BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

"Caracterizaci· n Microbiol· gica y Bioqu²mica de cepas de *Salmonella spp* y *Shigella spp* aisladas de muestras de agua residual"

"Microbiological and Biochemical Characterization of Salmonella spp and Shigella spp strains isolated from wastewater samples"

Tesis que para obtener el título de

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

MARLEN SERRANO HERNÁNDEZ

DIRECTORA:
NORMA ELENA ROJAS RUIZ

ABRIL 2025

BIO TECNOLOGÍA

Con todo mi amor para Marcela, Jorge, Jorge Arturo, Rubén y todos aquellos que, con su amor, apoyo incondicional y confianza en mí, han sido luz en mi camino. Este logro no es solo mío, sino de todos ustedes, que con su presencia han hecho de este camino una experiencia inolvidable.

"En lo invisible reside la clave de la vida. La microbiología nos recuerda que los seres más pequeños
pueden tener el mayor impacto en el mundo"

Agradecimientos

Desde lo más profundo de mi corazón, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a las personas que han sido mi guía, mi refugio y mi fortaleza en este camino.

En primer lugar, a mis padres y mi hermano, quienes han estado a mi lado no solo en la universidad, sino desde el primer día en que emprendí este largo viaje por el mundo del conocimiento. Gracias por cada palabra de aliento, por cada abrazo en los momentos de duda, por su paciencia infinita y por creer en mí incluso cuando ni yo misma lo hacía. Su amor ha sido mi mayor motor, y este logro también es suyo.

A mi amado Rubén Ortiz Aguilar, quien con su amor inquebrantable ha sido mi compañero en cada paso de esta travesía. Gracias por sostenerme cuando sentía que no podía más, por acompañarme en largas noches de estudio, por compartir conmigo el cansancio, los desvelos y, sobre todo, la ilusión de un futuro prometedor. Crecer a tu lado, tanto académica como personalmente, ha sido un privilegio. Eres una persona extraordinaria. Te amo con todo mi ser.

A esa pequeña bolita de pelos, mi fiel compañero de desvelos, mi dulce Cokie. Gracias por acurrucarte a mi lado en las noches más largas, por recordarme con tu ternura que incluso en los momentos de agotamiento siempre hay espacio para una caricia y un respiro. Tu amor incondicional me reconfortó más veces de las que podría contar.

A mis amigos, esos seres maravillosos que la vida puso en mi camino para llenarlo de risas, apoyo y compañía incondicional. Gracias por estar ahí, por cada palabra de aliento, por cada momento de distracción en medio del caos, por demostrarme que la verdadera amistad trasciende cualquier obstáculo. Y esa amistad entrañable que nació en la universidad y que ha estado conmigo desde el primer día hasta este momento. Gracias por todo el apoyo y los proyectos compartidos.

Por último, pero con un agradecimiento infinito, a mi asesora de tesis, la doctora Norma Elena Rojas Ruiz. Gracias por confiar en mí, por guiarme con paciencia y dedicación, por abrirme las puertas de su laboratorio, que durante meses se convirtió en mi segundo hogar. Gracias por transmitirme su amor por la ciencia y hacerme descubrir la pasión por la investigación. Al doctor Carlos Alberto Contreras Paredes y al doctor Alejandro Carabarin Lima, quienes con su apoyo y generosidad hicieron

posible este proyecto, y a todos esos maestros y docentes que me inspiraron con su conocimiento y vocación, sembrando en mí el deseo de seguir explorando las maravillas de la ciencia.

A todos ustedes, gracias. Porque en cada palabra de aliento, en cada gesto de apoyo, en cada momento compartido, han sido piezas fundamentales en este pequeño gran logro. Llevo su amor, su confianza y sus enseñanzas en cada paso que doy.

Tabla de contenido

RESUMEN 1
ABSTRACT 2
1. INTRODUCCIÓN 3
2. MARCO TEÓRICO 4
2.1. Características del género Salmonella. 11
2.2. Características del género Shigella. 18
2.3. Tinción de Gram. 22
2.4. Antibiogramas. 22
2.5. Conteo de bacterias. 23
2.6. Pruebas bioquímicas. 23
2.6.1. Prueba de catalasa. 23
2.6.2. Descarboxilación de lisina y desaminación de lisina. 24
2.6.3. Fermentación de Carbohidratos. 24
2.6.4. Citrato de Simmons. 24
2.6.5. Prueba de Urea 25
2.6.6. Descarboxilación de Ornitina. 25
2.6.7. Prueba de Movilidad y Producción de Sulfuro 25
3. JUSTIFICACIÓN 27
4. OBJETIVO GENERAL 28
5. OBJETIVOS PARTICULARES 28
6. HIPOTESIS 29
7. MATERIALES Y MÉTODOS 30
7.1. Cepas utilizadas 30
7.2. Medios de cultivo 30
7.2.1. Medio SS. 30
7.2.2. Medio Verde brillante. 30
7.2.3. Medio Agar Eosina-Azul de Metileno. 31
7.3. Identificación microbiana mediante características morfológicas. 31
7.4. Empleo de técnicas de tinción 32
7.5. Determinación del perfil de resistencia de antibióticos de cepas de Salmonella spp. 33
7.6. Conteo de bacterias 36
7.7. Pruebas bioquímicas 36
7.7.1. Prueba de catalasa. 37
7.7.2. Descarboxilación de lisina y desaminación de lisina. 37

7.7.3. Fermentación de carbohidratos....37
7.7.4. Citrato de Simmons....38
7.7.5. Prueba de Urea....38
7.7.6. Descarboxilación de la Ornitina....38
7.7.7. Prueba de Movilidad y Producción de Sulfuro....39
8. RESULTADOS....39
8.1. Género Salmonella....39
8.1.1. Identificación de las cepas del género Salmonella mediante métodos microbiológicos....39
8.1.2. Observación de la morfología bacteriana mediante técnicas de tinción....42
8.1.3. Determinación del perfil de resistencia a antibióticos....42
8.1.4. Conteo de unidades formadoras de colonias (UFC/mL)....48
8.1.5. Pruebas bioquímicas....49
8.2. Identificación de cepas presuntivas del Género Shigella....53
8.2.1. Identificación microbiológica....53
8.2.2. Morfología bacteriana al microscopio....55
8.2.3. Pruebas bioquímicas....56
9. DISCUSIÓN....58
10. CONCLUSIONES....62
11. REFERENCIAS....64
12. ANEXOS....70

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Número de casos e incidencia de Diarrea Aguda causada por Shigelosis, México 2000-2020 10

Figura 2. Incidencia de cada estado para shigelosis 11
Figura 3. Vías de transmisión de Salmonella 15
Figura 4. Esquema del proceso para realización de diluciones 34
Figura 5. Diagrama de sembrado masivo 35
Figura 6. Cultivo de cepas de Salmonella 39
Figura 7. Cultivo de cepas de *Salmonella* por estría cruzada 40
Figura 8. Aislamiento de colonias de Salmonella en medio SS. 41

Figura 9. Aislamiento de colonias de *Salmonella* en agar Verde Brillante. 41

Figura 10. Tinción de Gram de cepas de *Salmonella*. 42

Figura 11. Antibiogramas en medio MacConkey de las cepas presuntivas de *Salmonella spp*.
A) MIR Sal 3. B) MIR Sal 8. C) MIR Sal 19. D) MIR Sal 24. 44

Figura 12. Antibiogramas en medio SS de las cepas presuntivas de *Salmonella spp.*
A) MIR Sal 3. B) MIR Sal 8. C) MIR Sal 19. D) MIR Sal 24. 47

Figura 13. Unidades Formadoras de Colonias de las cepas empleadas en medio de cultivo agar SS en el factor de dilución 10^{-6}. A) MIR Sal 3. B) MIR Sal 8. C) MIR Sal 19. D) MIR Sal 24 48

Figura 14. Prueba de catalasa en cepas presuntivas de *Salmonella*. 49
Figura 15. Prueba de descarboxilación y desaminación de lisina en cepas presuntivas de *Salmonella spp.* 49

Figura 16. Prueba de fermentación de carbohidratos en cepas de *Salmonella* 50

Figura 17. Prueba de citrato de Simmons 51
Figura 18. Prueba de Urea en cepas de Salmonella 52
Figura 19. Prueba de descarboxilación de Ornitina en cepas de *Salmonella* 52
Figura 20. Prueba de descarboxilación de Movilidad y Producción de SH2 en cepas de *Salmonella* 53

Figura 21. Crecimiento de cepas presuntivas de *Shigella spp* en medio EMB. 54

Figura 22. Crecimiento de cepas presuntivas de *Shigella* en medio EMB. 54

Figura 23. Aislamiento de la cepa Sh2 en medio EMB 55

Figura 24. Shigella vista a al microscopio en un aumento de 100X 55
Figura 25. Pruebas de descarboxilación de lisina, desaminación de lisina y producción de SH_2 en la cepa presuntiva de *Shigella* Sh2. 56
Figura 26. Pruebas bioquímicas realizadas en medio TSI en una cepa presuntiva de *Shigella* Sh2 57
Figura 27. Prueba de urea en la cepa presuntiva Sh2 de *Shigella sp*. 57

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Enfermedades clínicas producidas por *Salmonella* 4
Tabla 2. Prevalencia de paratifoidea y otras salmonelosis en México 5
Tabla 3. Reacciones bioquímicas de algunas cepas de Salmonella 12
Tabla 4. Diferenciación de especies subespecies de Salmonella 13
Tabla 5. Pruebas para diferenciación de especies senovares de subespecies de *Salmonella* 14
Tabla 6. Pruebas bioquímicas para algunas especies de Shigella 18
Tabla 7. Diferenciación de *Shigellas* 19
Tabla 8. Especies patógenas de Shigella 20
Tabla 9. Interpretación de resultados según el manual del kit de colorantes para tinción diferencial de bacteria. 22
Tabla 10. Formulación para 1 litro del medio de cultivo Agar SS. 68
Tabla 11. Formulación para 1 litro de agua del medio Verde Brillante. 68
Tabla 12. Formula aproximada por litro del medio de cultivo Agar EMB 68
Tabla 13. Fórmula para elaboración del medio Agar MacConkey 69
Tabla 14. *Componentes del medio LB.* 33
Tabla 15. *Antibióticos contenidos en los discos de la serie Gram –, y la seria Gram + y Gram –.* 36
Tabla 16. Formulación para 1 litro de agua del medio Agar Hierro Lisina 69
Tabla 17. Formulación para 1 litro de agua del medio de cultivo Agar de Hierro y triple azúcar. 69
Tabla 18. Formulación para 1 litro de agua del medio de cultivo Agar Citrato Simons. 70
Tabla 19. Formulación aproximada para un litro del medio de cultivo Caldo Urea 70
Tabla 20. Formulación aproximada para un litro de agua del medio MIO. 70
Tabla 21. Formulación aproximada para un litro de agua del medio de cultivo SIM. 70
Tabla 22. Reasignación de nomenclaturas para las cepas de interés. 40
Tabla 23. Descripción de características morfológicas de cepas de Salmonella. 41
Tabla 24. Determinación del perfil de resistencia o susceptibilidad a los antibióticos para la cepa MIR Sal 3. 42
Tabla 25. Determinación del perfil de resistencia o susceptibilidad a los antibióticos para la cepa MIR Sal 8 en medio MacConkey. 43

Tabla 26. Determinación del perfil de resistencia o susceptibilidad a los antibióticos para la cepa MIR Sal 19 cultivada en medio MacConkey. 43
Tabla 27. Determinación del perfil de resistencia o susceptibilidad a los antibióticos para la cepa MIR Sal 24. 44
Tabla 28. En agar SS se muestra la determinación del perfil de resistencia o susceptibilidad a los antibióticos para la cepa MIR Sal 3. 45
Tabla 29. En agar SS se muestra la determinación del perfil de resistencia o susceptibilidad a los antibióticos para la cepa MIR Sal 8. 46
Tabla 30. Determinación del perfil de resistencia o susceptibilidad a los antibióticos para la cepa MIR Sal 19. 46
Tabla 31. Determinación del perfil de resistencia o susceptibilidad a los antibióticos para la MIR Sal 24. 47
Tabla 32. Conteo del número de unidades formadoras de colonia (UFC/mL) de las cepas empleadas. 48
Tabla 33. Descripción de características morfológicas de la cepa de Shigella cepa Sh2. 55

RESUMEN

Las Bacterias son microorganismos de suma importancia en los ecosistemas de la Tierra, las podemos encontrar en todos lados, incluso algunas sobreviven a condiciones extremas de temperatura, presión, salinidad, pH, etc. Algunas bacterias son benéficas para el hombre como las empleadas en biorremediación y obtención de compuestos de interés como los antibióticos o las empleadas en la industria alimenticia, otras en cambio ser perjudiciales para nuestra salud, por ser agentes causales de enfermedades.

En los ambientes naturales las bacterias pueden ser transmitidas a través del agua contaminada y llegar a los alimentos que son regados con este tipo de agua, por lo que los cuerpos de agua residual que recogen descargas de diversos orígenes se convierten en un reservorio de muchas de ellas.

De los diversos microorganismos que están presentes en estás aguas destacaremos dos muy importantes: *Salmonella spp* y *Shigella spp* las cuales son responsables de diversas enfermedades gastrointestinales. Estos géneros bacterianos son de importancia aún en la actualidad, en nuestro país se reportaron 1,992 casos de Shigelosis en 2020 y con respecto a Salmonela en Puebla fueron reportados para 2,712 casos en 2020. Además, la ONU ha evidenciado el incremento de Salmonella multirresistente a antibióticos, por lo que son microorganismos de prioridad alta.

En este trabajo se examinarán diversas cepas del género *Salmonella* y *Shigella* previamente aisladas de muestras de agua del Río Nexapa las cuales serán identificadas a través de pruebas microbiológicas y bioquímicas. También se determinará su perfil de resistencia a antibióticos.

Los resultados indicaron que los métodos de identificación microbiológica empleando medios de cultivo selectivos pueden permitir también el aislamiento de morfologías de microorganismos estrechamente relacionados, por lo que es necesario llevar a cabo la identificación a través de pruebas bioquímicas u otros métodos de identificación.

ABSTRACT

Bacteria are microorganisms of utmost importance in Earth's ecosystems. They can be found everywhere, with some even surviving extreme conditions of temperature, pressure, salinity, pH, and more. Certain bacteria are beneficial to humans, such as those used in bioremediation, the production of valuable compounds like antibiotics, or in the food industry. Others, however, can be harmful to our health as they are agents of disease.

In natural environments, bacteria can be transmitted through contaminated water, reaching crops irrigated with such water. Consequently, wastewater bodies that collect discharges from various sources become reservoirs for many of these microorganisms.

Among the various microorganisms present in such waters, two stand out for their significance: *Salmonella spp.* and *Shigella spp.*, which are responsible for various gastrointestinal diseases. These bacterial genera remain relevant today. In our country, 1,992 cases of shigellosis were reported in 2020, while in Puebla, 2,712 cases of salmonellosis were reported in the same year. Additionally, the UN has highlighted the increasing prevalence of antibiotic-resistant *Salmonella*, making these microorganisms a high-priority concern.

This study will examine various strains of the genera *Salmonella* and *Shigella* previously isolated from water samples taken from the Nexapa River. These strains will be identified using microbiological and biochemical tests, and their antibiotic resistance profiles will also be determined.

The results indicate that microbiological identification methods using selective culture media can also allow the isolation of morphologies from closely related microorganisms. Therefore, it is necessary to carry out identification through biochemical tests or other identification methods.

1. INTRODUCCIÓN

Salmonella spp y *Shigella* spp son géneros bacterianos de suma importancia debido a que son agentes causantes de enfermedades gastrointestinales con alta prevalencia en países en vías de desarrollo, en 2023 la Organización Mundial de la Salud (OMS) alertó con respecto al incremento de su multirresistencia a los antibióticos (World Health Organization, 2024). Estas bacterias se desarrollan en reservorios naturales como el intestino de algunos animales y el humano, en el ambiente se encuentran principalmente por la introducción de la materia fecal de animales infectados que puede contaminar el agua y también el suelo. Debido a la importancia de la bacteria Salmonella como patógeno, en México existe normatividad para determinar su presencia en alimentos, la Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la Determinación de Salmonella en Alimentos, establece un método general para detectar *Salmonella* en alimentos (Secretaría de Salud, 1994), sin embrago la determinación de la presencia de Salmonella y Shigella en compartimentos ambientales es poco estudiada, por lo que es de suma importancia el determinar su presencia en ambientes acuáticos que sirvan de medio de transporte de estas bacterias a otros compartimentos ambientales y permitan su ingreso a la cadena trófica. En un estudio previo se aislaron cepas presuntivas de bacterias patógenas a partir de muestras de agua residual del Río Nexapa (Vásquez, 2024), este cuerpo de agua recibe descargas de diversos orígenes y mediante el empleo de métodos microbiológicos fue posible determinar la presencia de distintas enterobacterias en diferentes puntos del recorrido del río. En el presente se seleccionaron de esta colección cepas presuntivas de los géneros *Salmonella* y *Shigella* para llevar a cabo su identificación mediante métodos microbiológicos tradicionales así como son el empleo de medios de cultivo selectivos diferenciales para su desarrollo, los cuales son ampliamente utilizados en el diagnóstico clínico, debido a que contienen compuestos inhibidores del desarrollo de otros microrganismos y favorece el crecimiento de los de interés, en este caso se empleó el medio Agar SS, que es utilizado para el aislamiento de *Salmonella* spp y Shigella spp en muestras biológicas y de alimentos, para corroborar la pertenencia de los aislados a los géneros de interés se emplearon también pruebas bioquímicas para la identificación de características metabólicas reportadas para estos microorganismos.

2. MARCO TEÓRICO

Las enfermedades gastrointestinales son el padecimiento más común dentro de la población mexicana, dichos padecimientos están relacionados con factores tales como alimentos, bebidas, hábitos de higiene, etc. De acuerdo con datos del INEGI en el año 2020 se registraron más de 2.1 millones de casos de infecciones gastrointestinales en México, en años anteriores dichas afecciones se posicionaron en el segundo lugar de las enfermedades más comunes en el país (Matute et al., 2023).

El Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) define a las enfermedades gastrointestinales como "aquellas que atacan el estómago y los intestinos, generalmente son ocasionadas por bacterias, parásitos, virus y algunos alimentos como leche y grasas, aunque también existen algunos medicamentos que las provocan" (IMSS, 2015), algunos de estos medicamentos pueden ser antiinflamatorios no esteroides, antipsicóticos, antidepresivos y metformina (Philpott et al., 2014).

Entre las enfermedades gastrointestinales con mayor prevalencia en México se encuentran aquellas que son causadas por *Salmonella* y *Shigella. Salmonella* provoca fiebre tifoidea, fiebre entérica, gastroenteritis y septicemia, mientras que *Shigella* es responsable de la disentería bacilar (Riedel et al., 2019). En la **tabla 1** se muestran algunas enfermedades causadas por *Salmonella.*

Salmonella es un microrganismo que presenta un comportamiento estacional, es decir que prevalece en una determinada estación del año (Contreras et al., 2018), particularmente en temperaturas y precipitaciones elevadas como lo es el caso de regiones tropicales y subtropicales donde las condiciones ambientales son ideales para el establecimiento de la bacteria (Contreras, et al. 2023).

Tabla 1. Enfermedades clínicas producidas por Salmonella. Jawetz, et al. (1973, p.236).

	Fiebres Intestinales	**Septicemias**	**Gastroenteritis**
Período de incubación	7-20 días	Variable	8-48 horas
Iniciación	Insidiosa	Súbita	Súbita
Fiebre	Gradual, después una “meseta” alta con estado “tifoideo”	Ascenso rápido, después temperatura en agujas, “séptica”	Generalmente baja

Duración de la enfermedad	Varias semanas	Variable	2 a 5 días
Síntomas gastrointestinales	A menudo constipación temprana; más tarde, diarrea sanguinolenta	A menudo no hay	Náuseas, vómito, diarrea al comienzo
Hemocultivo	Positivo durante la primera y la segunda semana de enfermedad	Positivo durante la fiebre alta	Negativo
Coprocultivo	Positivo de la segunda semana en adelante; negativo al principio de la enfermedad	Pocas veces es positivo	Después del comienzo, rápidamente positivo

La prevalencia de los casos reportados de Salmonella en México permite evidenciar que sigue siendo en la actualidad un problema de salud. En la **tabla 2** se nos muestra la prevalencia anual del 2015 al 2023 de paratifoidea y otras salmonelosis, entre hombres y mujeres para cada estado de México (SEMARNAT, 2023).

Se observa que para el caso de Puebla el año con mayor número de casos fue 2017 con 6228 casos, mientras que en el año 2023 se reportaron 1856 casos.

Tabla 2. *Prevalencia de paratifoidea y otras salmonelosis en México. Fuente Semarnat.gob.mx. 2023.*

Entidad Federativa	Sexo	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023
Aguascalientes	Hombres	521	686	463	169	176	81	63	80	131
	Mujeres	1010	1175	790	336	325	117	103	117	179
	Total	1,531	1,861	1,253	505	501	198	166	197	310
Baja California	Hombres	711	633	445	410	255	121	67	105	71
	Mujeres	1560	1294	1016	873	571	260	185	212	160
	Total	2,271	1,927	1,461	1,283	826	381	252	317	231
Baja California Sur	Hombres	86	78	120	69	50	25	55	62	88
	Mujeres	192	174	230	152	89	50	73	72	76
	Total	278	252	350	221	139	75	128	134	164
Campeche	Hombres	555	369	251	106	32	51	73	67	112
	Mujeres	1137	939	458	256	94	60	184	178	180
	Total	1,692	1,335	709	362	126	111	257	245	292
Coahuila	Hombres	644	446	1944	831	909	336	415	353	299
	Mujeres	1285	894	3847	1213	1853	698	796	645	609
	Total	1,929	1,340	5,791	2,044	2,762	1,034	1,211	998	908
Colima	Hombres	56	66	63	80	44	37	27	19	24
	Mujeres	127	108	101	118	52	58	61	44	21
	Total	183	174	164	198	96	95	88	63	45

Chiapas	Hombres	7927	7808	8557	8289	8462	5695	5264	5254	6025
	Mujeres	14676	14211	15264	13963	13894	8794	8801	8838	9715
	Total	22,603	22,019	23,821	22,252	22,356	14,489	14,065	14092	15740
Chihuahua	Hombres	775	977	1465	1087	1195	451	695	442	454
	Mujeres	2067	2491	2723	2361	2338	904	1357	902	815
	Total	2,067	2,491	2,723	2,361	2,338	904	1,357	1344	1269
Ciudad de México	Hombres	224	246	140	292	399	162	121	126	150
	Mujeres	336	351	311	470	422	166	140	182	186
	Total	560	597	451	762	821	328	261	308	336
Durango	Hombres	4	12	4	8	1	6	6	17	4
	Mujeres	21	21	13	19	5	8	23	36	10
	Total	25	33	17	27	6	14	29	53	14
Guanajuato	Hombres	151	268	390	297	396	263	215	151	167
	Mujeres	272	540	753	534	713	342	364	277	265
	Total	423	808	1,143	831	1,109	605	579	428	432
Guerrero	Hombres	519	637	666	502	566	401	258	325	392
	Mujeres	1140	1416	1418	1245	1115	640	469	567	839
	Total	1,659	2,053	2,084	1,747	1,681	1,041	727	892	1231
Hidalgo	Hombres	87	88	120	129	137	53	40	35	29
	Mujeres	151	155	128	141	142	85	71	50	52
	Total	238	243	248	270	279	138	111	85	81

Jalisco	Hombres	1194	1005	1281	828	816	653	523	590	555
	Mujeres	2430	2032	2210	1540	1433	1005	813	822	968
	Total	3,624	3,037	3,491	2,368	2,249	1,658	1,336	1412	1523
México	Hombres	826	730	719	624	723	346	393	450	500
	Mujeres	1292	1197	1089	962	1150	505	673	636	705
	Total	2,118	1,927	1,808	1,586	1,873	851	1,066	1086	1205
Michoacán	Hombres	597	650	710	689	707	427	438	432	845
	Mujeres	1273	1465	1597	1525	1508	817	751	818	1342
	Total	1870	2115	2307	2214	2215	1244	1189	1250	2187
Morelos	Hombres	179	92	99	67	78	32	9	53	111
	Mujeres	310	156	181	146	97	53	32	86	163
	Total	489	248	280	213	175	85	41	139	274
Nayarit	Hombres	1190	818	639	973	1492	871	492	1190	950
	Mujeres	2535	1632	1336	1776	2624	1357	960	1668	1330
	Total	3725	2450	1975	2749	4116	2228	1452	2858	2280
Nuevo León	Hombres	239	248	188	226	173	83	90	62	40
	Mujeres	450	465	472	342	280	123	107	81	78
	Total	689	173	660	568	453	206	197	143	118
Oaxaca	Hombres	520	489	649	759	638	426	376	387	535

	Mujeres	957	999	1038	1341	1188	676	588	758	917
	Total	1477	1488	1687	2100	1826	1102	964	1145	1452
Puebla	Hombres	2121	1877	2240	1893	1831	958	1169	893	664
	Mujeres	3959	3513	3988	3309	3100	1711	1543	1452	1192
	Total	6080	5390	6228	5202	4931	2669	2712	2345	1856
Querétaro	Hombres	64	113	78	55	6	3	5	2	14
	Mujeres	166	208	157	99	12	9	7	3	12
	Total	230	321	235	154	18	12	12	5	26
Quintana Roo	Hombres	568	774	1150	592	661	274	318	352	539
	Mujeres	865	1708	1850	1014	982	445	561	471	682
	Total	1433	2482	3000	1606	1643	719	879	823	1221
San Luis	Hombres	392	205	362	424	364	128	86	78	76
Potosí	Mujeres	829	537	771	703	516	194	145	151	151
	Total	1221	742	1133	1127	880	322	231	229	227
Sinaloa	Hombres	761	712	1876	1467	989	594	745	619	343
	Mujeres	2018	1750	3128	2709	2153	1598	1804	1513	1010
	Total	2779	2462	5004	4176	3142	2192	2549	2132	1353
Sonora	Hombres	261	254	235	170	98	72	114	36	31
	Mujeres	614	596	539	365	170	107	168	57	89
	Total	875	850	774	535	268	179	282	93	120
Tabasco	Hombres	2997	3212	3991	3292	3036	1428	1357	1506	2037

	Mujeres	6742	6422	7309	5973	5420	2299	2236	2535	3171
	Total	9739	9634	11300	9265	8456	3727	3593	4041	5208
Tamaulipas	Hombres	1026	1083	1403	1212	784	339	366	567	616
	Mujeres	2738	2603	3055	2420	1681	623	777	1024	1087
	Total	3764	3686	4458	3632	2465	962	1143	1591	1703
Tlaxcala	Hombres	271	272	261	236	156	61	71	58	122
	Mujeres	475	554	527	501	341	130	97	110	168
	Total	746	826	788	737	497	191	168	168	290
Veracruz	Hombres	2863	3311	5038	5059	5684	3923	3902	4879	3737
	Mujeres	6353	6698	10099	10585	11115	6772	6607	8180	7041
	Total	9216	10009	15137	15644	16799	10695	10509	13059	10778
Yucatán	Hombres	184	185	449	387	481	94	51	102	164
	Mujeres	293	351	690	640	669	132	111	181	262
	Total	477	536	1139	1027	1150	226	162	283	426
Zacatecas	Hombres	499	465	470	372	247	173	151	176	121
	Mujeres	1043	1104	917	791	472	284	284	248	237
	Total	1542	1569	1387	1163	719	457	435	424	358
Nacional	Hombres	29012	28836	36466	31594	31586	18567	17955	19468	19946
	Mujeres	59316	57759	68005	58422	56524	31022	30891	32914	33712
	Total	88328	86595	104471	90016	88110	45589	48846	52382	53658

Por otro lado, a nivel mundial se reportan alrededor de 600,000 defunciones anuales por *Shigella.* La tendencia de shigelosis en México del año 2000 al 2020 se representa en la Figura 1**.** Los datos indican que se mostró una reducción de un 69%, ya que en el año 2010 se reportaron 11,378 casos, en 2019 la cifra disminuyó a 3,557, y en 2020 se registraron 1,992 casos, lo que representa casi dos terceras partes del año anterior (Dirección General de Epidemiologia 2022).

Entre los años de 2017-2020 hubo decremento del 45% para shigelosis (Dirección General de Epidemiologia, 2022), esto se puede atribuir a las medidas preventivas aplicadas para reducir el contagio de COVID-19 lo que incluye el lavado de manos.

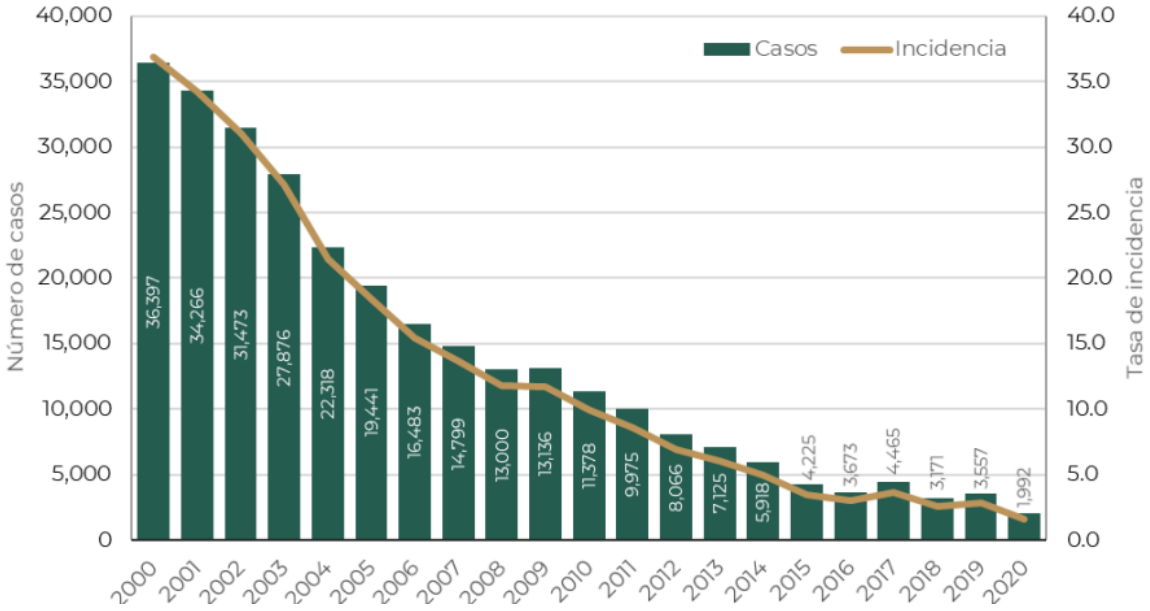


Figura 1. Número de casos e incidencia de Diarrea Aguda causada por Shigelosis, México 2000-2020.
Fuente SINAVE/DGE/DIE/Sistema de Notificación de casos nuevos de enfermedad.

En la Figura 2 se muestra la incidencia de la Shigelosis por estados de acuerdo con lo reportado por el SUIVE en 2021, se puede observar que los estados con mayor incidencia de Shigelosis son Zacatecas, Tlaxcala y Nayarit.

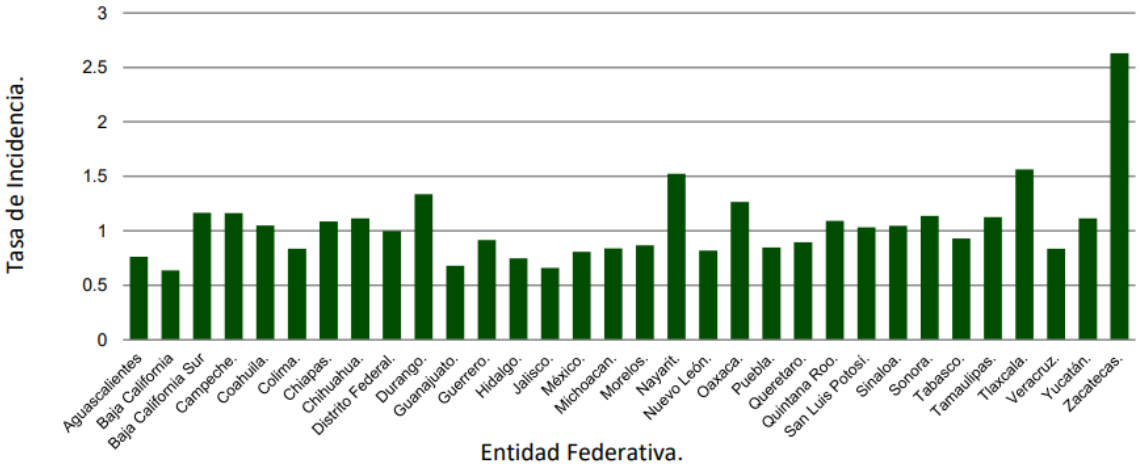


Figura 2. Incidencia de cada estado para shigelosis.
Fuente SUIVE, 2021.

2.1. Características del género Salmonella.

Con base al Manual de Bergey el género *Salmonella* se encuentra en el grupo cinco, que corresponde a las bacterias anaerobios facultativos Gram negativos. Es un bacilo cuyo tamaño puede oscilar entre los 0.7-1.5 x 2-5 µm. Su movimiento se debe a la presencia de flagelos peritricos. Obtiene su energía de la oxidación de compuestos orgánicos, es decir, es quimioorganótrofo, y posee dos tipos de metabolismo: respiratorio y fermentativo.

Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, mientras que el pH puede variar de entre 4-9, con un óptimo de 6.5-7.5. *Salmonella* crece en cualquier medio de cultivo habitual, pero se debe tomar en cuenta que no es capaz de llevar a cabo la fermentación de lactosa, sacarosa, salicina. Sin embargo, puede realizar la fermentación de L-arabinosa, maltosa, D-manitol, D-manosa, L-ramnosa, D-sorbitol, trehalosa y D-xilosa, forman ácido, y generalmente, gas (Holt et al., 1994).

Para la diferenciación de especies de este género se puede hacer a través de pruebas bioquímicas como se muestra en la **tabla 3** y **4** o por análisis antigénico, que suelen ser los más seguros para la identificación.

Tabla 3. Reacciones bioquímicas de algunas cepas de Salmonella.
Elaborada empleando como fuente Jawetz, et al., 1973.

Organismo	Movilidad	Glucosa	Lactosa	Sacarosa	Manitol	Xilosa	Producción de H_2S	Medio de triple azúcar con hierro o medio de doble azúcar de Russel	
								Porción inclinada	Fondo
S. typhi	+	A	-	-	A	±	±	Alc	A
S. paratyphi (A)	+	AG	-	-	AG	-	-	Alc	AG
S. paratyphi (B) (schottmülleri)	+	AG	-	-	AG	AG	+	Alc	AG
S. typhimutium	+	AG	-	-	AG	±	+	Alc	AG
S. choleraesuis	+	AG	-	-	AG	AG	±	Alc	AG
S. enteritidis	+	AG	-	-	AG	AG	+	Alc	AG

Nota: (±) variable, (+) positiva, (-) negativa, (A) ácido (amarillo), (AG) ácido y gas, (Alc) alcalinización, (t) tardía.

En la tabla 4 y 5 se muestran algunas de las principales pruebas bioquímicas que se realizan para diferenciación de subespecies del género *Salmonella.*

Tabla 4. Diferenciación de especies subespecies de Salmonella.
Elaborada empleando como fuente Holt, et al., 1994.

Test	***Salmonella bongori***	***Salmonella choleraesuis***			
		Subsp. *Arizonae*	Subsp. *diarizonae*	Subsp. *houtenae*	Subsp. *indica*
Citrato de Simmons	+	+	+	+	[+]
Producción de H_2S	+	+	+	+	+
Lisina descarboxilasa	+	+	+	+	+
Ornitina descarboxilasa	+	+	+	+	+
Motilidad	+	+	+	+	+
Crecimiento KCN	+	-	-	+	-
Utilización de malonato	-	+	+	-	-
D-glucosa gas	[+]	+	+	+	+
L-arabinosa ácido	+	+	+	+	+
Dulcitol ácido	+	-	-	-	D
Lactosa ácida	-	[-]	[+]	-	[-]
Maltosa ácida	+	+	+	+	+
Melibiosa ácida	[+]	+	+	+	[+]
L-ramnosa ácida	+	+	+	+	+
D-sorbitol ácido	+	+	+	+	-
Trehalosa ácida	+	+	+	+	+
D-xilosa ácida	+	+	+	+	+
Ácido múcico	+	+	d	-	+
Tartrato de Jordan	-	-	[-]	d	+
ONPG	+	+	+	-	D

Tabla 5. Pruebas para diferenciación de especies senovares de subespecies de Salmonella. Elaborada empleando como fuente Holt, et al., 1994.

Prueba	***Salmonella Choleraesuis* Subsp. *salamae***	***Salmonella choleraesuis* subsp. *Choleraesuis***		
		Serovar *Choleraesuis*	Serovar Gallinarum	Serovar *pullorum*
Citrato de Simmons	+	[-]	-	-
Producción de H_2S	+	d	+	+
Lisina descarboxilasa	+	+	+	+
Ornitina descarboxilasa	+	+	-	+
Motilidad	+	+	-	-
Crecimiento KCN	-	-	-	-
Utilización de malonato	+	-	-	-
D-glucosa gas	+	+	-	+
L-arabinosa ácido	+	-	[+]	+
Dulcitol ácido	+	-	+	-
Lactosa ácida	-	-	-	-
Maltosa ácida	+	+	+	-
Melibiosa ácida	-	d	-	-
L-ramnosa ácida	+	+	-	+
D-sorbitol ácido	+	[+]	-	[-]
Trehalosa ácida	+	-	d	[+]
D-xilosa ácida	+	+	d	[+]
Ácido múcico	+	-	d	-
Tartrato de Jordan	d	[+]	+	-
ONPG	[-]	-	-	-

Nota: -, 0-10% positivo; [-], 11-25% positivo; d, 26-75% positivo; [+], 76-89% positivo; + 90-100% positivo. Los resultados son para 48 horas de incubación.

Salmonella tiene una estructura compuesta por tres principales antígenos:

1. Antígenos “H” o flagelares: Se inactivan cuando se exponen a temperaturas superiores a 60°C, alcohol o ácidos. Dichos antígenos reaccionan con sueros que en su composición contengas anticuerpos anti- “H”. Los anticuerpos contra antígeno H son predominantemente IgG. Una especie de *Salmonella* puede presentarse en dos formas, denominadas Fase 1 y Fase 2.

2. Antígenos “O” somáticos: Son resistentes a temperaturas de 100°C, alcohol y ácidos diluidos. Reaccionan con sueros con anticuerpos anti- “O”. Los anticuerpos para antígenos O son predominantes del tipo IgM.
3. Antígeno “Vi”: Se destruye al ser sometido a calentamiento una hora a 60°C, así como en presencia de ácidos y fenol. Los cultivos que se presenta este antígeno suelen tener una mayor virulencia en comparación con aquellos que no lo poseen.

Dado que *Salmonella* presenta variabilidad en su composición antigénica, su clasificación se basa en el esquema de Kauffmann-White, el cual le asigna una combinación de números y letras a los serotipos según sus antígenos O y H. Por ejemplo, el serotipo 6,7:r:1,7 indica la presencia de los antígenos O 6 y 7, el antígeno H de la fase 1 (r) y los antígenos H de fase 2 (1 y 7). En esta formulación., los antígenos H se ordenan alfabéticamente (Diep et al., 2019).

Esta diversidad en los serotipos influye en la epidemiología de las infecciones causadas por *Salmonella,* ya que algunos serotipos están asociados con brotes específicos y niveles variables de virulencia. Las infecciones por *Salmonella* se transmiten principalmente por vía oral (Liu et al., 2023). De acuerdo con el Manuel de Microbiología Médica, algunas fuentes de infección se muestran en la Figura 3.

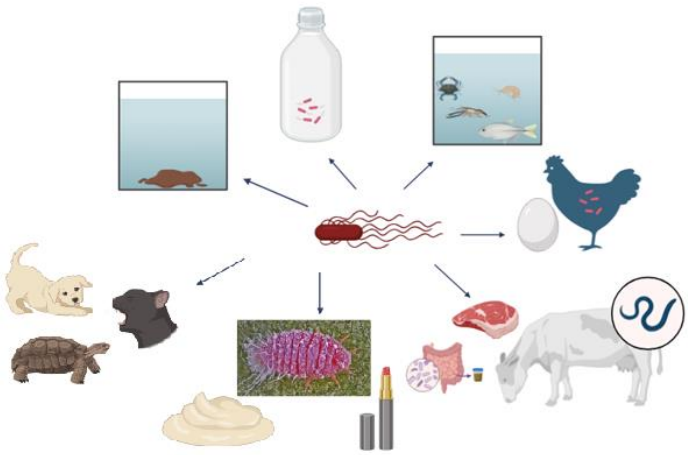


Figura 3. Vías de transmisión de Salmonella.

Salmonella puede transmitirse a través de alimentos contaminados, por lo que no se recomienda el consumo de alimentos crudos. Además, *Salmonella* también puede ser trasmitida por ciertos animales que actúan como reservorios naturales de estos microorganismos.

Para la correcta detección de estas infecciones, existen técnicas especializadas para el aislamiento de *Salmonella*, las cuales incluyen el uso de cultivos de enriquecimiento, cultivos en medios selectivos y cultivos en medios diferenciales.

El uso de medios de cultivo selectivos y diferenciales es una estrategia fundamental en este proceso, ya que permite favorecer el crecimiento de *Salmonella spp.* y diferenciarla de otros microorganismos. Se han desarrollado diversas formulaciones con este propósito, entre ellas el agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD), agar Entérico Hektoen (HE) y el agar Sulfito de Bismuto (BS). De estos, el XLD y el HE son los más mepleados, ya que permiten distinguir *Salmonella* por características como la producción de sulfuro de hidrógeno y la incapacidad de fermentar lactosa. Sin embargo, debido a que *Salmonella* comparte ciertas características con otros microorganismos como *Proteus* y *Citrobacter*, pueden producirse falsos positivos, lo que hace necesario complementar con pruebas confirmatorias adicionales (Park et al., 2012).

Técnicas de aislamiento de *Salmonella.*

1. Cultivos de enriquecimiento: La muestra es colocada en caldo-verde brillante o caldo-tetrationato, que son medios inhibitorios que contienen compuestos diseñados para suprimir el crecimiento de otros microorganismos. Luego de una incubación de 1 a 2 días, se procede a sembrar en medios diferenciales y selectivos.
2. Cultivos en medios selectivos: Se utilizan medios como el agar Salmonella-Shigella (SS) o el agar citrato y desoxicolato, los cuales favorecen la identificación de *Salmonella* al inhibir el crecimiento de bacterias no deseadas.
3. Cultivos en medios diferenciales: Debido a que *Shigella* no fermenta lactosa, pueden crecer en medios como eosina-azul de metileno, McConkey o deoxicolato. *S. typhi* se identifica rápidamente en medio sulfito de bismuto, donde las colonias se presentan de color negro debido a la producción de ácido sulfhídrico.

Para mejorar la especificidad de los medios convencionales, se han desarrollado medios cromogénicos que contienen sustratos incoloros que, al ser degradados por enzimas microbianas específicas, general colonias con colores distintivos, facilitando así la identificación visual de *Salmonella spp.* Aunque estos medios presentan una mayor especificidad, su sensibilidad puede sr baja, lo que aumenta la probabilidad de falsos negativos. Además, su alto costo limita su uso rutinario en laboratorios.

Las Reacciones Febriles son un conjunto de reacciones de aglutinación directa, y son utilizadas para el diagnóstico de fiebres entéricas, como *Salmonella* (reacción de Widal), brucelosis (reacción de Huddleston) y rickettsias (reacción de Weil-Felix).

Para el diagnóstico de *Salmonella,* los antígenos utilizados son los siguientes:

- Antígeno Paratyphoid A
- Antígeno Paratyphoid B
- Antígeno Typhoid H
- Antígeno Typhoid O

El control positivo: Dilución de suero humano inactivado positivo.

Control negativo: Dilución de suero humano negativo.

Los antígenos bacterianos suspendidos en solución fisiológica interactúan con los anticuerpos específicamente inducidos durante el contacto de las bacterias con el sistema inmune (Mulet et al., 2013).

Para la preparación de la muestra:

- Se toma una muestra de 5 ml de sangre sin anticoagulante
- Se deja coagular, posteriormente centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos.
- Se extrae el suero y se coloca en otro tubo.

Métodos de análisis:

- Cualitativo:
    - En una placa se marca el antígeno a detectar.
    - Se coloca 0.04 ml de suero problema.
    - Se agregar una gota de los antígenos en cada circulo.
    - Se mezclar y oscilar la paca durante 4 min y se observa.

Si hay presencia de grumos es un resultado positivo, lo que indica una infección actual, reciente o pasada. Si no hay grumos, el resultado es negativo, lo que puede indicar que el paciente no está infectado o que la infección es demasiado temprana para detectarse.

- Cuantitativo: Si el resultado es positivo, se repite la técnica utilizando diluciones del suero: 0.08 (1:20), 0.04 (1:40), 0.02 (1:80), 0.01 (1:600), 0.005 (1:320) (Mulet et al., 2013).

Interpretación de resultados:

a) “O” alto (1:160 o más), “H” bajo: infección activa.

b) ”H” alto (1:160 o más), “O” bajo: infección en el pasado.

c) ” Vi” alto: el paciente es portador.

Para tratar estas infecciones, suelen prescribir antimicrobianos como cloranfenicol y ampicilina. Sin embargo, con el tiempo *Salmonella* ha adquirido resistencia a varios antibióticos, transmitida genéticamente por un factor de transferencia de resistencia (FTR). Este fenómeno es común en bacterias entéricas y representa un problema de escala mundial en el tratamiento de infecciones por el género *Salmonella* (Riedel et al., 2019).

2.2. Características del género Shigella.

Al igual que *Salmonella, Shigella* se posiciona en el grupo cinco del manual de Bergey, es decir, es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, inmóvil y quimioorganótrofo. Las colonias formadas por estos bacilos tienen forma redonda, convexa, son transparentes y los bordes son enteros; el tamaño de las colonias es de alrededor de 2 mm. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C y *Shigella* crece en un pH de 5 a 9 (Holt et al., 1994). Los carbohidratos se catabolizan mediante la producción de ácido; algunas cepas poseen la capacidad de formar gas. Entre los carbohidratos que puede catabolizar se encuentran la D-glucosa, D-manitol, D-manosa, maltosa y trehalosa. Por otro lado, generalmente no es capaz de fermentar lactosa; sin embargo, las cepas que pueden fermentar la lactosa adquieren un color rojizo característico. Tampoco es capaz de fermentar salicina (Riedel et al., 2019).

En las tablas 6 y 7 se nos muestras las pruebas bioquímicas que se realizan para identificar a bacteria y poder determinar las especies correspondientes.

Tabla 6. Pruebas bioquímicas para algunas especies de Shigella. Elaborada empleando información de Jawetz, et al., 1973.

Organismo	Movilidad	Glucosa	Lactosa	Sacarosa	Manitol	Xilosa	Producción de H_2S	Medio triple azúcar con hierro o medio de doble azúcar de Russel	
								Porción inclinada	Fondo
Sh. Dysenteriae	-	A	-	-	-	-	-	Alc	A
Sh. flexneri.	-	A	-	±	±	-	-	Alc	A
Sh. Sonnei	-	A	tA	A	A	-	-	Alc	A

Nota: (±) variable, (+) positiva, (-) negativa, (A) ácido (amarillo), (AG) ácido y gas, (Alc) alcalinización, (t) tardía.

En la tabla 7 se enlistan las pruebas bioquímicas para realizar la diferenciación entre las subespecies del género *Shigella.*

Tabla 7. Diferenciación de Shigellas.
Elaborada con información de Holt, et al., 1994.

Prueba	***Shigella sonnei***	**Otras shigella**	**Prueba**	***Shigella sonnei***	**Otras shigella**
Indol	-	d	Producción de ácido a partir de D-adonitol	-	-
Voges-Proskauer	-	-	Producción de ácido a partir de Celobiosa	-	-
Citrato de Simmons	-	-	Producción de ácido a partir de Lactosa	-	-
Producción de H_2S	-	-	Producción de ácido a partir de D-manitol	+	+
Hidrólisis de urea	-	-	Producción de ácido a partir de Melibiosa	[-]	d
Lisina descarboxilasa	-	-	Producción de ácido a partir de L-ramnosa	[+]	-
Ornitina descarboxilasa	+	-	Producción de ácido a partir de D-sorbitol	-	d
Motilidad	-	-	Producción de ácido a partir de D-xilosa	-	-
Crecimiento KCN	-	-	Pigmento amarillo	-	-
Utilización de malonato	-	-	D-glucosa producción de gas	-	-

Nota: -, 0-10% positivo; [-], 11-25% positivo; d, 26-75% positivo; [+], 76-89% positivo; + 90-100% positivo. Los resultados son para 48 horas de incubación

De acuerdo con Mayo Clinic, en su libro de salud familiar, *Shigella* ocasiona infecciones intestinales, aunque una invasión al torrente circulatorio no suele ser común. Su contagio ocurre cuando el paciente ingiere pequeñas cantidades de bacterias presentes en las heces de una persona infectada. Esto puede suceder, por ejemplo, en guarderías donde el personal no aseé adecuadamente sus manos después de cambiar los pañales de los niños. También se puede adquirir por

alimentos infectados o al beber y nadar en agua no potable. *Shigella* suele alojarse en el intestino grueso del ser humano (Mayo Clinic, 2019).

En la tabla 8 se muestran algunas de las principales especies de *Shigella* causantes de las enfermedades, cuya clasificación se basa en sus características bioquímicas y antigénicas. Dentro de estos criterios, el antígeno O juega un papel clave, ya que es el único antígeno utilizado para la serotipificación de *Shigella,* dado que esta bacteria carece de los antígenos H y K. Además, el antígeno O juega un papel esencial en la inducción de la respuesta inmune del huésped y, en las especies de *Shigella*, está mediado por su capacidad de modificar el antígeno O para evadir el sistema inmunológico del huésped (Liu et al., 2008; Sadredinamin et al., 2023)

Tabla 8. Especies patógenas de Shigella.
Elaborada con información de Jawetz, et al., 1973.

	Grupo y tipo	**Nomenclatura actual**	**Nomenclatura anterior**
Manitol negativas	A (1)	*Sh. dysenteriae*	*Sh. shigae, Bacilo de Shiga*
	A (2)	*Sh. schmitzii*	*Sh. Ambigua*
	A (3-7)	*Sh. arabinotarda*	*Sh. large-sachsii, grupo Para-shiga*
Manitol positivas	B (1-6)	*Sh. flexneri*	*Sh. paradysenteriae,* subgrupo Flexner
	C (1-15)	*Sh. Boydii*	*Sh. paradysenteriae,* subgrupo Boyd
	D (1-2)	*Sh. sonnei*	Bacilo de Sonne

La sintomatología se presenta después del periodo de incubación que va de 1 a 4 días, dichos síntomas son dolor abdominal, fiebre, diarrea con presencia de mucosa y sangre, espasmos rectales, náuseas y vómitos, en niños pequeños ocurre una deshidratación y acidosis; los síntomas duran alrededor de cinco a siete días (Riedel et al., 2019).

Una vez recuperado el paciente sus heces aún podrían ser contagiosas por varias semanas. A pesar de haber desarrollado anticuerpos contra las *Shigellas* éstos no protegen de una reinfección.

El aislamiento de *Shigella* generalmente comienza con la siembra en medios diferenciales y selectivos bajo condiciones de incubación aeróbica. Entre los medios de aislamiento primarios más utilizados se encuentran MacConkey, Hektoen Enteric Agar y Agar Salmonella-Shigella (SS). Estos medios contienen sales biliares, que inhiben el crecimiento de otras bacterias Gramnegativas, así como indicadores de pH

que permiten diferenciar los microorganismos fermentadores de lactosa (coliformes) de aquellos que no fermentan lactosa, como *Shigella.* Adicionalmente, se puede inocular un medio de enriquecimiento líquido, como el caldo Hajna, diseñado para favorecer el crecimiento de bacterias Gramnegativas (Payne, 2019).

Tras una incubación a 37°C durante toda la noche, se seleccionan colonias incoloras que no fermentan lactosa y se siembran en medios diferenciales como el agar hierro de Kligler o el agar hierro triple azúcar. En estos medios, las especies de *Shigella* producen un tubo inclinado alcalino y un fondo ácido, sin formación de gas, lo que proporciona una identificación presuntiva. Para la confirmación, se realizan pruebas de aglutinación en portaobjetos utilizando antisueros específicos para determinar el serogrupo y serotipo de la bacteria.

Sin embargo, algunos biotipos de *E.coli* pueden presentar características similares a *Shigella,* ya que son inmóviles y fermentan la lactosa de forma retardada.

Para diferenciarlos, se utiliza la prueba de descarboxilación de lisina, ya que los coliformes típicamente poseen esta capacidad, a diferencia de *Shigella*. No obstante, ciertos coliformes patógenos pueden causar enfermedades enteroinvasiva al portar plásmidos de virulencia similares a los de *Shigella,* lo que hace necesario el uso de análisis serológicos más detallados para su identificación (Uyttendaele et al., 2001).

Las *E. coli* enteroinvasivas (EIEC) son bioquímicamente muy similares a *Shigella* y pueden provocar síntomas clínicos como diarrea y disentería. Además, algunas EIEC presentan una estrecha relación serológica con *Shigella,* como es el caso del serotipo O124 de EIEC, que aglutina con el antisuero del serotipo 3 de *Shigella dysenteriae* (Hale & Keusch, 1996).

De acuerdo con el Manual MSD el tratamiento para shigelosis normalmente está compuesto por fluoroquinoloa, azitromicina, ceftriaxona (Bush & Vazquez Pertejo, 2022).

En base a lo reportado por Ahmed y colaboradores (2015) en el artículo “Caracterización molecular de *Shigella spp.* multirresistentes de orden alimentario” algunas cepas de *Shigella* son resistentes a la ampicilina (87.5%), estreptomicina (100%), kenamicina (95.8%), ácido nalidíxico (95.8%), tetraciclinas (95.8%), espectinomicina (93.6%) y sulfametoxazol/trimetoprima (87.5%) (Ahmed & Shimamoto, 2015).

2.3. Tinción de Gram.

El mecanismo de la tinción de Gram se basa en las características fisicoquímicas de la pared celular de los microorganismos. Es un método diferencial de doble tinción, por lo tanto, las células que son Gram positivas retienen el colorante primario, esto se logra gracias a que el colorante básico entra al microorganismo donde con el Yodo forma una laca insoluble en agua. El alcohol-acetona deshidrata las paredes de los microorganismos Gram +, tratados como mordiente forma una barrera que la laca no puede atravesar. Por otro lado, en las células Gram negativas toman el colorante de contraste, esto debido a que los lípidos en la pared son más abundantes en comparación con las Gram +, por ello el tratamiento con alcohol-acetona logra disolver la pared lo que permite el escape de del complejo de cristal violeta con yodo (Clark, 1980).

El examen microscópico nos proporciona información con respecto al grupo de bacterias a las que pertenece de acuerdo con su patrón de tinción, además nos permite observar la morfología bacteriana. Los Resultados de la técnica de tinción se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Interpretación de resultados según el manual del kit de colorantes para tinción diferencial de bacteria.

Bacterias	Color
Gram positivas (+)	Morado azulado
Gram negativas (-)	Rojo/rosado

2.4. Antibiogramas.

Actualmente, la resistencia a los antimicrobianos (RAM) representa un desafío global de gran importancia, impulsado por el uso excesivo de antibióticos y su prescripción inadecuada. Se estima que, en 2019, la RAM estuvo relacionada con aproximadamente 4.95 millones de muertes, convirtiéndose en la tercera causa principal de fallecimientos a nivel mundial (Murray et al., 2022).

Los antibiogramas o ensayos de sensibilidad a antibióticos cumplen un papel importante en los laboratorios de microbiología clínica, uno de los principales objetivos es la evaluación de un microorganismo frente a uno o varios antibióticos, además de ser una herramienta muy útil a la hora de identificación de cepas, ya que con ellos se

pueden localizar cepas resistentes a los antibióticos, y llevar a cabo un seguimiento de estás, además de tener un mayor control de los antibióticos destinados al tratamiento de las infecciones ocasionadas por estos microorganismos (Calderón Jaimes Ernesto, 2000).

El uso de antibiogramas nos sirve para una orientación en la prescripción empírica, además de informar sobre el desarrollo de guías de tratamiento. Por último, también pueden utilizarse con el fin de aumentar la conciencia sobre la resistencia a antibióticos y rastrear los patrones de resistencia a lo largo del tiempo (Khatri et al., 2024).

2.5. Conteo de bacterias.

La cuantificación de bacterias mediante unidades formadoras de colonias (UFC), a través de técnicas de dilución en serie y siembra en placa, es un método clásico y fundamental en microbiología, ampliamente utilizado en investigación y diagnóstico. El recuento de UFC ha sido durante mucho tiempo el método más confiable y popular entre los microbiólogos, gracias a su capacidad para evaluar la viabilidad bacteriana y su impacto visual, claro y preciso (Bhuyan et al., 2023).

2.6. Pruebas bioquímicas.

Las pruebas bioquímicas nos proporcionan información respecto al metabolismo de cada bacteria empleada, por lo que es posible distinguir diferencias entre diferentes especies de microorganismos.

2.6.1. Prueba de catalasa.

La catalasa es una enzima antioxidante que descompone el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno, protegiendo a las células del daño oxidativo. Muchos patógenos producen catalasa como mecanismo de defensa contra el H_2O_2 lo que les permite resistir el estrés oxidativo. La prueba de catalasa es una herramienta útil para identificar la presencia de esta enzima en bacterias de interés, ayudando a comprender su capacidad de supervivencia y su patogenicidad. Por ello, medir la actividad de la catalasa en patógenos proporciona información valiosa sobre mecanismos que contribuyen a su virulencia y resistencia al estrés oxidativo (Iwase et al., 2013).

2.6.2. Descarboxilación de lisina y desaminación de lisina.

Estas pruebas se llevan a cabo en medio agar hierro lisina, este medio nos sirve para diferenciar microorganismos entéricos basados en su habilidad para descarboxilar o desaminar lisina y formar sulfuro de hidrógeno, esto se logra gracias a su composición la cual contiene lisina, dicho sustrato nos ayuda a la detección de la presencia de enzimas descarboxilasa y deaminasa, además de contener citrato de hierro y amonio y tiosulfato de sodio los cuales son indicadores de la producción de ácido sulfhídrico (Vila et al., 2009a).

La interpretación de resultados nos indica que si la prueba es positiva para descarboxilación de lisina la superficie debe presentar una coloración violeta y el fondo también, por otro lado, para un resultado negativo la superficie debe ser violeta y el fondo amarillo.

Para desaminación de lisina en caso de ser positivo la superficie debe ser rojiza y el fondo amarillo.

2.6.3. Fermentación de Carbohidratos.

En esta prueba se determina la capacidad de los microorganismos de fermentar, es decir degradar, un hidrato de carbono especifico incorporado en un medio basal, además de detectar la producción de ácido o ácido con gas (Macfaddin, 2000). Para la prueba de fermentación de hidratos de carbono se realiza en agar de hierro y triple azúcar.

Interpretación de resultados:

- Superficie alcalina/profundidad ácida: pico rojo/fondo amarillo, es decir que solo se fermenta glucosa.
- Superficie ácida/profundidad ácida: pico amarillo/fondo amarillo, el microorganismo fermenta glucosa, lactosa y/o sacarosa.
- Superficie alcalina/profundidad alcalina: pico rojo/fondo rojo, no fermenta azúcares.
- La presencia de burbujas o la ruptura de medio indica que hay producción de gas.

2.6.4. Citrato de Simmons.

Esta prueba bioquímica determina si las cepas probadas son capaces de emplear el citrato como fuente de carbono.

En el medio agar citrato de Simmons, el citrato es la única fuente de carbono disponible. Los microorganismos capaces de metabolizarlo lo descomponen en oxaloacetato y acetato. La enzima oxaloacetato deshidrogenasa convierte el oxaloacetato en piruvato y CO_2, y este último reacciona formando carbonato de sodio, lo que genera un aumento en el ph. Como resultado, el indicador de pH azul de bromotimol cambia de verde (neutral) a azul (alcalino), evidenciando el uso de citrato por el microorganismo (Van Hofwegen et al., 2016).

2.6.5. Prueba de Urea.

Esta prueba permite diferenciar microorganismos en función de su capacidad para producir ureasa, siendo especialmente útil en la identificación de especies del género *Proteus.* La ureasa hidroliza la urea, liberando amoniaco y dióxido de carbono, lo que alcaliniza el medio y provoca un cambio de color (Uotani & Graham, 2015).

Interpretación de resultados:

- Microorganismos que hidrolizan urea: el medio vira a un color rosado-rojizo.
- Microorganismos que no hidrolizan urea: el medio permanece en color naranja.

2.6.6. Descarboxilación de Ornitina.

Los sistemas de descarboxilación de ornitina y lisina están involucrados en la producción de putrescina y cadaverina en varían enterobacterias. Sus actividades combinadas contribuyen a la homeostasis de pH citosólico cuando las células están expuestas a ambientes ácidos (Lucas, 2017).

Esta prueba permite determinar la presencia de la enzima ornitina descarboxilasa en miembros de la familia Enterobacteriaceae.

Interpretación de resultados:

- Positivo: Color púrpura.
- Negativo: Color amarillo, aunque a veces suele desarrollar una coloración violácea en la superficie del medio.

2.6.7. Prueba de Movilidad y Producción de Sulfuro.

Esta prueba se utiliza para determinar la movilidad, la producción de indol y de sulfuro de hidrógeno en bacterias entéricas Gram negativas.

Con esta prueba se determina si ha habido alguna liberación de enzimática de ácido sulfhídrico (H_2S) gaseoso a partir de los aminoácidos azufrados, en consecuencia, se percibe una reacción negra (Macfaddin, 2000).

Interpretación de resultados.

Movilidad:

- Positivo: Presencia de turbidez o crecimiento más allá de la línea de siembra.
- Negativo: Crecimiento únicamente en la línea de siembra.

Producción de SH_2:

- Resultado positivo: Presencia de coloración negra en la línea de siembra o en todo el medio.
- Resultado negativo: No hay cambio de color en el medio.

3. JUSTIFICACIÓN

La caracterización microbiológica y bioquímica de cepas de *Salmonella* y *Shigella* cumple un papel fundamental en los campos de la microbiología y la salud pública. Estos patógenos son causantes de enfermedades gastrointestinales como la salmonelosis y la shigelosis de importancia en nuestro país y pueden ser transmitidas por alimentos contaminados con los microorganismos, los cuales pueden estar presentes en diversos entornos acuáticos, como afluentes y cuerpos de agua residual que pueden ser empleados para el riego de cultivos, por lo que podrían contaminar alimentos y transmitirse a través de la cadena trófica. Su presencia en estos ecosistemas plantea un riesgo significativo para la salud humana, especialmente en comunidades con acceso limitado a fuentes de agua seguras.

Debido a la importancia de microorganismos pertenecientes a *Salmonella spp* y *Shigella spp* que se encuentran presentes en el ambiente y que pueden transmitirse a través de la cadena trófica, es necesario determinar las características microbiológicas, bioquímicas y su perfil de resistencia a antibióticos con el objetivo de generar conocimiento que permita contribuir a mejorar las medidas de prevención y control, para reducir su propagación a través de los recursos hídricos y alimentarios.

En este trabajo se analizarán cepas del género *Salmonella* y *Shigella* previamente aisladas de muestras de agua del Río Nexapa, las cuales serán identificadas a través de pruebas microbiológicas y bioquímicas, además se determinará su perfil de resistencia a antibióticos.

Este tipo de investigaciones es crucial para el desarrollo de políticas de salud pública eficaces, ya que facilita la detección temprana de bacterias virulentas o resistentes. Asimismo, aporta datos que permitan elaborar estrategias de intervención, tanto en el manejo de los alimentos como en la gestión de fuentes de agua, promoviendo un entorno más seguro y saludable.

4. OBJETIVO GENERAL

Identificar mediante técnicas microbiológicas y bioquímicas cepas de *Salmonella spp* y *Shigella spp* aislados a partir de muestras de agua de origen residual.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar cepas de *Salmonella spp.*
- Identificar cepas de *Salmonella spp* y *Shigella spp* mediante técnicas microbiológicas
    - Determinar las características morfológicas de cepas de *Salmonella spp* y *Shigella spp.*
    - Emplear técnicas de tinción en cepas de *Salmonella spp* y *Shigella spp.*
- Identificar cepas de *Salmonella spp* y *Shigella spp* empleando pruebas bioquímicas.
- Determinar el perfil de resistencia de antibióticos de cepas de *Salmonella spp*.

6. HIPOTESIS

¿Los métodos de identificación bacteriana tradicionales como los microbiológicos y las pruebas bioquímicas son eficaces para la identificación de cepas presuntivas del género *Salmonella* spp y *Shigella* spp aisladas previamente a partir de muestras de agua residual del Río Nexapa?

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Cepas utilizadas

Las cepas utilizadas fueron proporcionadas por el laboratorio 402 del EMA 6 de Ciudad Universitaria de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, las cuales pertenecen a la colección de microorganismos aislados de agua del Rio Nexapa (Vásquez Jiménez, 2023).

Se seleccionaron 4 cepas las cuales corresponden a: S_5, S_9, S_{10}, S_{11}. Para *Salmonella* y 4 cepas para *Shigella* las cuales corresponden a: Sh_1, Sh_2, Sh_3, Sh_6.

7.2. Medios de cultivo

*7.2.1. **Medio SS.***

Con la finalidad de obtener un crecimiento óptimo de *Salmonella* las cepas bacterianas fueron cultivadas en el medio SS (*Salmonella, Shigella*), ya que es un medio selectivo y diferencial principalmente para enterobacterias lactosa negativa; proporcionado por MCD LAB S.A. de C.V. La formulación se puede consultar en la tabla 10.

Preparación del medio:

1. Suspender 60 g del medio en 1 L de agua purificada.
2. Calentar con agitación suave hasta completar la disolución del polvo y hervir durante 1 minuto.
3. Enfriar a una temperatura entre 45°C-50°C
4. Vaciar en placas Petri estériles de 90 x 15 mm aproximadamente. No esterilizar en autoclave.
5. Poner a prueba de esterilidad a 37°C por 24 horas.

*7.2.2. **Medio Verde brillante.***

Otro medio para utilizar para corroborar la identificación microbiológica de *Salmonella* es Verde Brillante, el cual es un medio altamente selectivo para el aislamiento de *Salmonella spp.,* excepto *Salmonella typhi*. Elaborado por Becton Dickinson de México, S.A. de C.V. La formulación se muestra en la tabla 11.

El medio de cultivo fue preparado de acuerdo con las indicaciones de la ficha técnica.

7.2.3. Medio Agar Eosina-Azul de Metileno.

De acuerdo con las necesidades nutrimentales de *Shigella* se seleccionó el medio EMB o agar eosina- azul de metileno, el cual es un medio altamente selectivo para bacilos Gramnegativos (tabla12), además de permitir el desarrollo de todas las especies de la familia *Enterobacteriaceae*, en especial de las especies de *Salmonella* y *Shigella* (Camacho Garrido, 2022). Proporcionado por Becton Dickinson de México, S.A. de C.V.

El medio de cultivo se prepara de acuerdo con las indicaciones de la ficha técnica del proveedor.

7.3. Identificación microbiana mediante características morfológicas.

La identificación cultural o de cultivo comprende aspectos tales como: forma, tamaño, opacidad, elevación, superficie, forma del borde, consistencia y olor (Camacho Garrido, 2022).

Para llevar a cabo esta identificación, se utilizan dos técnicas de cultivo; siembra por estría sencilla y siembra por agotamiento o estría cruzada. Ambos métodos se deben realizar bajo condiciones de esterilidad.

Estría sencilla:

1. Dentro de una campana de flujo laminar, sostener la caja Petri con la palma de la mano y, con la mano opuesta, manipular el asa bacteriológica.
2. Flamear el asa bacteriológica a rojo vivo con una lámpara de alcohol.
3. Enfriarla en un lado del agar.
4. Tomar una asada de la muestra.
5. Llevar el asa al medio y realizar una línea arrastrando los microorganismos hacia el extremo contrario; repetir el procedimiento hasta formar una estría.
6. Por último, sellar las cajas e incubar a 37°C durante 24 horas.

Siembra por estría cruzada.

Para realizar la estría cruzada, seguir los mismos pasos anteriores y añadir un giro de 90° a la caja en cada repetición. Su objetivo es reducir la carga microbiana (Cappuccino & Sherman, 2013).

7.4. Empleo de técnicas de tinción

La identificación preliminar de las bacterias se realiza mediante la Tinción de Gram, un método diferencial de doble tinción (Camacho Garrido, 2022). Con este método, es posible clasificar a las bacterias en dos grupos:

- Gram positivas, que contienen una mayor cantidad de peptidoglicano.
- Gram negativas, que, a diferencia de las Gram positivas, presentan un mayor contenido de lípidos (Tripathi & Sapra, 2024ª).

El procedimiento de preparación del frotis a partir de cultivos en caja Petri se realizó de la siguiente manera:

1. Colocar 90 µL de agua destilada estéril en un portaobjetos utilizando una micropipeta de 100 µL.
2. Tomar una colonia del cultivo con un asa bacteriológica previamente esterilizada y enfriada
3. Extender el cultivo con el asa de inoculación hasta formar una película fina de un largo de 60 mm.
4. Secar el portaobjetos con calor, moviéndolo de forma circular para evitar formación de patrones anulares.

El protocolo de tinción de Gram fue realizado de la siguiente forma:

1. Se añade cristal violeta y se deja actuar por un minuto.
2. Se enjuaga con agua destilada.
3. Se agrega Yodo Gram y se deja actuar por 5 minutos
4. Se enjuaga con agua destilada.
5. Se aplica alcohol-acetona, dejándolo actuar durante 1 minuto.
6. Se enjuaga con agua destilada.
7. Se adiciona safranina, la cual se deja actuar entre 10 y 15 minutos. Este tiempo prolongado se debe a que, a diferencia de la fucsina fenicada, la safranina presenta una menor pigmentación, por lo que se requiere un mayor tiempo de acción para intensificar la coloración de los organismos Gram negativos (Tripathi & Sapra, 2024b).
8. Posteriormente, se enjuaga y se coloca el cubreobjetos.
9. Finalmente, se realiza en examen microscópico. El portaobjetos se observó con el objetivo 100x y aceite de inmersión.

Los reactivos utilizados pertenecen al kit HYCEL, elaborado por HYCEL de México, S.A. de C.V., dicho kit contiene:

1. Violeta de genciana 1 x 125 ml
2. Yodo Gram 1 x 125 ml
3. Safranina 1 x 125 ml
4. Alcohol-Acetona 1 x 125 ml

7.5. Determinación del perfil de resistencia de antibióticos de cepas de Salmonella spp.

Para llevar a cabo estos ensayos se utilizaron dos condiciones nutricionales: Agar SS, descrito en el apartado 7.2.1, y otra en medio MacConkey, el cual sirve para aislar y diferenciar organismos entéricos. Este último es proporcionado por la empresa Becton Dickinson and Company. La formulación es mostrada en la tabla 13.

El medio de cultivo fue preparado de acuerdo con las indicaciones de la ficha técnica del proveedor.

Preparación del inóculo en medio líquido.

Para el cultivo de las bacterias seleccionadas se empleó el medio de cultivo LB (Luria-Bertani). La formulación es mostrada en la tabla 14.

Tabla 14. Componentes del medio LB.

Compuesto	Gramaje	Papel que desempeña
Cloruro de Sodio	10.0 g	Proporciona un equilibrio osmótico
Peptona de Caseína	10.0 g	Proveen los nutrientes necesarios para el desarrollo de los microrganismos
Extracto de Levadura	5.0 g	

El medio de cultivo fue preparado, se colocaron 3 mL en tubos tipo falcón y esterilizado a 121°C y 21 psi de presión durante 20 minutos.

Siembra del inóculo (Camacho Garrido, 2022).

1. Encender una lámpara de alcohol en una campana de flujo laminar para mantener condiciones estériles.
2. Flamear el asa bacteriológica hasta que esté incandescente para esterilizarla y dejar enfriar cerca de la llama durante 10 segundos.
3. Tomar una colonia del cultivo usando el asa.

4. Depositar la colonia en el medio dentro de un tubo mediante movimientos circulares.
5. Incubar a 37°C con agitación a 153 RPM por 24 horas para favorecer el crecimiento óptimo.

Preparación de diluciones seriadas de los cultivos empleados.

Para estandarizar la cantidad de inóculo, es necesario realizar factores de dilución, ya que la turbidez del cultivo es mayor que la del tubo con un valor de 0.5 en la escala de MacFarland. El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo con lo mostrado en la figura 4.

1. En condiciones de esterilidad se realizan factores de dilución seriales de 10^{-1} a 10^{-5}, colocando con una micropipeta 900 µL de agua destilada estéril en cada tubo y añadiendo 100 µL del cultivo original.
2. Agitar por inversión.
3. Tomar 100 µL del primer tubo y agregarlos al tubo etiquetado con la siguiente dilución y repetir el procedimiento.

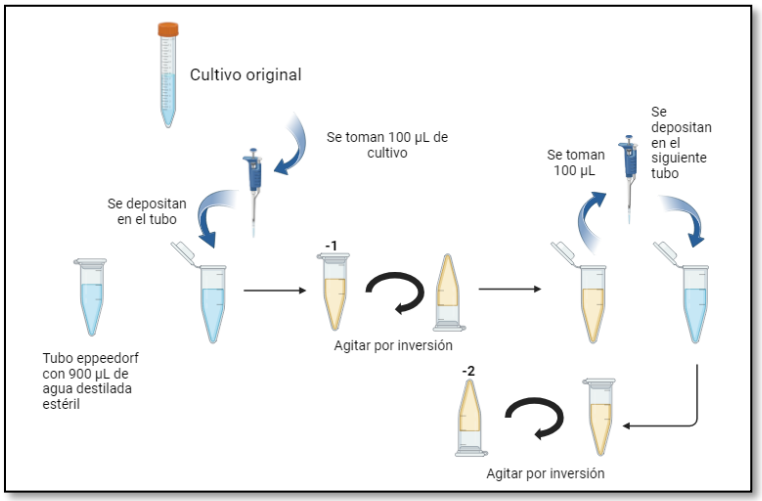


Figura 4. Esquema del proceso para realización de diluciones.

Inoculación en medio sólido y colocación de discos de antibióticos comerciales.

Para realizar el análisis de resistencia o sensibilidad a antibióticos se empleó la técnica de siembra por extensión en placa, para la obtención de un cultivo masivo de acuerdo con el siguiente procedimiento, el cual también se muestra en la figura 5:

1. Tomar 100 µL del factor de dilución que tenga la turbidez del tubo de 0.5 de la escala de McFarland.

2. Depositar en una placa Petri y se esparce el cultivo de manera uniforme en la caja Petri utilizando el asa de Digralsky previamente esterilizada.
3. Colocar el disco de antibióticos en la placa con ayuda de una pinza de disección estéril, asegurándose de que quede en perfecto contacto con la superficie del agar.
4. Incubar las placas con la tapa hacia arriba a 37°C durante 24 horas.
5. Trascurrido este tiempo, medir los diámetros de los halos de inhibición.

Cuando se determina el perfil de resistencia o susceptibilidad a los antibióticos de cualquier microorganismo se pueden obtener tres parámetros de clasificación (Calderón Jaimes Ernesto, 2000):

- Sensible: Nos indica que el antibiótico empleado inhibió el desarrollo del microorganismo y la infección causada por la cepa se puede tratar de forma adecuada con las dosis habituales del antibiótico.
- Intermedio: Indica que el halo al traducirlo a valores de CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) se aproxima a las concentraciones del antimicrobiano alcanzables en sangre o tejidos y se puede esperar eficacia clínica en aquellas localizaciones donde alcanza una alta concentración o se emplean dosis elevadas.
- Resistente: Hace referencia a los microorganismos que no son inhibidos por las concentraciones habituales de los antimicrobianos.

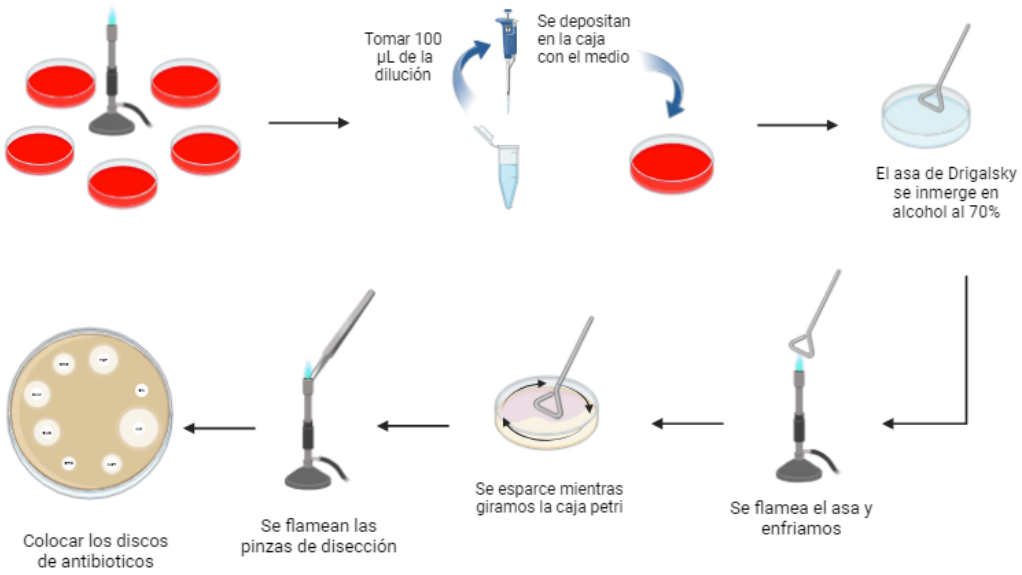


Figura 5. Diagrama de sembrado masivo.

Se utilizaron discos del proveedor “Investigación Diagnóstica”, para el medio MacConkey se utilizaron discos para bacterias Gram negativas, y para el medio Agar SS, utilizar discos de la serie Gram positivas y Gram negativas, los antibióticos se enlistan en la tabla 15.

Tabla 15. Antibióticos contenidos en los discos de la serie Gram –, y la seria Gram + y Gram –.

Antibiótico	Nomenclatura	Concentración
Amikacina	AK	30 μg
Ampicilina	AM	10 μg
*****Carbenicilina	CB	100 μg
Cefalotina	CF	30 μg
Cefotaxima	CFX	30 μg
*****Ciprofloxacino	CPF	5 μg
Cloranfenicol	CL	30 μg
Gentamicina	GE	10 μg
Netilmicina	NET	30 μg
Nitrofurantoína	NF	300 μg
*****Norfloxacino	NOF	10 μg
Sulfametoxazol/Trimetroprim	STX	25 μg
°Dicloxacilina	DC	1 μg
°Ceftriaxona	CTX	30 μg
°Penicilina	PE	10 U

*Nota: Para ambas series los antibióticos son los mismos a excepción de los marcados con * que pertenecen exclusivamente a los discos de la serie Gram -, mientras que los marcados con ° son de los discos Gram positivos y Gram negativos.*

7.6. Conteo de bacterias

El método de conteo del número de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) empleando la siembra de factores de dilución en placa proporciona información con respecto a la cantidad de microorganismos sembrados en una placa (Camacho Garrido, 2022).

Para ello se realiza el procedimiento mencionado en el punto 7.5 y se sembraron los factores de dilución 10^{-6} para cada una de las cepas.

7.7. Pruebas bioquímicas

Para *Shigella* se seleccionaron exclusivamente tres pruebas las cuales son: descarboxilación y desaminación de la lisina, además de la producción de ácido sulfhídrico, fermentación de carbohidratos y urea como única fuente de nitrógeno.

7.7.1. ***Prueba de catalasa.***

El procedimiento es el siguiente:

1. Se tiene un medio de cultivo en placa con el microorganismo de interés.
2. Se coloca peróxido de hidrogeno sobre el cultivo.
3. En caso de haber presencia de catalasa el H_2O_2 se descompondrá en agua y oxigeno gaseoso (Rosanna Hartline, 2024), por lo tanto, se apreciará un burbujeo.

7.7.2. ***Descarboxilación de lisina y desaminación de lisina.***

El medio que se utiliza es elaborado en México por MCD LAB. S.A. de C.V. La formulación es mostrada en la tabla 16.

Preparación.

1. El medio de cultivo fue preparado de acuerdo con las indicaciones de la ficha técnica del proveedor.
2. Fue colocado en tubos de vidrio de 13 x 100 mm, tapar y esterilizado en autoclave a 121°C a 15 libras de presión durante 15 minutos.
3. Se dejó enfriar en posición inclinada.
4. Para la inoculación con el microorganismo de interés se introduce el asa en forma recta hasta el fondo del tubo y se finaliza con una estría sencilla en la punta de la inclinación del agar.

7.7.3. ***Fermentación de carbohidratos.***

Se evalúa la capacidad de fermentar la lactosa, sacarosa y dextrosa, de los microorganismos, con su respectiva producción de gas, se determinó mediante crecimiento en agar de hierro y triple azúcar. Elaborado por BD Bioxon. La formulación es mostrada en la tabla 17.

1. El medio de cultivo se prepara de acuerdo con las indicaciones de la ficha técnica del proveedor.
2. El medio se distribuye en tubos de 13 x 100 mm.
3. Esterilizar a 118°C durante 15 minutos.
4. Los tubos se deben enfriar en posición inclinada de manera que el medio de cultivo en el fondo del tubo alcance una profundidad de 1.5 a 2.0 cm.
5. El protocolo de inoculación es igual al descrito en la prueba bioquímica mencionada en punto 7.7.2.

7.7.4. ***Citrato de Simmons.***

Con respecto a la prueba en la que se mide la capacidad de las enterobacterias de usar citrato como única fuente de carbono se ocupa medio citrato de Simmons. Este medio es proporcionado por Becton Dickinson de México, S.A. de C.V.

La formulación es mostrada en la tabla 18.

Método de preparación.

1. El medio de cultivo se prepara de acuerdo con las indicaciones de la ficha técnica del proveedor.
2. Inoculación con el microorganismo de interés: se llevó a cabo empleando la metodología del punto 7.5, con la diferencia de inocular 50 µl, debido a que la caja es más pequeña

7.7.5. ***Prueba de Urea.***

Otro análisis que ayuda en la identificación de *Salmonella* y *Shigella* es la prueba de urea, la cual se realiza en un medio liquido denominado medio urea. El medio, elaborado por Becton Dickinson and Company tiene su formulación presentada en la tabla 19.

Preparación.

1. El medio de cultivo se prepara de acuerdo con las indicaciones de la ficha técnica del proveedor.
1. Esterilizar por filtración empleando un filtro con un tamaño de poro de la membrana de 0.45 µm de la marca MILLEX®HA.
2. No hervir ni autoclave el medio.
3. Colocar los tubos a prueba de esterilidad en agitación de 153 RPM a 37°C durante 24 horas. El color original del medio es naranja; en caso de contaminación, vira a rosa.

7.7.6. Descarboxilación de la Ornitina.

Para este estudio se utilizó medio MIO, el cual se usa para diferenciar enterobacterias basado en su movilidad, actividad de la ornitina descarboxilasa y su producción de indol. Elaborado por Difco Laboratories. La formulación es mostrada en la tabla 20.

Instrucciones.

1. El medio de cultivo se prepara de acuerdo con las indicaciones de la ficha técnica del proveedor.

2. Inoculación con el microorganismo de interés: debido a que el medio posee una consistencia semisólida, permite identifica la movilidad de las bacterias. Por lo tanto, para su inoculación, se debe seguir el procedimiento del punto 7.7.2, omitiendo la estría en la punta del medio.

7.7.7. Prueba de Movilidad y Producción de Sulfuro.

Esta prueba se lleva a cabo en medio SIM, el cual sirve para la detección de producción de sulfuro, formación de indol y motilidad. Producido por Becton Dickinson y Compañía. La formulación es mostrada en la tabla 21.

Método de preparación.

1. El medio de cultivo se prepara de acuerdo con las indicaciones de la ficha técnica del proveedor.
2. Inoculación con el microorganismo de interés: este medio al igual que el anterior es de consistencia semisólida. Por lo tanto, se sigue la misma metodología de inoculación.

8. RESULTADOS

8.1. Género Salmonella

8.1.1. Identificación de las cepas del género Salmonella mediante métodos microbiológicos

Al sembrar las cepas en medio agar SS, se obtuvo un crecimiento adecuado, como se puede apreciar en la Figura 6, observándose el color negro característico de las cepas del género *Salmonella* en este medio de cultivo.

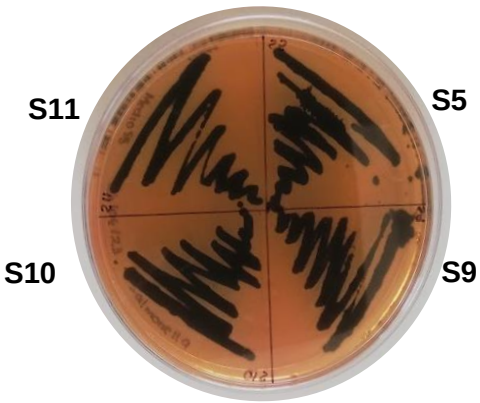


Figura 6. Cultivo de cepas de Salmonella.

Al resembrar las cepas mediante la técnica de estría cruzada, se observó la presencia de otras morfologías además de las de interés como se muestra en la Figura 7. Cabe resaltar que, al tratarse de aislados ambientales, estos podrían no encontrarse puros y estar contaminados con otras bacterias productoras de ácido sulfhídrico (H_2S). Estos resultados permiten sospechar la posible presencia de cultivos mixtos entre *Salmonella y Citrobacter*, ya que ambos microorganismos tienen la capacidad de producir H_2S.

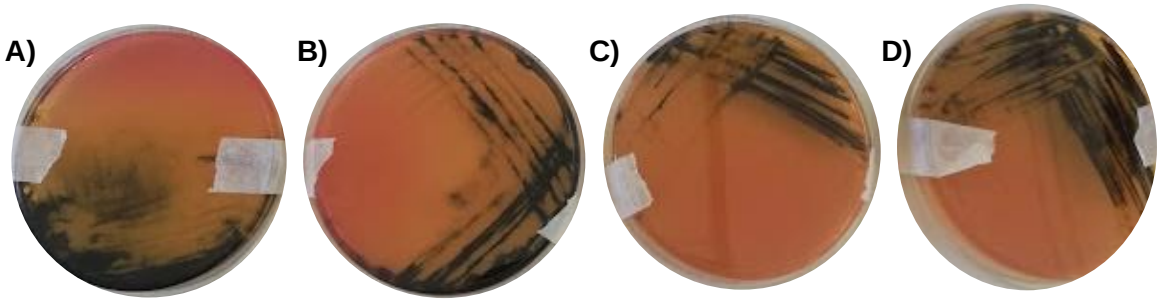


Figura 7. Cultivo de cepas de Salmonella por estría cruzada.
A) S_5. B) S_9. C) S_{10}. D) S_{11}.

Por lo anteriormente mencionado fue necesario resembrar hasta obtener cultivos completamente puros (Figura 8). Debido a esto, se reasignó una nomenclatura diferente a los aislados de *Salmonella* spp*,* diferenciándolos de *Citrobacter spp*. Las cepas purificadas de *Salmonella* spp con el nombre asignado se muestran en la tabla 22.

Tabla 22. Reasignación de nomenclaturas para las cepas de interés.

Nomenclatura anterior	**Nomenclatura nueva**
S_5	MIR Sal 3
S_9	MIR Sal 8
S_{10}	MIR Sal 19
S_{11}	MIR Sal 24

Los cultivos purificados presentaron colonias uniformes, de color negro con un halo transparente, los cultivos ya no mostraban morfologías combinadas, ni rastros de contaminación de otros microorganismos.

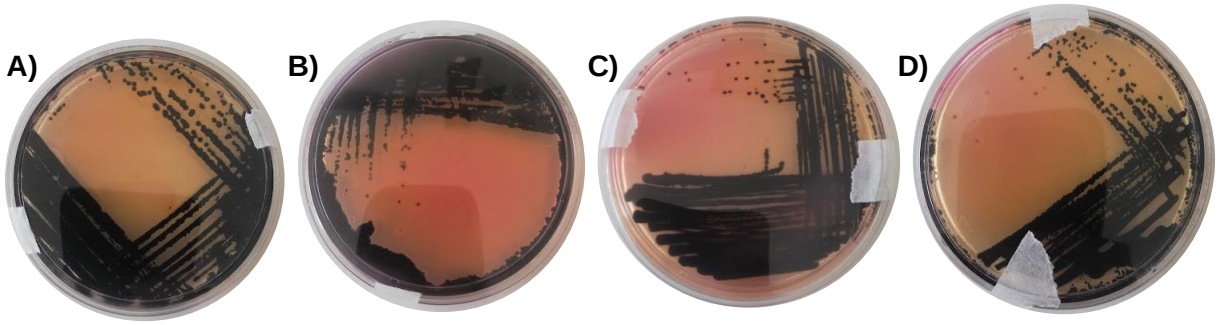


Figura 8. Aislamiento de colonias de Salmonella en medio SS.
A) MIR Sal 3. B) MIR Sal 8. C) MIR Sal 19. D) MIR Sal 24.

Una vez que se obtuvieron los cultivos puros se realizó la descripción de las características morfológicas como se muestra en la tabla 23.

Tabla 23. Descripción de características morfológicas de cepas de Salmonella.

	Características						
Cepa	**Forma**	**Tamaño**	**Color**	**Elevación**	**Superficie**	**Forma del borde**	**Consistencia**
MIR Sal 3	Circular	2-4 mm	Negras con halo transparente	Elevada	Brillante	Entero	Viscosa
MIR Sal 8	Circular	2-4 mm	Negras con halo transparente	Elevada	Brillante	Entero	Viscosa
MIR Sal 19	Circular	2-4 mm	Negras con halo transparente	Elevada	Brillante	Entero	Viscosa
MIR Sal 24	Circular	2-4 mm	Negras con halo transparente	Elevada	Brillante	Entero	Viscosa

Al sembrar las cepas en medio verde brillante se obtuvo un crecimiento óptimo como se puede apreciar en la figura 9. En esta condición nutrimental podemos observar colonias incoloras. El principio del agar verde brillante en incorporar indicadores e inhibidores específicos, el medio facilita la identificación de microorganismos fermentadores de lactosa o sacarosa y el aislamiento de bacterias.

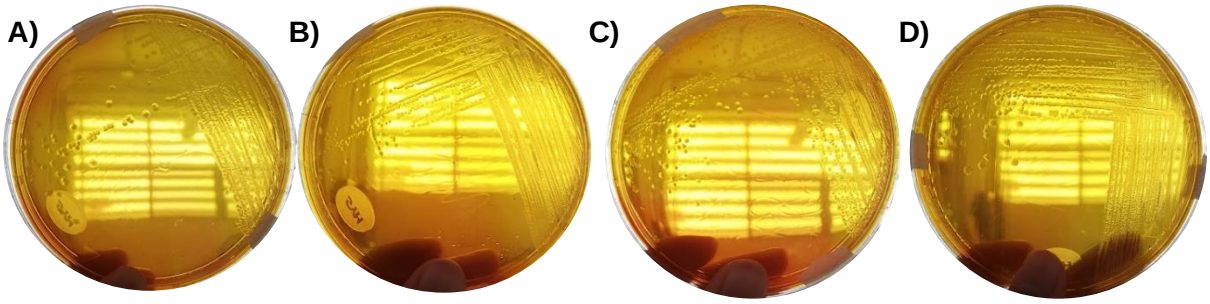


Figura 9. Aislamiento de colonias de Salmonella en agar Verde Brillante.

A) MIR Sal 3. B) MIR Sal 8. C) MIR Sal 19. D) MIR Sal 24.

8.1.2. Observación de la morfología bacteriana mediante técnicas de tinción

El análisis al microscopio demostró la presencia de bacterias con una coloración roja/rosada como se muestra en la figura 10, lo cual concuerda con lo esperado al ser Enterobacterias del género *Salmonella spp,* las bacterias además tienen una forma bacilar. Por lo que son bacilos Gram negativos.

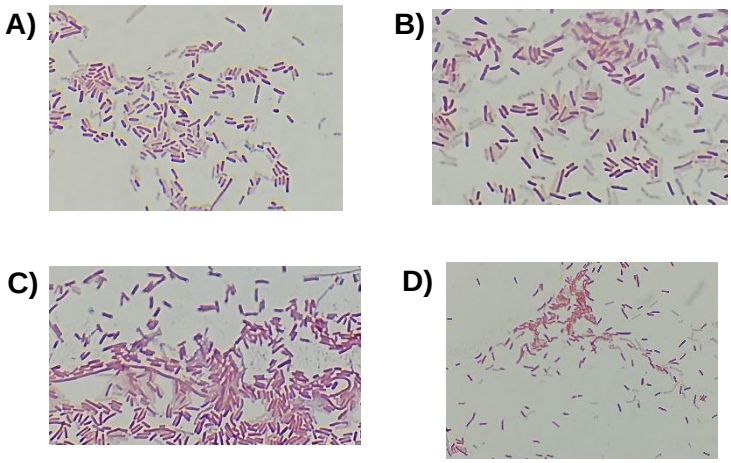


Figura 10. Tinción de Gram de cepas de Salmonella spp.
A) MIR Sal 3. B) MIR Sal 8. C) MIR Sal 19. D) MIR Sal 24.

8.1.3. Determinación del perfil de resistencia a antibióticos.

Para la cepa MIR Sal 3 en medio MacConkey se muestran en la tabla 24. El halo de inhibición se reporta en milímetros. La cepa MIR Sal 3 fue resistente a Siete de los doce antibióticos probados y fueron sensibles a tres antibióticos.

Tabla 24. Determinación del perfil de resistencia o susceptibilidad a los antibióticos para la cepa MIR Sal 3.

Cepa		Antibiótico	Concentración	Halo de inhibición en mm	Perfil
MIR Sal 3	AM	Ampicilina	10 µg	0	Resistente
	AK	Amikacina	30 µg	18	Sensible
	CB	Carbenicilina	100 µg	0	Resistente
	GE	Gentamicina	10 µg	8	Resistente
	CF	Cefalotina	30 µg	0	Resistente
	CFX	Cefotaxima	30 µg	20	Intermedio

	NET	Netilmicina	30 µg	16	Sensible
	CPF	Ciprofloxacino	5 µg	20	Intermedio
	NOF	Norfloxacino	10 µg	8	Resistente
	CL	Cloranfenicol	30 µg	0	Resistente
	SXT	Sulfametoxazol /Trimetroprim	25 µg	10	Resistente
	NF	Nitrofurantoína	300 µg	20	Sensible

En la tabla 25 se presentan los resultados de la susceptibilidad antimicrobiana de la cepa MIR Sal 8 en medio de cultivo MacConkey. En el caso de la cepa MIR Sal 8 mostró una mayor resistencia, ya que fue resistente a diez de los doce antibióticos probados y fue sensible a dos antibióticos.

Tabla 25. Determinación del perfil de resistencia o susceptibilidad a los antibióticos para la cepa MIR Sal 8 en medio MacConkey.

Cepa		Antibiótico	Concentración	Halo de inhibición en mm	Perfil
MIR Sal 8	AM	Ampicilina	10 µg	0	Resistente
	AK	Amikacina	30 µg	20	Sensible
	CB	Carbenicilina	100 µg	0	Resistente
	GE	Gentamicina	10 µg	10	Resistente
	CF	Cefalotina	30 µg	0	Resistente
	CFX	Cefotaxima	30 µg	14	Resistente
	NET	Netilmicina	30 µg	6	Resistente
	CPF	Ciprofloxacino	5 µg	0	Resistente
	NOF	Norfloxacino	10 µg	0	Resistente
	CL	Cloranfenicol	30 µg	0	Resistente
	STX	Sulfametoxazol /Trimetroprim	25 µg	6	Resistente
	NF	Nitrofurantoína	300 µg	24	Sensible

En la tabla 26 se muestran los resultados para el perfil de resistencia a antibióticos para la cepa MIR Sal 19. La cepa MIR Sal 19 fue resistente a Siete de los doce antibióticos probados y fue sensible a cinco antibióticos.

Tabla 26. Determinación del perfil de resistencia o susceptibilidad a los antibióticos para la cepa MIR Sal 19 cultivada en medio MacConkey.

Cepa		Antibiótico	Concentración	Halo de inhibición en mm	Perfil
	AM	Ampicilina	10 µg	0	Resistente
	AK	Amikacina	30 µg	18	Sensible

MIR Sal 19	CB	Carbenicilina	100 µg	0	Resistente
	GE	Gentamicina	10 µg	12	Resistente
	CF	Cefalotina	30 µg	0	Resistente
	CFX	Cefotaxima	30 µg	24	Sensible
	NET	Netilmicina	30 µg	30	Sensible
	CPF	Ciprofloxacino	5 µg	0	Resistente
	NOF	Norfloxacino	10 µg	0	Resistente
	CL	Cloranfenicol	30 µg	0	Resistente
	STX	Sulfametoxazol /Trimetroprim	25 µg	32	Sensible
	NF	Nitrofurantoína	300 µg	36	Sensible

La Tabla 27 muestra los resultados de la susceptibilidad antimicrobiana de la cepa MIR Sal 24 cultivada en medio MacConkey, los resultados indicaron que la cepa MIR Sal 24 fue resistente a ocho de los doce antibióticos probados, intermedio a dos y sensible a dos antibióticos.

Tabla 27. Determinación del perfil de resistencia o susceptibilidad a los antibióticos para la cepa MIR Sal 24.

Cepa		Antibiótico	Concentración	Halo de inhibición en mm	Perfil
MIR Sal 24	AM	Ampicilina	10 µg	4	Resistente
	AK	Amikacina	30 µg	12	Resistente
	CB	Carbenicilina	100 µg	2	Resistente
	GE	Gentamicina	10 µg	10	Resistente
	CF	Cefalotina	30 µg	0	Resistente
	CFX	Cefotaxima	30 µg	24	Sensible
	NET	Netilmicina	30 µg	14	Intermedio
	CPF	Ciprofloxacino	5 µg	20	Intermedio
	NOF	Norfloxacino	10 µg	12	Resistente
	CL	Cloranfenicol	30 µg	0	Resistente
	STX	Sulfametoxazol/Trimetroprim	25 µg	0	Resistente
	NF	Nitrofurantoína	300 µg	24	Sensible

Durante la determinación del perfil de resistencia para cada antimicrobiano, se observó que todas las cepas analizadas mostraron resistencia a la ampicilina.

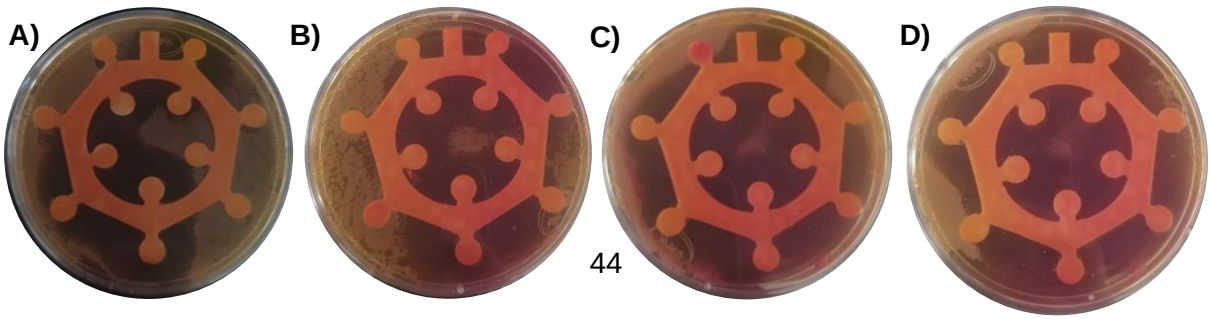


Figura 11. Antibiogramas en medio MacConkey de las cepas presuntivas de Salmonella spp. A) MIR Sal 3. B) MIR Sal 8. C) MIR Sal 19. D) MIR Sal 24.

En la tabla 28 se muestran los resultados obtenidos para la cepa MIR Sal 3, para esta prueba se emplearon los antibióticos correspondientes a la serie 2 para bacterias Gram + y Gram -, esto se debió a que se contaba sólo con estos antibióticos en existencia. Los resultados indican que la cepa fue resistente a seis antibióticos, intermedio a uno y sensible a cinco antibióticos.

Tabla 28. En agar SS se muestra la determinación del perfil de resistencia o susceptibilidad a los antibióticos para la cepa MIR Sal 3.

Cepa		Antibiótico	Concentración	Halo de inhibición en mm	Perfil
MIR Sal 3	AM	Ampicilina	10 µg	4	Resistente
	AK	Amikacina	30 µg	8	Resistente
	CFX	Cefotaxima	30 µg	28	Sensible
	DC	Dicloxacilina	1 µg	4	Resistente
	CF	Cefalotina	30 µg	16	Intermedio
	CTX	Ceftriaxona	30 µg	24	Sensible
	GE	Gentamicina	10 µg	10	Resistente
	CL	Cloranfenicol	30 µg	0	Resistente
	SXT	Sulfametoxazol/Trimetroprim	25 µg	24	Sensible
	PE	Penicilina	10 U	6	Resistente
	NET	Netilmicina	30 µg	16	Sensible
	NF	Nitrofurantoína	300 µg	20	Sensible

La Tabla 29 presentan los resultados obtenidos en las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana realizadas a la cepa MIR Sal 8, utilizando medio de cultivo agar SS. En esta tabla se observa que esta cepa mostró una mayor sensibilidad a los antibióticos probados, ya que sólo fue resistente a cuatro de los doce antibióticos probados, es probable que para esta cepa la condición nutricional si influya en la expresión del fenotipo de resistencia, ya que en medio agar MacConkey esta cepa mostró ser más resistente.

Tabla 29. En agar SS se muestra la determinación del perfil de resistencia o susceptibilidad a los antibióticos para la cepa MIR Sal 8.

Cepa		Antibiótico	Concentración	Halo de inhibición en mm	Perfil
MIR Sal 8	AM	Ampicilina	10 µg	0	Resistente
	AK	Amikacina	30 µg	*	Sensible
	CFX	Cefotaxima	30 µg	34	Sensible
	DC	Dicloxacilina	1 µg	*	Sensible
	CF	Cefalotina	30 µg	0	Resistente
	CTX	Ceftriaxona	30 µg	48	Sensible
	GE	Gentamicina	10 µg	*	Sensible
	CL	Cloranfenicol	30 µg	8	Resistente
	SXT	Sulfametoxazol/Trimetroprim	25 µg	*	Sensible
	PE	Penicilina	10 U	0	Resistente
	NET	Netilmicina	30 µg	*	Sensible
	NF	Nitrofurantoína	300 µg	34	Sensible

A continuación, en la tabla 30, se presentan los resultados de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana realizadas a la cepa MIR Sal 19. Como se puede observar en esta condición nutricional la cepa bacteriana fue resistente a siete antibióticos, intermedio a dos y sensible a tres antibióticos probados, similar al fenotipo de resistencia obtenido en agar MacConkey donde fue resistente a 8 antibióticos.

Tabla 30. Determinación del perfil de resistencia o susceptibilidad a los antibióticos para la cepa MIR Sal 19.

Cepa		Antibiótico	Concentración	Halo de inhibición en mm	Perfil
MIR Sal 19	AM	Ampicilina	10 µg	0	Resistente
	AK	Amikacina	30 µg	12	Resistente
	CFX	Cefotaxima	30 µg	32	Sensible
	DC	Dicloxacilina	1 µg	2	Resistente
	CF	Cefalotina	30 µg	4	Resistente
	CTX	Ceftriaxona	30 µg	36	Sensible
	GE	Gentamicina	10 µg	14	Intermedio
	CL	Cloranfenicol	30 µg	14	Intermedio
	SXT	Sulfametoxazol/Trimetroprim	25 µg	0	Resistente
	PE	Penicilina	10 U	0	Resistente
	NET	Netilmicina	30 µg	12	Resistente
	NF	Nitrofurantoína	300 µg	34	Sensible

La Tabla 31 presenta los resultados obtenidos en las pruebas de sensibilidad antimicrobiana efectuadas a la cepa MIR Sal 24. Los resultados indica que la cepa

fue resistente a siete antibióticos, intermedio a dos y sensible a tres antibióticos, mostrando un comportamiento similar al obtenido en agar MacConkey.

Tabla 31. Determinación del perfil de resistencia o susceptibilidad a los antibióticos para la MIR Sal 24.

Cepa	Antibiótico		Concentración en µg	Halo de inhibición en mm	Fenotipo
MIR Sal 24	AM	Ampicilina	10 µg	4	Resistente
	AK	Amikacina	30 µg	16	Intermedio
	CFX	Cefotaxima	30 µg	30	Sensible
	DC	Dicloxacilina	1 µg	4	Resistente
	CF	Cefalotina	30 µg	0	Resistente
	CTX	Ceftriaxona	30 µg	30	Sensible
	GE	Gentamicina	10 µg	8	Resistente
	CL	Cloranfenicol	30 µg	6	Resistente
	SXT	Sulfametoxazol /Trimetroprim	25 µg	0	Resistente
	PE	Penicilina	10 U	0	Resistente
	NET	Netilmicina	30 µg	16	Intermedio
	NF	Nitrofurantoína	300 µg	36	Sensible

*Nota. * Significa que no hay una colonia próxima para tomar el halo de inhibición, por lo tanto, solo se reporta como "sensible".*

De manera similar a los resultados obtenidos en el medio MacConkey todas las cepas probadas en el medio agar SS fueron resistentes a la ampicilina.

En La figura 12 se muestran los antibiogramas obtenidos para las cepas en medio agar SS, se observan claramente las zonas de crecimiento en color negro cuando las cepas fueron resistentes y los halos de inhibición cuando fueron sensibles.

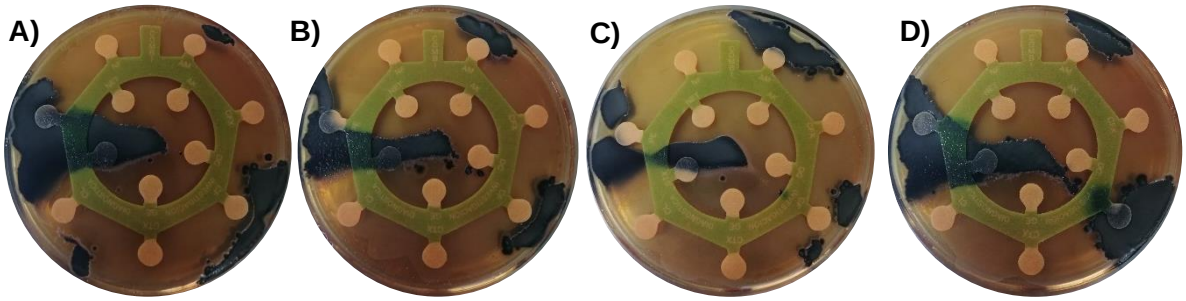


Figura 12. Antibiogramas en medio SS de las cepas presuntivas de Salmonella spp. A) MIR Sal 3. B) MIR Sal 8. C) MIR Sal 19. D) MIR Sal 24.

8.1.4. Conteo de unidades formadoras de colonias (UFC/mL)

El conteo de bacterias se realizó únicamente en medio agar SS, debido a la carga microbiana se realizaron factores de dilución seriados y se contabilizaron las colonias en los factores que era posible contar de manera precisa las colonias.

Para obtener el conteo de cada una de nuestras cepas se calcula en UFC /mL, es decir, número de colonias presentes en la caja Petri x factor de dilución en este caso (1,000,000) x 10, ya que se sembraron 100 microlitros de muestra. Este método proporciona una estimación cuantitativa de los microorganismos viables presentes en la muestra. Los resultados se enlistan en la tabla 32, cabe recalcar que el conteo se realizó en el facto de dilución 10^{-6}.

Tabla 32. Conteo del número de unidades formadoras de colonia (UFC/mL) de las cepas empleadas.

Cepa	UFC/mL
MIR Sal 3^{-6}	$2.6 \cdot 10^{-8}$
MIR Sal 8^{-6}	$2.1 \cdot 10^{-8}$
MIR Sal 19^{-6}	$9 \cdot 10^{-7}$
MIR Sal 24^{-6}	$1.4 \cdot 10^{-8}$

En la Figura 13 se presenta el número de colonias en medio de cultivo SS, obtenidas a partir de la siembra de un volumen de 100 µL de la muestra, correspondiente a al factor de dilución 10^{-6}. Se observan las colonias con la morfología reportada en la literatura para bacterias del género *Salmonella* spp.

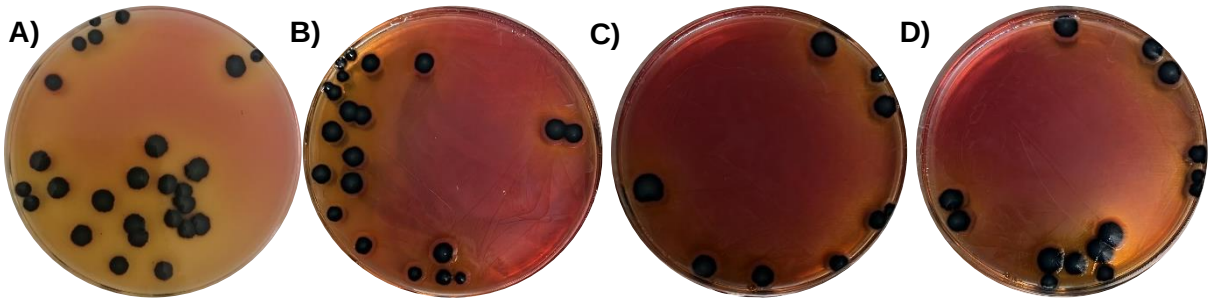
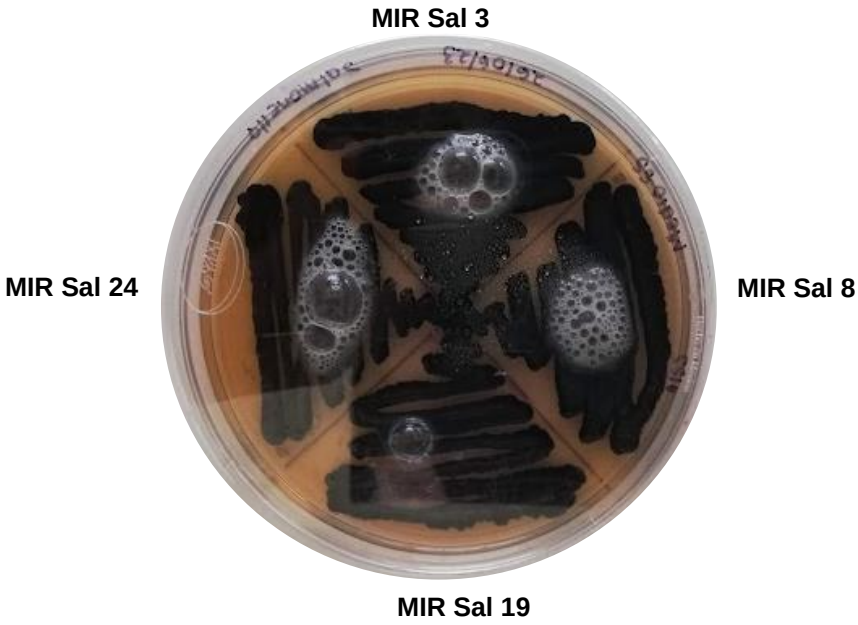


Figura 13. Unidades Formadoras de Colonias de las cepas empleadas en medio de cultivo agar SS en el factor de dilución 10^{-6}. A) MIR Sal 3. B) MIR Sal 8. C) MIR Sal 19. D) MIR Sal 24.

8.1.5. Pruebas bioquímicas

8.1.5.1. Prueba de catalasa

Las cuatro cepas de *Salmonella* probadas para evaluar cepas la presencia de la enzima catalasa presentaron burbujeo al agregar el peróxido de hidrogeno, en decir la prueba es positiva para las cuatro cepas estudiadas.



Prueba de Catalasa	Cepas			
	MIR Sal 3	MIR Sal 8	MIR Sal 19	MIR Sal 24
Resultado	+	+	+	+

Figura 14. Prueba de catalasa en cepas presuntivas de Salmonella.

8.1.5.2. Descarboxilación de lisina y desaminación de lisina

En las cepas probadas, las cuatro presentan la superficie violeta y el fondo amarillo, figura 15, por lo tanto, podemos decir que son negativas tanto para descarboxilación de lisina y desaminación de lisina. Este resultado de acuerdo con lo reportado en la ficha técnica del medio de cultivo para *Salmonella* spp.

Prueba	Cepas			
	MIR Sal 3	MIR Sal 8	MIR Sal 19	MIR Sal 24
Descarboxilación de lisina	-	-	-	-
Desaminación de lisina	-	-	-	-

Figura 15. Prueba de descarboxilación y desaminación de lisina en cepas presuntivas de Salmonella spp.

8.1.5.3. Fermentación de carbohidratos

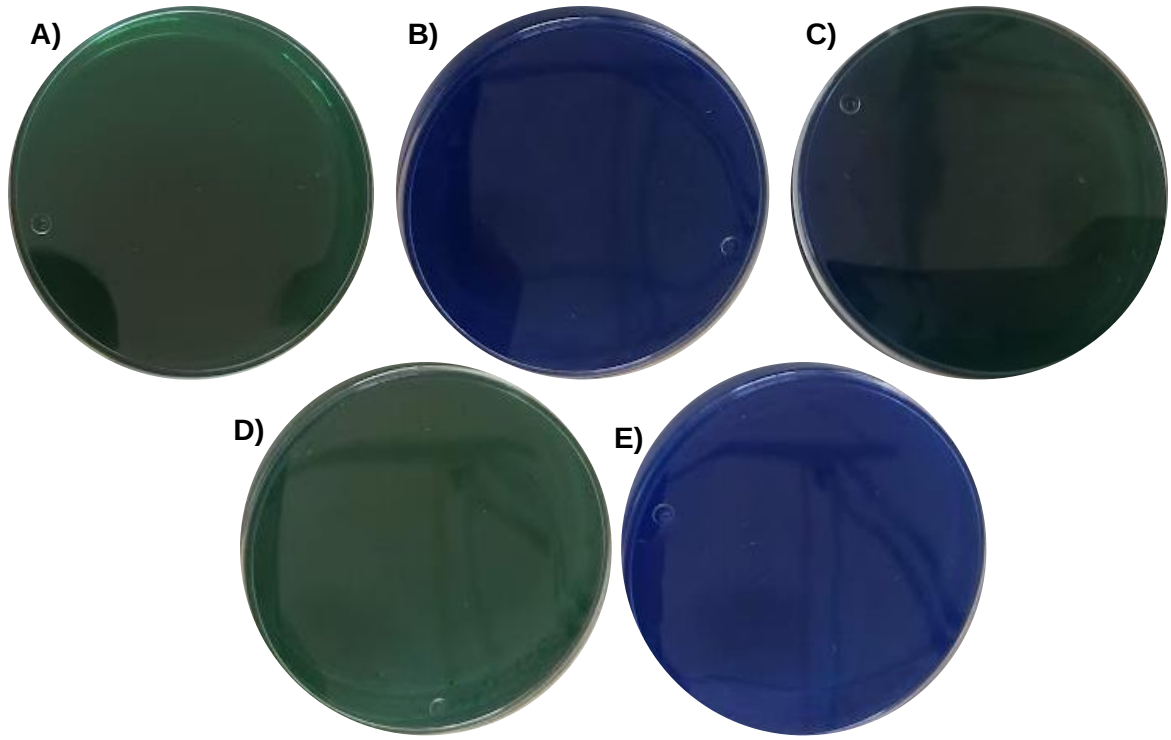
En la figura 16 observamos que las cepas empleadas fermentaron los siguientes carbohidratos: glucosa, lactosa y/o sacarosa, ya que tanto la superficie como el fondo del tubo se observa que viraron a color amarillo. Este resultado es diferente de acuerdo con la información de la ficha técnica del medio, sin embargo, se han reportado subespecies atípicas de *Salmonella entérica* no Tiphy fermentadoras de lactosa (García, et al., 2024).

Prueba	Cepas			
	MIR Sal 3	MIR Sal 8	MIR Sal 19	MIR Sal 24
Fermentación de carbohidratos	+	+	+	+

Figura 16. Prueba de fermentación de carbohidratos en cepas presuntivas de Salmonella. De izquierda a derecha: MIR Sal 3, MIR Sal 8, MIR Sal 19, MIR Sal 24 y el Control.

8.1.5.4. Citrato de Simmons

Dos de las cuatro cepas estudiadas mostraron un resultado positivo: MIR Sal 3 y MIR Sal 24, por otro lado, las cepas, MIR Sal 8 y MIR Sal 19 arrojaron un resultado negativo, lo que quiere decir que no usan el citrato como una fuente carbono y energía. En el caso de las cepas MIR Sal 3 y MIR Sal 24 concuerdan con lo esperado para el género *Salmonella spp* de acuerdo con la ficha técnica del medio de cultivo.

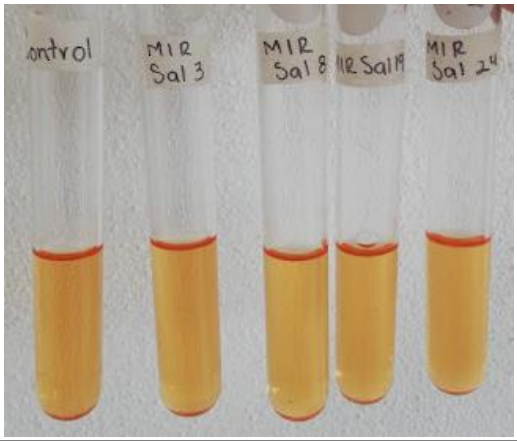


Prueba	Cepas			
	MIR Sal 3	MIR Sal 8	MIR Sal 19	MIR Sal 24
Citrato de Simmons	+	-	-	+

Figura 17. Prueba de citrato de Simmons. A) Control, B) MIR Sal 3. C) MIR Sal 8. D) MIR Sal 19. E) MIR Sal 24.

8.1.5.5. Prueba de Urea

Los resultados indicaron que las cuatro cepas probadas no hidrolizan urea, ya que, el medio de los cuatro tubos permaneció del color original del medio como se muestra en la figura 16. Este resultado concuerda con lo esperado de acuerdo con la ficha técnica para *Salmonella* spp.

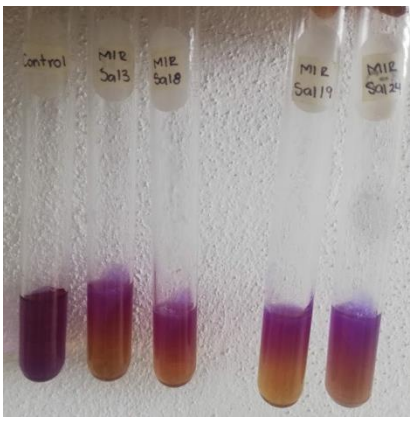


Prueba	Cepas			
	MIR Sal 3	MIR Sal 8	MIR Sal 19	MIR Sal 24
Urea	-	-	-	-

Figura 18. Prueba de Urea en cepas presuntivas de Salmonella.
De izquierda a derecha: Control, MIR Sal 3, MIR Sal 8, MIR Sal 19 y MIR Sal 24.

8.1.5.6. Descarboxilación de la Ornitina.

Los resultados indicaron que las cepas presentan una coloración amarilla con la superficie violeta, en la figura 19 se observa el resultado negativo para esta prueba, lo cual concuerda con lo reportado en la ficha técnica para Salmonella.

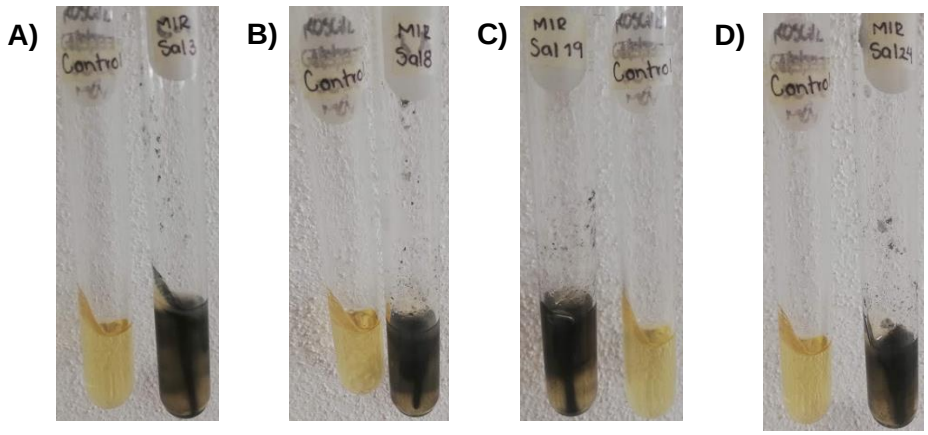


Prueba	Cepas			
	MIR Sal 3	MIR Sal 8	MIR Sal 19	MIR Sal 24
Descarboxilación de ornitina	-	-	-	-

Figura 19. Prueba de descarboxilación de Ornitina en cepas presuntivas de Salmonella. De izquierda a derecha: Control, MIR Sal 3, MIR Sal 8, MIR Sal 19 y MIR Sal 24.

8.1.5.7. Prueba de movilidad y producción de sulfuro

Las cuatro cepas examinadas presentan tanto un crecimiento más allá de la línea de inoculación, además de presentar coloraciones negras, por lo tanto, los resultados son positivos para ambas pruebas. Estos resultados concuerdan con lo planteado en la ficha técnica para Salmonella.



Prueba	Cepas			
	MIR Sal 3	MIR Sal 8	MIR Sal 19	MIR Sal 24
Movilidad	+	+	+	+
Producción de SH_2	+	+	+	+

Figura 20. Prueba de descarboxilación de Movilidad y Producción de SH_2 en cepas presuntivas de Salmonella. A) MIR Sal 3, B) MIR Sal 8, C) MIR Sal 19 y D) MIR Sal 24. Cada cepa fue comparada con el control.

8.2. Identificación de cepas presuntivas del Género Shigella

8.2.1. Identificación microbiológica.

En la figura 21 podemos observar que las cuatro cepas seleccionadas crecieron de manera óptima en medio EMB. Para corroborar la pureza del cultivo se resembró por estría cruzada para tener colonias aisladas y observar la morfología colonial.

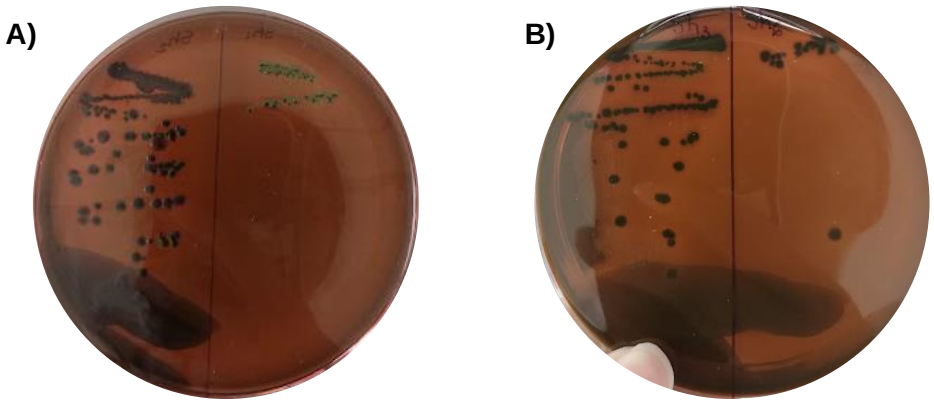


Figura 21. Crecimiento de cepas presuntivas de Shigella spp en medio EMB. A) Del lado izquierdo Sh_2, a la derecha Sh_1. B) Del lado izquierdo Sh_3, del lado derecho Sh_6.

Al ser sembradas por estría cruzada se confirmó que los cultivos estaban contaminados y tres de las cuatro cepas no eran el microorganismo de interés (Sh1, Sh2 y Sh3), es decir, no eran *Shigella*, sino *E. coli*, ya que presentaban un color verde metálico característico de dicho microorganismo en medio de cultivo EMB, y la última presentaba las características de *Shigella* (Sh_2), es decir, las colonias formadas tenían un color morado/transparente.

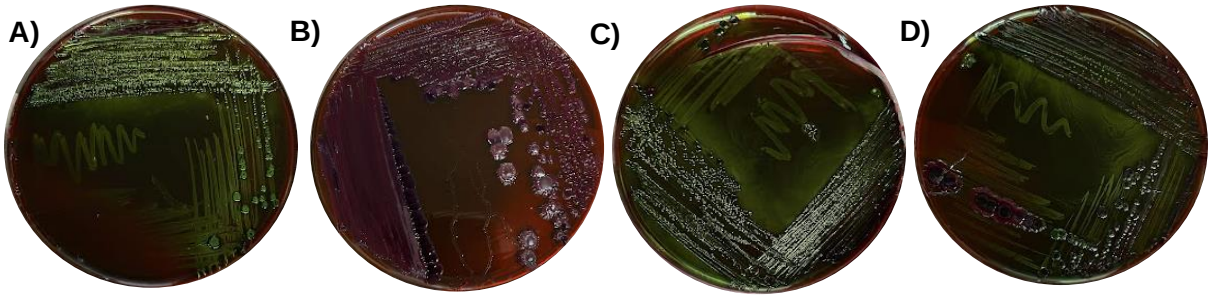


Figura 22. Crecimiento de cepas presuntivas de Shigella en medio EMB. A) Sh_1, B) Sh_2, C) Sh_3, D) Sh_6.

Con la cepa seleccionada se siguió resembrando para purificar el cultivo y realizar las pruebas bioquímicas correspondientes para su identificación, en la figura 23 se observa a la cepa Sh_2 en medio EMB.

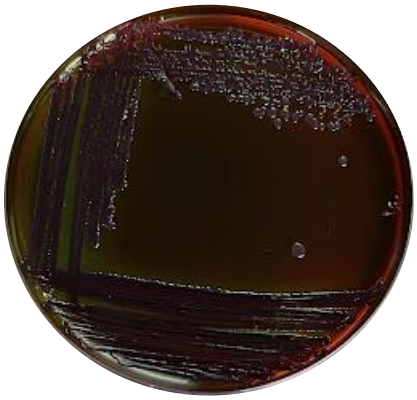


Figura 23. Aislamiento de la cepa Sh_2 en medio EMB.

En la tabla 33, se muestran las características morfológicas obtenidas en medio agar SS para la cepa Sh_2 del género *Shigella.*

Tabla 33. Descripción de características morfológicas de la cepa de Shigella cepa Sh2.

Cepa	**Características morfológicas**						
	Forma	Tamaño	Color	Elevación	Superficie	Forma del borde	Consistencia
Sh_2	Circular	3 mmm	Incoloras	Elevada	Opaca	Entero	Viscosa

8.2.2. Morfología bacteriana al microscopio

Al realizar el examen microscópico se pudo observar que el microorganismo, posee una forma bacilar y presenta una coloración rosa-rojiza, por lo tanto, en la figura 24 se observa la tinción de Gram característica de un bacilo Gram negativo.

Figura 24. Cepa Sh_2 presuntiva de Shigella sp vista a al microscopio en un aumento de 100X.

8.2.3. Pruebas bioquímicas

8.2.3.1. Descarboxilación, desaminación de la lisina y producción de ácido sulfhídrico

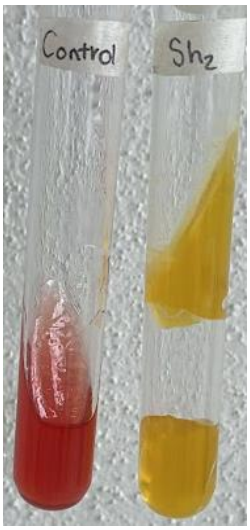
Al realizar la prueba nos podemos percatar que se presentó un ligero cambio de coloración, en la superficie se aprecia una tonalidad ligeramente violeta y el fondo se conserva el color del medio, además no tener precipitados de color negro, por lo tanto, el resultado es negativo para la descarboxilación y desaminación de lisina, así como para la producción de SH_2. Este resultado es el reportado por la ficha técnica para microorganismos del género *Shigela*.

Prueba	Cepa Sh_2
Descarboxilación de lisina	-
Desaminación de lisina	-
Producción de SH_2	-

Figura 25. Pruebas de descarboxilación de lisina, desaminación de lisina y producción de SH_2 en la cepa presuntiva de Shigella Sh2. Del lado izquierdo el control, a la derecha cepa Sh_2.

8.2.3.2. Fermentación de carbohidratos

Al realizar la prueba los siguientes resultados fueron: superficie amarilla, fondo amarillo, además de una ruptura del medio, es decir, el microorganismo fermenta glucosa, lactosa y/o sacarosa, además de indicar una producción de gas. En tubos de agar triple azúcar hierro o agar Kligler, esta bacteria produce una superficie alcalina (no hay fermentación de la lactosa), un fondo ácido (fermentación de la glucosa) y no hay producción de gas ni de ácido sulfhídrico (Vila et al., 2009b).



Prueba	Cepa Sh2
Fermentación de carbohidratos	+

Figura 26. Pruebas bioquímicas realizadas en medio TSI en una cepa presuntiva de Shigella Sh2. Del lado izquierdo el control, a la derecha cepa Sh_2.

8.2.3.3. Prueba de Urea

En la figura 27 se observan los resultados obtenidos para la prueba de urea en la cepa presuntiva de *Shigella* spp.

Prueba	Cepa Sh2
Urea	-

Figura 27. Prueba de urea en la cepa presuntiva Sh2 de Shigella sp. Del lado izquierdo cepa Sh2, del lado derecho el control.

Los resultados indicaron que el medio permaneció de color original, por lo tanto, podemos decir que el resultado es negativo para esta prueba, lo que concuerda con lo reportado para este género.

9. DISCUSIÓN

En la actualidad existen diversos métodos de identificación bacteriana como son el empleo de métodos moleculares, proteómicos y los tradicionales de tipo microbiológico y bioquímico (Bou et al., 2011).

Los métodos moleculares para la identificación de bacterias patógenas de interés se realizan principalmente a través de la amplificación de genes específicos por PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa), estos procedimientos son considerados más rápidos en comparación con los métodos de identificación tradicionales, además permiten la detección de bacterias que no son cultivables (Adzitey et al., 2013). La amplificación del gen que codifica para el ARNr 16S es uno de los métodos moleculares ampliamente empleados para la identificación de bacterias, esto es debido a que son genes que se encuentran de manera conservada en todas las bacterias (Valour et al., 2010; Franco-Duarte et al, 2019).

En el caso de los métodos proteómicos, se emplea la espectrometría de masas, específicamente (MALDI-TOF MS), por sus siglas en inglés matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer, la cual es una técnica que se desarrolló hace 30 años y ha demostrado ser rápida y eficaz en la identificación bacteriana. En la actualidad es empleada principalmente en la identificación de

microorganismos patógenos a través del perfil de proteínas (Seng et al., 2009, Garcia et al., 2012).

Los métodos microbiológicos se basan en el cultivo de microorganismos en diferentes condiciones nutricionales y la observación de características morfológicas distintivas, estos métodos implican el empleo de cultivos puros de la bacteria, lo cuales pueden ser sembrados en medios cromogénicos que permiten la identificación de microorganismos en función de la coloración que adquieren al realizar una función enzimática al actuar sobre un sustrato unido a un cromógeno. Los métodos microbiológicos tradicionales también implican el uso de medios selectivos diferenciales para el aislamiento de microorganismos de interés y la inhibición del desarrollo de otros (Díaz-Pérez et al., 2013: Franco-Duarte el al, 2019).

En la presente investigación se emplearon métodos microbiológicos tradicionales para la identificación de cepas de *Salmonella spp* aisladas de muestras de agua residual del Río Nexapa, los microorganismos presentaron las características morfológicas reportadas en la ficha técnica de medios de cultivos Selectivos como el Agar SS, ya que las colonias presentaban una coloración negra con un halo transparente (Sedeik et al., 2019), sin embargo al realizar siembras repetidas se observaron algunas diferencias en el fenotipo de las cepas presuntivas de *Salmonella spp,,* ya que los cultivos presentaban diferentes morfologías coloniales de color negro, por lo fue necesario la obtención de cultivos puros y evitar falsos positivos. Dado que el aislamiento inicial de los microorganismos a partir de muestras ambientales se realizó en el medio de cultivo Agar SS, es posible que se hayan seleccionado diversas morfologías de color negro presuntivo de *Salmonella spp,* por lo que las cepas criopreservadas fueran cultivos mixtos de microorganismos.

Ha sido reportado en la literatura que otros géneros bacterianos pueden tener un fenotipo similar al de *Salmonella spp* en medio Agar SS, como el género *Citrobacter spp*. En el año 2000 se reportó que los medios de cultivo convencionales mostraban poca especificidad para el aislamiento de *Salmonella spp*, encontrándose falsos positivos perteneciente a otros géneros bacterianos como *Citrobacter spp* y *Proteus spp* (Manafi et al., 2000).

Las bacterias del género *Citrobacter* están relacionadas filogenéticamente con el género Salmonella y presentan similitudes en los antígenos de la superficie celular, comportamiento bioquímico y similitud genotípica.

En un estudio realizado por Pławińska-Czarnak en 2021 se estimó que el 16.7 % de los aislados presuntivos de *Salmonella spp*, fueron pertenecientes a *Citrobacter brakii* (Pławińska-Czarnak et al., 2021).

De manera simultánea a este trabajo se identificó por métodos moleculares a los microorganismos con morfología similar a *Salmonella spp* como pertenecientes a *Citrobacter brakii* con un 99.75% de identidad, por lo que se hace evidente que efectivamente los medios de cultivos selectivos no son totalmente efectivos para el aislamiento diferencial de *Salmonella spp* y es necesario emplear varios métodos de identificación bacteriana.

Un aspecto importante es determinar la patogenicidad de las cepas de *Citrobacter brakii* aisladas a partir de muestras ambientales, así como su perfil de resistencia a antibióticos, ya que son microorganismos estrechamente relacionados con el género *Salmonella spp y* existe poca información al respecto.

Al realizar la determinación del perfil bioquímico de las cepas presuntivas de *Salmonella spp* se demostró que las cepas presentaron en su mayoría el perfil bioquímico reportado para las bacterias de este género, sin embargo, para la prueba de fermentación de azúcares, se encontró una variación en el fenotipo, en la literatura se han reportado subespecies atípicas de *Salmonella entérica* no Tiphy fermentadoras de lactosa (García, et al., 2024). Además, se ha observado variabilidad en las propiedades bioquímicas del género *Salmonella*, en general se considera que las pruebas API son adecuadas para realizar la identificación de bacterias, en un estudio realizado en 2013, se demostró que el 24% de los aislados de Salmonella identificados mediante pruebas API al emplear métodos moleculares fueron pertenecientes a *Citrobacter spp*. y el 16.4% fueron identificados como *Proetus spp* (Turki etal, 2013). Por lo que en la actualidad los métodos moleculares de identificación bacteriana son considerados altamente específicos (Bell et al, 2016: Ricke et al., 2018).

El empleo de métodos microbiológicos y bioquímicos para la identificación de cepas pertenecientes al género *Salmonella* y *Shigella* en este trabajo permitió la adecuada identificación de estos microorganismos, estos métodos son accesibles y se desarrollan en la mayoría de los laboratorios de Microbiología debido a su facilidad y bajo costo. Es importante mencionar que las cepas obtenidas y tipificadas en este estudio fueron empleadas posteriormente para un análisis molecular de los genes

específicos que codifican para el factor de invasividad *InvA* en *Salmonella* y del gen *ipaH* en *Shigella spp* corroborándose su identidad por PCR.

Al determinar el perfil de resistencia a los antimicrobianos de las cepas de *Salmonella spp* se encontraron variaciones con respecto a la condición nutricional, pero cabe resaltar que las cepas probadas mostraron un alto perfil de resistencia a los antibióticos comerciales, lo cual es preocupante ya que de acuerdo a la OMS Las bacterias *Salmonella* spp y *Shigella spp* se encuentran dentro de la lista de microorganismos de alta prioridad debido al incremente de su multirresistencia a los antibióticos (World Health Organization, 2024).

Por último, cabe resaltar que es necesario llevar a cabos diversos métodos de identificación bacteriana al analizar a los microorganismos aislados a partir de muestras ambientales, con la finalidad de evitar errores de identificación.

Se ha reportado en la literatura que, de acuerdo con las características morfológicas observadas en medio Agar SS, tanto *Citrobacter spp* como las bacterias del género *Salmonella spp* pueden identificarse erróneamente (Pławińska-Czarnak et al., 2021), esto concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo, por lo que los métodos microbiológicos tradicionales no son suficientes para la identificación de microorganismos pertenecientes a *Salmonella* spp.

10. CONCLUSIONES

- El empleo de medios de cultivo selectivos para el aislamiento de microrganismos pertenecientes al género *Salmonella spp* como es el caso del medio Agar SS, presentan algunas limitantes, ya que bacterias relacionadas filogenéticamente como es el caso de *Citrobacter spp,* presentan características morfológicas similares, por lo que es necesario realizar la discriminación entre ellas utilizando otros métodos de identificación como las pruebas bioquímicas.
- Las pruebas de identificación bioquímica son de utilidad para la identificación de microorganismos que son aislados del ambiente, en este proyecto permitieron la adecuada identificación de microorganismos presuntivos del género *Salmonella spp* y la diferenciación de bacterias del género *Citrobacter spp,* las cuales se habían identificado inicialmente por aislamiento en medios selectivos como pertenecientes al género *Salmonella.*
- Al determinar el perfil de resistencia de las cepas empleadas en dos condiciones nutricionales se observó que son resistentes al menos a seis antibióticos y la cepa con mayor resistencia MIR8 fue resistente a diez de los doce antibióticos probados.

- El perfil de resistencia a antibióticos obtenido hace evidente que los microorganismos que se encuentran en el ambiente presentan una alta resistencia a los antibióticos, lo que puede ser un grave problema de salud, ya que estos se pueden transmitir a través de alimentos contaminados.
- En este estudio se identificó mediante el empleo de pruebas bioquímicas una cepa de *Shigella spp* aislada a partir de agua residual del Río Nexapa.

11. PERSPECTIVAS

- Identificar las especies de *Salmonella* spp y *Shigella* spp mediante otras técnicas como MALDI-TOF o secuenciación.
- Realizar un análisis microbiológico para la determinación de la presencia de las bacterias *Salmonella spp* y Shigella spp en muestras de suelo y cultivos que hayan sido regados con agua residual proveniente del Río Nexapa.
- Determinar la presencia de genes de resistencia a diversos antibióticos a través de PCR.
- Monitorear la presencia de estas bacterias en distintas estaciones del año, para determinar la influencia de los factores ambientales en su desarrollo.

12. REFERENCIAS

1. Adzitey, F., Huda, N., & Ali, G. R. R. (2013). Molecular techniques for detecting and typing of bacteria, advantages and application to foodborne pathogens isolated from ducks. *3 Biotech*, *3*(2), 97–107. https://doi.org/10.1007/s13205-012-0074-4
2. *Agar Hierro y Lisina*. (n.d.).
3. Ahmed, A. M., & Shimamoto, T. (2015). Molecular characterization of multidrug-resistant Shigella spp. of food origin. *International Journal of Food Microbiology*, *194*, 78–82. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.013
4. Bassal, R., Keinan-Boker, L., & Cohen, D. (2021a). A Significant Decrease in the Incidence of Shigellosis in Israel during COVID-19 Pandemic. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *18*(6), 3070. https://doi.org/10.3390/ijerph18063070
5. Bassal, R., Keinan-Boker, L., & Cohen, D. (2021b). A Significant Decrease in the Incidence of Shigellosis in Israel during COVID-19 Pandemic. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *18*(6), 3070. https://doi.org/10.3390/ijerph18063070
6. Bell, R. L., Jarvis, K. G., Ottesen, A. R., McFarland, M. A., & Brown, E. W. (2016). Recent and emerging innovations in *Salmonella* detection: a food and environmental perspective. *Microbial Biotechnology*, *9*(3), 279–292. https://doi.org/10.1111/1751-7915.12359
7. Bhuyan, S., Yadav, M., Giri, S. J., Begum, S., Das, S., Phukan, A., Priyadarshani, P., Sarkar, S., Jayswal, A., Kabyashree, K., Kumar, A., Mandal, M., & Ray, S. K. (2023).

Microliter spotting and micro-colony observation: A rapid and simple approach for counting bacterial colony forming units. *Journal of Microbiological Methods*, *207*, 106707. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2023.106707
8. Bush, M. L., & Vazquez Pertejo, T. M. (2022, April). *Shigelosis*.
9. Calderón Jaimes Ernesto. (2000). *Aplicación Clínica de los Antibióticos y Quimioterapeúticos* . Méndez Editores, S.A. de C.V.
10. Camacho Garrido, S. (2022). *Ensayos microbiológicos* (2ª edición revisa...) [Book]. Sintesis.
11. Cappuccino, J. G., & Sherman, N. (2013). *Microbiology: A Laboratory Manual*.
12. Cazares-Tamez, R. (2016). Febrile reactions in the 21st century. *Medicina Universitaria*, *18*(70), 52–54. https://doi.org/10.1016/j.rmu.2015.12.004
13. *CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA LABORATORIO DE BACTERIOLOGÍA*. (n.d.).
14. Clark, G. (1980). *STAINING PROCEDURES* (Fourth, pp. 375–378).
15. Contreras, M., Medrano, J., Ibarra, J., Matínez, J., Chaidez, Q., & Castro, N. (2018). Los últimos 50 años de Salmonella en México: Fuentes de aislamiento y factores que influyen en su prevalencia y diversidad. *Revista Bio Ciencias*, *6*.
16. Contreras-Soto, M. B., Medrano-Félix, J. A., Ibarra-Rodríguez, J. R., Martínez-Urtaza, J., Chaidez, Q. C., & Castro-del Campo, N. (2018). Los últimos 50 años de Salmonella en México: Fuentes de aislamiento y factores que influyen en su prevalencia y diversidad. *Revista Bio Ciencias*, *6*.
17. Díaz Pérez, M. M., Claudio, C., Martínez, R., & Zhurbenko, D. C. R. (2013). Enterococcus, medios de cultivo convencionales y cromogénicos Enterococcus, conventional and chromogenic culture media. In *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología* (Vol. 51, Issue 1). http://scielo.sld.cu
18. Diep, B., Barretto, C., Portmann, A.-C., Fournier, C., Karczmarek, A., Voets, G., Li, S., Deng, X., & Klijn, A. (2019). Salmonella Serotyping; Comparison of the Traditional Method to a Microarray-Based Method and an in silico Platform Using Whole Genome Sequencing Data. *Frontiers in Microbiology*, *10*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02554
19. Dirección General de Epidemiología. (2022). *Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de la*. www.gob.mx/salud
20. Franco-Duarte, R., Černáková, L., Kadam, S., S. Kaushik, K., Salehi, B., Bevilacqua, A., Corbo, M. R., Antolak, H., Dybka-Stępień, K., Leszczewicz, M., Relison Tintino, S., Alexandrino de Souza, V. C., Sharifi-Rad, J., Melo Coutinho, H. D., Martins, N., & Rodrigues, C. F. (2019a). Advances in Chemical and Biological Methods to Identify Microorganisms—From Past to Present. *Microorganisms*, *7*(5), 130. https://doi.org/10.3390/microorganisms7050130
21. Franco-Duarte, R., Černáková, L., Kadam, S., S. Kaushik, K., Salehi, B., Bevilacqua, A., Corbo, M. R., Antolak, H., Dybka-Stępień, K., Leszczewicz, M., Relison Tintino, S., Alexandrino de Souza, V. C., Sharifi-Rad, J., Melo Coutinho, H. D., Martins, N., & Rodrigues, C. F. (2019b). Advances in Chemical and Biological Methods to Identify Microorganisms—From Past to Present. *Microorganisms*, *7*(5), 130. https://doi.org/10.3390/microorganisms7050130
22. García, P., Allende, F., Legarraga, P., Huilcaman, M., & Solari, S. (2012). Identificación bacteriana basada en el espectro de masas de proteínas: Una nueva mirada a la microbiología del siglo XXI. *Revista Chilena de Infectología*, *29*(3), 263–272. https://doi.org/10.4067/S0716-10182012000300003

23. Gobernado, M., & López-Hontangas, J. L. (2003). PRESENTE Y FUTURO DE LA MICROBIOLOGÍA CLÍNICA Identificación bacteriana. In *Enferm Infecc Microbiol Clin* (Vol. 21, Issue 2).
24. González Sánchez, J. F. (2022). *UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO*. https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/handle/123456789/26486
25. Hale, T. L., & Keusch, G. T. (1996). *Shigella*.
26. Hartline, R. (2022, January). *Catalase Test*.
27. Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., & Williams, S. T. (1994a). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Ninth).
28. Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., & Williams, S. T. (1994b). *Bergey's manual of determinative bacteriology* (9th ed.).
29. IMSS. (2015, February 24). *Enfermedades Gastrointestinales*. Enfermedades Gastrointestinales.
30. Iwase, T., Tajima, A., Sugimoto, S., Okuda, K., Hironaka, I., Kamata, Y., Takada, K., & Mizunoe, Y. (2013). A Simple Assay for Measuring Catalase Activity: A Visual Approach. *Scientific Reports*, *3*(1), 3081. https://doi.org/10.1038/srep03081
31. Jawetz, E. , Melnick, J. L., Adelberg, E. A. , & Fraga Escamilla, E. (1973). *Microbiología médica* (10a Ed.).
32. Khatri, D., Freeman, C., Falconer, N., de Camargo Catapan, S., Gray, L. C., & Paterson, D. L. (2024). Clinical impact of antibiograms as an intervention to optimize antimicrobial prescribing and patient outcomes—A systematic review. *American Journal of Infection Control*, *52*(1), 107–122. https://doi.org/10.1016/j.ajic.2023.08.013
33. L. Hale, T., & T. Keusch, G. (1996). Shigella. In *Medical Microbiology* (4th edition). https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7627/
34. Liu, B., Knirel, Y. A., Feng, L., Perepelov, A. v., Senchenkova, S. N., Wang, Q., Reeves, P. R., & Wang, L. (2008). Structure and genetics of *Shigella* O antigens. *FEMS Microbiology Reviews*, *32*(4), 627–653. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00114.x
35. Liu, B., Zhang, X., Ding, X., Bin, P., & Zhu, G. (2023). The vertical transmission of Salmonella Enteritidis in a One-Health context. *One Health*, *16*, 100469. https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2022.100469
36. Lucas, P. M. (2017). Ornithine and lysine decarboxylation in bacteria. In *The handbook of microbial metabolism of amino acids* (pp. 116–127). CABI. https://doi.org/10.1079/9781780647234.0116
37. Macfaddin, J. F. (2000). *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*.
38. Manafi, M. (2000). New developments in chromogenic and fluorogenic culture media. *International Journal of Food Microbiology*, *60*(2–3), 205–218. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00312-3
39. *Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de la*. (2022). www.gob.mx/salud
40. Martínez, O. M., Riverón, L., Alemán, A., Talavera, A., Montano, I., Soto, C., Diez, R., Araujo, L., & Suárez, M. (2008). *Selección de cepas de Shigella sonnei para el desarrollo de una vacuna efectiva contra la shigellosis*.
41. Matute, G., Morales, N., Reyes, J. C., & Castro, A. (2023). *Prevalencia y causas que influyen en las enfermedades gastrointestinales en niños* .
42. Mayo Clinic. (2019). *Infección por Shigella- Síntomas y Causas* .
43. Mayo Clinic. (2021). *Infección por Shigella (shigelosis)*.

44. Mulet, N. L., Victoria, S., & Meléndez, R. (2013). *Test de Widal ¿es útil para el diagnóstico de la fiebre tifoidea? Is Widal Test Useful for Thyroid Fever Diagnosis?* www.finlay.sld.cu/publicaciones/vaxtyvit1/tyvi-001.pdf
45. Murray, C. J. L., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., … Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, *399*(10325), 629–655. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0
46. Nataro, J. P., & Guerrant, R. L. (2018). Shigella infections. In *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease* (10th ed.). https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482337/
47. Neupane, D. P., Dulal, H. P., & Song, J. (2021). Enteric Fever Diagnosis: Current Challenges and Future Directions. *Pathogens*, *10*(4), 410. https://doi.org/10.3390/pathogens10040410
48. Olmos, F. A., Fuentes, G. C., Nieto, S. J. A., & Ramos, V. S. (2010). *Metodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología*.
49. Park, S.-H., Ryu, S., & Kang, D.-H. (2012). Development of an Improved Selective and Differential Medium for Isolation of Salmonella spp. *Journal of Clinical Microbiology*, *50*(10), 3222–3226. https://doi.org/10.1128/JCM.01228-12
50. Payne, S. M. (2019). Laboratory Cultivation and Storage of *Shigella*. *Current Protocols in Microbiology*, *55*(1). https://doi.org/10.1002/cpmc.93
51. Philpott, H. L., Nandurkar, S., Lubel, J., & Gibson, P. R. (2014). Drug-induced gastrointestinal disorders. *Frontline Gastroenterology*, *5*(1), 49–57. https://doi.org/10.1136/flgastro-2013-100316
52. Pilar, A. V. C., Petronella, N., Dussault, F. M., Verster, A. J., Bekal, S., Levesque, R. C., Goodridge, L., & Tamber, S. (2020). Similar yet different: phylogenomic analysis to delineate Salmonella and Citrobacter species boundaries. *BMC Genomics*, *21*(1), 377. https://doi.org/10.1186/s12864-020-06780-y
53. Pławińska-Czarnak, J., Wódz, K., Kizerwetter-Świda, M., Nowak, T., Bogdan, J., Kwieciński, P., Kwieciński, A., & Anusz, K. (2021a). Citrobacter braakii Yield False-Positive Identification as Salmonella, a Note of Caution. *Foods*, *10*(9), 2177. https://doi.org/10.3390/foods10092177
54. Pławińska-Czarnak, J., Wódz, K., Kizerwetter-Świda, M., Nowak, T., Bogdan, J., Kwieciński, P., Kwieciński, A., & Anusz, K. (2021b). Citrobacter braakii Yield False-Positive Identification as Salmonella, a Note of Caution. *Foods*, *10*(9), 2177. https://doi.org/10.3390/foods10092177
55. Retchless, A. C., & Lawrence, J. G. (2010). Phylogenetic incongruence arising from fragmented speciation in enteric bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(25), 11453–11458. https://doi.org/10.1073/pnas.1001291107
56. Reyna Nathan, Plymale Ruth, & Johnson Kristine. (2022). Medios de Elaboración (Caldo LB y Agar). In *LAB MANUAL: SYNTHETIC BIOLOGY PROTOCOLS*.
57. Ricke, S. C., Kim, S. A., Shi, Z., & Park, S. H. (2018). Molecular-based identification and detection of *Salmonella* in food production systems: current perspectives. *Journal of Applied Microbiology*, *125*(2), 313–327. https://doi.org/10.1111/jam.13888
58. Riedel, S., Morse, A. S., Mietzner, A. T., & Miller, S. (2019). *Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology* (10th ed.).
59. Rosanna Hartline. (2024). Catalasa Test. In *Microbiology Laboratory Manual*.

60. S., B. (2023). Overview on Old and New Biochemical Test for Bacterial Identification. *Journal of Surgical Case Reports and Images*, *6*(5), 01–11. https://doi.org/10.31579/2690-1897/163
61. Sadredinamin, M., Yazdansetad, S., Alebouyeh, M., Yazdi, M. M. K., & Ghalavand, Z. (2023). higella Flexneri Serotypes: O-antigen Structure, Serotype Conversion, and Serotyping Methods. *Oman Medical Journal*, *38*(4), e522–e522. https://doi.org/10.5001/omj.2023.65
62. Secretaría de Salud. Diario Oficial de Federación. Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la Determinación de Salmonella en Alimentos
63. Sedeik, M. E., El-shall, N. A., Awad, A. M., Elfeky, S. M., Abd El-Hack, M. E., Hussein, E. O. S., Alowaimer, A. N., & Swelum, A. A. (2019). Isolation, conventional and molecular characterization of Salmonella spp. from newly hatched broiler chicks. *AMB Express*, *9*(1), 136. https://doi.org/10.1186/s13568-019-0821-6
64. SEMARNAT. (2022). *Casos nuevos reportados de Paratifoidea y Otras Salmonelosis (Número de casos)*. https://epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/,
65. Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., la Scola, B., Fournier, P., Rolain, J. M., & Raoult, D. (2009). Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Clinical Infectious Diseases*, *49*(4), 543–551. https://doi.org/10.1086/600885
66. Tripathi, N., & Sapra, A. (2024). *Gram Staining*.
67. *Triple Sugar Iron Agar Protocols*. (2016).
68. Turki, Y., Mehri, I., & Ouzari, H. I. (2013). Identification of three related genera, Salmonella, Citrobacter and Proteus using API 20E, 16S-23S rDNA intergenic transcribed spacer fingerprinting and 16S rDNA sequencing. *Article in African Journal of Microbiology Research*. https://doi.org/10.5897/AJMR2013.5466
69. Uotani, T., & Graham, D. Y. (2015). *Diagnosis of Helicobacter pylori using the rapid urease test*. *3*.
70. Uyttendaele, M., Bagamboula, C. F., de Smet, E., van Wilder, S., & Debevere, J. (2001). Evaluation of culture media for enrichment and isolation of Shigella sonnei and S. flexneri. *International Journal of Food Microbiology*, *70*(3), 255–265. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00549-9

71. Valour, F., Boisset, S., Lebras, L., Martha, B., Boibieux, A., Perpoint, T., Chidiac, C., Ferry, T., & Peyramond, D. (2010). *Clostridium sordellii* Brain Abscess Diagnosed by 16S rRNA Gene Sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, *48*(9), 3443–3444. https://doi.org/10.1128/JCM.00307-10
72. van Hofwegen, D. J., Hovde, C. J., & Minnich, S. A. (2016). Rapid Evolution of Citrate Utilization by Escherichia coli by Direct Selection Requires *citT* and *dctA*. *Journal of Bacteriology*, *198*(7), 1022–1034. https://doi.org/10.1128/JB.00831-15
73. Vásquez Jiménez, O. (2024). Aislamiento e identificación de patógenos presentes en agua residual en el Río Nexapa. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla https://hdl.handle.net/20.500.12371/21866
74. Vila, J., Álvarez-Martínez, M. J., Buesa, J., & Castillo, J. (2009a). Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *27*(7), 406–411. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.009
75. Vila, J., Álvarez-Martínez, M. J., Buesa, J., & Castillo, J. (2009b). Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *27*(7), 406–411. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.009
76. Vila, J., Álvarez-Martínez, M. J., Buesa, J., & Castillo, J. (2009c). Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *27*(7), 406–411. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.009
77. Woo, P. C. Y., Fung, A. M. Y., Wong, S. S. Y., Tsoi, H.-W., & Yuen, K.-Y. (2001). Isolation and Characterization of a *Salmonella enterica* Serotype Typhi Variant and Its Clinical and Public Health Implications. *Journal of Clinical Microbiology*, *39*(3), 1190–1194. https://doi.org/10.1128/JCM.39.3.1190-1194.2001
78. World Health Organization. (2024). *Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance*. https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461
79. Yang, C., Li, H., Zhang, T., Chu, Y., Zuo, J., & Chen, D. (2020). Study on antibiotic susceptibility of Salmonella typhimurium L forms to the third and forth generation cephalosporins. *Scientific Reports*, *10*(1), 3042. https://doi.org/10.1038/s41598-020-59456-8

12. ANEXOS

Tabla 10. Formulación para 1 litro del medio de cultivo Agar SS. Elaboración en base a la ficha técnica del proveedor.

Componente	Gramos
Extracto de carne	5.0
Mezcla de peptonas	5.0
Lactosa	10.0
Mezcla de sales biliares	8.5
Citrato de sodio	8.5
Tiosulfato de sodio	8.5
Citrato férrico	1.0
Rojo neutro	0.025
Verde brillante	0.00033
Agar bacteriológico	13.5

Tabla 11. Formulación para 1 litro de agua del medio Verde Brillante. Elaboración en base a la ficha técnica del proveedor.

Componente	Gramos
Extracto de levadura	3.0 g
Mezcla de peptonas	10.0 g
Cloruro de Sodio	5.0 g
Lactosa	10.0
Sacarosa	10.0 g
Rojo de fenol	80 mg
Verde brillante	12.5 mg
Agar bacteriológico	20.0 g

pH final 6.9+/-0.2 a 25°C.

Tabla 12. Formula aproximada por litro del medio de cultivo Agar EMB. Elaborada en base a la información proporcionada en la ficha técnica del proveedor.

Componente	Gramos
Peptona de Gelatina	10.0 g
Lactosa	5.0 g
Sacarosa	5.0 g
Fosfato Dipotásico	2.0 g
Eosina Y	0.4 g
Azul de metileno	65.0 mg
Agar	13.5 g

pH final 7.2 +/- 0.2.

Tabla 13. Fórmula para elaboración del medio Agar MacConkey . Elaboración en base a la ficha técnica del proveedor.

Compuesto	Gramaje
Digerido Pancreático de gelatina	17.0 g
Peptonas (Carne y Caseína)	3.0 g
Lactosa	10.0 g
Sales Biliares	1.5 g
Cloruro de Sódico	5.0 g
Agar	13.5 g
Rojo neutro	0.03 g
Cristal violeta	0.001 g

pH final 7.1 ± 0.2.

Tabla 16. Formulación para 1 litro de agua del medio Agar Hierro Lisina. Elaboración en base a la información de la ficha técnica del proveedor.

Compuesto	Gramaje
Peptona de gelatina	5.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Dextrosa	1.0 g
L-Lisina	10.0 g
Tiosulfato de sodio	0.04 g
Citrato de hierro y amonio	0.5 g
Púrpura de Bromocresol	0.02 g
Agar bacteriológico	13.5 g

Con un pH final de entre 6.7 + 0.2.

Tabla 17. Formulación para 1 litro de agua del medio de cultivo Agar de Hierro y triple azúcar.
Elaborada en base a la ficha técnica del proveedor.

Compuesto	Gramaje
Peptona de caseína	10 g
Peptona de carne	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Lactosa	10 g
Sacarosa	10 g
Dextrosa	1 g
Sulfato de hierro y amonio	0.2 g
Tiosulfato de sodio	0.2g

Rojo fenol	25 mg
Agar bacteriológico	13 g

Tabla 18. Formulación para 1 litro de agua del medio de cultivo Agar Citrato Simons. Elaborada en base a la información proporcionada en la ficha técnica del proveedor.

Compuesto	**Gramaje**
Fosfato Dihidrogenado de Amonio	1.0 g
Fosfato Dipotásico	1.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Citrato de Sodio	2.0 g
Sulfato de Magnesio	0.2 g
Agar	15.0 g
Azul de Bromotimol	80 mg

pH final de entre 6.9 +/- 0.2 a 25°C.

Tabla 19. Formulación aproximada para un litro del medio de cultivo Caldo Urea. Elaborada en base a la información proporcionada en la ficha técnica del proveedor.

Compuesto	**Gramaje**
Extracto de levadura	0.1 g
Fosfato monopotásico	9.1 g
Fosfato dipotásico	9.5 g
Urea	20.0
Rojo fenol	0.01 g

pH final 6.8 ± 0.1.

Tabla 20. *Formulación aproximada para un litro de agua del medio MIO. Elaborada en base a la información proporcionada en la ficha técnica del proveedor.*

Compuesto	**Gramaje**
Extracto de levadura	3.0 g
Peptona	10.0 g
Triptona	10.0 g
L-Ornitina HCl	5.0 g
Dextrosa	1.0 g
Agar	2.0 g
Púrpura de Bromocresol	0.02 g

. pH final 6.5 +/- 0.2.

Tabla 21. Formulación aproximada para un litro de agua del medio de cultivo SIM. Elaborada en base a la información proporcionada en la ficha técnica del proveedor.

Compuesto	**Gramaje**
Digerido pancreático de caseína	20.0 g
Digerido péptico de tejido animal	6.1 g
Sulfato ferroso de amonio	0.2 g

Tiosufato sódico	0.2 g
Agar	3.5 g

pH final 7.3 +/- 0.2.