

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Salmonella* spp., DE BABILLAS (*Caiman crocodilus fuscus*) EN SU HÁBITAT NATURAL (REPRESA HIDROPRADO),
 DEPARTAMENTO DEL TOLIMA.**

MARTÍN EDUARDO LÓPEZ CRUZ

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
 Médico Veterinario Zootecnista.**

Director:

**NOEL VERJAN GARCÍA
 Ph.D. en Inmunología**

Co-Director:


**LUZ CLEMENCIA FANDIÑO DE RUBIO
 MSc en Ciencias Pecuarias**

Co-Director:

**NOHORA CRISTINA MORA
 MSc en Gestión Ambiental**

**UNIVERSIDAD DEL TOLIMA
 FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
 MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
 IBAGUÉ - TOLIMA**

2018

 UNIVERSIDAD DEL TOLIMA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA	ACTA No. 011
	Fecha: 02 de Noviembre de 2018
ACTA SUSTENTACIÓN TRABAJO DE GRADO	
Pagina 1 de 1	

TRABAJO DE GRADO DIRIGIDO

Siendo las 08.30 horas del día viernes 02 de Noviembre de 2018, se reunieron en la Sala de Sistemas de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad del Tolima, el jurado calificador integrado por las doctoras ADRIANA DEL PILAR PULIDO VILLAMARIN y MARTHA LILY OCAMPO GUERRERO con el Director del trabajo de grado Dr. NOÉL VERJÁN GARCÍA y los codirectores LUZ CLEMENCIA FANDIÑO DE RUBIO y NOHORA CRISTINA MORA, para dar su concepto sobre el Trabajo de Grado Titulado "AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE SALMÓNELLA SPP. DE BABILLAS (*Caiman crocodilus fuscus*) EN SU HABITAT NATURAL (REPRESA HIDROPRADO), DEPARTAMENTO DEL TOLIMA.", presentado y sustentado por el estudiante del programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia MARTÍN EDUARDO LÓPEZ CRUZ. Luego de las correcciones y deliberaciones, el jurado asignó la calificación de:

Cuatro coma cuatro (4,4) Sobresaliente

En constancia de lo anterior, firman.

ADRIANA DEL PILAR PULIDO VILLAMARIN

JURADO

MARTHA LILY OCAMPO GUERRERO

JURADO

NOÉL VERJÁN GARCÍA

Noel Verjan G.

DIRECTOR

LUZ CLEMENCIA FANDIÑO DE RUBIO

CODIRECTORA

NOHORA CRISTINA MORA

CODIRECTORA



**ACTA SUSTENTACIÓN TRABAJO
DE GRADO**

TRABAJO DE GRADO DIRIGIDO

Siendo las 08:30 horas del día viernes 02 de Noviembre de 2018, se reunieron en la Sala de Sistemas de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad del Tolima, el jurado calificador integrado por las doctoras ADRIANA DEL PILAR PULIDO VILLAMARIN y MARTHA LILY OCAMPO GUERRERO con el Director del trabajo de grado Dr. NOÉL VERJÁN GARCÍA y los codirectores LUZ CLEMENCIA FANDIÑO DE RUBIO y NOHORA CRISTINA MORA, para dar su concepto sobre el Trabajo de Grado Titulado: "AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE SALMONELLA SPP., DE BABILLAS (*Caiman crocodilus fuscus*) EN SU HABITAT NATURAL (REPRESA HIDROPRADO), DEPARTAMENTO DEL TOLIMA.", presentado y sustentado por el estudiante del programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia MARTÍN EDUARDO LÓPEZ CRUZ. Luego de las correcciones y deliberaciones, el jurado asignó la calificación de:

Cuatro (4,4) Sobresaliente

En constancia de lo anterior, firman:

ADRIANA DEL PILAR PULIDO VILLAMARIN

JURADO

MARTHA LILY OCAMPO GUERRERO

JURADO

NOÉL VERJÁN GARCÍA

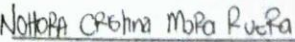
DIRECTOR

LUZ CLEMENCIA FANDIÑO DE RUBIO



CODIRECTORA

NOHORA CRISTINA MORA



CODIRECTORA

U	UNIVERSIDAD DEL TOLIMA	ACTA No. 011
	FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA	Fecha: 02 de Noviembre de 2018
	ACTA SUSTENTACIÓN TRABAJO DE GRADO	Página 1 de 1

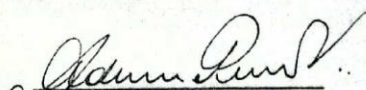
TRABAJO DE GRADO DIRIGIDO

Siendo las 08:30 horas del día viernes 02 de Noviembre de 2018, se reunieron en la Sala de Sistemas de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad del Tolima, el jurado calificador integrado por las doctoras ADRIANA DEL PILAR PULIDO VILLAMARIN y MARTHA LILY OCAMPO GUERRERO con el Director del trabajo de grado Dr. NOÉL VERJÁN GARCÍA y los codirectores LUZ CLEMENCIA FANDIÑO DE RUBIO y NOHORA CRISTINA MORA, para dar su concepto sobre el Trabajo de Grado Titulado: "AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE SALMONELLA SPP., DE BABILLAS (*Caiman crocodilus fuscus*) EN SU HABITAT NATURAL (REPRESA HIDROPRADO), DEPARTAMENTO DEL TOLIMA.", presentado y sustentado por el estudiante del programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia MARTÍN EDUARDO LÓPEZ CRUZ. Luego de las correcciones y deliberaciones, el jurado asignó la calificación de:

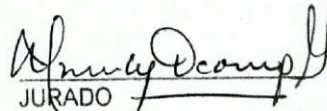
Cuatro coma cuatro (4,4) Sobresaliente

En constancia de lo anterior, firman:

ADRIANA DEL PILAR PULIDO VILLAMARIN


JURADO

MARTHA LILY OCAMPO GUERRERO


JURADO

NOÉL VERJÁN GARCÍA

DIRECTOR

LUZ CLEMENCIA FANDIÑO DE RUBIO

CODIRECTORA

NOHORA CRISTINA MORA

CODIRECTORA

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION	11
1. MARCO TEÓRICO	13
1.1 BABILLA (<i>CAIMAN CROCODRILUS</i>)	13
1.1.1 Estatus y conservación en Colombia	13
1.2 <i>SALMONELLA</i> SPP.	14
1.2.1 Características taxonómicas, fenotípicas y bioquímicas del género <i>Salmonella</i>	15
1.2.2 Patogenicidad de <i>Salmonella</i> spp.	16
1.2.3 Plásmidos y resistencia a antibióticos	17
1.2.4 Aislamiento bacteriano e identificación de <i>Salmonella</i> spp.	17
1.2.5 Recolección de muestras mediante hisopo cloacal en babillas.	21
2. METODOLOGÍA	22
2.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO	22
2.2 TOMA DE MUESTRAS	22
2.3 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>SALMONELLA</i> SPP.	23
2.4 EXTRACCIÓN DE ADN BACTERIANO	25
2.5 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	25
2.6 SEROTIPIFICACIÓN DE <i>SALMONELLA</i> SPP.	26
3. RESULTADOS	27
4. DISCUSIÓN	29
5. CONCLUSIONES	33
RECOMENDACIONES	34

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Características macroscópicas de <i>Salmonella</i> spp. en diferentes medios de cultivo.	19
Tabla 2. Propiedades bioquímicas de las subespecies de <i>Salmonella</i> spp.	21
Tabla 3. Principales serotipos de <i>Salmonella</i> spp., aislados en babilla (<i>Caiman crocodilus fuscus</i>) provenientes de la represa Hidroprado	28

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Clasificación del género <i>Salmonella</i> spp.	16
Figura 2. Captura de animales y toma de muestras	23
Figura 3. Muestras en agua peptonada-bufferada para su pre-enriquecimiento (imagen 1 y 2); enriquecimiento selectivo en caldo de tetrionato y Rappaport-Vassiliadis (imagen 3 y 4).	24
Figura 4. Siembra en agar SS (<i>Salmonella-Shigella</i>), agar XLT4 (Xilosa Lisina Tergitol, Oxoid, Alemania) y agar XLD (Xilosa Lisina Desoxicolato, Oxoid, Alemania).	24
Figura 5. Amplificación del gel <i>InvA</i> de cepas de <i>Salmonella</i> spp., aisladas de babilla (<i>Caiman crocodilus fuscus</i>). M: Marcador de peso molecular de 100 pb; Línea 1: control positivo <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076; Línea 2, control positivo <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028; líneas 3 a 17: Cepas de <i>Salmonella</i> spp. aisladas de babilla (<i>Caiman crocodilus fuscus</i>).	27

RESUMEN

Salmonella spp., es considerada un habitante normal del tracto gastrointestinal de los animales domésticos, aves y reptiles. No obstante, en condiciones que favorecen su proliferación e invasión de los tejidos, los animales desarrollan la enfermedad y en cautiverio podrían ser fuente de la bacteria para el humano en contacto permanente con dichas especies. Con el objeto de iniciar a comprender el estado sanitario del *Caiman crocodilus fuscus* en su hábitat natural (Represa Hidroprado), se diseñó este estudio preliminar que buscó aislar y caracterizar los serotipos de *Salmonella* spp., presentes en el tracto gastrointestinal. Las muestras fueron colectadas a través de hisopados cloacales, seguido de aislamiento microbiológico, serotipificación y confirmación molecular a través de PCR convencional. Como resultados se aislaron en total 15 cepas de *Salmonella* spp., proveniente de 80 muestras de hisopos cloacales. A partir de la serotipificación se identificaron los serotipos *Salmonella* Paratyphi B (n=2), *S. Saintpaul* (n=2), *S. Javiana* (n=4), *S. Braenderup* (n=3), *S. Soerenga* (n=1), *S. Infantis* (n=1), y dos cepas no fueron serotipificables. El gen *invA* fue amplificado exitosamente en todos los aislamientos de *Salmonella*. Estos resultados indican que la *Salmonella* spp., está presente en el tracto gastrointestinal del *Caiman crocodylus fuscus* en su hábitat natural y clínicamente sanos. Los serotipos identificados sugieren un riesgo de transmisión de dichas *Salmonella* al humano en contacto con estos animales. Se requieren de estudios adicionales con mayor cobertura para conocer la dinámica del microorganismo, sus posibles implicaciones en la salud en esta especie y su importancia en la transmisión al humano.

Palabras clave: *Salmonella* spp, *Caiman cocodrilus*, Babilla, Serotipificación.

ABSTRACT

Salmonella is considered a normal inhabitant of the gastrointestinal tract of domestic animals, birds and reptiles. The bacteria may take advantage of environmental factors such as stress and captivity to proliferate and invade animal tissues and to cause disease and thus human beings in permanent contact with these animal species become at risk of the infection. In order to begin to understand the health status of the *Caiman crocodilus*, this preliminary study was designed to isolate and characterize the serotypes of *Salmonella* spp., present in the gastrointestinal tract of *C. fuscus* in their natural habitat (Hydroprado Dam). Cloacal swabs samples were collected for microbiological isolation, serotyping and molecular confirmation through conventional PCR. A total of 15 *Salmonella* isolates were obtained from 80 samples. Serotyping identified *Salmonella* Paratyphi B (n = 2), *S. Saintpaul* (n = 2), *S. Javiana* (n = 4), *S. Braenderup* (n = 3), *S. Soerenga* (n = 1), *S. Infantis* (n = 1), and two *Salmonella* isolates could not be serotyped. The *InvA* gene was successfully amplified in all *Salmonella* isolates. These results indicate that *Salmonella* spp., is present in the gastrointestinal tract of clinically healthy *Caiman Crocodylus fuscus* in its natural habitat. The identified serotypes suggest a potential risk of transmission of *Salmonella* to the people in close contact with these animals. Additional studies with large coverage are required to understand the dynamics of the microorganism, its possible association with disease in crocodiles and as a potential source of human salmonellosis.

Keywords: *Salmonella* spp, *Caiman cocodrilus*, Babilla, serotyping.

INTRODUCCIÓN

La salmonelosis es una enfermedad zoonótica de distribución mundial que afecta a diversas especies animales (Ministerio de la Protección Social. Instituto Nacional de Salud (INS). UERIA, 2011). La enfermedad es causada principalmente por diferentes subespecies y serovares de *Salmonella enterica*, que representan un fuerte impacto económico en la industria animal y en la salud pública (ICA, 2013; WHO, 2014). La principal fuente de *Salmonella* spp. para humanos, es el consumo de alimentos de origen animal y vegetal, contaminados (Salyers y Whitt, 2002; OIE, 2014; WHO, 2014)

Los serotipos aislados con mayor frecuencia en pacientes con salmonelosis asociada al contacto con reptiles incluyen *S. enterica* subsp. *diarizonae* serovar (IIIb), *S. enterica* subsp. *houtenae* (IV) serovares Chamaleon y Marina, y *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (I) serovares Java, Stanley y Poona (Institute for international cooperation in animal biologics, 2013). Generalmente, no se observan en estos animales signos clínicos por esta infección, pero pueden ocurrir diarreas esporádicas y cuadros sistémicos cuando el animal esta inmunocomprometido. En el humano, la infección produce malestar gastrointestinal desde dolores abdominales hasta fuertes diarreas sanguinolentas, además se presentan cuadros extraintestinales de tipo sistémico como ocurre con algunos casos de fiebre tifoidea (Carriquiriborde, 2010).

Los microorganismos pertenecientes al género *Salmonella* forman un grupo heterogéneo debido a su gran variedad de características fenotípicas y genotípicas (Ministerio de la Protección Social. INS. UERIA, 2011), entre ellas la elevada resistencia antimicrobiana, causada principalmente por el uso indiscriminado de antibióticos durante la cría de animales en granja (Madigan, Michael, Martinko, John y Parker, 1997; Salyers y Whitt, 2002). La resistencia antibiótica de los diferentes serotipos de *Salmonella*, representa un problema para la salud pública, debido a la persistencia del microorganismo en el ambiente, los alimentos de origen animal, los zocriaderos y las reservas naturales de animales silvestres (Fierro, Osorio, Fandiño de Rubio y Rondón, 2011); Woosward,

Khakhria y Jhonson, 1997). Por lo anterior es necesario desarrollar investigación que permita aportar al conocimiento de la microbiota del tracto gastrointestinal de los cocodrilianos y en particular de microorganismos que tienen gran importancia zoonótica como *Salmonella* spp., que permita contribuir a la epidemiología de la enfermedad desde diversos ángulos y especies animales que interactúan con el ser humano; por lo tanto el aislamiento y la caracterización bioquímica de *Salmonella* spp., es fundamental para generar estrategias de prevención efectivas contra la Salmonelosis (Ministerio de salud y protección social, 2011).

Este estudio permitió estimar la prevalencia de *Salmonella* spp., presente en babillas (*Caiman crocodilus*) en vida silvestre en la represa de Hidroprado en el departamento del Tolima, así como identificar los serotipos presentes en estos animales. Finalmente, el estudio constituye una primera aproximación al estado sanitario del *Caiman crocodilus fuscus* en su hábitat natural. Los resultados indican que la *Salmonella* está presente en los crocodilos en vida silvestre y esta información es de gran utilidad para desarrollar estudios en animales en cautiverio y su relación, si existe alguna, con la enfermedad en el hombre (Chan, Baker, Kim, Detweiler, Dougan y Falkow, 2003).

1. MARCO TEÓRICO

1.1 BABILLA (*CAIMAN CROCODRILUS*)

La babilla (*Caiman crocodilus*) pertenece al Orden Reptilia, Familia *Alligatoridae*, Género *Caiman*, especie *crocodilus*. Se han identificado las subespecies *C. c. crocodilus* (Linnaeus, 1758), *C. c. fuscus* (Cope, 1868), *C. c. chiapasius* (Bocourt, 1876) y *C. c. apaporensis* (Medem, 1955). La sinonimia de la especie es *Caimán sclerops*. Puede encontrarse en Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guyana y Guyana Francesa, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Perú, Surinam, Trinidad y Tobago, Venezuela e introducido en Cuba, Puerto rico y Estados Unidos (Velasco y Ayarzagüena, 2010). Es un reptil de talla media con un tamaño máximo de 2.70 metros, de coloración verde oliva a marrón. Los machos y las hembras presentan su madurez sexual alrededor de 1.2 y 1.5 metros respectivamente. La ovoposición transcurre usualmente durante la época lluviosa cuando depositan de 28 a 32 huevos en nidos de material vegetal con forma de montículo. El período de incubación promedio es de 75 a 80 días. Las crías al nacer miden aproximadamente 20 cm y presentan una coloración marrón claro con manchas de marrón oscuro a negro (Velasco y Ayarzagüena, 2010).

Es extremadamente adaptable en términos de requerimientos, ocupando ríos, caños de quebradas, lagos, lagunas, pantanos, represas y pozos artificiales. Son animales oportunistas, su dieta varía con la edad iniciando con invertebrados incorporando crustáceos, moluscos, peces, aves, reptiles y mamíferos siendo así controladores biológicos de las poblaciones presa (Thorbjarnarson, 1992). Algunos estudios muestran que las babillas prefieren micro-hábitats con vegetación flotante y estructuras formadas por árboles caídos (Balaguera, 2012).

1.1.1 Estatus y conservación en Colombia: La CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres), clasifica a tres de las cuatro subespecies del *C. crocodilus* en el Apéndice II, sin embargo, el *C. c.*

apaporensis se encuentra en el apéndice I. A nivel nacional *C. crocodilus* se encuentra en categoría LRLc o de preocupación menor (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, 2009). Esta especie animal se distribuye a lo largo de las diferentes regiones del país (regiones Caribe, Pacífica, Andina, Orinoquía y Amazónica). (Balaguera, Barbosa, Moná, Farias, Caicedo, Martínez y González, 2010).

Colombia es un importante productor de pieles de *C. c. fuscus* en la región, reportando una exportación de 7.8 millones de pieles entre 1995 al 2007 (Velasco y Ayarzagüena, 2010). En la última década se han iniciado varios programas de conservación de cocodrilianos con la participación de las comunidades, empresas privadas y autoridades ambientales. En 2004, en el canal del Dique (Bolívar) la comunidad de pescadores desarrolló un programa piloto de rancheo que se basa en la recolección de huevos de nidos en estado silvestre con la posterior incubación artificial y liberación de individuos en áreas de colecta con la comercialización legal de la cota fijada por la autoridad ambiental de 150.000 ejemplares correspondiente a un 10 % de la demanda mundial (Martínez, 1996). Con base en esta exitosa experiencia el programa se amplió a varios municipios del Atlántico en 2005. Este programa ha reintroducido alrededor de 15.000 ejemplares de crías y juveniles contribuyendo a la repoblación de la especie en zonas húmedas donde ya habían sido casi eliminados en su totalidad. En la actualidad este programa constituye un aporte valioso a la conservación de las poblaciones silvestres de la especie en la zona del norte del país.

1.2 SALMONELLA SPP.

El género *Salmonella* está incluido en la familia Enterobacteriaceae, compuesto por bacilos Gram-negativos anaerobios facultativos. Tienen, por tanto, las características generales de las enterobacterias: son fermentadores de glucosa, catalasa positiva, oxidasas negativas y suelen ser móviles; excepción de *Salmonella Gallinarum* y *Pullorum*, que no son móviles (Ministerio de la Protección Social. INS. UERIA, 2011).

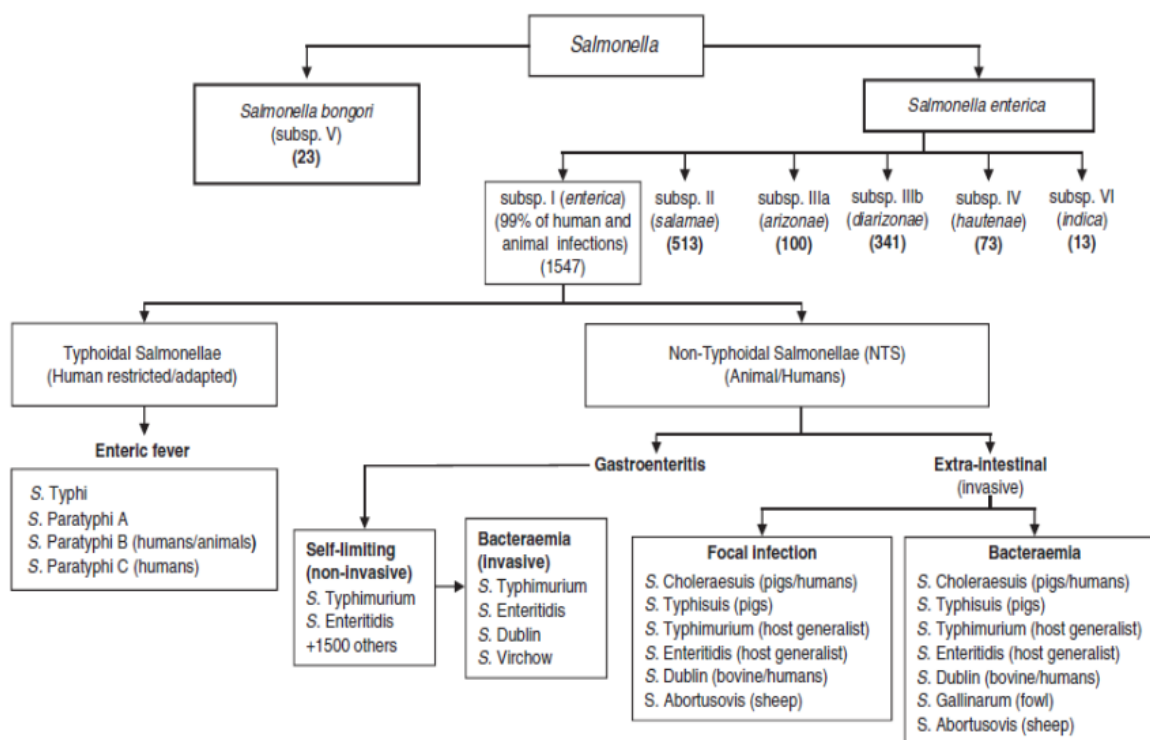
La nomenclatura de *Salmonella* es compleja, se han usado diferentes sistemas para referir a este género. Teniendo en cuenta que estas bacterias tienen una muy importante

homología general de su ADN, fueron agrupadas en dos únicas especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*, diferenciables entre sí por características metabólicas tales como la hidrólisis del ONPG (orto-nitrofenilgalactopiranosido), el crecimiento en presencia de KCN (cianuro de potasio) y otras (Ministerio de la Protección Social. INS. UERIA, 2011).

Salmonella enterica se subdivide, a su vez, en seis subespecies: Enterica (i), salamae (II), Arizonae (IIIA), Diarizonae (IIIB), Houenae (IV), e Indica (VI) que corresponden a los viejos subgéneros (Ministerio de la Protección Social. INS. UERIA, 2011). Al igual que todas las enterobacterias, el género *Salmonella* tiene tres tipos de antígenos: Somático (O), flagelar (H) y de envoltura (Vi) (Popoff y Minor, 2001)

1.2.1 Características taxonómicas, fenotípicas y bioquímicas del género *Salmonella*:
Los antígenos O se clasifican en mayores y menores; los mayores son los que definen un grupo antigénico. Así, el factor antigénico O:4 caracteriza el antiguo grupo B, hoy llamado O:4, mientras los antígenos menores tienen menor valor discriminativo, por ejemplo, el antígeno O:12 lo presenta toda *Salmonella* perteneciente a los grupos A, B y D; pueden encontrarse otros antígenos menores generados por modificaciones químicas o por conversiones fágicas. Los antígenos capsulares o de envoltura sólo lo presentan algunos serotipos de *Salmonella* (Typhi y Dublin) (Popoff y Minor, 2001). Los antígenos flagelares son proteicos y termolábiles. Algunos serovares sólo producen un único tipo de antígeno H, siendo, en consecuencia, monofásicos; sin embargo, otros serotipos pueden producir alternativamente dos tipos de antígenos H, por lo que se denominan bifásicos. Mediante el uso de reacciones antígeno anticuerpo se determina la fórmula antigénica de una cepa y a partir de dicha fórmula, se la clasifica en serovar o serotipo siguiendo el esquema propuesto originalmente por White-Kauffmann Le-Minor, que agrupa todas las serovariedades conocidas en más de dos mil quinientos (Lopardo, Predari y Vay, 2016)

Figura 1. Clasificación del Género *Salmonella*.



Fuente: Sanderson y Nair (2013).

Los miembros del género *Salmonella* se pueden encontrar ampliamente distribuidos por la naturaleza, estos se ubican como patógenos en el tracto gastrointestinal de aves, mamíferos domésticos y animales silvestres. Además, se pueden presentar como contaminantes en el medio ambiente como en los alimentos, agua, suelo, superficies de trabajo, insectos y en la materia fecal (Grimont, Grimont y Bouvet, 2000).

1.2.2 Patogenicidad de *Salmonella* spp. Esta depende de su especie, subespecie y serotipo, del tamaño del inóculo, de los factores de virulencia expresados por la cepa, del hospedador y su estado inmunitario. *Salmonella* se puede dividir en dos grupos, los que generan enfermedad sistémica y generalmente colonizan pobremente el intestino (no contaminan la superficie de la piel, y raramente están involucradas en toxiinfecciones humanas). Y en las que solamente colonizan el intestino sin provocar alteración sistémica (Uzzau et al, 2000).

La invasión de los organismos está mediada por la expresión de varios genes cromosómicos, mientras la capacidad de crecer en el interior de las células hospedadoras, depende de los plásmidos de virulencia (Vadillo, 2002). Después de la infección a través de la ingestión de alimentos o aguas contaminadas, la bacteria se localiza en la porción distal del intestino delgado, de allí pasa el epitelio intestinal, causando cambios en la arquitectura de los enterocitos, luego pasa a la lámina propia donde es fagocitada por células polimorfonucleares y macrófagos, donde sobrevive intracelularmente y puede continuar su recorrido hacia otros órganos como nódulos linfoides, bazo e hígado (Saldarriaga y Rugeles, 2009).

1.2.3 Plásmidos y resistencia a antibióticos: La mayoría de los agentes anti-bacterianos, debido a la presión que ejercen sobre las bacterias, inducen en ellas modificaciones en sus genes y la adquisición de resistencia dando origen al fenómeno conocido como resistencia múltiple a los antibióticos. Dicha resistencia se considera que en el 5% de los casos se debe a mutaciones en el cromosoma bacteriano, y la mayoría de las veces se debe a la incorporación de genes o conjunto de genes transferidos desde otros organismos por medio de elementos genéticos extra-cromosómicos o plásmidos, los cuales son porciones circulares de ADN extra-cromosómico que pueden codificar proteínas involucradas en la resistencia a determinados antibióticos (FAO, 2004). Los plásmidos codifican funciones consideradas como no esenciales para la actividad fisiológica normal de una bacteria, pero si portan genes para otras funciones que les confieren a los microorganismos ventajas competitivas para colonizar nuevos ambientes. Los plásmidos se pueden clasificar según el tipo de fenotipo que codifican como los R, que codifican una o más resistencia a antibióticos o a metales pesados (Merino, Alonso, Ronconi y Hreñuk, 2004; Saldarriaga y Rugeles, 2009; Mendoza, Herrero y Rodicio, 2009).

1.2.4 Aislamiento bacteriano e identificación de *Salmonella* spp: Existen diferentes protocolos utilizados para el aislamiento bacteriológico de *Salmonella* spp., los cuales en su mayoría se basan en el protocolo para aislamiento de *Salmonella* norma ISO/6579:

2002/AMD1: 2007. El protocolo de cultivo de *Salmonella* spp. posee varias etapas para asegurar su óptima recuperación

- Pre-enriquecimiento no selectivo: Esta etapa es fundamental para el aislamiento bacteriano, sobre todo cuando la bacteria ha estado expuesta a factores de estrés como el pH, el calor o cuando la cantidad de bacterias es baja en la muestra.

La fase de pre-enriquecimiento consiste en colocar parte de la muestra (25 g o 25 ml,) en un recipiente (tubos Ependorf, tubos Falcon o bolsas de cierre hermético, según la muestra) y añadir 225 ml de agua de peptona tamponada, obteniendo así una relación 1:9 (1 parte de muestra + 9 partes de agua peptonada), posteriormente se incuba a 36 ° C (+/- 1 ° C) durante 16-20 horas (WHO, 2010).

- Enriquecimiento selectivo: en esta parte del proceso se requiere de medios líquidos o semisólidos como el Tetrionato y Rappaport–Vassiliadis los cuales inhiben las cepas termosensibles ($\leq 43^{\circ}\text{C}$), los cuales permiten el crecimiento selectivo de la *Salmonella*, inhibiendo a su vez el crecimiento de otro tipo de bacterias (OIE, 2014),

En esta fase se toma 1 mL de caldo de pre-enriquecimiento el cual se transfiere a 10 mL de Medio Tetrionato (Müller-Kauffmann) selectivo y se incuba a $41^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas; ó 0.1 mL de caldo de pre-enriquecimiento a 10 mL de Medio Rappaport-Vassiliadis selectivo (RVS) y se incuba a $41,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 18-24 horas (WHO, 2010).

- Cultivo bacteriano: En esta parte del proceso se utilizan agares selectivos solidificados, que permiten el crecimiento diferencial e inhiben bacterias distintas a *Salmonella*.

Se realiza la inoculación de 10 μl del cultivo en medio de enriquecimiento selectivo Tetrionato y Rappaport-Vassiliadis, en medios XLD (Xilosa–Lisina–Desoxicolato) y en agar BGA (Verde Brillante Agar) o en medios menos selectivos como McConkey,

los cuales se incuban a $36,0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 18-24 horas (WHO, 2010; OIE, 2014) y se observan colonias, de 2 mm de diámetro, con las características indicadas en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de *Salmonella* spp. en diferentes medios de cultivo.

Medio de cultivo	Selectividad	Aspecto de las colonias
Agar MacConkey	Baja	Incoloras
Agar Eosina Azul de Metileno (EMB)	Baja	Incoloras
Agar <i>Salmonella Shigella</i> (SS)	Alta	Incoloras con centro negro
Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD)	Alta	Rojas con centro negro
Agar Hektoen (HE)	Alta	Verdes-azuladas con centro negro
Agar verde brillante (BG)	Alta	Rosadas pálidas

Fuente: Caffer y Terragno (2001). Citados por Rodríguez, 2015. (p. 23).

- Selección de colonias sospechosas y cultivo de las mismas: Los cultivos en agar McConkey o Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) se examinan con precaución para seleccionar las colonias sospechosas. En el agar XLD las colonias típicas de *Salmonella* poseen un centro negro y un halo rojo ligeramente transparente, (Tabla 2). (WHO, 2010). Caffer y Terragno (2001), consideran la utilización de un medio poco selectivo como el agar McConkey y otro de alta selectividad como lo son el agar *Salmonella-Shigella* (SS) o XLD, para un apropiado aislamiento, reconocimiento y diferenciación de las colonias típicas de *Salmonella*.

Luego del procedimiento anteriormente descrito, se toman en promedio tres colonias sospechosas de cada uno de los agares y se cultivan en medios no selectivos para posteriormente realizar la confirmación bioquímica y serotipificación de las muestras (Rodríguez R., 2015).

- Confirmación bioquímica: Las diferentes subespecies de *Salmonella*, poseen diversas características bioquímicas que las diferencian (Tabla 2), lo cual facilita su caracterización bioquímica mediante pruebas que se pueden realizar con azúcares en agua peptonada, implementando sistemas comerciales como el “Índice de Perfil Analítico [API]” o también en medios compuestos como el agar triple azúcar–hierro [TSI], entre otros. (OIE, 2014).

Caffer y Terragno, (2001), indican que posterior a la selección de colonias sospechosas según lo expuesto en la Tabla 2, se siembran con asa y se realiza punción en estría en agar Tripticasa de soya (TSA), Triple azúcar–hierro (TSI) y agar Lisina – hierro (LIA), posteriormente se incuban a 37°C, durante 18 - 24 horas.

A la observación de las muestras positivas, en el agar TSI, se encuentra un pico alcalino (rojo) con fondo ácido (amarillo): (K/A), con producción de ácido sulfhídrico (SH₂), con o sin gas por fermentación de glucosa; con agar LIA se encuentra un pico alcalino (violeta) con fondo alcalino (violeta): (K/K), con producción de SH₂ (Caffer y Terragno, 2001).

- Serotipificación: Este método consistente en una reacción antígeno-anticuerpo, basada en las diferencias antigénicas de cada microorganismo (Rodríguez R., 2015). La identificación y análisis serológico está establecido bajo el esquema White-Kauffmann Le-Minor (Sanderson y Nair, 2013; Grimont y Weill, 2007), el cual determina el reconocimiento de serotipos mediante una única combinación de antígenos presentes en todos los microorganismos Gram-negativos (Caffer y Terragno, 2001; Parra, Durango y Máttar, 2002).

Tabla 2: Propiedades bioquímicas de las subespecies de *Salmonella*.

Pruebas bioquímicas	<i>S. enterica</i> subesp. <i>enterica</i> (I)	<i>S. enterica</i> subesp. <i>salamae</i> (II)	<i>S. enterica</i> subesp. <i>arizonae</i> (IIIa)	<i>S. enterica</i> subesp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	<i>S. enterica</i> subesp. <i>houtenae</i> (IV)	<i>S. enterica</i> subesp. <i>indica</i> (VI)	<i>S. bongori</i> (V)
Dulcita	+	+	-	-	-	d	+
ONPG	-	-	+	+	-	d	+
Malonato	-	+	+	+	-	-	-
Gelatina	-	+	+	+	+	+	-
Sorbita	+	+	+	+	+	-	+
KCN	-	-	-	-	+	-	+
L(+) tartrato	+	-	-	-	-	-	-
Mucato	+	+	+	- (70%)	-	+	+
Salicina	-	-	-	-	+	-	-
Lactosa	-	-	- (75%)	+	-	d	-
Habitat de la mayoría de las cepas	Animales de sangre caliente		Animales de sangre fría y medio ambiente				

(+)90% ó más de los resultados positivos; (-) 90% ó más de los resultados negativos; (d): diferentes reacciones producidas por diferentes serovares (Le Minor et al., 1982; Le Minor et al., 1986).

Fuente: Caffer y Terragno (2001); Grimont y Weill (2007), Citados por Rodríguez, 2015. (p. 25).

1.2.5 Recolección de muestras mediante hisopo cloacal en babillas. Según la organización mundial de sanidad animal (OIE) (2004), el método adecuado para la recolección de muestras cloacales en reptiles neonatos (< 1 año) y adultos en general, se debe realizar de la siguiente manera:

Se introduce a través de la cloaca un hisopo estéril y se realizan movimientos suaves de rotación sobre la mucosa; inmediatamente el hisopo se deposita en una bolsa de cierre hermético; las muestras son incubadas en agua peptonada-bufferada para su pre-enriquecimiento; se recubre el algodón y un poco más del hisopo el cual contenga la muestra con el agua peptonada, con el fin de evitar la deshidratación, contaminación y conservar la muestra. Ésta debe remitirse al laboratorio entre 24 y 48 horas posteriores a su recolección. Además, todas las muestras se remiten en bolsas de cierre hermético debidamente identificadas. Por último, y no menos importante, deben ser transportadas en refrigeración.

2. METODOLOGÍA

2.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población de *Caiman crocodilus fuscus* objeto del estudio fue la presente en la Central hidroeléctrica del río Prado (Hidroprado), la cual se encuentra ubicada al Sureste del departamento de Tolima, en la vertiente occidental de la cordillera oriental. Pertenece al sistema de la cuenca del río Magdalena y se localiza entre los 3° 45´ de Latitud Norte y los 74° 50´ de Longitud Oeste, a una altura de 319 m.s.n.m; posee un área de 4300 hectáreas, 43 km², con una cota máxima de 367 m.s.n.m.

Se estableció el tamaño muestral según la fórmula: $n = ((Z_{(\alpha)}^2 \cdot p \cdot q)) / i^2$, siendo, n= tamaño muestral, p=probabilidad de éxito, q=1-p (probabilidad de fracaso), $Z_{(\alpha)}^2$ = Nivel de confianza y i^2 =Error. Donde, $z_{\alpha} = 0.05 = 1.95$, $p = 0.7$, $q = 1 - p = 1 - 0.7 = 0.3$, $i = 10\% = 0.1$ (Normasapa.net, 2018). Por tanto, $n = 79.85 = 80$ animales; siendo este número la cantidad de animales muestreados.

2.2 TOMA DE MUESTRAS

La captura de las babillas se realizó en horas de la noche entre las 9:00pm a 01:00am durante 3 días consecutivos sin tener en cuenta parámetros como la edad o sexo. Los animales fueron capturados al azar mediante el uso de una lazada de cuerda delgada sujeta al extremo de una vara. Se obtuvieron ochenta (80) muestras cloacales, introduciendo hisopos estériles mediante movimientos suaves en la mucosa de la cloaca (Figura 2). Los hisopos fueron transferidos a un tubo plástico estéril que contenía 5 ml de Agua Peptonada Tamponada, para evitar la deshidratación de la muestra. Las muestras fueron refrigeradas (<4°C), y transportadas en neveras isotérmicas en un tiempo menor de 8 horas al Laboratorio Diagnóstico Veterinario de la Universidad del Tolima, para su procesamiento.

Figura 2. Captura de animales y obtención de muestras cloacales.

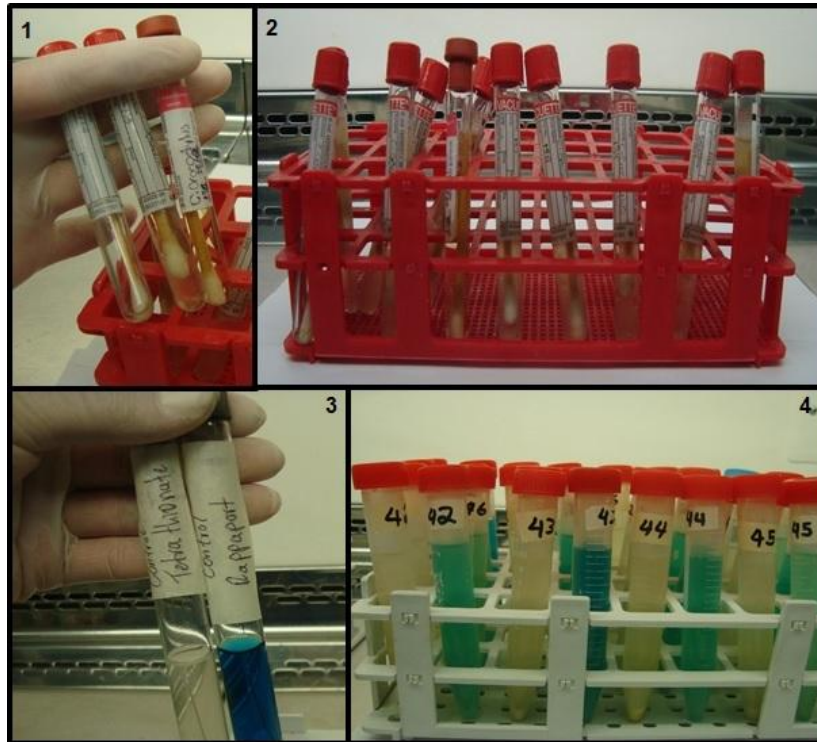


Fuente: Mora (2016).

2.3 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Salmonella* spp.

Posterior a la toma y envío de las muestras se continuó con el cultivo microbiológico para verificar las bacterias presentes en las mismas. Las cepas fueron aisladas mediante protocolos internacionales estándar (ISO 6579; ISO 6579:2002/Amd1:2007). Brevemente, las muestras se incubaron en agua peptonada-bufferada para su pre-enriquecimiento, fueron dispuestas en caldo tetrionato (Müller-Kauffmann) y Rappaport Vassiliadis, para su enriquecimiento selectivo (Figura 3). De allí se sembraron en agar SS (*Salmonella-Shigella*), agar XLT4 (Xilosa Lisina Tergitol, Oxoid, Alemania) y agar XLD (Xilosa Lisina Desoxicolato, Oxoid, Alemania). Las colonias compatibles fueron reaisladas en agar McConkey y Tripticasa Soya Agar (TSA), (Figura 4). confirmadas como *Salmonella* spp, mediante desafío con Antiserum Poly A-I & Vi (Difco® 222641; USA).

Figura 3. Muestras en agua peptonada-bufferada para su pre-enriquecimiento (imagen 1 y 2); Enriquecimiento selectivo en caldo de tetrionato y Rappaport-Vassiliadis (imagen 3 y 4).



Fuente: López (2016).

Figura 4. Siembra en agar SS (*Salmonella-Shigella*), agar XLT4 (Xilosa Lisina Tergitol, Oxoid, Alemania) y agar XLD (Xilosa Lisina Desoxicolato, Oxoid, Alemania).



Fuente: Fandiño de Rubio, (2016).

2.4 EXTRACCIÓN DE ADN BACTERIANO

Una asada abundante de cada aislamiento se resuspendió en 100-400 µL de agua destilada para extracción de ADN por el método de ebullición (Rahn, De Grandis, Clarke, Curtiss y Gyles, 1992), a 100 °C por 5-10 minutos y luego se enfrió en hielo por otros 5 minutos. Después de esto, la suspensión de células lisadas se centrifugó a 12,000 rpm por 5-10 minutos a 4 °C y el sobrenadante se colectó en un tubo eppendorff nuevo para ser almacenado a -80 °C hasta su uso como plantilla de ADN en PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

2.5 REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Con la reacción de PCR simple se buscó amplificar 284 pares de bases del gen *InvA* con los primer F-(GTGAAATTATCGCCACGTTCTGGGCAA), y R-(TCATCGCACCGTCAAAGGAACC). La reacción se realizó en un volumen total de 30µL, conteniendo buffer de PCR 1X, 0.2 mM MgCl₂, 2.5 U Taq DNA polimerasa, 0.2 mM de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), 0.5 µM de cada primer y 50-100 ng de ADN genómico. La amplificación se desarrolló en un termociclador T-100 (Bio-Rad) con el siguiente programa: una desnaturalización inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos que incluyen 30s de desnaturalización a 94 °C, 30s anillado a 55 °C y 60s de extensión a 72 °C, seguido de un paso final de extensión a 72 °C por 3-5 minutos. Control positivo (ADN de *Salmonella* Enteritidis) y negativo (dDW) fueron incluidos en cada corrida de PCR. Los productos del PCR se analizaron por electroforesis en 1.5% gel de agarosa, teñidos con bromuro de etidio, visualizados y fotografiados bajo luz ultravioleta (Figura 5).

2.6 SEROTIPIFICACION DE *SALMONELLA* SPP.

La serotipificación de los aislamientos de *Salmonella* mediante el esquema White-Kauffmann Le-Minor, se llevó a cabo en el Laboratorio Nacional de Diagnóstico Veterinario del Instituto Colombiano Agropecuario ICA, en la ciudad de Bogotá. La

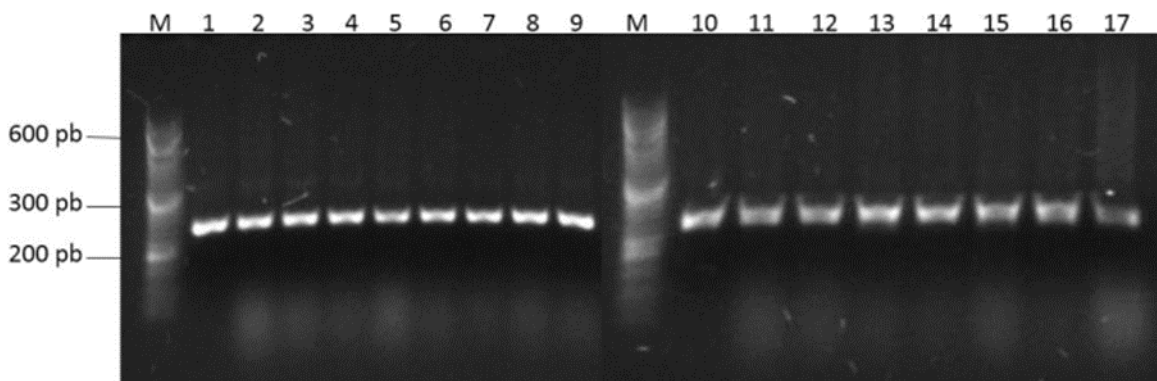
clasificación de serotipos se realizó en función de la combinación de antígenos superficiales somáticos o antígenos O, de antígenos flagelares o antígenos H y, eventualmente, del antígeno capsular (Vi) (Popoff y Le Minor, 1997). (Tabla 3).

3. RESULTADOS

En el presente estudio se encontró que el 18.75% de la población muestreada fue positiva a *Salmonella* spp., se aislaron e identificaron 15 serovares de dicha bacteria a partir de un total de 80 babillas en vida silvestre muestreados al azar (sin tener en cuenta parámetros como la edad o el sexo) por medio de hisopos cloacales. Los aislamientos fueron confirmados a través de cultivo microbiológico, algunas bioquímicas y PCR, seguido de identificación a nivel de serotipos a través de serotipificación de acuerdo al esquema White-Kauffmann Le-minor, la cual se llevó a cabo en el Instituto colombiano agropecuario (ICA).

Los serovares identificados fueron: *Salmonella* Paratyphi B. (2/15: 13.3% de las muestras positivas), *S. Saintpaul* (2/15: 13.3%), *S. Javiana* (4/15: 26.6%), *S. Braenderup* (3/15: 20%), *S. Soerenga* (1/15: 6.6%), *S. Infantis* (1/15: 6.6%), las cuales pertenecen a los serogrupos B, CI, D1 y N; no obstante, dos aislamientos no pudieron ser serotipificadas por esta metodología.

Figura 5. Amplificación del gel *InvA* de cepas de *Salmonella* spp., aisladas de babilla (*Caiman crocodilus fuscus*). M: Marcador de peso molecular de 100 pb; Línea 1: control positivo *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076; Línea 2, control positivo *S. Typhimurium* ATCC 14028; líneas 3 a 17: Cepas de *Salmonella* spp. aisladas de babilla (*Caiman crocodilus fuscus*).



Fuente: López (2017).

Tabla 3. Principales serotipos de *Salmonella*, aislados de babilla (*Caiman crocodilus fuscus*) provenientes de la represa Hidroprado.

Código de muestra	Tipo de muestra	Procedencia	Tipificación por White-Kauffmann Le-Minor
UTCCF01	Hisopado Cloacal	Babilla (Prado)	<i>Salmonella</i> Paratyphi B 4,5,12,b,1,2 (Grupo B)
UTCCF02	Hisopado Cloacal	Babilla (Prado)	<i>Salmonella</i> Saintpaul
UTCCF03	Hisopado Cloacal	Babilla (Prado)	<i>Salmonella</i> Javiana
UTCCF04	Hisopado Cloacal	Babilla (Prado)	<i>Salmonella</i> Braenderup
UTCCF05	Hisopado Cloacal	Babilla (Prado)	<i>Salmonella</i> Braenderup
UTCCF06	Hisopado Cloacal	Babilla (Prado)	Pendiente
UTCCF07	Hisopado Cloacal	Babilla (Prado)	<i>Salmonella</i> Braenderup
UTCCF08	Hisopado Cloacal	Babilla (Prado)	<i>Salmonella</i> Soerenga
UTCCF09	Hisopado Cloacal	Babilla (Prado)	<i>Salmonella</i> Saintpaul
UTCCF10	Hisopado Cloacal	Babilla (Prado)	<i>Salmonella</i> Infantis
UTCCF11	Hisopado Cloacal	Babilla (Prado)	<i>Salmonella</i> Javiana
UTCCF12	Hisopado Cloacal	Babilla (Prado)	<i>Salmonella</i> Javiana
UTCCF13	Hisopado Cloacal	Babilla (Prado)	<i>Salmonella</i> Javiana
UTCCF14	Hisopado Cloacal	Babilla (Prado)	<i>Salmonella</i> Paratyphi B 4,5,12,b,1,2 (Grupo B)
UTCCF15	Hisopado Cloacal	Babilla (Prado)	Pendiente

Los aislamientos de *Salmonella* obtenidos a partir del *Caiman crocodilus fuscus* fueron confirmados a nivel de género mediante la amplificación un fragmento de 284 pb del gen que codifica para Invasina A (*InvA*) mediante PCR convencional. Este gen es un factor de virulencia relacionado con el proceso de invasión al epitelio intestinal y utilizado por otros enteropatógenos como *Shigella* spp. durante el proceso de infección (Rahn et al, 1992), se utilizó como control positivo *Salmonella* Typhimurium. Como resultado se obtuvo amplificación positiva en el 100% de los 15 aislamientos.

4. DISCUSIÓN

Salmonella spp., fue aislada en el 18,75% de las muestras cloacales (15/80) obtenidas de babilla (*Caiman crocodilus fuscus*) en su hábitat natural en la represa Hidroprado, Tolima, confirmadas por amplificación del gen *invA* mediante reacción en cadena de la polimerasa o PCR (O'Regan et al., 2008; Shanmugasamy, Velayutham y Rajeswar, 2011), una técnica rápida y potente utilizada para la identificación de *Salmonella* (Cardona et al., 2007; Molina et al., 2010; Tafda et al., 2013; Ibrahim et al., 2014). 13 de los aislamientos fueron identificados hasta serotipo.

Este estudio por primera vez reporta los principales serovares de *Salmonella* presente en el *Caiman crocodilus fuscus* en una región del departamento del Tolima. El estudio y conocimiento de la microbiota en especies silvestres y domesticadas como las iguanas, lagartos, tortugas y serpientes, aporta conocimiento de distribución de la bacteria, como también, la potencial patogenicidad de la misma (Mitchell y Shane, 2001; Corrente et al, 2004; Ebani y Fratini, 2005; Hidalgo, Díaz, Pérez, De Frutos y Herrero, 2008).

Esta prevalencia de *Salmonella* es significativamente superior a la registrada en la mucosa oral del *Crocodylus acutus* (caimán de aguja) (0%; n = 8) en vida silvestre, capturados en Puerto Vallarta, Jalisco, México (Cupul et al, 2005), y en muestras cloacales de Yacaré overo (*Caiman latirostris*) (1.05%; n = 21) en Brasil (Silva et al, 2009). Esto pueden deberse a diferencias en las condiciones medioambientales (por ejemplo, calidad del agua, clima, momento de la captura, edad de los animales muestreados, etc.), como también en el tamaño de la población muestreada.

Pachón C., Pulido V., y Moreno T. (2010), identificaron la presencia de *Salmonella* spp. en el 6% de 129 muestras ambientales (agua y heces) e hisopados cloacales en Caimán Llanero (*Crocodylus intermedius*) y Testudines de la estación de Biología Tropical Roberto Franco en Villavicencio, Colombia. Sin embargo, los mismos autores (2011), reportan *Salmonella* spp. en el 57,1% de 35 muestras de agua obtenidas de 24

estanques con Caimán Llanero y un estanque con *Caiman crocodylus*, en la región mencionada anteriormente. Por lo tanto, el tipo de muestra a analizar puede ser un factor a tener en cuenta en este tipo de estudios debido a la presencia de la bacteria en el entorno con respecto al animal.

En Colombia, para el primer semestre del 2018 se han reportado 90 casos registrados válidos para fiebre tifoidea y paratifoidea (INS, 2018), transmisible por causas varias tales como manipulación o consumo de alimentos contaminados, cascara de huevo comercial y/o mala higiene personal (Rodríguez, Rondón y Verjan, 2015; INS, 2018) Sin embargo, Mitchell y Shane (2001); Corrente et al (2004); Ebani y Fratini (2005); The Center for Food Security and Public Health (2006); Hidalgo et al (2008); Institute for international cooperation in animal biologics (2013), reportan la transmisión de *Salmonella* asociada a reptiles como iguanas, tortugas y lagartos, no obstante, no existen reportes que relacionen la contaminación de *Salmonella* spp. en humanos por animales pertenecientes al orden Crocodilia (cocodrilos, aligátores y caimanes) ("Crocodilia", 2018), Lo cual indica que la población objeto de estudio constituye un riesgo para la transmisión de *Salmonella* a humanos como en otros animales, debido a la presencia de los serotipos S. Paratyphi B, S. Javiana, S. Braenderup, S. Infantis, S. Saintpaul y S. Soerenga, ya que según lo reportado por Beutlich et al (2010); Mizoguchi et al (2011); Nógrády, Király, Davies y Nagy (2012); Mezal, Stefanova y Khan (2013), estos poseen un alto grado de patogenicidad y están asociados a brotes de enfermedad en humanos.

Los serotipos de *Salmonella*. Paratyphi B, S. Javiana, S. Braenderup, S. Infantis, S. Saintpaul y S. Soerenga, identificados en este estudio, previamente han sido asociados a la presentación de enfermedad en humanos (Beutlich et al, 2010; Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2013; CDC, 2014; Moreno, 2018). Así mismo, el Ministerio de la Protección Social. INS. UERIA (2011), reportan asociación de todos estos serovares con brotes de enfermedad transmitida por alimentos en Colombia.

Brotes de *Salmonella* enterica serotipo Braenderup fueron reportados durante agosto de 2008 en Japón (Mizoguchi et al., 2011), originados por el consumo de alimento

empacado; se evaluaron 3 tipos de alimentos, el primero era tamagotoji (huevo suave con vegetales y carne), el segundo menú cerdo cocinado en salsa de soya y la última, comida avinagrada. Los brotes fueron asociados a al menos uno de los alimentos, ya que no existe un buen proceso de pasteurización en el producto. Por otro lado, Nógrády, Király, Davies y Nagy (2012), reportan la presencia de *S. Infantis* en pollo de engorde y carne cruda durante el 2004 y 2009 en Europa, lo cual representa una amenaza potencial para la salud pública. Esto indica un posible riesgo de contaminación por *Salmonella* spp. en humanos, no solo por los alimentos mal conservados sino también por su presencia en animales destinados al consumo humano.

Salmonella serovar Javiana es uno de los cinco más importantes implicados en salmonelosis humana (Mezal, Stefanova y Khan, 2013). Este serovar está presente en una población diversa como muestras clínicas, alimenticias y ambientales, y este a su vez posee varios genes virulentos y plásmidos que pueden contribuir al desarrollo de la enfermedad. La presencia de *S. Javiana* en babilla (*Caiman crocodilus fuscus*) constituye un riesgo y potencial fuente de contaminación especialmente para la población humana en contacto directo con estos animales, dado que en el presente estudio *S. Javiana* fue el principal serotipo aislado representando un 26.6% (4/15) de los aislamientos.

Lo anterior propone una posible relación entre las babillas en vida libre y la salmonelosis en esta región. Sin embargo, actualmente no se ha abordado el impacto de la *Salmonella* en la región del Tolima (Rodríguez, Rondón y Verjan, 2015, p.549).

En condiciones de inmunosupresión impuesta por el estrés de la manipulación en cautiverio, *Salmonella* puede ser excretada de manera intermitente (Bradley y Angulo, 2001; Ebani et al, 2005) y lograr colonizar hospederos susceptibles en una población de animales y puede llegar a producir estados patológicos caracterizados por letargia, anorexia, septicemia, neumonía, abscesos, shock hipovolémico y, bajo circunstancias extremas, la muerte de los animales (Onderka y Finlayson, 1985; Frye, 1991). Sin embargo, ninguno de los animales capturados al momento del muestreo presentaba sintomatología clínica o asociada con salmonelosis, lo cual puede ser compatible con

varias investigaciones que han establecido el estado de portador asintomático de la enterobacteria (Millán et al, 1997; Mitchell y Shane, 2000; Geue y Lóschner, 2002; Pasmans et al, 2005; Chambers y Hulse, 2006).

Las observaciones y resultados obtenidos en el presente trabajo, coinciden con lo reportado por Uhart et al, (2011), respecto al aislamiento de *S. Infantis*, que incluye un número de serotipos patógenos para los humanos, presentes en animales del género *Caiman*. Ante esto, en el presente estudio no se comprobó la relación entre el contacto con babillas vivas o el consumo de su carne con respecto a la aparición de casos de salmonelosis humana; no obstante, Manolis, Webb, Pinch, Melville y Hollis, (1991) y Madsen (1996), reportan la presencia de *Salmonella* spp. aislada de la carne de crocodilos, lo cual indica un punto muy importante para la determinación de salmonelosis asociada a reptiles de este tipo.

Chan et al (2003), reportan la presencia de *Salmonella* spp. como habitante normal de los animales en vida silvestre; sin embargo, Uhart et al (2011), establecen tanto para animales en vida libre, como en cautiverio, la presencia de enterobacterias del género *Salmonella* spp. agregando que el tipo de hábitat e higiene pobre no son, probablemente, los únicos factores que contribuyen al aumento de la presencia de estas bacterias en animales del género *Caiman*. Por tal motivo, no es posible descartar otras fuentes de *Salmonella*, incluido su origen en otras especies animales y el hombre que han permitido su dispersión en medios acuáticos.

5. CONCLUSIONES

Este estudio por primera vez logró aislar e identificar mediante cultivo microbiológico, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y serotipificación la presencia de enterobacterias del género *Salmonella* spp. en la babilla (*Caiman crocodilus fuscus*) “*In Situ*”, en la en la represa de Prado en el departamento del Tolima; estableciendo una prevalencia del 18.75% para dicha especie bacteriana.

Se documenta la identificación a nivel de serovares de los aislamientos de *Salmonella* spp., hallados en hisopados cloacales de babilla (*Caiman crocodilus fuscus*) en la represa de Hidroprado en el departamento del Tolima, lo cual constituye un registro muy valioso de los serotipos de *Salmonella* circulantes en estos animales, como también, un factor de riesgo para la población en contacto con la babilla de la región.

Los animales muestreados en este estudio son portadores asintomáticos de *Salmonella* spp., por esta razón se hace necesario implementar medidas de prevención que minimicen su potencial transmisión al humano, lo cual se puede lograr a través de una educación adecuada del personal en contacto estrecho con dichos animales.

Teniendo en cuenta la presencia de aislamientos de *Salmonella* spp., pertenecientes a los serogrupos B, Cl, D1 y N, es de vital importancia la implementación de medidas de bioseguridad que disminuyan su riesgo zoonótico, tanto por la infección producida a las personas, como también por la capacidad que tienen estos serogrupos de infectar directamente a los animales presentes en la región, pudiendo generar pérdidas económicas, como contaminación indirecta al consumo de los mismos.

RECOMENDACIONES

Es de notar que las bacterias del género *Salmonella* spp., presentes en la babilla (*Caiman Crocodylus Fuscus*), aun siendo un agente común de su microbiota habitual, bajo ciertas condiciones sanitarias puede ocasionar estados de enfermedad y riesgo vital tanto para los animales como para la población en general debido a los serotipos identificados en este estudio. Por lo cual es necesario profundizar en estos factores y generar mayores aportes investigativos que nos permitan entender con más exactitud la carga bacteriana de esta especie animal, como también el impacto medioambiental que puede ocasionar esta información.

Se recomienda informar y concientizar a la población humana en contacto estrecho con estos animales, la presencia de un número de serovares de *Salmonella* en el *Caiman crocodylus fuscus*, lo que indica el estado de portador asintomático de la bacteria y un riesgo potencial de transmisión de salmonelosis al humano.

REFERENCIAS

- Balaguera, R., (2012). Ethno-zoological relationships, habitat and population structure of *Caiman crocodilus fuscus* at Zapatosa and Costilla swamps, Cesar Department, Colombia. [in Spanish]. *Herpetotropicos* 8 (1-2): 05-12.
- Balaguera, S., Barbosa, J., Moná, Y., Farias, N., Caicedo, D., Martínez, R., y González, J. (2010). Estado poblacional de *Caiman crocodilus* en la cuenca baja y media del río Atrato, Departamento de Chocó, Colombia. *Revista Latinoamericana De Conservación*, 1. 131-132.
- Beutlich, J., Rodriguez, I., Schroeter, A., Kasbohrer, A., Helmuth, R., y Guerra, B. (2010). A Predominant Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Saintpaul Clonal Line in German Turkey and Related Food Products. *Applied And Environmental Microbiology*, 76(11), 3657-3667. doi: 10.1128/aem.02744-09
- Bocourt, F., (1876). Note sur quelques reptiles de l'Isthme de Tehuantepec (Mexique) donnés par M. Sumichrast au museum. *Journal de Zoologie*. Paris. 5 (5-6): 386-411
- Bradley, T. y Angulo, F., (2013). Reptile-Associated Salmonellosis. [Ebook] pp.1-4. Extraído de: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/reptile_associated_salmonellosis.pdf
- Caffer, M., y Terragno, R. (2001). Manual de procedimientos para la caracterización de salmonella [Ebook]. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Departamento Bacteriología Servicio Enterobacterias. Buenos Aires, Argentina. Recuperado de <https://vdocuments.site/documents/manual-de-procedimientos-para-salmonella.html>

Carriquiriborde, M., (2010). enfermedades zoonóticas asociadas a reptiles. [online] Sitio argentino de Producción Animal. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/Zoonosis/06-reptiles.pdf [acceso: 12 de Julio de 2017].

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2014). Reports of selected Salmonella Outbreak Investigations. Extraído de: <http://www.cdc.gov/salmonella/outbreaks.html>

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2013). National Enteric Disease Surveillance: Salmonella Annual Report, 2010 (pp. 2-6). Atlanta, Georgia, US.: CDC.

Chambers, D. y Hulse, A., (2006). *Salmonella* Serovars in the Herpetofauna of Indiana County, Pennsylvania. *Applied and Environmental Microbiology*. 72 (5): 3771-3773.

Chan, K., Baker, S., Kim, C., Detweiler, C., Dougan, G. y Falkow, S., (2003): Genomic Comparison of *Salmonella enterica* Serovars and *Salmonella bongori* by Use of an *S. enterica* Serovar Typhimurium DNA Microarray; *Journal of Bacteriology*; 185(2): 553-563.

Cope, E. D., (1868). On the Crocodilian Genus *Perosuchus*. *Proc. Acad. Nat. Sci. Philadelphia* 1868:203.

Corrente, M. A., Madio, K., Friedrich, G., Greco, C., Desario, S., Tagliabue, M., d'Incau, M., Campolo, y C. Buonavoglia. (2004). Isolation of *Salmonella* strains from reptile faeces and comparison of different culture media. *Journal of Applied Microbiology* 96: 709–715.

Cupul Magaña, F.G., Rubio Delgado, A., y Reyes Juárez, A. (2005). La mordida del cocodrilo americano (*Crocodylus acutus*) ¿es potencialmente séptica? Revista Biomédica, 16 (1): 65-67.

Crocodilia. (2018). Extraído de: <https://es.wikipedia.org/wiki/Crocodilia>.

Ebani, V. y Fratini, F., (2005). Bacterial zoonoses among domestic reptiles. Dipartimento di Patologia animale, Profilassi e Igiene degli Alimenti, Facolta di Medicina Veterinaria, Universidad di Pisa, Italy. Pp: 85-90.

Ebani, V.V., Cerri, D., Fratini, F., Meille, N., Valentini, P., y Andreani, E., (2005). *Salmonella* enterica isolates from faeces of domestic reptiles and a study of their antimicrobial in vitro sensitivity. Veterinary Science. 78: 117 — 121.

FAO. (2004). Uso de antimicrobianos en animales de consumo incidencia del desarrollo de resistencias en la salud pública (pp. 27 -29). Roma – Italia.

Fierro - Amature, M., Osorio - Amortegui, C., Fandiño de Rubio, L., y Rondón - Barragán, I. (2011). Resistencia Antibiótica en *Salmonella* enterica serovar Typhimurium aisladas de granjas porcícolas en el departamento del Tolima. Orinoquia, 15(1), 71.

Frye, F.L., (1991). Infectious diseases. Fungal actinomycete, bacterial, rickettsial and viral diseases. In: Biomedical and Surgical Aspects of Captive Reptile husbandry. Krieger, Melbourne, FL. p. 101 – 160.

Geue, L. y Löschner, U., (2002). *Salmonella* enterica in reptiles of German and Austrian origin. Veterinary Microbiology , 84(1-2), 79-91.

Grimont, P., Grimont, F. y Bouvet P., (2000). *Salmonella* in domestic animals. CAB International, United Kingdom. (1) 1-13

Grimont, P. y Weil, F., (2007) Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. In WHO Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*. Paris France: Institute Pasteur.

Hidalgo, J., Díaz, C., Pérez, N., De Frutos, C. y Herrero, A., (2008). *Salmonella* in free living exotic and native turtles and in pet exotic turtles from SW Spain. *Research in Veterinary Science*. 85: 449-452.

Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) 2013. Boletín epidemiológico mensual de ocurrencias de enfermedades vesiculares y otras enfermedades de declaración obligatoria en Colombia. Extraído de: <http://www.ica.gov.co/getattachment/3d1a70bb-4014-4fb7-ad88-49f8e0badc1f/Julio.aspx>.

Instituto Nacional de Salud (INS). (2018). *Fiebre tifoidea y paratifoidea. Colombia, I Semestre 2018* (pp. 4-11). INS.

Institute for international cooperation in animal biologics. (2013). Salmonellosis asociada a reptiles (pp. 1-4). Recuperado de: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/reptile_associated_salmonellosis-es.pdf

International Union for the Conservation of nature. (2009). The IUCN Red List of Threatened Species. Extraído de: <http://www.iucnredlist.org/details/46584/0>

Linnaeus, C., (1758). *Systema naturæ per regna tria naturæ, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. Tomo I. 10th Edition: 824 pp.

- Lopardo, H., Predari, S., y Vay, C. (2016). Manual de microbiología clínica de la asociación argentina de microbiología. Asociación Argentina de Microbiología. Buenos Aires, Argentina. 1st ed., pp. 184 - 186.
- Madigan, Michael T., Martinko, John, M., y Parker, J., (1997). Brock biology of microorganisms (8th ed.; international ed.). Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
- Madsen, M., (1996). Prevalence and serovar distribution of *Salmonella* in fresh and frozen meat from captive Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*). International Journal of Food Microbiology 29: 111–118.
- Manolis S. C., G. J. Webb, D. Pinch, L. Melville, y G. Hollis. (1991). *Salmonella* in captive crocodiles (*Crocodylus johnstoni* and *C. porosus*). Australian Veterinary Journal 68: 102–105.
- Martínez, E. (1996). Diseño y operación de zocriaderos abiertos de babas (*Caiman crocodilus crocodilus*) en Venezuela. Zocriaderos, 1(2), Art. 3 pp. 11-20.
- Martiny, D., Dediste, A., Anglade, C., Vlaes, L., Moens, C., Mohamed, S., y Vandenberg, O. (2016). Performance of the chromID *Salmonella* Elite chromogenic agar in comparison with CHROMagar™ *Salmonella*, Oxoid™ Brilliance™ *Salmonella* and Hektoen agars for the isolation of *Salmonella* from stool specimens. Diagnostic Microbiology And Infectious Disease, 86(2), 128-130. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2016.07.021
- Medem, F., (1955). A new subspecies of *Caiman sclerops* from Colombia. Fieldiana: Zoology 37: 339-343.
- Mendoza, M., Herrero, A. y Rodicio, R., (2009). Ingeniería evolutiva en *Salmonella*. La emergencia de plásmidos híbridos de virulencia-resistencia a antimicrobianos en

serotipos no tifoideos. *Journal Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 27(1): 37 -43.

Merino, A., Alonso, J., Ronconi, M., Hreñuk., (2004). Dotación plasmídica como marcador epidemiológico Bacteriano. Instituto de medicina Regional. Universidad Nacional del Nordeste. Chaco Argentina.

Mezal, E., Stefanova, R., y Khan, A., (2013). Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar Javiana from food, environmental and clinical samples. *International Journal Of Food Microbiology*, 164(1), 113-118. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.021

Millán, J. M., Purdie, J. L., y Melville, L. F., (1997). Public health risk of the flesh farmed crocodiles. *Revue Scientifique Technique*. 16:605-608.

Ministerio de la Protección Social. Instituto Nacional de Salud (INS). UERIA. (2011). Perfil de riesgo *Salmonella* spp. (no tifoideas) en pollo entero y en piezas (pp. 15-25). Bogotá D. C.: Ministerio de Salud y Protección Social, MINSALUD.

Mitchell, M.A. y Shane, S.M., (2001). *Salmonella* in reptiles. *Seminars in avian and exotic pet medicine*. 10 (1): 25-35

Mitchell, M.A. y Shane, S., (2000). Preliminary findings of *Salmonella* spp. in captive green iguanas, Iguana iguana, and their environment. *Proceedings of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians*, 7: Pp. 67-68.

Mizoguchi, Y., Suzuki, E., Tsuchida, H., Tsuda, T., Yamamoto, E., Nakase, K., y Doi, H. (2011). Outbreak of *Salmonella* Braenderup Infection Originating in Boxed Lunches in Japan in 2008. *Acta Med. Okayama*, 65(2), 63-69. Retrieved from http://www.lib.okayama-u.ac.jp/www/acta/pdf/65_2_63.pdf

- M. Uhart, H. Ferreyra, R. Mattiello, M. Caffer y R. Terragno, (2011), isolation of *Salmonella* spp. from yacare caiman (*Caiman yacare*) and broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) from the argentine Chaco. *Journal of Wildlife Diseases*, 47(2): 271–277
- Nógrády, N., Király, M., Davies, R., y Nagy, B. (2012). Multidrug resistant clones of *Salmonella* Infantis of broiler origin in Europe. *International Journal Of Food Microbiology*, 157(1), 108-112. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.007
- Normasapa.net. (2018). Fórmula para calcular la muestra de una población. [online] Extraído de: <http://normasapa.net/formula-muestra-poblacion/> [Accessed 22 May 2018].
- Onderka, D. K., y M. C. Finlayson. (1985). *Salmonellae* and salmonellosis in captive reptiles. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 49: 268–270.
- O'Regan, E., McCabe, E., Burgess, C., McGuinness, S., Barry, T., y Duffy, G. et al. (2008). Development of a real-time multiplex PCR assay for the detection of multiple *Salmonella* serotypes in chicken samples. *BMC Microbiology*, 8(1), 156. doi: 10.1186/1471-2180-8-156
- Pachón, D., Pulido, A., y Moreno, C. (2010). Aislamiento e identificación de microorganismos entéricos en muestras ambientales y cloacales en *Crocodylus intermedius* y testudines de la estación de biología tropical roberto franco en VillaVicencio, Colombia. *Revista De La Facultad De Medicina Veterinaria Y De Zootecnia*, 57(1), 23-34. doi: 10.15446/rfmvz
- Pachón C, D., Pulido V, A., y Moreno T, C. (2011). Aislamiento y serotipificación de *Salmonella* sp. en estanques con *Crocodylus intermedius* y testudines cautivos en Villavicencio - Colombia. *Revista MVZ Córdoba*, 16(2), 2564. doi: 10.21897/rmvz.1021

- Parra, Durango y Máttar. (2002). Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por *Salmonella*. MVZ-Córdoba, 7(2):187-200.
- Pasmans, F., Martel, A., Boyen, F., Vanderkerchove, D. y Wybo., (2005). Characterization of *Salmonella* isolates from captive lizards. Veterinary Microbiology. 110: 285 — 291.
- Popoff, M. Y. y L.E. Minor, L., (2001). Formules antigeniques des serovars des *Salmonella*. WHO collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institut Pasteur, Paris.
- Popoff, M.Y. y Le Minor, L., (1997). Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. WHO collaborating centre for reference and research on *Salmonella*. Institute Pasteur, Paris.
- Rodriguez, J., Rondón, I., y Verjan, N. (2015). Serotypes of Salmonella in Broiler Carcasses Marketed at Ibagué, Colombia. *Revista Brasileira De Ciência Avícola*, 17(4), 545-552. doi: 10.1590/1516-635x1704545-552
- Rodríguez R., (2015). Prevalencia y caracterización molecular de *Salmonella* spp, en granjas avícolas de postura comercial en el departamento del Tolima (tesis de maestría). Universidad del Tolima. Ibagué, Tolima, Colombia.
- Rodríguez, R., Fandiño, C., Donado, P., Guzmán, L., y Verjan, N. (2015). Characterization of *Salmonella* from Commercial Egg-Laying Hen Farms in a Central Region of Colombia. *Avian Diseases*, 59(1), 57-63. doi: 10.1637/10873-052714-reg
- Rahn, K., S. A. De Grandis, R. C., Clarke, R. Curtiss y C. L. Gyles, (1992). Amplification of an *invA* gene sequence of virulence genes, *invA* and *spvC* by an enrichment broth

Salmonella typhimurium by polymerase chain reaction as a culture-multiplex PCR combination assay. J. Clin. specific method of detection of *Salmonella*. Mol. Cell. Microbiol., 67: 2619- 2622. Probes., 6: 271- 279.

S. Uzzau, D.J. Brown, T. Wallis, S. Rubino, G. Leori, S. Bernard, J. Casadesus, D. J. Platt y J. E. Olsen. (2000). Review Host adapted serotypes of *Salmonella* entérica. Epidemiology Infección. Capitulo 125. Pag 229-255.

Saldarriaga O. y T. Rugeles. (2009). Genes y plásmidos de la *Salmonella* spp. asociados con virulencia. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, ISSN 0120-0690, Vol. 14, Nº. 1. Pp. 11-19.

Shanmugasamy, M., Velayutham, T., y Rajeswar, J. (2011). Inv A gene specific PCR for detection of *Salmonella* from broilers. Veterinary World, 562. doi: 10.5455/vetworld.2011.562-564

The Center for Food Security and Public Health. (2006). *Salmonellosis asociada a los reptiles*. http://www.cfsph.iastate.edu/FastFacts/spanish/salmonella_reptile_F-es.pdf.

Salyers, A. y Whitt, D., (2002). Bacterial pathogenesis: a molecular approach. 2nd ed. Washington, D.C.: ASM Press.

Sanderson, K.E. y Nair, S., (2013) Taxonomy and species concepts in the Genus *Salmonella*. In: Barrow PA, Methner U. *Salmonella* in domestic animals. 2 Edition, CAB International Publishing, Oxford, UK.

Silva, J., Mota, R., Pinheiro Júnior, J., Almeida, M., Silva, D., Ferreira, D., y Azevedo, J., (2009). Aerobic bacterial microflora of Broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) oral cavity and cloaca, originating from Parque Zoológico Arruda Câmara, Paraíba, Brazil. Brazilian Journal Of Microbiology, 40(1), 194-198.

Thorbjarnarson, J., H. Messel, F.W. King y J. P. Ross., (1992). Crocodiles: An Action Plan for Their Conservation. IUCN Gland Switzerland. pp.136.

Vadillo, S., (2002). Manual de microbiología Veterinaria. 2° Edición. Editorial McGraw Hill. Interamericana.


Velasco, A. y J. Ayarzagüena. (2010). Spectacled Caiman *crocodilus*. Status Survey and Conservation Action Plan. pp. 10-15

Woosward, D. L., Khakhria, R., y Jhonson, W. M., (1997). Human salmonellosis associated whit exotic pets. *Journal of Clinical Microbiology*. 35:2786-2790.

World Health Organization, WHO., (2010). Laboratory Protocol "Isolation of *Salmonella* spp. From Food and Animal Faeces". Extraído de: http://www.who.int/gfn/activities/CDB_poster_Sept09.pdf

World Organization for Animal Health, OIE., (2014). Terrestrial manual, Fowl Typhoid and Pullorum Disease. NB: Recuperado de: <http://www.oie.int/es/normasinternacionales/codigo-terrestre/acceso-en-linea/>.

World Health Organization, WHO., (2014). Typhoid Fever. Extraído de: http://www.who.int/topics/typhoid_fever/en/. [Consulta: 14 septiembre 2014].

	PROCEDIMIENTO DE FORMACIÓN DE USUARIOS AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	Página 1 de 3
		Código: GB-P04-F03
		Versión: 03
		Fecha Aprobación: 15 de Febrero de 2017

Los suscritos:

_____	Martín Eduardo López Cruz	con C.C N°	_____	1.110'542.820
_____	Noel Verjan García	con C.C N°	_____	93'449.118
_____	Luz Clemencia Fandiño De Rubio	con C.C N°	_____	35'464.229
_____	Nohora Cristina Mora	con C.C N°	_____	52'710.605

Manifiesto (an) la voluntad de:

Autorizar

No Autorizar **Motivo:** _____

La consulta en físico y la virtualización de **mi OBRA**, con el fin de incluirlo en el repositorio institucional de la Universidad del Tolima. Esta autorización se hace sin ánimo de lucro, con fines académicos y no implica una cesión de derechos patrimoniales de autor.


Manifestamos que se trata de una OBRA original y como de la autoría de LA OBRA y en relación a la misma, declara que la UNIVERSIDAD DEL TOLIMA, se encuentra, en todo caso, libre de todo tipo de responsabilidad, sea civil, administrativa o penal (incluido el reclamo por plagio).

Por su parte la UNIVERSIDAD DEL TOLIMA se compromete a imponer las medidas necesarias que garanticen la conservación y custodia de la obra tanto en espacios físico como virtual, ajustándose para dicho fin a las normas fijadas en el Reglamento de Propiedad Intelectual de la Universidad, en la Ley 23 de 1982 y demás normas concordantes.

La publicación de:

Trabajo de grado	<input checked="" type="checkbox"/>	Artículo	<input type="checkbox"/>	Proyecto de Investigación	<input type="checkbox"/>
Libro	<input type="checkbox"/>	Parte de libro	<input type="checkbox"/>	Documento de conferencia	<input type="checkbox"/>
Patente	<input type="checkbox"/>	Informe técnico	<input type="checkbox"/>		
Otro: (fotografía, mapa, radiografía, película, video, entre otros)					<input type="checkbox"/>

Producto de la actividad académica/científica/cultural en la Universidad del Tolima, para que, con fines académicos e investigativos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad del

 Universidad del Tolima	PROCEDIMIENTO DE FORMACIÓN DE USUARIOS AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	Página 2 de 3
		Código: GB-P04-F03
		Versión: 03
		Fecha Aprobación: 15 de Febrero de 2017

Tolima. Con todo, en mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada con arreglo al artículo 30 de la Ley 23 de 1982. En concordancia suscribo este documento en el momento mismo que hago entrega del trabajo final a la Biblioteca Rafael Parga Cortes de la Universidad del Tolima.

De conformidad con lo establecido en la Ley 23 de 1982 en los artículos 30 “...**Derechos Morales. El autor tendrá sobre su obra un derecho perpetuo, inalienable e irrenunciable**” y 37 “...**Es lícita la reproducción por cualquier medio, de una obra literaria o científica, ordenada u obtenida por el interesado en un solo ejemplar para su uso privado y sin fines de lucro**”. El artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, “**los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores**” y en su artículo 61 de la Constitución Política de Colombia.

- Identificación del documento:

Título completo: **AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE Salmonella spp., DE BABILLAS (Caiman crocodilus fuscus) EN SU HÁBITAT NATURAL (REPRESA HIDROPRADO), DEPARTAMENTO DEL TOLIMA.**

- Trabajo de grado presentado para optar al título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA.


- Proyecto de Investigación correspondiente al Programa (No diligenciar si es opción de grado “Trabajo de Grado”):

- Informe Técnico correspondiente al Programa (No diligenciar si es opción de grado “Trabajo de Grado”):

- Artículo publicado en revista:

- Capítulo publicado en libro:

- Conferencia a la que se presentó:


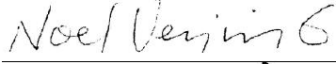

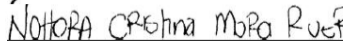
 Universidad del Tolima	PROCEDIMIENTO DE FORMACIÓN DE USUARIOS AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	Página 3 de 3
		Código: GB-P04-F03
		Versión: 03
		Fecha Aprobación: 15 de Febrero de 2017

Quienes a continuación autentican con su firma la autorización para la digitalización e inclusión en el repositorio digital de la Universidad del Tolima, el:

Día: **21** Mes: **Noviembre** Año: **2018**

Autores:

Firma

Nombre:	Martín Eduardo López Cruz		C.C.	1.110'542.820
Nombre:	Noel Verjan García		C.C.	93'449.118
Nombre:	Luz Clemencia Fandiño De Rubio		C.C.	35'464.229
Nombre:	Nohora Cristina Mora		C.C.	52'710.605

El autor y/o autores certifican que conocen las derivadas jurídicas que se generan en aplicación de los principios del derecho de autor.