

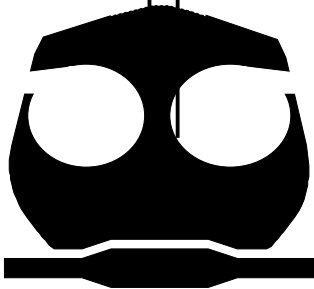


UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**AISLAMIENTO DEL GÉNERO SALMONELLA A PARTIR DE
MUESTRAS DE AGUA DE TORTUGUEROS Y SU
IDENTIFICACIÓN CON MEFAQUI**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A:
GUADALUPE VERENICE CALDERÓN ALVAREZ



MEXICO, D. F.

2012.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora: MARIA GUADALUPE TSUZUKI REYES
VOCAL: Profesora: ADRIANA GUADALUPE MEJIA CHAVEZ
SECRETARIO: Profesor: LUCIANO HERNANDEZ GOMEZ
1er SUPLENTE: Profesora: ROSALIA GUEVARA LEONEL
2º SUPLENTE: Profesora: ROSALBA ESQUIVEL COTE

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA EXPERIMENTAL EDIFICIO A,
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA, FACULTAD DE QUIMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:
M. en C. LUCIANO HERNANDEZ GOMEZ

SUPERVISOR TECNICO:
QFB. MARIA ANTONIETA SILVA CHAVEZ

SUSTENTANTE:
GUADALUPE VERENICE CALDERÓN ALVAREZ

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por permitirme llegar hasta este momento por que sin su compañía y guía durante todo este camino no lo hubiera logrado. Por que Donde hay fe hay amor, donde hay amor hay paz, donde hay paz está Dios y donde está dios no falta nada.

A la UNAM y en especial a los profesores de la Facultad de Química por haberme transmitido todos los conocimientos que ahora son la base con la que empezaré a construir mi futuro.

Agradezco a mi tutor el M. en C. Luciano Hernández Gómez por haberme permitido realizar este proyecto.

DEDICATORIAS

A Dios por que siempre ha estado conmigo y jamás me ha abandonado, por su amor, su comprensión, su bondad y por guiar cada uno de mis pasos.

A mi madre Lucrecia Alvarez Carrillo por ser la mujer más maravillosa y extraordinaria que Dios pudo darme, por tus consejos, por tu apoyo y amor incondicional y por siempre creer en mí, por darme fuerzas cuando más lo necesite. TE AMO MAMÁ le doy gracias a Dios por tenerte.

A mi padre José Cruz Calderón Castro por ser el pilar de la casa, por tu ayuda, por tu amor incondicional, porque siempre creíste en mí, por tu esfuerzo constante por sacarnos adelante y porque nunca te rindes y siempre buscas lo mejor para nosotros, eres mi ejemplo a seguir. TE AMO PAPÁ le doy gracias a Dios por haberme puesto en tu vida.

A mis hermanos Diana y Carlos, por esos momentos de risa, de juegos, de enojos y de peleas. ¡Los amo!

Al M. en C. Luciano Hernández Gómez por todo lo que me ha enseñado, por sus consejos y por su apoyo. Gracias por abrirme las puertas del Laboratorio de Microbiología Experimental y haber creído en mí para la realización de este trabajo.

A la QFB Ma. Antonieta Silva Chávez por su apoyo y consejos para la realización de este trabajo.

A la M. en C. Guadalupe Tsuzuki y QFB Adriana Mejía por las aportaciones a este trabajo.

ABREVIATURAS

En este trabajo se hace referencia a las siguientes abreviaturas, se entiende por:

MEFAQUI	Micrométodo Estandarizado en la Facultad de Química
CDC	Center for Diseases Control
GLU	Glucosa
IND	Indol
RM	Rojo de Metilo
VP	Vogues Proskauer
NIT	Nitrato
H ₂ S	Ácido Sulfhídrico
CIT	Citrato
UR	Urea
LIS	Lisina
ORN	Ornitina
FDA	Fenilalanina desaminasa
MAL	Malonato
TREH	Trehalosa
LAC	Lactosa
SAC	Sacarosa
MAN	Manitol
MALT	Maltosa
XIL	Xilosa
RAMN	Ramnosa
RAF	Rafinosa
SORB	Sorbitol
INO	Inositol
DUL	Dulcitol
SAL	Salicina
ARA	Arabinosa

OX	Oxidación
FER	Fermentación
SIM	Sulfhídrico, Indol, Movilidad
SS	<i>Salmonella-Shigella</i>
CTA	Cistina Tripteína Agar
SSI	Solución Salina Isotónica

INDICE

	Página
1. Introducción	8
2. Generalidades	10
2.1 Reptiles	10
2.2 Bacterias Gram negativas asociadas a tortugas	12
2.2.1 Familia <i>Enterobacteriaceae</i>	12
2.2.2 Género <i>Salmonella</i>	14
2.2.3 Otros géneros	15
2.3 Zoonosis	16
2.4 Morfología y estructura microbiana	19
2.5 Fisiología	20
2.6 Estructura antigénica	21
2.7 Medios para el aislamiento de <i>Salmonella</i> sp.	23
2.8 Pruebas bioquímicas para la identificación de <i>Salmonella</i> sp.	24
2.8.1 Fundamento de las pruebas bioquímicas para identificación	25
2.9 Serotipificación	37
2.9.1 Aglutinación	37
2.9.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	38
2.10 Sistemas comerciales de identificación	39
3. Justificación	44
4. Objetivo general	45
4.1 Objetivos particulares	45
5. Hipótesis	45
6. Equipo material y reactivos	46
7. Metodología	49
8. Resultados	57
9. Análisis de resultados	63
10. Conclusiones	67
11. Sugerencias y perspectivas	68
12. Referencias bibliográficas	69

1. INTRODUCCIÓN

Pascal James Imperato, presidente del departamento de medicina preventiva y salud comunitaria del Centro Médico Downstate de la Universidad Estatal de Nueva York, mencionó que la relación simbiótica entre el Género *Salmonella* y las tortugas es una convivencia antigua, por lo que no deben ser consideradas como mascotas para ningún infante, debido a que las tortugas contaminan el agua presente en los tortugeros, de ahí que, los niños cuando tocan el agua y se llevan los dedos a la boca se contagian fácilmente con *Salmonella* sp. (CDC, 2007)

Actualmente, el CDC en su informe semanal, que aparece en la edición del 3 de febrero de 2012 de la revista, *Morbidity and Mortality Weekly Report*, describe un brote de 132 infecciones con *Salmonella* sp. en 18 estados entre agosto de 2010 y septiembre de 2011. El origen fue rastreado hasta las tortugas pequeñas (las que tienen un caparazón de menos de 10 centímetros o 4 pulgadas), que son mascotas en los hogares, donde habitan niños menores de 8 años u otras personas en alto riesgo, como las mujeres embarazadas, los adultos mayores y los que tienen sistemas inmunitarios debilitados. (CDC, 2012)

En México no existen estudios que evidencien la participación de las tortugas en síndromes diarreicos, por lo que en este trabajo se pretendió demostrar que las tortugas son portadoras del Género *Salmonella* al aislar e identificar este microorganismo del agua de tortugeros.

La identificación del Género *Salmonella* se realizó por medio de dos métodos uno de ellos es el método tradicional de pruebas bioquímicas convencionales en tubo, donde generalmente se determina la actividad de una vía metabólica a partir de un sustrato incorporado en un medio de cultivo, donde la bacteria lo transforma para su desarrollo, esto genera metabolitos que pueden ser detectados en el medio con algún indicador, lo cual ayuda para realizar una identificación bacteriana. (Murray y col., 2007)

El segundo es el micrométodo MEFAQUIM que es un sistema de identificación bacteriana de bacilos Gram negativos, estandarizado en la Facultad de Química (Rojo, 2002).

2. GENERALIDADES

2.1 Reptiles

Los reptiles pertenecen a la clase *Sauropsida* o *Reptilia*, los cuales son animales vertebrados terrestres o semiacuáticos, que evolucionaron a partir de los primitivos anfibios. Fueron los primeros animales que se extendieron por tierra firme, gracias a que desarrollaron pulmones, piel dura y escamosa, fecundación interna donde el macho posee órgano copulador, además de huevos con cáscara dura que no necesita del agua para su desarrollo. (Carrquiriborde, 2010. Fontanilla y col., 1999)

Por otro lado, son incapaces de regular su temperatura (poiquilotermos), es así que, sus procesos fisiológicos como la temperatura corporal dependen de la temperatura ambiente por lo que son exotérmicos. La piel gruesa, cornificada y en muchos casos escamada, contribuye en gran medida a impedir la deshidratación. (Carrquiriborde, 2010. Fontanilla y col., 1999)

Los reptiles ocupan una gran variedad de hábitats, sobre todo aquellas zonas con presencia de agua como pantanos, lagos, orillas de los ríos, etc. (Zoo Barcelona, 2012)

Por su parte, las tortugas a diferencia de los demás reptiles presentan una coraza que es una modificación tegumentaria y ósea lo que las hace muy peculiares, además no presentan aperturas en el cráneo detrás de los ojos y el hueso cuadrado de la mandíbula es inmóvil. (Carrquiriborde, 2010. Fontanilla y col., 1999)

La Clasificación científica de las tortugas es (Chordata Batenson, 1885):

Reino: *Animalia*

Subreino: *Eumatazoa*

Rama: *Bilateria*

Filo: *Chordata*

Subfilo: *Vertebrata*

Superclase: *Gnathotomata*

Clase: *Reptilia*

Subclase: *Anapsida*

Orden: *Testudines*

El uso de reptiles con fines científicos es limitado. Por lo que, el número de grupos de ésta clase de animales es menor que otras clases empleadas, de ahí que, los grupos más utilizados son los quelonios (tortugas), ofidios (serpientes) y lagartos. Además, la popularidad que en la actualidad tienen los reptiles ha producido un incremento considerable en la utilización de éstos como mascotas; siendo las tortugas terrestres y acuáticas las más comunes, seguidas por las iguanas y ofidios que frecuentemente pueden ocupar un lugar como mascotas en los hogares. (Carriquiriborde, 2010)

Se ha considerado, que los reptiles en cautiverio son más vulnerables a estar colonizados por microorganismos zoonóticos (TABLA 1) que los que se encuentran en estado silvestre, esto se debe a que los animales en estado salvaje se encuentran en ambientes donde el agua tiene un flujo continuo y los que se encuentran en cautiverio viven en estanques donde el recambio del agua es poco frecuente y por lo tanto son más susceptibles a que se infecten con sus propias heces. Por otro lado, se ha observado que la microbiota que poseen es muy diferente a la que se encuentra en animales homeotermos, es así que microorganismos como *Salmonella* sp., son considerados flora normal del tracto gastrointestinal en algunas de estas especies. Por lo que, los huevos muchas

veces se contaminan con éste microorganismo por su paso a través de la cloaca. (Carriquiriborde, 2010. Barbour y Chacra, 2007)

Los agentes infecciosos involucrados en zoonosis pueden ser transmitidos a través de distintos mecanismos: contacto directo, ingestión, inhalación, por vectores, arañazos o mordeduras. Ciertos agentes pueden ser transmitidos por más de un mecanismo, por ejemplo, *Salmonella* sp. También se ha visto que algunos de los animales que portan agentes patógenos zoonóticos pueden desarrollar enfermedad clínica. (Carriquiriborde, 2010. Barbour y Chacra, 2007)

La salmonelosis es la zoonosis más importante en este grupo de animales, sin embargo, estos también pueden ser portadores de otros microorganismos patógenos o parásitos como bacterias de los géneros: *Aeromonas* sp., *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter fetus*, *Klebsiella* sp., *Staphylococcus* sp., *Proteus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Clostridium* sp., *Bacteroides* sp., *Pasteurella* sp., hongos como *Mucor* sp.; parásitos como *Cryptosporidium*.; y virus como el *alfavirus*, causante de la Encefalitis Equina de Oeste. (Carriquiriborde, 2010. Fontanilla y col., 1999)

Se ha podido caracterizar a una gran variedad de bacterias que se localizan en la cavidad bucal de los reptiles, tales como *Serratia* sp., *Providencia* sp., *Citrobacter* sp., *Campylobacter* sp., *Proteus* sp., *Bacteroides* sp., y *Pseudomonas* sp. (Carriquiriborde, 2010. Fontanilla y col., 1999)

2.2 Bacterias Gram negativas asociadas a tortugas

2.2.1 Familia *Enterobacteriaceae*

Las enterobacterias (*Enterobacteriaceae*) constituyen una familia grande y diversa de bacilos Gram negativos, de la que son miembros tanto microorganismos de vida libre como los de la microbiota autóctona del hombre y animales. Algunos de

éstos están adaptados para vivir en el ser humano. Las enterobacterias crecen con rapidez bajo condiciones aerobias o anaerobias y son activas desde el punto de vista metabólico. (Pachón, 2009)

Yersinia sp.

El Género *Yersinia* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, es un bacilo, Gram negativo, anaerobio facultativo, patógeno de humanos y animales. Los reptiles pueden ser portadores asintomáticos ocasionales o desarrollar enfermedad entérica denominada “*red mouth*” la transmisión se produce a través del manejo de los animales. En el hombre se aloja en el intestino delgado, particularmente en el íleon, provocando gastroenteritis aguda, nefritis y adenitis en el mesenterio. (Carriquiriborde, 2010. Madigan y col., 2011)

Edwardsiella sp.

Género perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Es un bacilo Gram negativo, con un diámetro de 1µm de ancho y 2-3 µm de largo. Generalmente es móvil (aunque existen cepas no móviles) mediante flagelos peritricos, anaerobio facultativo, catalasa positivo y oxidasa negativo. Este microorganismo se encuentra principalmente en animales de sangre fría, es poco frecuente como agente infeccioso en el hombre, el más reconocido en éste aspecto es *Edwardsiella tarda*, que en humanos puede ser causa de gastroenteritis semejante a la infección de *Salmonella sp.* Hasta el momento se ha reportado un solo caso asociado a una tortuga. (Amorocho y García, 2008. Castro y col., 2009)

Klebsiella sp. – Enterobacter sp.

Estos dos géneros pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* de la misma familia que la *Salmonella*, estos dos grupos es raro que infecten a reptiles, por lo que se considera microbiota entérica normal, aunque se han reportado casos de ofidios

con infecciones pulmonares causadas por estos agentes. El hombre se puede contagiar por manipuleo o contacto directo provocando infecciones del tracto respiratorio y septicemia. (Carrquiriborde, 2010. Madigan y col., 2011)

2.2.2 Género *Salmonella*

Los miembros del género *Salmonella* son bacilos gramnegativos, no fermentadores de lactosa, anaerobios facultativos, no esporulados, generalmente móviles por flagelos peritricos con la excepción de *Salmonella gallinarum* y *Salmonella pullorum*, responsables de la tifoidea aviar y pullorosis respectivamente. (Madigan y col., 2011)

Poseen metabolismo fermentativo y oxidativo; fermentan glucosa con producción de ácido y gas, también fermentan L-arabinosa, maltosa, D-manitol, D-manosa, L-ramnosa, D-sorbitol, trehalosa, D-xilosa y D-dulcitol. Dan reacción positiva a catalasa, rojo de metilo y citrato de Simmons, son negativos a la oxidasa, urea, indol y Voges-Poskauer (VP), también producen H₂S, descarboxilan la lisina y ornitina. Entre otras características bioquímicas se encuentran la reducción de nitratos a nitritos, no desaminan la fenilalanina y son tetracionatoreductasa. (Pachón, 2009)

El contenido de G+C en su ADN está comprendido entre 50 a 53%. (Pachón, 2009)

Recientemente la clasificación del Género *Salmonella* está basada en estudios realizados sobre la base técnica de hibridación del ADN de la bacteria, donde han llegado a la conclusión que está conformado por dos especies:

1) *Salmonella entérica*, dividida en seis subespecies aisladas de:

-
- a. Subespecie I. *S. enterica* subsp. *enterica*: Humanos y animales de sangre caliente.
 - b. Subespecie II. *S. enterica* subsp. *salamae*: Animales de sangre fría y del ambiente.
 - c. Subespecie III a. *S. enterica* subsp. *arizonae*: Animales de sangre fría y del ambiente.
 - d. Subespecie III b. *S. enterica* subsp. *diarizonae*: Animales de sangre fría y del ambiente.
 - e. Subespecie IV. *S. enterica* subsp. *houtenae*: Animales de sangre fría y del ambiente.
 - f. Subespecie VI. *S. enterica* subsp. *indica*: Animales de sangre fría y del ambiente

2) *Salmonella bongori*. Subespecie V: No constituye un patógeno para los humanos, pero si se encuentra implicada en ciertas patologías en animales.

Aunque existan sólo dos especies de *Salmonella* según su hibridación de ADN, tanto las especies como las subespecies mencionadas se encuentran constituidas por más de 2400 variedades serológicas, determinadas según las distintas asociaciones de los antígenos somáticos O y flagelares H. (Pachón, 2009)

2.2.3 Otros géneros

***Aeromonas* sp.**

El Género *Aeromonas* pertenece a la familia *Vibrionaceae*, son bacilos Gram negativos fermentadores de glucosa, reducen nitratos a nitritos, presentan la citocromo oxidasa. Se localizan principalmente en la cavidad orofaríngea de los reptiles. Las infecciones al humano se producen por el contacto con el agua contaminada en heridas abiertas, mordidas o arañazos producidos por reptiles, lo que se manifiesta con fiebre, heridas infecciosas, síndrome diarreico y septicemia

en personas inmunocomprometidas. En los ofidios produce ulceraciones gástricas y septicemia hemorrágica. (Carriquiriborde, 2010. Madigan y col., 2011)

***Campylobacter* sp.**

El género *Campylobacter* perteneciente a la familia *Campylobacteraceae*, son bacilos Gram negativos con forma de coma y móviles por la presencia de uno o dos flagelos polares, hidrolizan la urea, presentan citocromo oxidasa y son catalasa positiva. En humanos produce diarrea, gastroenteritis aguda, vómitos y fiebre. Se transmite por manipuleo, ingestión de los animales o de agua contaminada. (Carriquiriborde, 2010. Madigan y col., 2011)

2.3 Zoonosis

La naturaleza zoonótica de la salmonelosis en los animales en cautiverio puede resultar del intercambio entre los cuidadores y ellos. La que se presenta en tres formas diferentes: entérica, septicémica y abortiva. Para saber la cantidad de microorganismos que se necesitan para infectar a un organismo, se han realizado una serie de estudios experimentales, donde se ha podido determinar la dosis infectiva que va de 10^5 a 10^{10} células bacterianas, no obstante para que pueda establecerse una infección va a depender de la edad y la salud del hospedero, así como de los biotipos de las especies del género *Salmonella*. (Gillespie, 2005. Barragán y Karol, 2002)

Una gran variedad de serovares de *Salmonella* de todas las subespecies se han podido caracterizar en los reptiles, muchos de los cuales representan serovariedades raras o exóticas (TABLA 2). Por ejemplo, en EEUU aumentó el aislamiento de *Salmonella enterica* subsp. *houtemae* serovar Marina en humanos, de 2 casos en 1988 a 47 en 1998 y de *S. enterica* serovar poona que se incrementó de 199 a 341 casos en los mismos años. Los serotipos aislados con mayor frecuencia en pacientes con salmonelosis asociada en reptiles incluyen *S.*

enterica subsp. *diarizonae* serovar (IIIb)2, *S. enterica* subsp. *houtenae* (IV) serovares *chamaleon* y *marina* y *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (I) serovares *java*, *stanley* y *poona*. (Zaldl y col., 2006. Ebani y col., 2005. Barragán y Karol, 2002)

Generalmente, no se observan en estos animales signos clínicos por esta infección, pero pueden ocurrir diarreas esporádicas. En el humano, la infección produce dolores abdominales, gastroenteritis, diarreas mucosas sanguinolentas, náuseas, vómitos y fiebre. Según estudios recientes, son difíciles de tratar por el carácter multirresistente de las cepas implantadas. (Zaldl y col., 2006. Ebani y col., 2005)

TABLA 1. Principales microorganismos causantes de zoonosis transmitidas por reptiles (Carrquiriborde, 2010)

Zoonosis		
Especie animal	Bacterias	Hongos
Quelonios	<i>Salmonella</i> sp. *	Zygomycosis (Phycomicosis y mucormicosis)
	<i>Yersinia</i> sp.	<i>Rhizopus</i> sp. <i>Mucor</i> sp.
	<i>Aeromonas</i> sp. **	Micosis superficiales
	<i>Campylobacter</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.
	<i>Edwardsiella tarda</i> **	<i>Candida</i> sp.
	<i>Klebsiella</i> sp. **	<i>Trichosporum</i> sp.
	<i>Enterobacter</i> sp. **	<i>Trichophyton</i> sp.
	<i>Mycobacterium</i> sp. **	<i>Microsporium</i> sp.
<i>Coxiellaburnetti</i> **	Micosis profundas: <i>Aspergillus</i> sp. <i>Cephalosporium</i> sp. <i>Metarhizium</i> sp.	

Continuación TABLA 1. Principales microorganismos causantes de zoonosis transmitidas por reptiles (Carriquiriborde, 2010)

Zoonosis		
Especie animal	Bacterias	Hongos
Ofidios y lagartos	<i>Salmonella sp.</i> *	Zygomycosis (Phycomycosis y mucormycosis)
	<i>Yersinia sp.</i>	<i>Rhizopus sp.</i> , <i>Mucor sp.</i>
	<i>Aeromonas sp.</i> **	Micosis superficiales
	<i>Klebsiella sp.</i> **	<i>Aspergillus sp.</i>
	<i>Enterobacter sp.</i> **	<i>Fusarium sp.</i>
	<i>Mycobacterium sp.</i> **	<i>Candida sp.</i>
	<i>Coxiellaburnetti</i> **	<i>Trichosporum sp.</i> <i>Trichophyton sp.</i>
<i>Plesiomonas sp.</i> **	<i>Microsporum sp.</i> Micosis profundas: <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Cephalosporium sp.</i> , <i>Metarhizium sp.</i>	
*Zoonosis más común		
**Zoonosis de baja prevalencia		

La salmonelosis asociada a la adopción de reptiles como mascotas fue reconocida en Canadá como un serio problema de Salud Pública en las décadas de 1960 y 1970. En EE.UU., el CDC estimó que ocurrieron 50.000 casos de salmonelosis asociada a reptiles en 1963. (Carriquiriborde, 2010).

En México no se cuenta con estadísticas nacionales de infecciones por *Salmonella sp.* La falta de un sistema de vigilancia con comunicación entre epidemiólogos, clínicos, y el sector veterinario, así como la falta de infraestructura necesaria, impide que países como el nuestro puedan identificar las principales serovariedades de *Salmonella* en las diferentes clases de reptiles. (Zaldl y cols., 2006)

TABLA 2. Serovariedades de *Salmonella enterica* aisladas de muestras de materia fecal de reptiles. (Ebani y col., 2005)

Serovares de <i>Salmonella</i>	No de microorganismos aislados	Animal
<i>S. berta</i>	9	Tortugas
<i>S. chichiri</i>	1	Tortugas
<i>S. duval</i>	1	Tortugas
<i>S. kottobus</i>	1	Tortugas
<i>S. montevideo</i>	2	Lagarto Tortugas
<i>S. trimdon</i>	4	Tortugas-Ofidio-Lagarto
<i>S. agona</i>	1	Camaleón
<i>S. anatum</i>	1	Lagarto
<i>S. apapa</i>	3	Iguanas
<i>S. blukea</i>	1	Ofidio
<i>S. caracas</i>	2	Lagarto-Ofidio
<i>S. cayco</i>	1	Ofidio
<i>S. durban</i>	1	Camaleón
<i>S. ebrie</i>	3	Lagarto-Ofidio-Camaleón
<i>S. fluntern</i>	4	Lagartos
<i>S. friedrichsfelde</i>	1	Ofidio
<i>S. Israel</i>	1	Ofidio
<i>S. kapemba</i>	1	Ofidio
<i>S. kuntair</i>	1	Lagarto
<i>S. memphis</i>	1	Ofidio
<i>S. midway</i>	2	Ofidio
<i>S. muenchen</i>	1	Ofidio
<i>S. othnmarsch</i>	3	Lagarto
<i>S. readring</i>	1	Ofidio
<i>S. senftenberg</i>	2	Ofidio-Iguana
<i>S. veneziana</i>	1	Lagarto

2.4 Morfología y estructura microbiana

Las enterobacterias se encuentran entre las bacterias de mayor tamaño, miden de 2 a 4 μm de longitud y de 0.4 a 0.6 μm de ancho, con lados paralelos y extremos redondeados. (Ryan y Ray, 2007)

La pared celular, membrana celular y estructuras internas son morfológicamente similares en todas las enterobacterias. Los componentes de la pared celular y de la superficie, son antigénicos, lo que ha llevado a estudios extensos en algunos Géneros como *Salmonella* y *Escherichia*, además de constituir la base para su sistema de clasificación en serotipos. De esta forma, se ha podido denominar al lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa como antígeno O. Su especificidad antigénica está determinada por la composición de azúcares que forman las cadenas laterales largas de polisacáridos terminales enlazadas con el polisacárido central y el lípido A. Así mismo, los polisacáridos de la superficie celular pueden formar una cápsula bien definida o una cubierta de consistencia viscosa amorfa, que se denomina antígeno K. Las cepas móviles cuentan con flagelos proteínicos peritricos que se extienden bastante más allá de la pared celular y cuyo componente proteínico se denomina antígeno H. (Ryan y Ray, 2007)

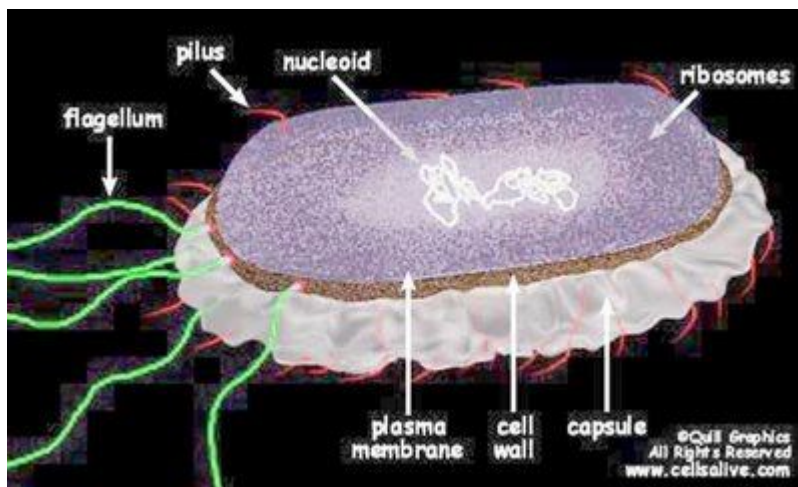


Figura 1. Esquema morfológico de *Salmonella* sp.
(Arrascuelimo, C. 2008)

2.5 Fisiología

El conocimiento de la fisiología y metabolismo de los microorganismos permite determinar la caracterización e identificación de éstos, de ahí que, las características bioquímicas y de su cultivo nos llevan a un adecuado aislamiento y determinación. El Género *Salmonella* no fermenta la lactosa, la mayor parte de las

cepas son móviles y producen H₂S a partir de una fuente inorgánica de azufre como el tiosulfato de sodio. De ahí, que las pruebas que ayudan a diferenciar las distintas subespecies de los aislamientos más frecuentes se presentan en la TABLA 3. (Murray y col., 2007)

TABLA3. Reacciones bioquímicas usadas para la diferenciación de especies y subespecies de *Salmonella*. (Murray y col., 2007)

Bioquímica	Especies y subespecies						<i>S. bongori</i>
	<i>S. entérica</i>						
	I	II	IIIa	IIIb	IV	VI	
Dulcitol	+	+	-	-	-	D	+
Lactosa	-	-	-	+	-	D	-
ONPG	-	-	+	+	-	D	+
Salicina	-	-	-	-	+	-	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	-	+
Malonato	-	+	+	+	-	-	-
Crecimiento en KCN	-	-	-	-	+	-	+

D= reacción diferente

2.6 Estructura antigénica

La estructura antigénica de *Salmonella* sp., es similar a la de otras enterobacterias, contando con la presencia de dos clases de antígenos principales: Antígeno O (somáticos) y Antígenos H (flagelares). En algunas cepas se encuentra un tercer tipo de Antígeno de superficie, análogo funcionalmente a los Antígenos K (capsulares) de otros Géneros. Al estar este antígeno relacionado con la virulencia de las cepas se le denomina Vi, que puede interferir con la aglutinación por antisueros O y que se relacionan con invasividad. Poseen una amplia variación de determinantes antigénicos en su pared celular y en sus flagelos, lo que propicia la existencia de numerosas combinaciones de antígenos somáticos y flagelares, llegando actualmente a reconocerse más de 1100 serotipos. (Murray y col., 2007)

- a. Antígenos Somáticos (O): son complejos de fosfolípidos, polisacáridos y fracciones proteicas, termoestables, la especificidad de estos antígenos se

fundamenta en los grupos terminales de las cadenas de polisacáridos. Existen 57 antígenos somáticos, los cuales están identificados del 1 al 64, con números arábigos. El complejo de antígenos O determina el subgrupo somático al que pertenecen los géneros de *Salmonella* sp., *Arizona* sp., *Citrobacter* sp., *Escherichia* sp., *Providencia* sp., *Serratia* sp., entre otros. (Murray y col., 2007)

- b. Antígenos Flagelares (H): son proteicos y termolábiles, constituidos por flagelina, cuya composición en aminoácidos es constante para un tipo antigénico determinado. El tipo de aminoácidos que componen la proteína así como la secuencia en que éstos se agrupan, son responsables de la especificidad de los antígenos H. La aglutinación que se produce con éstos es de tipo flocular y ocurre rápidamente. En el género *Salmonella* los antígenos H se designan con letras del alfabeto (a, b, c, etc.), y están sujetas a una variación reversible, conocida como variación de fase. (Murray y col., 2007)
- c. Antígeno capsular (K): Es un antígeno termolábil, aunque existen pocas excepciones donde son considerados termoestables, en *Salmonella* se conoce como Ag (Vi), que protege a la bacteria dándole resistencia antifagocítica. La presencia de este antígeno hace imposible la aglutinación de suero anti O debido a que recubre toda la bacteria, en este caso, la cepa en estudio debe ser sometida a un calentamiento a 100°C durante 30 minutos, a fin de desnaturalizar dicha cubierta y luego poder realizar la prueba de aglutinación con el Ag somático correspondiente. De allí que la expresión de este factor depende de al menos dos genes (ViA + ViB), siendo necesario que existan los dos en la bacteria para que la expresión tenga lugar. (Pachón, 2009)

2.7 Medios para el aislamiento de *Salmonella* sp.

Debido a que la mayoría de las muestras analizadas para el aislamiento de *Salmonella* sp., contienen varias especies de bacterias mezcladas es necesario contar con una metodología que ayude a la separación de ésta, por lo que se dispone de dos tipos generales de medios aunados al método: 1) Enriquecimiento selectivo en caldos de enriquecimiento, 2) Aislamiento selectivo o siembra en placa de medios selectivos y diferenciales. El uso de estos medios con fórmulas complejas incluye componentes que no sólo inhiben el desarrollo de ciertas especies bacterianas, sino que también detectan una variedad de características bioquímicas de importancia en la identificación preliminar de los microorganismos seleccionados. (Koneman, 2009. CIEMA, 2000. Madigan y col., 2011)

1) Enriquecimiento selectivo en caldos de enriquecimiento: los caldos de enriquecimiento se usan para incrementar el desarrollo de ciertas especies bacterianas, deteniendo el crecimiento de los microorganismos superfluos.

Existe una gran variedad de medios de enriquecimiento, entre los más usados para el enriquecimiento selectivo de *Salmonella* sp., se encuentran: Caldo Selenito y Caldo Tetrionato. (Koneman, 2009)

2) Aislamiento selectivo o Siembra en placa de medios selectivos y diferenciales.

2.a) Agar de aislamiento selectivo y diferencial: Mediante el uso de medios selectivos se inhibe el desarrollo de ciertas bacterias superfluas, permitiendo el crecimiento de especies de interés clínico. Los medios se hacen selectivos al añadir a sus fórmulas una variedad de inhibidores en menor o mayor medida de las concentraciones halladas en los medios de aislamiento, esto generalmente permite dividir a los medios en poco, mediana y altamente selectivos. Algunos ejemplos de estos medios de aislamiento son: el Agar MacConkey, Agar Eosina azul de metileno (EMB) y Agar Endo. (Koneman, 2009)

Los medios selectivos para el aislamiento de *Salmonella* sp. pueden ser considerados como mediana o altamente selectivos, además de que con estos medios se pueden observar otras peculiaridades que son de carácter bioquímico y de esta forma ayuda no sólo a separar a *Salmonella* sp. sino también a diferenciarla de otras bacterias que se desarrollen en estas fórmulas. Los medios más usados para este fin son el Agar *Salmonella-Shigella* (SS), Agar entérico de Hektoen (HE), Agar sulfito de bismuto y Verde Brillante (VB). (Koneman, 2009)

2.8 Pruebas bioquímicas para la identificación de *Salmonella* sp.

La identificación del Género *Salmonella*, así como de otras bacterias está basada principalmente en la determinación de la presencia o ausencia de diferentes enzimas codificadas por el material genético del cromosoma bacteriano. Estas enzimas guían el metabolismo de las bacterias a lo largo de una de las diversas vías que pueden detectarse a través de medios especiales utilizados en las técnicas de cultivo in vitro. Los sustratos sobre los cuales estas enzimas pueden actuar se incorporan al medio de cultivo, junto con un sistema indicador que puede detectar ya sea, la degradación del sustrato o la presencia de productos metabólicos específicos. Con la selección de éste tipo de medios, es posible determinar un perfil bioquímico para lograr la identificación de los microorganismos no sólo a nivel de Género, sino también, en la mayoría de los casos, la especie. (Koneman, 2009)

En la actualidad existen esquemas de clasificación muy variados y complejos, en los diferentes sistemas que facilitan la realización de una identificación, ya que, proponen un mayor número de pruebas bioquímicas donde la lectura e interpretación de resultados puede ser o no automática, con porcentajes de tipificación, identificación extendida a otros posibles grupos de microorganismos, además de la miniaturización de los sustratos. De ahí, el surgimiento y el auge de los métodos miniaturizados, que surgen a partir del concepto de la placa de microtitulación, que permite reducir el volumen de reactivos y medios a emplear en

los ensayos, son fáciles de usar, precisos y económicamente rentables. (VISA VET, 2008)

2.8.1 Fundamento de las pruebas bioquímicas para identificación

Prueba de la Oxidasa

El principio de la prueba consiste en determinar la presencia de la enzima oxidasa en los microorganismos.

Bioquímicamente la prueba de oxidasa se basa en la producción bacteriana de una enzima oxidasa intracelular. Esta reacción de oxidasas se debe a un sistema de citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular, el que a su vez actúa como un aceptor de electrones en la fase terminal del sistema de transferencia de electrones. (MacFaddin, 2003)

Todas las bacterias aeróbicas obtienen su energía por la respiración, proceso responsable de la oxidación de diversos sustratos. El oxígeno molecular oxida un sustrato con la intervención del sistema de transporte de electrones. El oxígeno es el aceptor de hidrógeno final, produciendo a partir del hidrógeno agua o peróxido de hidrógeno, según la especie bacteriana y su sistema enzimático. (MacFaddin, 2003)

El sistema citocromo sólo se encuentra por lo general en los organismos aeróbicos, lo que los hace capaces de utilizar el oxígeno como un aceptor de hidrógeno final para reducir el oxígeno molecular en peróxido de hidrógeno, el último enlace de la cadena de la respiración aeróbica. (MacFaddin, 2003).

El reactivo empleado es el diclorhidrato de tetrametil-*p*- fenilendiamina al 1%, el cual imparte un color lavanda a las colonias oxidasa positivo que gradualmente vira a un púrpura-negruzco intenso. (MacFaddin, 2003)

Prueba de Oxidación-Fermentación

El principio de la prueba se basa en determinar el proceso metabólico oxidativo o fermentativo de un hidrato de carbono por parte del microorganismo problema. Bioquímicamente las bacterias utilizan los hidratos de carbono por uno de dos procesos metabólicos, fermentativo u oxidativo, las bacterias aerobias estrictas sólo pueden metabolizar un hidrato de carbono en condiciones aerobias, lo que hace que éstas sólo lleven a cabo el proceso oxidativo teniendo como resultado la producción de CO₂, que se observa con la acidez en el medio de cultivo diferencial, mientras que las bacterias anaerobias facultativas metabolizan los hidratos de carbono bajo el proceso óxido-fermentativo, donde se van a producir una gran cantidad de ácidos dependiendo la vía metabólica que tomen. Un ejemplo se demuestra por la producción de ácido cuando cambia de color el indicador ácido-base como el azul de bromotimol que vira de color azul a amarillo, cuando el medio se torna ácido. (MacFaddin, 2003)

La principal diferencia entre el metabolismo fermentativo y el metabolismo oxidativo de un hidrato de carbono, es el requerimiento de oxígeno molecular y la fosforilación inicial. En la fermentación se lleva a cabo un proceso anaerobio, por lo que requiere de una fosforilación de la glucosa antes de la degradación y transformación a una mezcla de ácidos relativamente fuertes, mientras que la oxidación, es un proceso aerobio estricto que involucra la oxidación directa de una molécula de glucosa no fosforilada, lo que produce una menor cantidad de ácidos que los producidos en la fermentación. (MacFaddin, 2003)

Prueba de fermentación de glucosa y lactosa, producción de sulfhídrico y gas en el medio de Kligler

El principio de la prueba consiste en determinar la capacidad de los microorganismos para degradar un hidrato de carbono específico incorporado en un medio de cultivo, con la producción de gas y de ácido sulfhídrico (H₂S).

Bioquímicamente el Agar Hierro de Kligler (KIA) es un medio diferencial de cultivo en tubo con una posición inclinada del agar o pico de flauta, que cumple con un doble propósito: a) determinar la fermentación de hidratos de carbono y b) determinar la producción de gas y H₂S. (MacFaddin, 2003)

El medio KIA contiene dos hidratos de carbono: lactosa, con concentración del 1%, y glucosa, con concentración del 0.1%. Algunos organismos tienen la facultad de fermentar ambos hidratos de carbono; otros fermentan solamente la glucosa; y otros, no son capaces de fermentar ni la lactosa ni la glucosa.

La producción de gases es debido a que los productos de la fermentación del hidrato de carbono son CO₂ + H₂, y pueden ser observables cuando el medio de KIA se rompe o es separado del fondo del tubo.

La fermentación de los hidratos de carbono se produce anaeróticamente dando como resultado la producción de ácidos, este proceso se detecta con el vire del rojo de fenol (indicador ácido-base) que va de rojo a amarillo por la presencia de los ácidos.

De esta forma se pueden observar tres patrones de interpretación básicos en el medio KIA:

- a) fermentación sólo de la glucosa (vire amarillo en el fondo del tubo).
- b) fermentación de glucosa y de lactosa (vire amarillo en el fondo y superficie del tubo)
- c) ausencia de fermentación de glucosa o lactosa (Con o sin vire a rojo).

Para la determinación de la producción de sulfhídrico, es necesario incorporar el tiosulfato de sodio al medio de cultivo el cual actúa como sustrato, el citrato de amonio férrico es la fuente de iones Fe³⁺, los cuales se combinan con el ácido

sulfhídrico y producen sulfuro de hierro, de color negro. Este proceso se lleva a cabo en dos etapas.

1ª etapa

Bacteria (medio ácido) + tiosulfato de sodio \longrightarrow H₂S gas \uparrow

El ácido sulfhídrico es un gas incoloro, por lo tanto es necesario un indicador para detectar en forma visible su producción.

2ª etapa

H₂S + iones férricos \longrightarrow sulfuro ferroso \downarrow (precipitado negro insoluble)

El precipitado negro del sulfuro ferroso que indica la producción de H₂S puede ocultar la condición ácida producida en la capa superior del medio KIA; por lo tanto, si se produce H₂S es que existe una condición ácida, aun cuando no se observe.

Con fines de identificación, todos los tubos de KIA deben de interpretarse en lo que respecta a la fermentación de los hidratos de carbono después de 18-24 horas de incubación. (MacFaddin, 2003)

Prueba de Ureasa

Bioquímicamente esta prueba determina la capacidad de un organismo de hidrolizar la urea, formando dos moléculas de amoníaco por acción de la enzima ureasa. Dicha acción se puede detectar por el vire del indicador rojo de fenol hacia un color rojo rosado, que indica la alcalinización del medio por la presencia del amoníaco. (MacFaddin, 2003. Koneman, 2009)

Prueba de Citrato de Simon's

El principio de la prueba consiste en determinar la capacidad de los microorganismos para utilizar el citrato como única fuente de carbono.

Bioquímicamente el citrato de sodio es una sal del ácido cítrico, un compuesto orgánico simple que constituye uno de los metabolitos del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ciclo de Krebs). Es una prueba útil en la identificación de Enterobacterias y se detecta en un medio de cultivo con citrato como única fuente de carbono. El medio que se usa para su determinación incluye citrato de sodio, un anión, como única fuente de carbono y fosfato de amonio como única fuente de nitrógeno. Las bacterias que pueden utilizar citrato también pueden extraer nitrógeno de la sal de amonio, con la producción de amoníaco y así alcalinizando el medio. Esta prueba es positiva cuando se observa crecimiento a lo largo de la estría de un virre del indicador al azul o solamente crecimiento del microorganismo, esto es posible debido a que para que el desarrollo del microorganismo sea visible, debe encontrarse en la fase logarítmica, la cual es posible sólo si el carbono y el nitrógeno han sido asimilados. (Koneman, 2009. MacFaddin, 2003)

El desarrollo de un color azul intenso en 24-48 horas indica una prueba positiva y revela que el organismo en estudio ha sido capaz de utilizar el citrato en el medio, con la formación de productos alcalinos. (Koneman, 2009)

Prueba de las Descarboxilasas (Lisina-Ornitina-Arginina)

El principio de la prueba consiste en determinar la capacidad enzimática del organismo para descarboxilar un aminoácido.

Bioquímicamente las descarboxilasas son un grupo de enzimas sustrato-específicas, capaces de actuar sobre la porción carboxilo (COOH) de los aminoácidos, con formación de aminas de reacción alcalina. Esta reacción,

conocida como descarboxilación, produce dióxido de carbono como producto secundario. (Koneman, 2009)

Los tres aminoácidos para esta prueba, y que son utilizados en la identificación de enterobacterias, son Arginina, Lisina y Ornitina. Los productos de la descarboxilación de Lisina y Ornitina son cadaverina y putrescina (diaminas), mientras que para la Arginina es la citrulina por acción de una dihidrolasa. La prueba se debe acompañar con un tubo control que contiene medio base sin aminoácido. Como la descarboxilación es una reacción anaeróbica, se debe cubrir el medio con una capa de aceite mineral o parafina estéril. El proceso ocurre en dos etapas: por fermentación de la glucosa se produce una acidificación del medio ($\text{pH} < 6.0$), apareciendo color amarillo. La acidificación es necesaria para que ocurra la descarboxilación. Este último proceso da lugar a la formación de las aminas que elevan el pH con el consiguiente viraje del indicador al color violeta. (MacFaddin, 2003)

Prueba de reducción de Nitratos

El principio de la prueba consiste en determinar la capacidad de los microorganismos para reducir los nitratos a nitritos o gas nitrógeno libre.

Bioquímicamente la reducción de nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-) y a nitrógeno gaseoso (N_2) es una reacción que se produce en condiciones de anaerobiosis. (MacFaddin, 2003)

Las bacterias pueden utilizar nitratos mediante varios procesos, entre ellos asimilación, desasimilación y desnitrificación. (Rodríguez y col., 2006)

1. Asimilación: implica la reducción del nitrato a amoníaco, el cual puede ser utilizado por las células para la síntesis de aminoácidos y otros compuestos

nitrogenados (es decir, lo asimila como fuente de nitrógeno). (Rodríguez y col., 2006)

2. Desasimilación: es la utilización del nitrato como aceptor final de electrones en ausencia de oxígeno libre, reduciéndose a nitritos, que aparecen en el medio. (Rodríguez y col., 2006)

3. Desnitrificación: es la reducción del nitrato hasta productos finales gaseosos como nitrógeno, óxido nitroso o el óxido de nitrógeno. (Rodríguez y col., 2006)

El desarrollo de un color rojo a los 30 segundos de añadir el reactivo A (α -naftilamina, ácido acético 5N al 30%) y reactivo B (ácido sulfanílico, ácido acético 5N al 30%) indica la presencia de nitritos y representa una reacción positiva para la reducción de nitratos. La ausencia de color tras el agregado de los reactivos puede indicar que los nitratos no han sido reducidos (una verdadera reacción negativa) o que han sido reducidos a productos distintos de los nitritos. Dado que los reactivos detectan sólo nitritos es necesario añadir una pequeña cantidad de polvo de zinc a todas las reacciones negativas, el desarrollo de un color rojo tras el agregado del polvo de zinc indica la presencia de nitratos residuales y confirman la reacción negativa verdadera. (Koneman, 2009)

Prueba de Voges-Proskauer

El principio de la prueba consiste en determinar la capacidad de los microorganismos para producir un producto final neutro, acetilmetilcarbinol (AMC, acetoína), a partir de la fermentación de la glucosa.

Bioquímicamente la prueba de Voges-Proskauer (VP) se basa en la conversión del acetilmetilcarbinol (acetoína) en diacetilo por acción del KOH al 40% y el oxígeno atmosférico, el α -naftol actúa como catalizador para revelar un complejo rojo. A partir del ácido pirúvico, las bacterias pueden seguir muchos caminos metabólicos;

la producción de acetoina es una de las vías metabólicas de la degradación de la glucosa en las bacterias. (MacFaddin, 2003. Koneman, 2009)

Prueba de Rojo de Metilo

El principio de la prueba consiste en determinar la capacidad de los microorganismos para producir y mantener estables los productos finales ácidos a partir de la fermentación de la glucosa. Además, ésta es una prueba cualitativa para la producción de ácido (determinación de pH); algunos microorganismos producen más ácidos que otros.

Bioquímicamente la prueba de rojo de metilo (RM) es una prueba cualitativa basada en el uso de un indicador de pH, el rojo de metilo, para determinar la concentración de ión hidrógeno (pH) cuando un microorganismo fermenta la glucosa, por la vía de fermentación ácido mixta. La concentración de ion hidrógeno depende de la relación de gases (CO_2 y H_2), lo que a su vez es un índice de las diferentes vías metabólicas de la glucosa exhibidas por los diversos microorganismos. Los diferentes patrones de fermentación se deben a las variaciones en las enzimas relacionadas con el metabolismo del ácido pirúvico en el microorganismo. (MacFaddin, 2003. Koneman, 2009).

El rojo de metilo es un indicador de pH que se utiliza para visualizar la producción de ácido por la vía de fermentación ácido mixta. El desarrollo de un color rojo estable en la superficie del medio indica que la producción de ácido es suficiente como para bajar el pH a 4.4 y es una prueba positiva. (MacFaddin, 2003)

Prueba de Indol

El principio de la prueba consiste en determinar la capacidad de un microorganismo para producir indol a partir del triptófano.

Bioquímicamente el indol es uno de los productos del metabolismo del aminoácido triptófano. Las bacterias que poseen la enzima triptofanasa son capaces de degradar triptofano con la producción de indol, ácido pirúvico y amoníaco (NH_3). (Koneman, 2009)

El triptófano es un aminoácido que puede ser oxidado por ciertas bacterias para formar tres metabolitos indólicos principales: indol, escatol (metil indol) y ácido indolacético (IA, A, indolacetato). Las diversas enzimas intracelulares involucradas se denominan colectivamente “triptofanasa”, un término general usado para designar el sistema completo de enzimas que median la producción de indol por actividad hidrolítica sobre el sustrato triptófano. El principal intermediario en la degradación es el ácido indolpirúvico, a partir del cual puede formarse indol por desaminación y escatol por descarboxilación del IAA. (MacFaddin, 2003. Koneman, 2009)

La prueba del indol está basada en la formación de un complejo de color rojo cuando el indol reacciona con el grupo aldehído del p-dimetilaminobenzaldehído. Este es el principio activo de los reactivos de Kovac y Ehrlich. (MacFaddin, 2003)

Prueba de Malonato

El principio de la prueba consiste en determinar la capacidad de los microorganismos para utilizar el malonato de sodio como única fuente de carbono.

Bioquímicamente el malonato es un inhibidor enzimático. Quastel y Woodridge demostraron por primera vez que el ácido malónico (malonato) interfería con la oxidación del ácido succínico a ácido fumárico mediante la inhibición de la acción catalítica de la enzima succínico deshidrogenasa. El ácido malónico inactiva la enzima por un proceso denominado inhibición competitiva. La succínico deshidrogenasa transfiere hidrógeno a un aceptor apropiado en la conversión de ácido succínico a ácido fumárico; pero esta reacción puede ser inhibida por un

compuesto orgánico similar desde el punto de vista estructural al sustrato natural, el ácido succínico. Una prueba positiva se observa con el cambio de color del indicador de pH (azul de bromotimol), de verde a azul de Prusia. (MacFaddin, 2003. Koneman, 2009)

Prueba de la Fenilalanina-desaminasa

El principio de la prueba consiste en determinar la capacidad de los microorganismos para desaminar la fenilalanina en ácido fenilpirúvico por su actividad enzimática.

Bioquímicamente la fenilalanina es un aminoácido que por desaminación forma un cetoácido, el ácido fenilpirúvico. El aminoácido aromático fenilalanina sufre la desaminación oxidativa catalizada por una aminoácido oxidasa, para producir el ácido cetónico (ácido fenilpirúvico). La desaminación oxidativa da como resultado la extracción del grupo amino (NH_2) del aminoácido para formar un doble enlace α -cetoácido y liberación de amoníaco (NH_3). Es éste un proceso en dos etapas; en un principio, es extraído el hidrógeno dando un iminoácido y el hidrógeno se combina con el oxígeno para formar agua, luego el iminoácido es hidrolizado a un cetoácido. (MacFaddin, 2003. Koneman, 2009)

La fenilalanina es desaminada a ácido fenilpirúvico, el que luego es reducido a ácido feniláctico. Este último puede ser reconvertido en fenilalanina, con el que el ciclo de la desaminación vuelve a repetirse. Una prueba positiva se observa al agregar cloruro férrico, el cual provoca un color verde intenso. (MacFaddin, 2003)

Pruebas de fermentación de carbohidratos

El principio de la prueba consiste en determinar la capacidad de los microorganismos para fermentar un hidrato de carbono específico incorporado en un medio base, produciendo ácido, o ácido con gas visible. Bioquímicamente la

fermentación es un proceso metabólico de oxido-reducción que tiene lugar en un medio anaerobio, en el cual un sustrato orgánico es el aceptor final de hidrógeno (electrones) en lugar del oxígeno. En los sistemas analíticos bacteriológicos este proceso se detecta observando visualmente cambios de color de indicadores de pH al formarse los productos ácidos. La acidificación de un medio puede tener lugar a través de la degradación de hidratos de carbono por vías distintas de las estrictamente fermentativas, o bien algunos medios pueden contener componentes distintos de los hidratos de carbono que dan por resultado subproductos ácidos. (Koneman, 2009)

Muchas bacterias, fermentan hidratos de carbono mediante la vía conocida como “fermentación ácido mixta”, en la cual se produce finalmente una variedad de ácidos orgánicos que derivan del ácido pirúvico. En esta prueba, determinados azúcares se agregan a un medio basal estéril. La producción de ácido se manifiesta por un cambio de color del indicador. La elección del medio y del indicador depende de la vía metabólica del organismo y de la claridad visual del cambio de pH. (MacFaddin, 2003. Koneman, 2009).

TABLA 4. Perfil bioquímico de *Salmonella* sp.

BQ's	Reacción
OX/GLU	+
FER/GLU	+
IND	-
RM	+
VP	-
NIT	+
H ₂ S	+
CIT	+
UR	-
LIS	+
ORN	+
ARG	-
FDA	-
MAL	-
TREH	+
GLU	+
LAC	-
SAC	V
MAN	+
MALT	+
XIL	+
RAM	+
RAF	V
SOR	+
INO	V
DUL	+
SAL	V
ARA	+

V=variable

2.9 Serotipificación

El uso de reacciones Ag–Ac para la serotipificación de las bacterias se basa en que los microorganismos presentan diferencias en su constitución antigénica, aún entre grupos de microorganismos relacionados. Los microorganismos expresan una gran variedad de antígenos (Ag) a partir de componentes estructurales de la célula (pared, cápsula, fimbrias) y productos de excreción (exotoxinas, enzimas extracelulares). (Caffer y Terragno, 2001)

Químicamente, los Ag pueden ser proteínas, hidratos de carbono y complejos de polipéptidos y carbohidratos. Como son moléculas complejas tienen más de una subestructura que puede servir como determinante antigénico. Debido a esto en los sueros inmunes se encuentran anticuerpos que reaccionan contra distintos determinantes antigénicos de la misma molécula. (Caffer y Terragno, 2001)

La base para la serotipificación de enterobacterias son los determinantes antigénicos que presentan y que pone en evidencia la presencia de diferentes antígenos como el somático (Antígeno O, compuesto de polisacáridos), flagelar (Antígeno H, compuesto de proteínas), fimbrial (Antígeno F, compuesto de proteínas) y capsular (Antígeno K, compuesto de polisacáridos). (Caffer y Terragno, 2001). Todos los serotipos de *Salmonella* están definidos con base a su estructura antigénica, en algunos serotipos se apoyan en reacciones bioquímicas, además de las fórmulas antigénicas como el antígeno O y el antígeno H. (Balows, 2005)

2.9.1 Aglutinación

Es la interacción entre un anticuerpo y una partícula antigénica que se visualiza por la formación de agregados o grumos macroscópicos. En este proceso, el anticuerpo es conocido como aglutinina y el antígeno como el aglutinógeno.

Las reacciones serológicas son específicas entre un antígeno y un anticuerpo y pueden ser usadas para el trabajo de diagnóstico

Para la aglutinación de *Salmonella* sp. se usan antígenos superficiales con anticuerpos contra estos antígenos presentes en el suero del paciente.

En una primera identificación se usan sueros polivalentes que determinan la presencia de antígeno de un género y para la caracterización serológica específica se usan sueros monovalentes dentro de cada tipo de antígeno.

Esta técnica es útil para determinar de forma rápida y precisa bacterias, hongos, grupos sanguíneos y otros antígenos; además ayuda a detectar anticuerpos, los cuales pueden indicar un estado de enfermedad.

2.9.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, polymerase chain reaction), es un método *in vitro* para replicar una secuencia de ADN de modo que su cantidad se incrementa exponencialmente. De esta manera pequeñas cantidades de un gen específico de una célula, puede ser amplificado a un millón de copias dentro de unas pocas horas por esta metodología. (Gerhardt, 2001)

Es una técnica sencilla, que consiste en la separación por calor de las dos cadenas del DNA que se quiere amplificar, y su copia simultánea a partir de un punto determinado por un fragmento de DNA artificial llamado cebador u oligonucleotido con sus extremos 3' y 5' orientados en direcciones opuestas los que son sintetizados para su uso, para la amplificación es requerida la acción de una enzima denominada DNA polimerasa. El resultado es la duplicación del número de moléculas de una secuencia concreta de DNA. Este proceso se repite en un número determinado de veces o ciclos, generalmente 30, y se consigue un aumento o amplificación exponencial del número de copias del fragmento de DNA

molde. Por tanto, si partimos de una molécula única de DNA en la muestra inicial, y en cada ciclo se duplica el número de moléculas, teóricamente, al final de los 30 ciclos, se obtendrán 2^{30} moléculas idénticas, es decir 1073741824 moléculas. (Espinoza, 2007)

El avance en la biotecnología ha permitido el desarrollo de técnicas moleculares para el estudio del genoma de *Salmonella*. (Espinoza, 2007)

2.10 Sistemas comerciales de identificación

El uso de los sistemas miniaturizados de identificación microbiana se dio a fines de la década de los 60's, el cual propicio el auge de procedimientos de identificación más precisos en menor tiempo, además de ser semi y automatizados. Estos métodos utilizan modificaciones de las pruebas bioquímicas convencionales, ya sea con sustratos deshidratados, tiras de papel filtro impregnadas en reactivo o pequeños compartimentos fáciles de inocular. Para la caracterización en todos los casos se emplean códigos numéricos que sirven para la interpretación de resultados. (Bou G., y col., 2010)

Estos sistemas fueron desarrollados inicialmente para la identificación de las enterobacterias debido a la frecuencia de su aislamiento en muestras clínicas, con un desarrollo metodológico relativamente rápido y a sus reacciones bioquímicas en general bien definidas. (Bou y col., 2010)

La estructura compacta de estos sistemas, le permite ocupar poco espacio para su almacenamiento; su facilidad de uso e interpretación de las reacciones químicas, hace que sean muy convenientes para su empleo en laboratorios de Microbiología. Son especialmente útiles en laboratorios que trabajan en menor escala, ya que ayudan a identificar bacterias que de otro modo pueden requerir medios especiales para llevar a cabo pruebas convencionales donde el control de calidad es más difícil de mantener. (Bou y col., 2010)

Las ventajas al usar este tipo de micrométodos son: fácil de usar, menor cantidad de reactivo usado, menor espacio de almacenamiento, mayor número de pruebas, tiempo de almacenamiento mayor a 6 meses en condiciones adecuadas de humedad, fácil de leer, mayor reproducibilidad, mayor precisión. Las desventajas son: mayor riesgo de contaminación entre cada pozo.

Algunos sistemas comerciales múltiples para identificación de bacterias Gram negativas son:

Sistemas API

a) API 20E

La batería de pruebas API 20E es usado para la identificación de la familia *Enterobacteriaceae*, bacterias Gram negativas no fermentadoras y otras bacterias Gram negativas. Consiste en una tira de plástico con microtubos que contienen sustratos deshidratados. En ellos se inocula una suspensión de microorganismos y ponen de manifiesto 21 características bioquímicas. Para la lectura de los resultados se requiere de 24 horas de Incubación (condiciones aeróbicas). (Biomérieux, 2010)

b) API Rapid 20E (RE)

Es un sistema usado para la identificación de la familia *Enterobacteriaceae*. Este sistema que da resultados a las cuatro horas, es similar a API 20E pero con algunas modificaciones, las cúpulas de RE son más pequeñas y los sustratos no tienen buffer por lo que permite reacciones más rápidas. Su tiempo de incubación es de 4 horas a 37°C. (Biomérieux, 2010)

c) API 20 NE

El API 20 NE es un sistema para la identificación de bacilos Gram negativos no enterobacterias que combina 8 pruebas convencionales y 12 de asimilación. El kit consta de una galería con 20 microtubos conteniendo medios y/o sustratos en forma deshidratada. Se inoculan con una suspensión bacteriana en solución salina de la cepa a analizar y en un periodo de incubación de 24-48 horas a 30 °C se pueden observar cambios de color en el medio, directamente o tras la adición de reactivos. Las pruebas de asimilación se realizan en un medio mínimo, donde se observa crecimiento bacteriano si la cepa en estudio es capaz de utilizar el sustrato correspondiente. La interpretación se realiza sumando las pruebas positivas por tríos. Se obtiene un número clave para la bacteria en cuestión, que puede ser buscado en una tabla de códigos. (Biomérieux, 2010)

BBL Enterotube II

Este sistema consiste de un tubo de plástico con medios de cultivo diferentes, que permiten la determinación de hasta 15 reacciones bioquímicas. Está diseñado para la inoculación simultánea de los medios con una sola colonia, utilizando la aguja de inoculación dispuesta en el centro. La combinación de reacciones resultante, junto con la guía de interpretación (libro de códigos), permite la identificación de miembros de la familia *Enterobacteriaceae* con importancia clínica. (Becton, Dickinson and Company 2007)

OXI/FERM Tube II (Becton Dickinson)

Es un sistema para la identificación de bacilos Gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos, oxidasa positivo. Consiste en un tubo de plástico de 12 medios de cultivo que permite la realización simultánea de 14 pruebas bioquímicas. Su incubación es a 35°C y su interpretación es a partir de las primeras 5 horas. (Koneman, 2009)

UniScept 20E

Es un sistema usado para la identificación de la familia *Enterobacteriaceae*, bacterias Gram negativas no fermentadoras y otras bacterias Gram negativas. Consta de una tira de plástico con microtubos que contiene 23 sustratos deshidratados que permite la determinación de 23 reacciones bioquímicas. El tiempo de incubación para su interpretación es de 24-48 h. (Gerhardt, 2001)

Entero-set 20

En este sistema se ponen de manifiesto 20 características bioquímicas para diferenciar Géneros de la familia *Enterobacteriaceae*, donde se utiliza una tarjeta con 20 unidades, capilares que contienen 20 reactivos. En ellos se hace pasar una colonia aislada, su interpretación se realiza de 20 a 24 horas. (Koneman, 2009)

Sistema Micro-ID

Se utilizan discos de papel impregnados con sustratos y reactivos para diferentes miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Consiste en una bandeja de plástico moldeado con tapa en bisagra, contiene 15 cámaras de pruebas, para detectar la presencia específica de enzimas o productos metabólicos. Se inoculan las cámaras con una suspensión bacteriana y su interpretación se realiza a partir de las primeras 4 horas de incubación. (Heredia, 2004)

Sistema VITEK

Este sistema consiste de una tarjeta plástica que contiene 30 sustratos bioquímicos en forma deshidratada, se basa en cambios de color y en la producción de gas de los cultivos inoculados en los pocillos. Este es un sistema automatizado para la realización de las pruebas de identificación y antibiograma. Está constituido por un inoculador/sellador, que permite la inoculación de las tarjetas en pocos minutos, un incubador/lector, asegura simultáneamente la

incubación y la lectura de las tarjetas para una capacidad que varía de 32 a 480 tarjetas según el modelo y de un ordenador equipado con los programas que el equipo requiere para efectuar un control permanente de las operaciones en curso, memoriza los valores e interpreta los resultados. (Herranz, 2008. Biomérieux, 2012)

Sistema Rapid OnE (Remel)

Es un método cualitativo que utiliza sustratos convencionales y cromogénicos para la identificación de enterobacterias y otras bacterias Gram negativas oxidasa negativas. Cada panel Rapid OnE tiene 18 cavidades de reacción formadas en la periferia de una bandeja descartable de plástico. Las cavidades de reacción contienen sustratos deshidratados y la bandeja permite la inoculación simultánea de cada cavidad con una cantidad predeterminada de inóculo. Los paneles inoculados se colocan en las bandejas de incubación de manera aglomerada provistas en el paquete e incubadas a 35°C durante 4 horas. (Koneman, 2009)

MEFAQUI

Es un sistema usado para la identificación de bacilos Gram negativos estandarizado en la Facultad de Química. Es un método que consta de una placa de microtitulación de 96 pozos con 26 sustratos deshidratados que son colocados por duplicado para la identificación de 2 microorganismos por medio de 28 reacciones bioquímicas. Cada pozo con sustrato es inoculado con una concentración del 1 de MacFarland de una suspensión bacteriana, que tras un período de incubación de 24 horas a 37°C se puede observar virajes de color en el medio, directamente o tras la adición de reactivos. (Rojo, 2002)

3. JUSTIFICACIÓN

Expertos del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de Atlanta en EEUU, advirtieron en julio del 2007, que sigue prohibida la venta de tortugas pequeñas como mascotas a los niños estadounidenses desde 1975, como consecuencia de infecciones por *Salmonella* sp. asociadas a éstas y que en ocasiones estas infecciones han sido mortales. Por ejemplo, un bebé de tres semanas de nacido en Florida murió a causa de salmonelosis por estar en contacto con una tortuga que le fue regalada como mascota, así como el caso de 19 personas, la mayoría niños, de 11 estados de la unión americana, los cuales enfermaron con *Salmonella* sp., luego de haber manipulado tortugas en mercados o tiendas de mascotas, por lo que en su boletín semanal de morbilidad y mortalidad (*Morbidity and Mortality Weekly Report*), muestra que los reptiles y anfibios, como las tortugas que son utilizadas como mascotas, producen alrededor del 6% de todos los casos de salmonelosis y del 11% de éstas infecciones en sujetos menores de 21 años.

En México no hay reportes de este tipo de infecciones causadas por reptiles, de ahí que se desconoce si las tortugas que son adoptadas como mascotas son causa de alguna infección por *Salmonella* sp. en la población. En este trabajo se pretende comprobar que las tortugas son portadoras de *Salmonella* sp. a través del aislamiento de éste microorganismo del agua de los tortugeros donde las mantienen.

4. OBJETIVO GENERAL

Aislar e identificar cepas del Género *Salmonella*, obtenidas a partir de agua de expendios de tortugas y tortugeros domésticos.

4.1 Objetivos particulares

3.1.1. Aislar *Salmonella* sp., a partir del agua de los tortugeros domésticos y de expendios de tortugas.

3.1.2. Identificar *Salmonella* sp., por medio del método convencional de pruebas bioquímicas.

3.1.3. Identificar *Salmonella* sp., por medio del método miniaturizado MEFAQUI.

3.1.4. Aglutinar con antisuero polivalente S-1 a las cepas presuntivas de *Salmonella* sp.

5. HIPOTESIS

Si las tortugas son portadoras del Género *Salmonella* entonces se podrá aislar a este microorganismo del agua de los tortugeros.

6. EQUIPO, MATERIAL Y REACTIVOS

- Equipos:
 - Congelador REVCO (EQUIPAR S.A de C.V)
 - Autoclave (Hirayama)
 - Balanza analítica (OHAUS)
 - Campana de flujo laminar (VECO)
 - Incubadora a 37°C (Riossa)
 - Liofilizadora Freeze Dryer 3 (LABCONCO)
 - Refrigerador (AMERICAN)
 - Centrifugadora
- Material:
 - Placas de microtitulación estéril de 96 pozos de fondo en U (COSTAR)
 - Membrana de nitrocelulosa de 0.45µm de poro (Millipore)
 - Puntas de polietileno color amarillo estériles (Rainin Instrument C.A.INC)
 - Porta puntas (Rainin Instrument C.A.INC)
 - Micropipeta 100µL Finnpipette (Labsystems)
 - Material de laboratorio
 - Equipo de filtración Swinnex (Millipore)
 - Tubos para centrifuga de 50mL
- **Reactivos**
 - Lugol
 - Rojo de Metilo
 - Alfa naftol
 - Hidróxido de potasio
 - Zinc
 - Griss A
 - Griss B
 - Erlich o Kovaks
 - Cloruro Férrico
 - Aceite mineral

➤ **Sustratos y
medios de cultivo**

Glucosa (SIGMA)
Urea (SIGMA)
Lisina (SIGMA)
Ornitina (SIGMA)
Arginina (SIGMA)
Trehalosa (SIGMA)
Lactosa (SIGMA)
Sacarosa (SIGMA)
Manitol (SIGMA)
Maltosa (SIGMA)
Xilosa (SIGMA)
Ramnosa (SIGMA)
Rafinosa (SIGMA)
Sorbitol (SIGMA)
Inositol (SIGMA)
Dulcitol (SIGMA)
Salicina (SIGMA)
Arabinosa (SIGMA)
Nitrato de potasio
Polipeptona
Fosfato dipotásico
Fosfato monopotásico
Peptona de caseína
Cloruro de sodio
Citrato de sodio
Tiosulfato de sodio
Sulfato férrico 10%
Sulfato de magnesio
Rojo de fenol
Azul de bromotimol
Medio SIM

Medio RM-VP
Caldo Nitrato (SIGMA)
Caldo Fenilalanina (Bioxon)
Caldo Malonato (Bioxon)
Extracto de carne
Urea
Monofosfato de amonio
Extracto de levadura
Base de Mouller
Medio OF
Medio CTA
Medio BHI
Medio Citrato de Simmons
Suero polivalente para *Salmonella* Vi s-1 y *Salmonella*
del grupo A-I

7. MÉTODOLÓGÍA

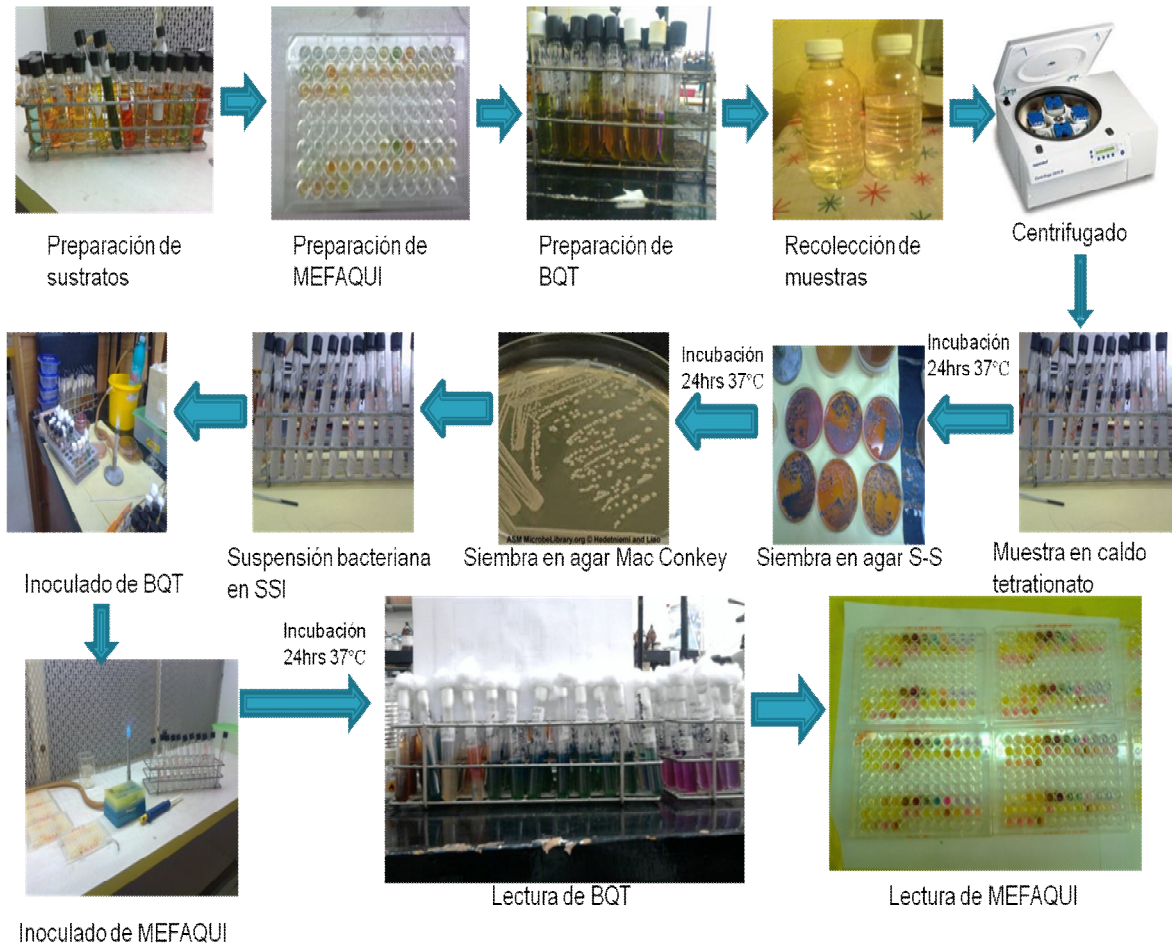


FIGURA 2. Diagrama de flujo de la metodología utilizada para el aislamiento e identificación del Género *Salmonella*.

7.1 Preparación de sustratos para las pruebas bioquímicas en tubo (método convencional)

Se prepararon 12 sustratos: SIM, Caldo VP-RM, Caldo Nitrato, Agar Citrato de Simmons, O/F de glucosa, O/F de lactosa, Caldo malonato-fenilalanina, Agar Hierro de Kligler, Caldo Urea, Lisina, Ornitina y Arginina, de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

7.2 Preparación de sustratos para las pruebas bioquímicas miniaturizadas.

Se prepararon 26 sustratos a doble concentración, de acuerdo con MacFaddin (2003), todos los sustratos se esterilizaron por filtración con membranas. Los sustratos preparados se mencionan a continuación:

Para la fermentación de hidratos de carbono: GLU, LAC, SAC, MAN, XIL, RAM, RAF, SOR, INO, DUL, SAL, ARA.

Para la asimilación de sustratos: CIT y MAL.

Para las reacciones de descarboxilación de aminoácidos: LIS; ORN y ARG.

Para la desaminación de aminoácidos: FDA.

Otras pruebas: NIT; Hidrólisis de URE; RM; VP; H₂S; IND; Oxido/Fermentación de la Glucosa (O/Fglu).

Como control de calidad de los sustratos, las placas se inocularon con dos cepas de referencia: *Enterobacter aerogenes* y *Proteus vulgaris*.

7.3 Preparación de MEFAQUI en placas de microtitulación.

En una placa de microtitulación, se agregaron en condiciones asépticas con una micropipeta 100 μ L cada uno de los sustratos por pozo. Todas las actividades se realizaron dentro de una campana de flujo laminar vertical. Las placas se colocaron a -72°C en un ultracongelador por 24 horas; se liofilizaron por 4 horas a -44°C y 22 pulgadas de Hg de presión, se envolvieron en papel kraftin, se colocaron en bolsas de plástico. Se almacenaron en un lugar seco y fresco hasta su uso.



FIGURA 3. Sustratos preparados a doble concentración para la realización del micrométodo MEFAQUI



FIGURA 4. Llenado de la placa de microtitulación para la realización del micrométodo MEFAQUI con cada uno de los sustratos



FIGURA 5. Placa de microtitulación para la realización del micrométodo MEFAQUI después de ser liofilizados los sustratos

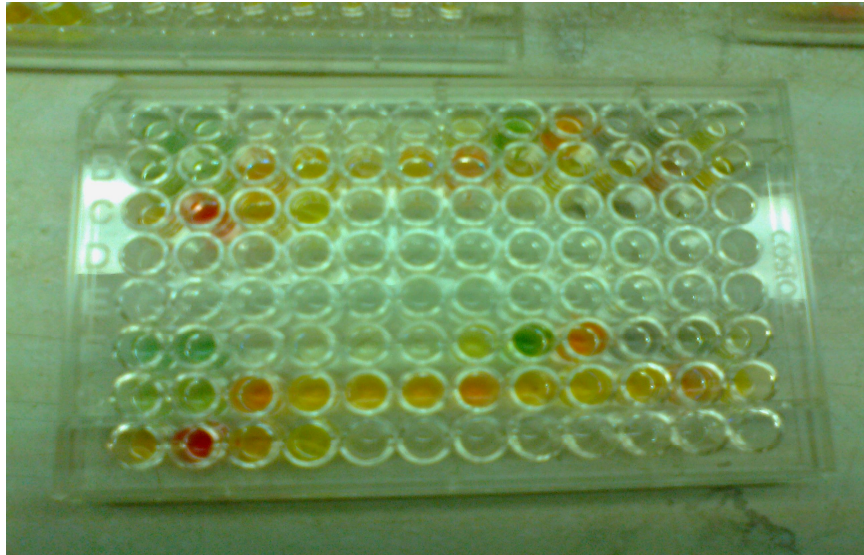


FIGURA 6. Placa de microtitulación para la realización del micrométodo MEFAQUI después de ser inoculados los pozos y antes de la incubación

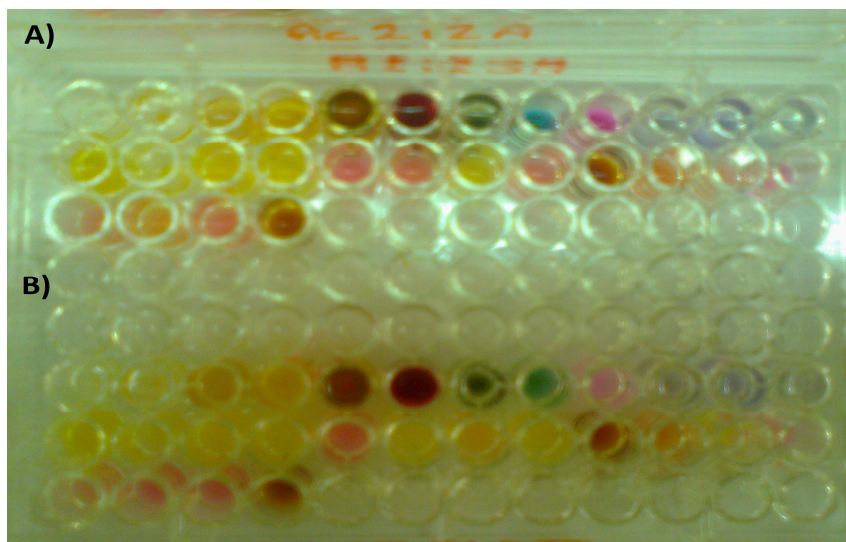


FIGURA 7. Placa de microtitulación para la realización del micrométodo MEFAQUI después de incubación a 37°C, donde se puede observar en A) *Proteus mirabilis* y en B) *Salmonella* sp.

7.4 Preparación de medios de cultivo

Todos los medios de cultivo se prepararon de acuerdo a las instrucciones del proveedor: El caldo tetrionato en tubos de 16 X 150mm con tapón de rosca. El Agar *Salmonella-Shigella* y agar MacConkey en placas de Petri. El medio CTA en tubos de 13x100 con tapón de rosca. Una vez preparados se guardaron a 4° C hasta su uso.

7.5 Procesamiento de las muestras (agua de tortugeros) y aislamiento

Se obtuvieron 50 muestras de agua de tortugeros de las cuales 29 provienen de acuarios y 21 de tortugeros domésticos.

Las muestras se colocaron en tubos para centrifuga, se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante, el sedimento se depositó en tubos con caldo tetrionato, se les agregó unas gotas de lugol y se incubó a 37°C por 24 hrs. Con asa bacteriológica se tomó una asada y se inoculó por estría cruzada en agar SS y se incubó a 37°C por 24 horas. Las colonias con características de *Salmonella* sp. se seleccionaron y resembraron en agar MacConkey, se incubaron a 37°C por 24 hrs. Las colonias lactosa negativa se resembraron en agar MacConkey, se incubaron a 37°C por 24 hrs, una vez obtenidas las colonias lactosa negativa se guardaron en agar CTA para su posterior identificación.

7.6 Identificación de las cepas mediante bioquímica en tubo y MEFAQUI

Todas las cepas se reactivaron en caldo BHI y se incubaron a 37°C por 24 hrs, se sembraron en agar MacConkey por estría cruzada, se incubaron a 37°C por 24 horas, cada una de las cepas se inoculó en los sustratos para las pruebas bioquímicas en tubo y se incubaron a 37°C por 24 horas.

Para inocular las placas de microtitulación, primero se preparó una suspensión bacteriana en tubos de 16x150 con tapón de rosca con 10 mL de solución salina isotónica (SSI) estéril a la concentración 1 de la escala de Mac Farland. En condiciones asépticas, en la campana de flujo laminar vertical, se depositaron 100 µL de la suspensión bacteriana para cada sustrato (pozo). Después de la incubación a 37°C por 24 horas, se agregaron los reactivos correspondientes para revelar las pruebas que así lo requirieron. Todos los resultados se interpretaron de acuerdo al MacFaddin (2003).

7.7 Conservación de las cepas

Se preparó 3mL de caldo BHI con glicerol al 15% en tubos de 13X100 de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

Se inocularon los tubos con cada una de las cepas y se transfirieron a tubos eppendorf y se guardaron en un ultracongelador a -70°C

7.8 Aglutinación de *Salmonella* sp.

Las cepas con identificación presuntiva de *Salmonella* sp, fueron aglutinadas con el antisuero polivalente S-1 [Salmonella del grupo A al I, más el antígeno Vi (Sanofi Pasteur)].

7.9 Ecuaciones para determinar la sensibilidad, especificidad y exactitud

La sensibilidad indica la frecuencia de los resultados positivos en ambos métodos (verdaderos positivos), esto es positividad expresada en porcentaje

Ecuación 1.....
$$S = \frac{VP}{VP + FN} \times 100$$

VP= Verdadero Positivo

FN= Falso Negativo

La especificidad indica la frecuencia de resultados negativos para ambos métodos (verdaderos negativos):

Ecuación 2.....
$$Es = \frac{VN}{VN + FP} \times 100$$

VN= Verdadero Negativo

FP= Falso Positivo

La exactitud de una prueba indica el porcentaje de los métodos que dan positivos y negativos, las pruebas que son interpretadas correctamente.

Ecuación 3.....
$$Ex = \frac{VP + VN}{VP + FP + VN + FN} \times 100$$

8. RESULTADOS

De las 50 muestras de agua de tortugeros procesadas se logró aislar un total de 44 cepas sospechosas de ser *Salmonella* sp., de las cuales 16 fueron conseguidas de 29 muestras de tortugeros de establecimientos vendedoras de estos animales y las 28 cepas restantes de 21 muestras de tortugeros domésticos (TABLA 5). Todas las cepas fueron llevadas a identificación por medio de los dos métodos, el método convencional de identificación bacteriana (prueba en tubo) y MEFAQUI (Rojo 2003), los resultados obtenidos de la caracterización de las cepas fueron similares en cuanto a la identificación (TABLA 6), por lo que se logró obtener un total de 15 cepas pertenecientes al Género *Salmonella*, de estas 5 (10%) fueron aisladas de muestras de tortugeros de establecimientos expendedoras y 10 (20%) de muestras de tortugeros domésticos. Del resto de las cepas, 11 pertenecieron al Género *Proteus*, 2 al Género *Citrobacter*, 2 al Género *Pantotea*, 2 al Género *Shigella*, 3 al Género *Shewanella*, 4 al Género *Edwardsiella*, 1 al Género *Escherichia*, 2 al Género *Pseudomonas* y 2 al Género *Aeromonas* (TABLA 5).

De las 15 cepas con identificación presuntiva de *Salmonella* sp. 6 de ellas fueron aglutinadas con el antisuero polivalente para *Salmonella* Vi S-1 y *Salmonella* del grupo A-I, las 6 cepas aglutinaron con el suero polivalente Vi y dos de ellas aglutinaron con el suero del Grupo B (TABLA 7).

TABLA 5. Número de cepas aisladas de acuarios y de tortugeros domésticos.

MUESTRA	GÉNERO									
	<i>Salmonella</i>	<i>Proteus</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Pantoea</i>	<i>Shigella</i>	<i>Shewanella</i>	<i>Edwardsiella</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Aeromonas</i>
ACUARIO	5	6	0	0	0	2	3	0	0	0
DOMÉSTICO	8	5	2	2	2	1	1	1	2	2

TABLA 6. Comparación de las pruebas de identificación bioquímica por MEFAQUI y el método convencional para la identificación del Género *Salmonella*.

No.	1		2		3		4		5		6		7		8	
CEPAS	<i>Salmonella</i> sp.		<i>Salmonella</i> sp.		<i>Salmonella</i> sp.		<i>Salmonella</i> sp.		<i>Salmonella</i> sp.		<i>Salmonella</i> sp.		<i>Salmonella</i> sp.		<i>Salmonella</i> sp.	
BQ's	MF	BQT	MF	BQT	MF	BQT	MF	BQT	MF	BQT	MF	BQT	MF	BQT	MF	BQT
OX/GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FER/GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RM	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NIT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₂ S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
CIT	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
UREA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LIS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
ORN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARG	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MAL	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
TREH	+		+		+		+		+		-		+		+	
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LAC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAC	-		-		-		-		-		+		-		+	
MAN	+		+		+		+		+		+		+		+	
MALT	+		-		-		+		+		-		-		+	
XIL	-		+		-		-		+		-		+		-	
RAM	-		-		-		+		+		-		+		+	
RAF	-		-		-		-		-		-		-		-	
SOR	-		-		-		+		+		-		-		+	
INO	-		-		-		+		+		-		+		-	
DUL	-		-		-		-		+		-		+		+	
SAL	-		-		-		-		-		-		-		-	
ARA	+		+		+		+		+		-		-		-	

MF= MEFAQUI BQT= BIOQUIMICA EN TUBO

Continuación TABLA 6.

TABLA 6. Comparación de las pruebas de identificación bioquímica por MEFAQUI y el método convencional para la identificación del Género *Salmonella*.

No.	9		10		11		12		13		14		15	
CEPAS	<i>Salmonella</i> sp.		<i>Salmonella</i> sp.		<i>Salmonella</i> sp.		<i>Salmonella</i> sp.		<i>Salmonella</i> sp.		<i>Salmonella</i> sp.		<i>Salmonella</i> sp.	
BQ's	MM	BQT	MM	BQT	MM	BQT	MM	BQT	MM	BQT	MM	BQT	MM	BQT
OX/GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FER/GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RM	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NIT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₂ S	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
CIT	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
UREA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LIS	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
ORN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARG	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
FDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MAL	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
TREH	+		+		+		+		-		+		+	
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LAC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAC	-		-		-		-		-		-		+	
MAN	+		+		+		+		-		-		+	
MALT	-		+		+		+		-		-		-	
XIL	-		+		+		+		-		-		-	
RAM	-		+		+		+		-		-		-	
RAF	-		-		-		-		-		-		-	
SOR	-		-		-		+		-		-		-	
INO	-		+		+		+		-		-		-	
DUL	-		+		+		+		-		-		-	
SAL	-		-		-		-		-		-		-	
ARA	+		+		+		+		-		-		-	

MF= MEFAQUI BQT= BIOQUIMICA EN TUBO

TABLA 7. Resultados de la aglutinación con el suero Polivalente A-I + Vi y grupo B de las 6 cepas presuntivas de *Salmonella* sp.

MUESTRA	Poli A-I + Vi	<i>Salmonella</i> grupo B
1. <i>Salmonella</i>	+	-
2. <i>Salmonella</i>	+	-
3. <i>Salmonella</i>	+	+
4. <i>Salmonella</i>	+	-
5. <i>Salmonella</i>	+	+
6. <i>Salmonella</i>	+	-

En cuanto a la comparación de las pruebas de identificación realizadas a las cepas de *Salmonella* sp. por los dos métodos y comparadas con la bibliografía, se pudo observar una concordancia del 87%, debido a que en MEFAQUI de las 15 cepas de *Salmonella* sp. identificadas por la bioquímica en tubo, sólo pudo reconocer 13, porque no se observó la producción de H₂S en dos cepas. Así mismo, los sustratos que también dieron reacción diferente en los dos métodos, pero que no causaron cambio en la identificación fueron RM, H₂S, CIT, LIS, ARG y MAL (TABLA 8). De estos, podemos resaltar que el MAL tuvo 5 reacciones diferentes, mientras que el CIT presenta 4, el RM 3, LIS y ARG 1 cada una de reacciones desiguales entre los dos métodos, en comparación con la literatura (Murray, 2007).

TABLA 8. Sustratos que presentaron diferencias en la reacción por los dos métodos.

SUSTRATO	TOTAL	REACCIÓN	MM	BQT
RM	3	Positiva	0	3
		Negativa	3	0
H ₂ S	2	Positiva	0	2
		Negativa	2	0
CIT	5	Positiva	0	5
		Negativa	5	0
LIS	2	Positiva	2	0
		Negativa	0	2
ARG	1	Positiva	0	1
		Negativa	1	0
MAL	6	Positiva	2	4
		Negativa	4	2

De acuerdo a la comparación de los resultados obtenidos para la caracterización de las 44 cepas aisladas, por los dos métodos se determinó la eficiencia de los sustratos que presentan diferencias en la identificación (TABLA 8), donde se observaron diferentes porcentajes de sensibilidad (ecuación 1), especificidad (ecuación 2) y exactitud (ecuación 3) para cada uno de ellos por los dos métodos (MEFAQUI y método convencional) los resultados se pueden observar en la TABLA 9. Donde se resalta que el RM presentó una sensibilidad del 76.9%, una especificidad del 100% y una exactitud del 80%, el H₂S presentó una sensibilidad del 86.7%, una especificidad del 0% y una exactitud del 86.7%, el CIT presentó una sensibilidad del 58.3%, una especificidad del 100% y una exactitud del 66.7%, la LIS presentó una sensibilidad del 100%, una especificidad de 33.3% y una exactitud del 86.7%, la ARG presentó una sensibilidad del 92,3%, una especificidad del 100% y una exactitud del 93.3%, el MAL presentó una sensibilidad del 0%, una especificidad del 81.8% y una exactitud del 60%. (TABLA 9)

TABLA 9. Sensibilidad, especificidad y exactitud de los sustratos para las 44 cepas identificadas por los dos métodos.

Sustrato	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Exactitud (%)
RM	76.9	100	80
H ₂ S	86.7	0	86.7
CIT	58.3	100	66.7
LIS	100	33.3	86.7
ARG	92.3	100	93.3
MAL	0	81.8	60

9. ANALISIS DE RESULTADOS

En USA desde la década de los 70's el CDC ha reportado, que las tortugas no pueden ser mascotas para los infantes, debido a la colonización de estas con *Salmonella* sp. Desafortunadamente en México no existen reportes o estudios por parte de la Secretaría de Salud donde se involucre a las tortugas como causantes de infecciones por *Salmonella* sp., en el presente estudio se logró aislar e identificar 15 (30%) cepas de *Salmonella* sp., a partir de 50 muestras de agua de tortugeros obtenidas de establecimientos expendedoras de tortugas y tortugeros domésticos. Con éste resultado se puede decir al igual que lo reportado por el CDC, que las tortugas son portadoras de *Salmonella* sp. y por lo tanto sí es posible aislar a éste microorganismo del agua donde se encuentran. Es importante resaltar, que el 20% de los aislados proviene de tortugeros domésticos, lo que podríamos asumir que no hay un recambio continuo del agua de los tortugeros y se van acumulando los microorganismos. Además, se puede resaltar que el Género *Salmonella* no fue el único patógeno que se logró aislar sino que también otros como:

Shigella que es un Género de bacterias que pueden ocasionar diarreas en los seres humanos, la infección, típicamente comienza por contaminación fecal-oral. Dependiendo de la edad y la condición del hospedador, puede ser la causa de disentería, resultado de la destrucción de células epiteliales de la mucosa intestinal a nivel del ciego y el recto.

Edwardsiella que es un Género que se asemeja a las *Salmonella* sp. en algunos aspectos bioquímicos y a veces en su patogenicidad. Ya que, la especie *E. tarda* es la única del género que produce enfermedad en los humanos misma que puede llegar a producir gastroenteritis en el 50 a 80% de los casos, produciendo infección leve en la mayoría, o grave en ocasiones.

Aeromonas que es un Género al que se le han descrito catorce especies, la mayoría de las cuales están asociadas con enfermedades humanas. Las especies más importantes son *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii* biovar sobria. Las dos

principales enfermedades asociadas con *Aeromonas* son la gastroenteritis y las infecciones de heridas, con o sin bacteriemia. La gastroenteritis generalmente se produce por la ingestión de agua o de alimentos contaminados, mientras que las infecciones de heridas son el resultado de la exposición al agua contaminada.

Por lo que se puede recomendar, que las tortugas no sean usadas como mascotas o en su caso, hacer un recambio continuo del agua de tortugeros y de esta forma evitar en lo posible la transmisión de este patógeno potencial a niños que las adquieren como mascotas.

Por otro lado, en cuanto a la correlación de los 2 métodos bioquímicos, tenemos que Rojo Alatorre en su estudio no midió la concordancia entre el micrométodo y el método convencional de identificación bacteriana por sustrato, sólo realizó la comparación a nivel de identificación, mientras que en este estudio se comparó la correlación para cada sustrato en identificación realizada a las cepas de *Salmonella* sp. por los dos métodos y comparadas con la bibliografía, donde se pudo observar, que de los 29 sustratos en 6 de ellos se vio que el MAL tuvo 5 reacciones diferentes, mientras que el CIT presentó 4, el RM 3, H₂S 2, LIS y ARG 1 cada una de reacciones desiguales entre los dos métodos. Además hay que resaltar que 6 de las cepas con identificación presuntiva de *Salmonella* sp. fueron aglutinadas con suero polivalente para *Salmonella* sp., donde se obtuvo una aglutinación positiva.

En general para las 44 cepas se logró tener un porcentaje en la identificación del 95% para MEFAQUI. Este porcentaje es debido a que dos cepas presuntamente como *Salmonella* sp. presentaron reacción diferente en la producción de H₂S para MEFAQUI, que en la bibliografía la refiere como una identificación contraria a la bioquímica en tubo. Además, se encontraron diferencias en la lectura de 6 sustratos más, lo cual no fue motivo para cambiar la identificación de las cepas al ser comparadas con tablas en la bibliografía (Murray, 2007). Al extender la semejanza de los sustratos en las 44 cepas se observa que existieron 19 diferencias en los dos métodos, que al compararlos con la bibliografía se observó

para MEFAQUI 6 reacciones con el mismo resultado que el indicado en la literatura, en 8 un resultado diferente y en las 5 restantes la literatura indica que hay reacción variable, por lo que estos últimos no pueden ser considerados una buena comparación con los resultados de MEFAQUI, debido a que cualquier resultado que se obtenga, ya sea positivo o negativo no es un buen indicador confiable.

Es así que, al hacer la comparación de MEFAQUI con la literatura (Murray, 2007) los sustratos donde hubo un mayor número de divergencias entre los dos métodos fue el MAL con 6 reacciones diferentes de las cuales 2 son positivas y 4 negativas, al hacer la comparación con la bibliografía 4 son iguales y 2 son diferentes. Para el Citrato se observaron 5 reacciones diferentes de las cuales 5 fueron negativas, está nos indica que no se puede hacer una comparación ya que para *S. tiphy* tiene que ser una reacción negativa pero para otras especies de *Salmonella* es variable por lo tanto el Citrato presenta resultados confiables al no tener resultados diferentes a los reportados en la bibliografía. En RM se observaron 3 reacciones diferentes al reportado en la bibliografía. En H₂S se vieron 2 reacciones diferentes de las cuales 2 son negativas, al comparar el micrométodo con tablas, las 2 reacciones fueron diferente al reportado en la literatura. Para LIS se observaron 2 reacciones que mostraron diferencias, las cuales fueron positivas, la comparación con tablas nos dice que las 2 son iguales al de la literatura. En ARG se observó una reacción diferente al método convencional que fue negativa, para MEFAQUI en la comparación, la reacción observada con la bibliografía, es diferente al reportado en está.

Rojo Alatorre reportó una sensibilidad, especificidad y exactitud por arriba del 90% en la identificación, en este estudio se obtuvo la sensibilidad, especificidad y exactitud para cada uno de los sustratos donde 20 de ellos obtuvieron sensibilidad, especificidad y exactitud por arriba del 90%, los 6 restantes (RM, H₂S, CIT, LIS, ARG y MAL) fue como sigue: el RM presentó una sensibilidad del 76.9% , una especificidad del 100% y una exactitud del 80%, el H₂S presentó una

sensibilidad del 86.7% , una especificidad del 0% y una exactitud del 86.7%, el CIT presentó una sensibilidad del 58.3%, una especificidad del 100% y una exactitud del 66.7%, la LIS presentó una sensibilidad del 100%, una especificidad de 33.3% y una exactitud del 86.7%, la ARG presentó una sensibilidad del 92,3%, una especificidad del 100% y una exactitud del 93.3%, el MAL presentó una sensibilidad del 0%, una especificidad del 81.8% y una exactitud del 60%. Con estos resultados se puede decir que MEFAQUI es confiable en la identificación, pero si es recomendable hacer mejoras en los sustratos para tener una mayor confiabilidad en los resultados.

10. CONCLUSIONES

- Se logró aislar e identificar a 15 cepas del Género *Salmonella* de las cuales 5 fueron aisladas de muestras de agua de tortugeros de establecimientos expendedores de tortugas y 10 de muestras agua de tortugeros domésticos.
- El 20% de los aislamientos de *Salmonella* sp. son de tortugeros domésticos.
- Se lograron aislar otros patógenos como *Shigella* sp., *Edwardsiella* sp., *Aeromonas* sp.
- La comparación en la identificación bacteriana por los 2 métodos bioquímicos, MEFAQUI obtuvo un 95% de concordancia con la bioquímica en tubo.
- MEFAQUI es un test bioquímico con resultados confiables.

11. SUGERENCIAS Y PERSPECTIVAS

- Se debe realizar un recambio continuo del agua de los tortugeros domésticos para evitar alguna infección causada por *Salmonella* sp.
- Se debe prohibir la venta de tortugas como mascotas debido a que pueden ser una fuente potencial para la transmisión de *Salmonella* sp.
- Realizar el mismo procedimiento pero ahora en busca de bacterias Gram positivas.
- Realizar PCR a todas las cepas de *Salmonella* sp.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ✓ Amorocho R, García A. 2008. Sepsis por *Edwardsiella tarda* y asociación con anemia falciforme: reporte de caso y revisión de la literatura. Medicina & Laboratorio. Volumen 14, Números 1-2. pp. 43-48
- ✓ Balows, A. 2005. Manual of Clinical Microbiology. Editorial American Society for Microbiology. 5a Edition. Washington. pp. 371
- ✓ Barbour, E. Chacra N. 2007. Performance, bacterial shedding and microbial drug resistance in two tortoise species. The Veterinary Record, July 14.
- ✓ Barragán, F. Karol, B. 2002. Enfermedades de reptiles y anfibios. Boletín GEAS, volumen III, Núm. 1 – 6
- ✓ Bou, G. Fernández, A. García, C. Sáenz, J. Valdezate, S. 2010. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
- ✓ Caffer M, Terragno R. 2001 Manual de procedimientos para la caracterización de *Salmonella*. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Buenos Aires, Argentina.
- ✓ Carriquiriborde, M. 2010. Enfermedades zoonóticas asociadas a reptiles. Revista Veterinaria Argentina, 27(267). De: Temas de Zoonosis IV, capítulo 48. pp. 1-6

-
- ✓ Castro N, Toranzo A, Magariños B. 2009. Avances en el conocimiento del patógeno emergente de rodaballo *Edwardsiella tarda*. Revista Real Academia Galega de Ciencias. Vol. XXVIII. pp. 215-281.
 - ✓ Centro de vigilancia sanitaria veterinaria (VISAVET). 2008. Métodos rápidos y automatización en microbiología alimentaria. 8 de Febrero.
 - ✓ Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos (CIEMA). 2000. Microbiología de los alimentos. Vol. 1. 2da edición. Editorial Acribia, S.A. España. pp. 169-172
 - ✓ Ebani et al. 2005. *Salmonella enterica* isolates from faeces of domestic reptiles and study of their antimicrobial in vitro sensitivity. Res. Vet. Science. Vol. 78 (2):117-121
 - ✓ Espinoza, E. 2007. Identificación de *Salmonella* sp., mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa anidado (Nested PCR) y técnicas convencionales en huevos recolectados en los principales mercados de la ciudad de la paz. Revista: Visión científica. No 2. Vol. 1. pp. 10-16
 - ✓ Fontanilla, J. García, C. De Gaspar I. 1999. Los reptiles, Biología comportamiento y patología. Ediciones Mundi-Prensa. España. pp. 20
 - ✓ Gerhardt, P. 2001. Methods for General and Molecular Bacteriology. Editorial American Society for Microbiology. Washington. pp. 418, 636-637
 - ✓ Gillespie, S. 2005. Principles and Practice of Clinical Bacteriology. Segunda edición. Editorial Jonh Wiley & Sons, Ltd. Inglaterra. pp. 368-374

-
- ✓ Heredia, N. 2004. Métodos rápidos modernos. Revista de la Facultad de Salud Pública y Nutrición. No 5. Monterrey.
 - ✓ Herranz, C. 2008. Métodos rápidos y automatización en microbiología alimentaria. Dpto. de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Madrid. pp. 111
 - ✓ Katime, Abraham. 2006. Reacción de Widal, interpretación clínica. Rev Panam Infectol. Colombia. pp. 40-44
 - ✓ Koneman, E. Allen, S. 2009. Diagnóstico microbiológico. Editorial Médica Panamericana. 3ra reimpresión. México DF. pp. 152-198, 272-289.
 - ✓ MacFaddin. 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial Médica Panamericana. Tercera edición. Estados Unidos. pp. 54-58, 92-93, 113-117, 192-194, 206-208, 223, 226-229, 291-293, 301-303, 306-308, 326-328, 345-346, 354-356, 362-363, 397-398, 411-415.
 - ✓ Madigan, M. Martinko, J. Parker, J. 2011. Biología de los Microorganismos. 10a Edición. Editorial Pearson. España 2006. pp. 107, 368- 386.
 - ✓ Murray, P. Baron, E. Jorgensen, J. 2007. Manual of Clinical Microbiology. 9° Edición. Editorial ASM Press. Estados Unidos. pp. 649-743.
 - ✓ Pachón, D. 2009. Aislamiento, identificación y serotipificación de Enterobacterias del Género Salmonella en una población de *Crocodylus inytermedius* y testudinos mantenidos en cautiverio en la estación de Biología tropical Roberto Franco de la facultad de ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Bogotá.

-
- ✓ Ryan, K. Ray, G. 2007. Microbiología Médica. Editorial Mc Graw Hill. 4a Edición. México. pp. 373-374.
 - ✓ Rodríguez, E. Gamboa, M. Hernández, F. García, J. 2006. Bacteriología General: Principios y prácticas de laboratorio. Primera edición. Editorial Universidad de Costa Rica. Costa Rica. pp. 307
 - ✓ Rojo M. 2003. Adaptación de un método miniaturizado para identificación de Enterobacterias y *Pseudomonas* para su uso en docencia e investigación. UNAM. México 2003.
 - ✓ Salazar, E. 2008. Utilidad del Sistema API 20NE para identificar especies del género *Acinetobacter* y otros bacilos Gram negativos no fermentadores. Revista de la sociedad Venezolana de microbiología. pp. 89-95.
 - ✓ Zaldl, M. López, C. Calva, E. 2006. Estudios mexicanos sobre *Salmonella*: epidemiología, vacunas y biología molecular. Revista Latinoamericana de Microbiología. Vol. 48, No. 2. Abril-Junio. pp. 121-125

En línea:

- ✓ U.S. Centers for Disease Control and Prevention, news release. 2-Feb 2012. Revisado: 11-Junio-2012
http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/news/fullstory_121564.html
- ✓ Identificación de *Enterobacteriaceae* mediante, BBL Enterotubell. Revisado: 11-Junio-2012
http://virus.usal.es/Web/demo_mr/Enterotube/Enterotubell.htm
- ✓ Chordata Bateson, 1885. Revisado 19-Febrero-2012

<http://www.testudines.org/Articulos/Apendices-y-Glosarios/Vocabulario-taxonomico/Chordata-Bateson,-1885.aspx>

- ✓ Zoo Barcelona. Revisado el 28-Junio-2012
<http://www.zoobarcelona.cat/es/conoce-el-zoo/animales-por-categorias/reptiles/>

- ✓ Arrascuelimo C. 2008. Revisado: 11-Junio-2012
<http://arrascuelimoclaudia.blogspot.mx/>

- ✓ Becton, Dickinson and Company. 2007. Revisado: 16-Junio-2012
<http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/ETUT/ES-IA-273176.pdf>

- ✓ Biomérieux. 2012. Revisado 16 de Junio 2012
http://www.biomerieux.es/servlet/srt/bio/spain/dynPage?doc=SPN_IND_FD A_PRD_G_PRD_NDY_7

- ✓ CDC 2007. Revisado 15 de Julio 2012
<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5626a1.htm>