudio de la susceptibilidad a antibióticos de las cepas de *Salmonella* aisladas, este es el primer trabajo que aporta información al respecto. Los antibióticos utilizados en las pruebas de sensibilidad fueron con base en ser antibióticos recomendados en la práctica clínica en los reptiles^{79,105} y porque son propuestos por la CDC como tratamiento para salmonelosis en humanos.⁸ Las cepas resultaron ser sensibles a la mayoría de los antibióticos probados, en contraste con otros autores en estudios hechos en reptiles.^{47,81} Esto sugiere que aún no existe una fuerte presión selectiva en las cepas de *Salmonella* presentes en las poblaciones de tortugas de este estudio, lo cual es una ventaja en la selección de un tratamiento en caso de presentarse una infección clínica tanto en reptiles como en humanos. Sin embargo, estos resultados no se deben considerar como recomendaciones en la selección de antibióticos para un tratamiento. En cuanto a la resistencia presentada por algunas

cepas de *Salmonella* aisladas en este estudio (hacia el ácido nalidixico y la cefoxitima), no se considera relevante para el tratamiento, debido a que si bien éstos antibióticos forman parte de dos de los grupos de antibióticos de elección (fluoroquinolonas y cefalosporinas de 3ra generación, respectivamente), recomendados contra las salmonelosis en humanos a nivel mundial,¹⁰⁶ no son los de primera elección contra las salmonelosis en México. Una forma de evitar la presión selectiva sobre cepas resistentes que pudieran ser transmitidas de las tortugas al humano sería el control sobre el uso de antibióticos de manera indiscriminada en los quelonios que no presenten signos de salmonelosis o alguna otra enfermedad bacteriana, seguir una adecuada antibioterapia en el caso de ser indicada y sobre todo, llevar a cabo buenas prácticas de higiene pues son un factor importante en la prevención de la salmonelosis transmitida por un quelonio.^{106,107}

Relacionado al tema de la salmonelosis transmitida al humano por quelonios, es importante mencionar que según los datos proporcionados por los propietarios en la encuesta, ninguno de ellos o de las personas que convivían con dichos animales, mostraron signología gastroentérica previa, ni durante el estudio. Así mismo, tampoco los animales presentaron signología alguna. Solamente 5 de los quelonios estuvieron expuestos a una tortuga que murió de salmonelosis (según resultados de estudios histopatológicos no mostrados), de las cuales, una resultó positiva a *Salmonella* spp. por la técnica de PCR y a *S. arizonae* por aislamiento en cultivo puro, aun que no presentó signos de salmonelosis y por lo que estas tortugas pueden comportarse como portadores asintomáticos.

Con esto no se propone descartar a las tortugas como un factor de riesgo potencial de salud pública sino, destacar que el cuidado en el manejo de los reptiles, enfocado primordialmente a la higiene representa la mejor forma de prevención.¹⁸ Aun que no se logró identificar serovariedades que pudieran estar involucradas como causantes de enfermedad gastrointestinal en el humano, sí se

identificó *S. arizonae*, la cual se ha aislado de pacientes con signología de fiebre, artritis y meningoencefalitis a partir de sitios anatómicos diferentes al TGI, donde se ha observado ser un patógeno oportunista en aquellas personas inmunocomprometidas, ancianos y niños que son considerados como los más susceptibles.¹²

Se identificaron otras bacterias que podrían considerarse de riesgo como: *Proteus* spp, *Yersinia* spp, *Pseudomonas* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp. lo cual coincide con lo mencionado en la literatura sobre microbiota en el orden Chelonia^{77,79,108} y con estudios realizados en México con fauna silvestre (tortugas) en vida libre.⁴⁶ Los microorganismos más comúnmente aislados de tracto gastrointestinal de reptiles son bacterias Gram negativas que normalmente no causan enfermedades, por lo que se consideran comensales del TGI.^{58,68,76,79,108} Sin embargo; algunos de estos pueden comportarse como patógenos oportunistas,^{79,108} esto quiere decir que bajo circunstancias en las cuales se compromete el sistema inmunológico del animal, por debilidad, temperaturas no óptimas, estrés por un cambio de alimentación, alojamiento, transporte, pobres condiciones de higiene, alimentación inapropiada o séptica, pueden presentar infecciones que podrían llegar a septicemia.^{79,108} El aislamiento de *Yersinia* spp, fue un hallazgo inesperado, pues principalmente se aísla de cavidad oral, no cloacal. Esta puede ser una bacteria de estudio de relevancia como zoonosis.^{79,108}

Como resultado de la información obtenida en esta investigación, se sugiere que en México se implemente una normatividad que obligue la realización y aplicación de pruebas diagnósticas en criaderos nacionales y establecimientos dedicados a la comercialización e importación de tortugas como animales de compañía. Así también en promover un adecuado manejo de los animales y educación en la población en general sobre el riesgo de esta zoonosis.

VIII. CONCLUSIONES

- El presente trabajo es el primer reporte en México donde fue posible detectar *Salmonella* en tortugas sanas.
- Se favorece la detección de *Salmonella* en los quelonios al emplear dos pruebas diagnósticas en conjunto como son PCR y aislamiento.
- Las cepas aisladas fueron susceptibles a sulfas y cloranfenicol que son antibióticos de primera elección para el tratamiento de las salmonelosis en salud pública en México, por lo que se sugiere que si estas cepas se transmitieran al humano no representarían un problema por antibioterapia fallida.
- La excreción de *Salmonella* por cloaca en las tortugas no mostró una relación significativa con la temperatura, el tamaño del animal, la utilización de filtro o la alimentación.

ANEXO 1 CUESTIONARIO A LOS PROPIETARIOS

1. ¿Cuántos reptiles tiene en casa y que especies de reptiles son, edad y sexo? ¿Cómo lo adquirió?
En caso de ser varios, preguntar si se alojan en el mismo lugar, o qué especies sí aloja en el mismo espacio, o condiciones para cada uno.

Características del alojamiento:

Tamaño: Altura Ancho Largo Profundidad

Material:

Material del sustrato o cama:

Accesorios:

Frecuencia y con qué limpia el alojamiento y accesorios:

Temperatura: Día ___°C Noche ___°C

Cuenta con: Termómetro Filtro Higrómetro Calentador Zona seca

Fuente de luz: Solar Lámpara de rayos UV Foco

Cuánto tiempo la expone y con qué frecuencia

2. ¿Cuántas personas habitan en su casa?
3. ¿Quiénes tienen contacto con el o los reptiles?
4. ¿Que edad tienen las personas que tienen contacto con el o los reptiles?
5. ¿Desde hace cuanto tiempo tiene al reptil?
6. ¿En qué lugar de la casa habita(n) su(s) reptil(es), tiene(n) su propio espacio, sus propios trastes para comer?
7. ¿Tipo de alimento que le proporciona a su reptil? En caso de dar comida, frutas o verduras, donde prepara el alimento para el reptil?, ¿lo desinfecta? En caso de ser alimento vivo, donde lo adquiere y que manejo le da?
8. ¿De dónde obtiene el agua de la pecera o que le da de tomar al reptil, dónde la desecha cuando ya está sucia?
9. ¿Cómo es el manejo del reptil, se lava ud. las manos antes y después de tocarlo o tocar cualquier superficie que tenga contacto con el reptil?
10. ¿Le han dado antibióticos en alguna ocasión a su reptil? Y ¿recientemente?, (aquí se dirige la pregunta con la finalidad de que por lo menos tuvieran 15 días sin antibiótico)
11. ¿Cuál fue el motivo por el cual su reptil tuvo que ser tratado con antibioterapia? (pregunta dirigida para saber si en alguna ocasión le diagnosticaron salmonelosis)
12. ¿Su reptil ha presentado signos como diarrea, debilidad, inapetencia? (cuándo o importante si fue recientemente)
13. ¿Ud se ha enfermado o presentado signos clínicos compatibles con gastroenteritis o dolores de cabeza, articulaciones, o algún otro signo que quiera comentar desde que tiene a su reptil?
14. ¿Le dieron antibióticos como tratamiento?, ¿Cuáles?
15. ¿Hay más animales en casa?
16. ¿Estas mascotas han presentado diarrea, inapetencia, debilidad, vómitos, baja de peso? (algún otro signo que el propietario quiera comentar)
17. ¿Llevó a su mascota al veterinario, diagnosticaron a su mascota con alguna enfermedad gastrointestinal?

ANEXO 2. MEDIOS DE CULTIVO

Agar MacConkey

Agar MacConkey	50 g
Agua destilada	1000 mL

Disolver 50 g de Agar MacConkey por cada litro de agua destilada. Esterilizar por autoclave 15 min, 15lb, 121°C.

Agar Verde brillante

Agar Verde brillante	50 g
Agua destilada	1000 mL

Disolver 58 g de Agar MacConkey por cada litro de agua destilada. Esterilizar por autoclave 15 min, 15lb, 121°C.

Agar de soya tripticaseína

Agar de soya tripticaseína	40 g
Agua destilada	1000 mL

Suspender 40 g del medio en un litro de agua destilada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos.

Caldo selenito

Caldo selenito	23 g
Agua destilada	1000 mL

Disolver 23 g del polvo en un litro de agua destilada.

Mezclar bien y calentar ligeramente hasta su disolución completa. Evite el calentamiento excesivo. No esterilizar en autoclave.

Caldo Rappaport-Vassidialis

Caldo Rappaport-Vassidialis	26.6 g
Agua destilada	1000 mL

Disolver 26.6 g de Caldo Rappaport-Vassidialis por cada litro de agua destilada. Esterilizar por autoclave por 15 min, a 10lb a 116 °C.

Agua peptonada

Peptona de caseína	25g
NaCl	5 g
Agua destilada	1000mL

Disolver los componentes en agua destilada cbp la cantidad necesaria a preparar.

Agar Muller-Hinton

Agar Mueller Hinton	38 g
---------------------	------

Suspender 38 g del polvo en 1 L de agua destilada. Mezclar vigorosamente y calentar la solución dejando hervir por 1 min hasta la disolución completa del polvo. Autoclavear a 121 °C por 15 minutos, 15 lb. Evitar sobrecalentar.

ANEXO 3. SOLUCIONES

Solución Tris pH 8.0

Tris HCl 1M 121.14 g/L

Pesar el Tris HCl y disolver en la mitad de agua destilada a preparar de solución, mezclar y medir pH a 8.0, ajustando con HCl, aforar a la cantidad necesaria.

Solución EDTA pH 8.0

EDTA 0.5M 372.24 g/L

Pesar el EDTA y disolver en la mitad de agua destilada a preparar de solución, mezclar y medir pH a 8.0, ajustando con NaOH, aforar a la cantidad necesaria.

Solución Acetato de sodio pH 6.0

Acetato de amonio 3M 136.08 g/L

Pesar el Acetato de sodio y disolver en la mitad de agua destilada a preparar de solución, mezclar y medir pH a 6.0, ajustando con ácido acético, aforar a la cantidad necesaria.

Solución TAE

Solución 50X, pH 8.5:

Tris base	242 g
Ácido acético glacial	57.1 mL
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	37.2 g

Aforar con agua desionizada a 1 L

Solución de trabajo 1X

Tris acetato	40mM
EDTA pH 8.0	1mM

Solución de lisis

Sarcosyl	5%
EDTA pH 8.0	25mM
Proteinasa K	50 Mg/mL.

La Proteinasa K es un polvo blanco a una concentración de 100 mg, como solución stock se prepara a una concentración de 20 mg/mL y se almacena a -20°C. Se diluye en 50mM Tris pH (PM 158. 17g) 8.0, 1.5mM de acetato de calcio.

Cloroformo alcohol isoamílico (V/V)

Cloroformo 24mL
Alcohol isoamílico 1mL

Fenol/Cloroformo alcohol isoamílico (V/V)

Fenol 25 mL
Cloroformo 24 mL
Alcohol isoamílico 1 mL

CTAB/NaCl 10% P/V en 0.7M NaCl

Disolver 4.1g de NaCl en 80 mL de agua desionizada, lentamente agregar 10 g de CTAB, calentando a 55°C. Ajustar el volumen final a la cantidad deseada. Almacenar a 15°C para evitar que el CTAB se precipite.

Solución TE (Tris/EDTA) (10:1) solución de trabajo 1X

10mM Tris Cl pH 7.4, 7.5 u 8

1mM EDTA pH 8.0

Se esteriliza por autoclave

SDS 10% (lauryl sulfato)

Según la cantidad a preparar, disolver en agua desionizada para ajustar a una dilución de 10%, se esteriliza por autoclave.

NaCl 5M

Peso molecular del NaCl 58.4 g. Disolver 292g por cada 1000 mL de agua desionizada, esterilizar por autoclave.

Etanol frío 70%

Por cada Litro, 70 ml de etanol puro y 30 ml de agua desionizada. Congelar a -20°C.

REFERENCIAS

Sambrook J, Fritsh EF, Maniatis T. Molecular Cloning a Laboratory Manual, 2nd ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Merk. Manual de Medios de Cultivo. Darmstadt, Alemania. 1994.

REFERENCIAS

1. World Health Organization.int [home page on the internet]. updated 2007. Disponible en URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/2007>
2. Calva E. *Salmonella typhi* y la fiebre tifoidea: de la biología molecular a la salud pública. Martínez RE, Martínez RJC, editores. Microbios en línea [Data base on the internet]. UNAM. Disponible en URL: http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_07/
3. Servicio de Vigilancia de Zoonosis de Transmisión Alimentaria y Resistencia a Antimicrobianos Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) Universidad Complutense [home page on the internet] Domínguez L, Porrero M^aC, Téllez S. Seguridad alimentaria y alimentación Weblog gestionado por el programa Vigilancia Sanitaria. Disponible en URL: <http://weblogs.madrimasd.org/alimentacion/archive/2007/05/31/66792.aspx>
4. Gyles CL, Prescott JF. Themes in bacterial pathogenic mechanisms. In: Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO, editors. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 3rd ed. USA:Blackwell Publishing, 2004:3-12.
5. Grimont PAD, Weill FX. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. Disponible en: http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/salmoms/WKLM_2007.pdf
6. World Health Organization.int [home page on the internet] updated 2005. Disponible en URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/2005>
7. Turnbull. Información estadística sobre enfermedades transmitidas por los alimentos en Europa peligros microbiológicos y químicos. Documento de la conferencia Información estadística sobre enfermedades transmitidas por los alimentos en Europa peligros microbiológicos y químicos; 1979.
8. World Health Organization.int [home page on the internet] updated 2007. Disponible en URL: <http://www.who.int/topics/salmonella/en/>
9. Libby SJ, Halsey TA, Altier C, Potter J, Gyles CL. Salmonella. In: Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO, editors. Pathogenesis of bacterial infections in animals. USA:Blackwell Publishing, 2004:143-168.
10. Lamm SH, Taylor A, Gangarosa EJ, Anderson HW, Young W, Clark MH *et al.* Turtle associated salmonellosis I. An estimation of the magnitude of the problem in the United States, 1970-1971. Am J Epidemiol 1972;95:511-517.
11. Altman R, Gorman JC, Bernhardt LI, Goldfield M. Turtle associated salmonellosis II. The relationship of pet turtles to salmonellosis in children in New Jersey. Am J Epidemiol 1972;95:518-520.

12. De Jong B, Andersson Y, Ekdahl K. Effect of Regulation and Education on Reptile-associated salmonellosis, Emerging Infectious Diseases, Disponible en URL: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5626a1.htm>
13. Gutiérrez CL, Montiel VE, Aguilera PP, González AM. Serotipos de Salmonella identificados en los servicios de salud pública. Salud Pública de México 2000;42:490-495.
14. Hirsh DC. Enterobacteriaceae: *Salmonella*. In: Hirsh DC, MacLachlan NJ, Walker RC, editors. Veterinary Microbiology. USA:Blackwell Publishing, 2004:69-74.
15. Smith EK, Salman MD, Wimsatt J. Survey of clinical veterinarian perceptions of the potential for growth in exotic animal practice. J Am Vet Med Assoc 1998;212:49-52.
16. Nakadai A, Kuroki T, Kato Y, Suzuki R, Yamai S, Yaginuma C *et al.* Prevalence of *Salmonella* spp. in pet reptiles in Japan. J Vet Med Sci 2005;67:97-101.
17. Woodward D, Khakhria R, Johnson W. Human salmonellosis associated with exotic pets. J Clin Microbiol 1997;35:2786-2790.
18. Turtles as pets [www.CDC.gov]. U.S. Centers for Disease Control and Prevention, gov.; [no date]. Disponible en URL: http://www.cdc.gov/healthypets/spotlight_an_turtles.htm
19. Austin CC, Wilkins MJ. Reptile-associated salmonellosis. J Am Vet Med Assoc 1998;212: 866-877.
20. Mermin J, Hutwagner L, Vugia D, Shallow S, Daily P, Bender J, *et al.* Reptiles, Amphibians, and Human salmonella infection: a population-based, case-control study. Clin Infect Dis 2004;38 Suppl 3:S253-61.
21. U. S. Pet Ownership & Demographics Sourcebook [market research statistics]. (U.S.): American Veterinary Medical Association. [cited 2005 January 28]. Disponible en URL: <http://www.avma.org/reference/marketstats/ownership.asp>
22. Lumeij JT, Endenburg N, Luyten BR. The percentage of feline, canine, avian and exotic animal consultations in veterinary practice in The Netherlands in 1994 and suggested consequences for the veterinary curriculum and residency programs. Vet Q 1998;20:35-7.
23. Sánchez MGD, Perpiñán HD. Ética y legislación. En: Aguilar RF, Hernández DS, Hernández DS, editores. Atlas de medicina, terapéutica y patología de animales exóticos. Buenos Aires: Intermédica, 2005:17-26.
24. D'Aoust JY, Lior H. Pet turtle regulations and abatement of human salmonellosis. Can J Public Health 1978;69:107-108.
25. Newman LT. *Salmonella* in tortoises. Br Med J 1967;4:296-297.

26. Rodriguez MO. 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* (tesis de licenciatura). Distrito Federal (México) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UNAM, 1996.
27. Mitchel MA, Shane SM. Salmonella in reptiles. *Seminars in Avian and Exotic Pet Med* 2001;10:25-35.
28. Edwards PR, Fife MA, Ramsey CH. Studies on the arizona group of Enterobacteriaceae. *Bacteriol Rev* 1959;23:155-174.
29. Harvey RWS, Price TH. Salmonella isolation from reptilian faeces: A discussion of appropriate cultural techniques. *J Hyg Camb* 1983;91:25-32.
30. Bearson BL, Wilson L, Foster JW. A Low pH-Inducible, PhoPQ-Dependent Acid Tolerance Response Protects *Salmonella typhimurium* against Inorganic Acid Stress. *J Bacteriol* 1998;180:2409-2417.
31. Jepson MA, Clark MA. The role of M cells in *Salmonella* infection. *Microbes and Infection* 2001;3:1183-1190.
32. Finlay BB, Falkow S. *Salmonella* as an intracellular parasite MicroReview. *Mol Microbiol* 1989;3:1833-1841.
33. Galán J. Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. *Mol Microbiol* 1996;20:263-271.
34. Galán JE, Curtis R. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella* Typhimurium to penetrate tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci* 1989;86:6383-6387.
35. Galán JE. *Salmonella* interactions with host cells: type III secretion at work. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:53-86.
36. Galán JE, Ginocchio C, Costeas P. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasión gene *invA* homology of InvA to members of a new protein family. *J Bacteriol* 1992;174:4338-4349.
37. Ginocchio CC, Galán JE. Functional conservation among members of the *Salmonella typhimurium* InvA family of proteins. *Infect Immun* 1995;63:729-732.
38. Galán JE, Curtis R. Distribution of the *invA*, -B, -C, and -D Genes of *Salmonella typhimurium* among Other *Salmonella* Serovars: *invA* Mutants of *Salmonella typhi* Are Deficient for Entry into Mammalian Cells. *Infection and Immunity* 1991;59:2901-2908.

39. Galán J, Collmer E. Type III Secretion Machines: Bacterial Devices for Protein Delivery into Host Cells. *Science* 1999;284:1322-1328
40. Kubori T, Sukhan A, Aizawa SI, Galán JE. Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Proc Acad Sci.* 2000;97:10225-10230.
41. Kubori T *et al.* *Science* 1998;280:602-605.
42. Nikaido H. Outer membrane. In: Neidhardt FC, editor in chief. *E. coli and Salmonella cellular and molecular biology.* 2nd edition Vol 1. USA:ASM Press, 1996:29-47.
43. Rahn K, De Grandis SA, Clarke RC, McEwen SA, Galán JE, Ginocchio C, Curtiss R 3rd, Gyles CL. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of Salmonella. *Mol Cell Probes* 1992;6:271-279.
44. Kwang J, Littledike ET, Kee JE. Use of the polymerase chain reaction for *Salmonella* detection. *Lett Appl Microbiol* 1996;22:46-51.
45. Herrera LS, Saco M, Martínez SA, Silveira L, Echeita A, Usera MA. Molecular characterization of a new serovar of *Salmonella bongori* 13, 22: z₃₉: isolated from a lizard. *Research Microbiol* 2005;156:597-602.
46. Aguillón GD, Villareal DL, Ramírez RR, Aguirre RA, Zárate RJ, Wong GA. Bacterias cloacales y evaluación física de la herpetofauna del Parque Ecológico Chipinque. *CIENCIA UANL* 2007;10:168-174.
47. Ebani VV, Cerri D, Fratini F, Meille N, Valentini P, Andreani E. *Salmonella enterica* isolates from faeces of domestic reptiles and a study of their antimicrobial *in vitro* sensitivity. *Res Vet Sci* 2005;78:117-121.
48. Melissa Kaplan's Herp Care Collection: [Last updated 2005 March 21]. Available from: <http://www.anapsid.org/reslider.html>
49. Galindo BMA. Análisis de las enfermedades más comunes de los reptiles en cautiverio, según los casos de consulta externa del laboratorio de herpetología de la FES-Iztacala-UNAM. Memorias del XXII Simposio sobre Fauna Silvestre; 2005 octubre 25-27; Distrito Federal (DF) México. CD-ROM.
50. Kraus A, Guerra BG, Alarcón SD. *Salmonella arizona* arthritis and septicemia associated with rattlesnake ingestion by patients with connective tissue diseases. A dangerous complication of folk medicine. *J Rheumatol* 1991;18:1328-1331.

51. Márquez DG, Martínez BC, Suárez RI. Desiccated rattlesnake capsules: a potential source of gram-negative bacterial infection. *Rev Invest Clin* 1991;43:315-317.
52. Sistema Unico de información para la Vigilancia Epidemiologica [Boletín de Vigilancia Epidemiologica Casos por entidad federativa de Enfermedades infecciosas y parasitarias del Aparato Digestivo hasta la semana epidemiologica 51 del 2010]. Mexico (DF): Direccion General de Epidemiologia. [2009 sem 52 cua4.pdf]. Disponible en: <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2010/2010/sem51.pdf>
53. McNeil E, Hinshaw WR. Salmonella from Galapagos turtles, a gila monster and a Iguana. *Am J Vet Res* 1946;7:62-63.
54. Kaufmann AF, Morrison ZL. An epidemiology study of salmonellosis in turtles. *Am J Epidemiol* 1966;84:364-670.
55. Chiodini RJ, Sundberg JP. Salmonellosis in reptiles: a Review. *Am J Epidemiol* 1981;113:494-500.
56. Briones V, Téllez S, Goyache J, Ballesteros C, Lanzarot M, Domínguez L *et al.* Brief report *Salmonella* diversity associated with wild reptiles and amphibians in Spain. *Environ Microbiol* 2004;6:868-871.
57. Schröter M, Roggentin P, Hofmann J, Speicher A, Laufs R, Mack D. Pet snakes as a reservoir for *Salmonella enterica subsp. diarizonae* (serogroup III b): a prospective study. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:613-615.
58. Johnson-Delaney CA. Reptiles zoonoses and threats to public health. In: Mader D, editor. *Reptile Medicine*. USA:Saunders, 2006:1017-1030.
59. Wells G, MacConnell CG, Morris KG. Evaluation of methods for isolating *Salmonella* and *Arizona* organisms from pet turtles. *Appl Microbiol* 1974;27:8-10.
60. Siebeling RJ, Neal PM, Granberry WD. Evaluation of methods for the isolation of *Salmonella* and *Arizona* organisms from pet turtles treated with antimicrobial agents. *Appl Microbiol* 1975;29:240-245.
61. Siebeling RJ, Caruso D, Neuman S. Eradication of *Salmonella* and *Arizona* Species from Turtle Hatchlings Produced from Eggs Treated on Commercial Turtle Farms. *Appl Environ Microbiol* 1984;47:658-662.
62. DuPonte M, Nakamura R, Chang EML. Activation of latent *Salmonella* and *Arizona* organisms by dehydration in red-eared turtles, *Pseudemys scripta-elegans*. *Am J Vet Res* 1978;39:529-530.

63. Kaufmann AF, Fox MD, Morris JK, Wood BT, Feeley JC, Frix MK. Turtle associated salmonellosis III. The effects of environmental salmonellae in commercial turtle breeding ponds. *Am J Epidemiol* 1972;95:521-528.
64. Kaufmann AF, Feeley JC, DeWitt WE. *Salmonella* excretion by turtles. *Pub health Rep* 1967;82:840-842.
65. Bäumler AJ, Tsolis RM, Ficht TA, Adams LG. Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. *Infect Immun* 1998;66:4579-4587.
66. Origi FC. Reptile immunology. In: Jacobson ER, editor. *Infectious diseases and pathology of reptiles Color Atlas and Text*. USA:CRC Press, 2007:131-166.
67. Broom DM, Kirkden RD. Welfare, stress, behavior, and pathophysiology. In Dunlop RH, Malbert CH, editors. *Veterinary pathophysiology*. USA:Blackwell Publishing, 2004:337-369.
68. Johnson Delaney CA. Reptile zoonoses and threats to public health. In: Mader DR, editor. *Reptile medicine and surgery*. 2nd ed. Canada:WB Saunders, 1996:20-32.
69. Pasmans F, Van Immerseel F, Van den Broeck W, Bottreau E, Velge P, Ducatelle R, Haesebrouck F. Interactions of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Muenchen with intestinal explants of the turtle *Trachemys scripta scripta*. *J Comp Path* 2003;128:119-126.
70. Chiodini R. Transovarian passage, visceral distribution and pathogenicity of *Salmonella* in snakes. *Infect Immun* 1982;36:710-713.
71. Ketz Riley CJ. Salmonellosis and Shigellosis. En: Fowler, Miller, editors. *Zoo and Wild Animal Medicine*. 5th ed. London:Saunders, 2003:686-689.
72. Pasmans F, De Herat P, Dewulf J, Haesebrouck F. Pathogenesis of infections with *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Muenchen in the turtle *Trachemys scripta scripta*. *Vet Microbiol* 2002;87:315-325.
73. Varga M. Reptiles maintenance and welfare. In: Girling SJ, Raiti P, editors. *BSAVA Manual of reptiles*. 2nd ed. Wareham:Fusion Desing British small animal veterinary association 2004: 6-17.
74. Wright K. Beyond POTZ: Environmental influences on reptile healing. *Exotic* 2005;7:11-15.
75. Mitchell MA. *Salmonella*: Diagnostic methods for reptiles. In: Mader D, editor. *Reptile Medicine and Surgery*. Canada:Saunders Elsevier, 2006:900-905.
76. Cooper JE. Reptilian Microbiology. In Fudge AM, editor. *Laboratory Medicine Avian and Exotic Pets*. USA:WB Saunders, 2000:223-227.
77. Rosenthal KL, Mader DR: Microbiology. In Mader DR, editor: *Reptile Medicine and Surgery*. Philadelphia, USA: WB Saunders, 1996:117-125.

78. Persing DH. In vitro nucleic acid amplification techniques. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ, editors. Diagnostic molecular Microbiology Principles and Applications. Washington:Mayo Foundation, 1993:51-83.
79. McArthur S. Infectious agents. In McArthur S, Wilkinson R, Meyer J, editors. Medicine and surgery of tortoises and turtles. Oxford:Blackwell Publishing, 2004:31-34.
80. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. Preparation and analysis of DNA. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. Current Protocols in Molecular Biology, Vol 1. 5th ed. USA:John Wiley and Sons, 1996:2.4.1-2.4.2.
81. Trust TJ, Bartlett KH. Aquarium pets as a source of antibiotic-resistant *Salmonellae*. Can J Microbiol 1979;25:535-541.
82. Gaillard C, Strauss F. Etanol precipitación of DNA with linear polyacrylamide as carrier. Nucleic Acids Res 1990;18:378.
83. User Manual en español. Ultrospec 3000 UV/Visible Spectrophotometer. Pharmacia Biotech. (4), Cambridge, England:13.
84. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol 1966;45:493-496.
85. BD BBL™ Sensidisc™ Antimicrobial sensibility test discs. A list of antimicrobial agents generic names- trade names. http://www.bd.com/ds/technicalCenter/misc/ch_8_2052.pdf
86. Van Bell G, Fisher LD, Heagerty PJ, Lumley T. Categorical Data: Contingency Tables. In: Van Bell G, Fisher LD, Heagerty PJ, Lumley T, editors. Biostatistics. A Methodology for health science 2nd ed. USA: Wiley, 2004:208-252.
87. Calvert I. Nutrition. In: Girling SJ, Raiti P, editors. BSAVA Manual of reptiles 2nd ed. Wareham:Fusion Design British small animal veterinary association, 2004:18-39.
88. Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR. Enterobacteriaceae: Salmonella. In: Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR, editors. Clinical Veterinary Microbiology. London:Mosby™ Harcourt Publishers Limited, Wolfe Publishing, 1994:209-236.
89. Cambre RC, Green DE, Smith EE, Montali RJ, Bush M. Salmonellosis and Arizonosis in the reptile collection at the nacional zoological park. JAVMA 1980;177:800-803.
90. Pasmans F, Herdt P, Haesebrouck. Presence of Samonella infections in freshwater turtles. Vet Rec 2002;150:692-693.
91. Pasmans F, Herdt P, Chasseur-Libotte ML, Ballasina DL. Occurrence of *Salmonella* in tortoises in a rescue centre in Italy. Vet Rec 2000;146:256-258.

92. Hidalgo VJ, Paniagua CD, Frutos EC, Jiménez MC, Pérez SN. Salmonella in free living terrestrial and aquatic turtles. *Vet Microbiol* 2007;119:311–315.
93. Onderka DK, Finlayson MC. Salmonellae and salmonellosis in captive reptiles. *Can J Comp Med* 1985;49:268-270.
94. McKibben JS, Porterfield PD, Westergaard JM. Effect of dry versus wet bowl environment on pet turtles. *Am J Vet Res* 1978;39:109-114.
95. Kumar MR, Akhtar KS, Singh CD, Kumar N, Hans C, Chaudry R. Fatal case of salmonella enterica subsp. Arizonae gastroenteritis in an infant with microcephaly. *J Clin Microbiol* 2003; 41:5830-5832.
96. Magnino S, Colin P, Dei-Cas E, Madsen M, McLauchlin J, Nöckler K, Prieto MM, Tsigarida E, Vanopdenbosch E, Van Peteghem C. Biological risks associated with consumption of reptile products. *Int J Food Microbiol* 2009;134:163-175.
97. Morse EV, Duncan MA. Salmonellosis an environmental health problem. *JAVMA* 1974;165:1015-19.
98. Waterman SH, Jurez G, Carr SJ, Kilman L. Salmonella arizona Infections in Latinos Associated with Rattlesnake Folk Medicine. *AJPH* 1990;80:286-289.
99. Aguilar RF, Alfonseca SE, Cervantes OR, Escalante OC, Figueroa OIM, García DGA *et al.* Manual de prácticas de laboratorio de bacteriología y micología veterinarias. Departamento de Microbiología e Inmunología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, DF. 2003.
100. Thomason BM, Dodd DJ, Cherry WB. Increased recovery of salmonellae from environmental samples enriched with buffered peptone water. *App Environ Microbiol* 1977;34:270-3.
101. Amavisit P, Browning GF, Lightfoot D, Church S, Anderson GA, Whithear G, *et al.* Rapid PCR detection of Salmonella in horse faecal samples. *Vet Microbiol* 2001;79:63-74.
102. Stone GG, Oberst RD, Hays MP, Mcvey S, Chengappa MM. Detection of Salmonella Serovars from Clinical Samples by Enrichment Broth Cultivation-PCR Procedure. *J Clin Microbiol* 1994;32:1742-1749.
103. Kubitschek HE, Freedman ML. Chromosome replication and the division cycle of *Escherichia coli* B/r. *J Bacteriol* 1971;107:95-99.
104. Tenover FC Unger ER. Nucleic acid probes for detection and identification of infectious agents. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ, editors. *Diagnostic molecular Microbiology Principles and Applications*. Washington:Mayo Foundation, 1993:3-25

105. Jacobson ER. Bacterial diseases of reptiles. In: Jacobson ER, editor. Infectious diseases and pathology of reptiles Color Atlas and text. USA:CRC Press, 2007:461-526.
106. Joyce M, Woods WC. Antibacterial susceptibility testing in the clinical laboratory. *Infect Dis Clin N Am* 2004;18:401–434.
107. Van den Borgan AE, Stobberingh EE. Epidemiology of resistance to antibiotics Links between animals and humans. *Int J Antimicrob Agents* 2000;14:327–335.
108. Paré JA, Sigler L, Rosenthal KL, Mader DR. Medicine Microbiology: Fungal and bacterial diseases of reptiles. In: Mader RD, editor. Reptile medicine and surgery 2nd ed. Canada: Saunders Elsevier, 2006:217-238.